Verkürzung und Optimierung des Nachweises von *Listeria monocytogenes* in Milcherzeugnissen mittels Real-Time-PCR

Matthias Völzke

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl: Prof. Dr. E. Märtlbauer)
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Verkürzung und Optimierung des Nachweises von *Listeria monocytogenes* in Milcherzeugnissen mittels Real-Time-PCR

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Matthias Völzke
aus
Brake/Unterweser

München 2007

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximillians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Referent:	Prof. Dr. Märtlbauer
Korreferent:	Prof. Dr. Klee

Tag der Promotion: 9. Februar 2007

Inhaltsverzeichnis

1	**Einleitung**	**1**
2	**Schrifttum**	**3**
2.1	**Allgemeines zur Gattung *Listeria***	**3**
2.1.1	**Kurzbeschreibung**	**3**
2.1.2	**Mikrobiologie**	**3**
2.1.3	**Taxonomie**	**4**
2.1.4	**Pathogenitätsmechanismen**	**4**
2.2	**Nachweisverfahren für Listerien in Lebensmitteln**	**5**
2.2.1	**Amtliche Untersuchungsmethoden nach § 64 LFGB**	**5**
2.2.2	**Immunologische Verfahren**	**9**
2.3	**Molekularbiologische Verfahren**	**10**
2.3.1	**Direkte DNA-Hybridisierung**	**10**
2.3.2	**Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**	**10**
2.3.2.1	**Allgemeines**	**10**
2.3.2.2	**Detektionsmethoden**	**11**
2.3.2.3	***Listeria monocytogenes* und *Listeria* spp. spezifische Zielsequenzen**	**12**
2.3.2.4	**PCR-Systeme**	**13**
2.3.2.5	**Potentielle PCR-Störfaktoren bei Analysen aus Lebensmitteln**	**18**
2.3.2.6	**Probenvorbereitung für die PCR und DNA-Extraktion**	**19**
3	**Eigene Untersuchungen**	**23**
3.1	**Materialien und Geräte**	**23**
3.1.1	**Reagenzien und Nährmedien**	**23**
3.1.2	**Verbrauchsmaterialien**	**24**
3.1.3	**Bakterienstämme und Anzuchtbedingungen**	**24**

3.1.4 Geräte 24
3.2 Methodik 25

3.2.1 Adaptierung einer TaqMan-PCR zum Nachweis von *Listeria monocytogenes* und *Listeria innocua* nach HEIN et al. (2001) 25
3.2.1.1 Methodik 25
3.2.1.2 Ergebnisse 28
3.2.1.3 Versuche zur Optimierung der TaqMan-PCR nach HEIN et al. (2001) 28
3.2.2 Erstellung neuer TaqMan-Systeme für den Nachweis von Listerien 29
3.2.2.1 Genusspezifischer Nachweis für Listerien 29
3.2.2.2 Spezifischer Nachweis von *Listeria monocytogenes* 32

3.2.3 Überprüfung der Spezifität der Listeriennachweise 33
3.2.3.1 Screening auf *Listeria*-Spezies 33
3.2.3.2 Erweiterung der erfassten Listerienspezies durch Verwendung eines interkalierenden Farbstoffes (SybrGreen®) anstelle der TaqMan-Sonden 36
3.2.3.3 Spezifischer Nachweis von *Listeria monocytogenes* 36

3.2.4 Sensitivität der TaqMan-Nachweise 38

3.2.5 Versuche zur Anwendbarkeit der TaqMan-Nachweise für die Untersuchung von Milchprodukten 39
3.2.5.1 Methodik 39
3.2.5.2 Ergebnisse 40

3.2.6 Nachweis niedriger Listerien-Konzentrationen in Milchprodukten 40
3.2.6.1 Methodik 40
3.2.6.2 Ergebnisse 41

3.2.7 Integration einer internen Positivkontrolle 43
3.2.7.1 Methodik 43

3.2.7.2 Ergebnisse 45
3.2.8 Übertragbarkeit der TaqMan-Nachweise auf andere Real-Time PCR Plattformen 45
3.2.9 Verkürzung der Nachweiszeit durch Separation der Listerien mittels paramagnetischer listerienbindender Partikel und anschließender nicht selektiver Anreicherung 46
3.2.9.1 Materialien 46
3.2.9.2 Methodik 47
3.2.9.3 Ergebnisse 49
4 Diskussion 53
4.1 Entwicklung von TaqMan PCR-Methoden für den Nachweis von *Listeria* spp. und von *Listeria monocytogenes* 53
4.2 Verkürzung der Nachweiszeit durch Kombination der TaqMan-PCR mit einer Methode zur spezifischen Separation der Listerien 57
5 Zusammenfassung 61
6 Summary 62
7 Literaturverzeichnis 63

Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	aqua destilata
a	Adenin
BHI	Brain Heart Infusion
CBD	C-terminal cell wall binding domains
c	Cytosin
dATP	Desoxy-Adenintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanindintriphosphat
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
dUTP	Desoxy-Uridintriphosphat
DIN	Deutsches Institut für Normung
DNA	Desoxyribonucleic Acid
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EN	Europanorm
g	Guanin (im Zusammenhang mit den Primersequenzen)
g	Gramm
HCl	Salzsäure
hlyA	hemolysin A
iap	invasion-associated-protein
ISO	International Organisation for Standardization
KbE	Kolonie bildende Einheiten
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LFGB	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch
Mg	Magnesium
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	Messenger-RNA
NaOH	Natriumhydroxid
nM	nanomolar

nm	Nanometer
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	ribonucleoic acid
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
spp.	species
ssp.	subspecies
Taq	*Thermus aquaticus*
t	Thymin
TSB-Y	Trypthone-Soja-Broth+Yeast
UV	Ultraviolett
U	Unit
µ	mikro
°C	Grad Celsius
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Seit der grundlegenden Arbeit über *Listeria monocytogenes* und Listerieninfektionen bei Menschen und Tieren von Gray und Killinger im Jahr 1966, ist die Bedeutung von *Listeria monocytogenes* als Ursache von Lebensmittelinfektionen zunehmend deutlicher geworden.

Während Fälle von humaner Listeriose früher eher als sporadisch anzusehen waren, nahm die Listeriose-Inzidenz, vor allem im Zusammenhang mit kontaminierten Lebensmitteln, Anfang der 80er Jahre des vorigen Jahrhunderts deutlich zu (FARBER and PETERKIN, 1991). Dies führte zum einen durch umfangreiche Untersuchungen zu einem wesentlich besseren Verständnis der Infektionswege und des Krankheitsbildes, und machte zum anderen die Bedeutung von routinemäßigen lebensmittelhygienischen Untersuchungen deutlich. Das Auftreten mehrerer größerer lebensmittelbedingter Ausbrüche in jüngerer Zeit zeigte, dass kontaminierte Lebensmittel wohl die Hauptursache für humane Listeriose-Ausbrüche sind (FARBER und PETERKIN, 1991; MCLAUGHLIN, 2004). Dabei spielen vor allem nicht oder unzureichend erhitzte Lebensmittel eine große Rolle. Hohe Kontaminationsraten für *Listeria* finden sich vor allem in rohem Geflügel (47%) und in Meeresfrüchten (32%) (BANSAL et al., 1996). Auch die verlängerte Haltbarkeit gekühlter Lebensmittel wird als Ursache vermutet (KLIMA and MONTVILLE, 1995), wobei *Listeria monocytogenes* durch die Pasteurisierungsschritte (z.B. der Milch) zwar zuverlässig abgetötet wird (STEINMEYER, 1988), aber nachfolgende, während der Verarbeitung auftretende Kontaminationen ein großes Problem darstellen. Somit können, bedingt durch die Vermehrungsfähigkeit des Bakteriums bei Kühlschranktemperaturen, auch geringe Kontaminationen eine Keimzahl erreichen, die eine Gesundheitsgefährdung darstellen. Obwohl die minimale Infektionsdosis von *Listeria monocytogenes* noch nicht bekannt ist (BEUMER and HAZELEGER, 2002), gilt als gesichert, dass Gesundheitsgefährdungen vor allem für Personen mit prädisponierenden Faktoren, insbesondere einer Immunsuppression, bestehen (GELLIN et al., 1991; NIEMAN and LORBER, 1980; MC LAUCHLIN, 1990; SCHMIDT et al., 1987). Die klinischen Erscheinungsbilder reichen von milden gastroenteralen Erkrankungen bis hin zu Septikämien, Infektionen des ZNS, Meningitiden bei Neugeborenen, Totgeburten und Aborten (FARBER und PETERKIN, 1991).

Zur Zeit erfolgt die routinemäßige Untersuchung von Lebensmitteln nach § 64 des LFGB unter Verwendung von flüssigen Selektivanreicherungsmedien, gefolgt vom Einsatz verschiedener Selektiv-Nähragarplatten, auf denen verdächtige Kolonien isoliert werden können (DIN ISO EN 11290-1). Zur Bestätigung schließen sich Untersuchungen auf Hämolyseeigenschaften und biochemische Tests an. Ein negatives Ergebnis liegt frühestens

nach fünf Tagen vor, bis zu einer Bestätigung im positiven Falle können 12 Tage vergehen. Im Hinblick auf die kurze Haltbarkeit verschiedener Produkte wurden in den letzten Jahren verschiedene, auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basierende Systeme entwickelt, mit dem Ziel die Untersuchungszeit wesentlich zu verkürzen.

Ziel dieser Arbeit war es, im Rahmen des Forschungsvorhabens AiF Nr. 13433 N, ein vollautomatisches molekularbiologisches System zum Nachweis von Listerien in Milcherzeugnissen unter Verwendung der TaqMan-PCR (5´-Nuklease-Fluoreszenztest) zu entwickeln. Die TaqMan-PCR weist gegenüber herkömmlichen PCR-Techniken einige wesentliche Vorteile auf, da die gesamte Auswertung automatisiert ist und daher keine weiteren Arbeitsschritte, wie Gelelektrophorese, Hybridisierungsreaktionen oder ELISA erforderlich sind. Auch falsch positive Signale durch Fehlamplifikate werden durch Verwendung einer Sonde vermieden, so dass sich eine zusätzliche Verifizierung positiver Ergebnisse z.B. durch Restriktionsverdau der Amplifikate, wie sie für PCR-Methoden mit elektrophoretischer Detektion der Amplifikate gefordert wird, erübrigt.

Gefördert aus Mitteln der industriellen Gemeinschaftsforschung (Bundesministerium für Wirtschaft und Arbeit/AiF) über den Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. FEI)
Projekt-Nr.: AiF-FV 13433N

2 Schrifttum

2.1 Allgemeines zur Gattung *Listeria*

2.1.1 Kurzbeschreibung

Eine erstmalige Beschreibung von *Listeria monocytogenes* findet sich bei Murray et. al 1926 (MURRAY et. al, 1926). Aufgrund der charakteristischen Monozytose bei infizierten Laborkaninchen und Meerschweinchen wurde der Erreger zuerst als *Bacterium monocytogenes* beschrieben. Von Pirie wurde er 1927 zunächst in *Listerella hepatolytica* umbenannt und erhielt von diesem 1940 mit *Listeria monocytogenes* seinen endgültigen Namen.

Der ersten Beschreibung folgend, konnte das Bakterium 1929 von Gill (GILL, 1933) auch aus infizierten Schafen und von Nyfeldt (NYFELT, 1929) aus infizierten Menschen isoliert werden (GRAY et al., 1966). Seitdem wurde auch von gelegentlichen Fällen von Listeriose, gehäuft bei Arbeitern, die in Kontakt mit erkrankten Tieren standen, berichtet. Vermehrte Ausbrüche als Folge von Lebensmittelkontaminationen wurden ab etwa 1980 beschrieben (FARBER and PETERKIN, 1991).

2.1.2 Mikrobiologie

Bei *Listeria monocytogenes* handelt es sich um gram-positive, nicht Sporen bildende, fakultativ anaerobe Stäbchen mit Wachstumsfähigkeit zwischen -0,4 und 50°C (JUTTILA et al., 1988; WALKER et al., 1987). Sie sind Katalase positiv, Oxidase negativ und weisen eine β-Hämolyse auf Schafblutagar auf. Der CAMP-Test verläuft mit *Staphylococcus aureus* positiv, mit *Rhodococcus equi* dagegen negativ. Unter dem Mikroskop zeichnet sich *Listeria monocytogenes* durch eine charakteristische taumelnde Beweglichkeit aus, die durch eine petriche Begeißelung zustande kommt. Typische Kolonien von *Listeria monocytogenes* weisen eine charakteristische blau-grüne Farbe bei der Durchleuchtung mit der Henrylampe auf (HENRY, 1933).

Das Bakterium ist weit in der Umwelt verbreitet, unter anderem im Boden, auf Pflanzen und in Wasserfilmen und wurde auch aus verschiedenen Tieren, wie Rindern, Schafen, Ziegen und Geflügel, isoliert. Häufig kontaminierte Lebensmittel sind rohes Fleisch, rohe Fleischprodukte und geräucherter Fisch, aber auch Rohmilch und verschiedene Käse, insbesondere Weich- und Rotschmierekäse, wurden als Vehikel von Ausbrüchen bekannt (MCLAUCHLIN et al.,

2004). Bei Produkten aus pasteurisierter Milch ist dabei stets von einer Rekontamination auszugehen, da die Listerien bei der Pasteurisierung zuverlässig abgetötet werden.

2.1.3 Taxonomie

In Bergey´s Manual of Determinative Bacteriology wird *Listeria monocytogenes* heute der Familie der *Corynebacteriaceae* zugeordnet (FARBER and PETERKIN, 1991).
Lange Zeit galt *Listeria monocytogenes* als einziger Vertreter der Gattung *Listeria*. Eine Unterscheidung erfolgte bis 1961 lediglich serologisch in verschiedene Agglutinationsgruppen, aufgrund unterschiedlicher O- und H-Antigene. Durch die Entdeckung biochemischer und genetischer Unterschiede erfolgte eine weitere Unterteilung der Gattung in verschiedene Spezies. Dazu zählen heute: *Listeria monocytogenes, Listeria innocua*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria grayi* ssp. *grayi* und *Listeria grayi* ssp. *murrayi* (SEELIGER, 1984; ROCOURT, 1988; JONES and SEELIGER, 1987; ROCOURT et al., 1992). Als einzige Spezies der Gattung gilt *Listeria monocytogenes* als human- und tierpathogen. *Listeria ivanovii* ist nur tierpathogen. In sehr seltenen Fällen wurde von Erkrankungen durch *Listeria ivanovii* (CUMMINS et al. 1994) und *Listeria seeligeri* (ROCOURT et al. 1987) bei Menschen berichtet, wobei diese Erkrankungen allerdings nicht im Zusammenhang mit Lebensmitteln standen.

2.1.4 Pathogenitätsmechanismen

Listeria monocytogenes gehört zu den intrazellulären Pathogenen und hat als solches zahlreiche Mechanismen entwickelt in Zellen einzudringen, sowie der körpereigenen Abwehr zu widerstehen. So zeigten Beobachtungen an Zellkulturen unter dem Videomikroskop die Biologie der Infektion. Nachdem das Bakterium von körpereigenen Zellen, hier insbesondere Makrophagen, phagozytiert worden ist, befindet es sich in Vakuolen im Zellinnern. Aus diesen kann *Listeria monocytogenes* wieder in das Zytoplasma entkommen, wo es sich stark vermehrt und sich aufgrund der Ausbildung von Actinfilamenten, sowie actinbindenden Proteinen fortbewegen kann. Grundsätzlich sind vier Schritte der Zellbiologie einer *Listeria monocytogenes*-Infektion zu unterscheiden (PORTNOY et al., 1992): Aufnahme des Bakteriums in die Zelle, Entkommen aus der Vakuole, Ausbildung von Actinfilamenten und die Ausbreitung von Zelle zu Zelle. An jedem dieser Schritte sind bestimmte, auf einem Cluster eng benachbart liegende Gensequenzen beteiligt. Das *hly*-Gen ist wohl die am besten

untersuchte Determinante der Pathogenese von *Listeria monocytogenes*. Es kodiert das 58 kDa Protein Listeriolysin O, das zur Gruppe der sulfhydryl-aktivierten Cytolysine gehört. Es vermittelt die Lyse der Vakuole, in die das Bakterium aufgenommen wurde. Flankierend dazu und für die Pathogenese ebenfalls bedeutend, liegen zwei Operons, strangabwärts einmal das Lecithinase-Operon mit den Genen *mpl*, *actA* und *plcB*, sowie strangaufwärts das *plcA*-*prfA*-Operon. *PrfA* ist ein positiver Regulator für wenigstens vier Gene, *plcA* kodiert eine phosphatidylinositol-spezifische Phospolipase C, *mpl* eine Metalloprotease, die vermutlich die Lecithinase proteolytisch aktiviert, *actA* kodiert ein Oberflächenprotein, welches für die Actinbildung wichtig ist und *plcB* kodiert die Lecithinase selbst (PORTNOY et al., 1992) (**Abb. 1**). Ein weiterer Pathogenitätsfaktor, der allerdings allen *Listeria*-Spezies gemein ist, ist das *iap*-Gen (invasion-associated protein). Es kodiert das p60-Protein, welches eng mit der Fähigkeit zum Eindringen in normalerweise nicht-phagozytierende Zellen assoziiert ist.

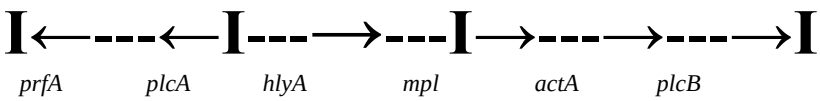

Abb. 1: *Listeria monocytogenes* Listeriolysin-Gen (hly) und seine zwei flankierenden Operons (nach PORTNOY et al. 1992)

2.2 Nachweisverfahren für Listerien in Lebensmitteln

2.2.1 Amtliche Untersuchungsmethoden nach § 64 LFGB

Die amtliche Methode zur Detektion und Isolierung von Listerien in Lebensmitteln und Umweltproben nach § 64 LFGB entspricht der Methode DIN EN ISO 11290-1 und beruht auf einer selektiven Voranreicherung, gefolgt von einer selektiven Unteranreicherung des Probenmaterials in flüssigen Nährmedien und dem anschließenden Einsatz verschiedener fester Selektiv-Nährmedien zur Isolation verdächtiger Kolonien (Abb. 2). Die verwendeten Selektivsubstanzen in den flüssigen Anreicherungsmedien sind Acriflavin, Nalidixinsäure und Cyclohexamid. In der selektiven Voranreicherung sind diese Zusätze in geringeren Konzentrationen enthalten, um die Wiederbelebung eventuell geschädigter Zellen zu unterstützen. Der Farbstoff Acriflavin unterdrückt das Wachstum der Begleitflora. Nalidixinsäure hemmt als Antibiotikum die DNA-Synthese von Zellen und wird zahlreichen Selektivmedien, meist in Kombination mit Cyclohexamid, zur Hemmung des Wachstums

gramnegativer Mikroorganismen zugesetzt. Cyclohexamid hemmt die Proteinsynthese eukaryotischer Zellen, indem es an 80s ribosomale RNA bindet und so das Wachstum von Hefen und Schimmelpilzen verhindert (BEUMER and HAZELEGER, 2002). Sowohl Acriflavin, als auch Cyclohexamid haben so gut wie keinen Effekt auf das Wachstum von Listerien in Anreicherungsmedien. Dadurch werden die Wachstumsbedingungen für *Listeria monocytogenes* verbessert. Das nach DIN EN ISO 11290-1 verwendete flüssige Selektivnährmedium enthält neben Aesculin, Acriflavin, Nalidixinsäure und Lithiumchlorid, die Indikatorsubstanz Ammoniumeisen(III)-Citrat. Durch die Fähigkeit der *Listeria* spp. zur Aesculinhydrolyse kommt es zur Bildung von 6,7-Dihydroxycumarin, welches mit Eisenionen ein schwarzes Präzipitat bildet. Selektivnährböden zum Nachweis von *Listeria monocytogenes* aus der Anreicherung enthalten unter anderem die Selektivsubstanzen Lithiumchlorid, Aesculin Nalidixinsäure und Cyclohexamid, sowie, bei den in den letzten Jahren entwickelten chromogenen Medien, bestimmte Substrate, die die Unterscheidung von *Listeria monocytogenes* zu anderen *Listeria* spp. ermöglichen. Hier wird die Fähigkeit von *Listeria monocytogenes* zur Produktion einer phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C, die ein zugesetztes, spezielles Substrat hydrolysiert und so zur Bildung eines opaken Hofes führt, ausgenutzt (BEUMER and HAZELEGER, 2002).

Eine schematische Darstellung von DIN EN ISO 11290-1 zeigt **Abb. 2** und eine Übersicht über die Differenzierung der verschiedenen *Listeria* spp. ist der **Tab. 1** zu entnehmen.

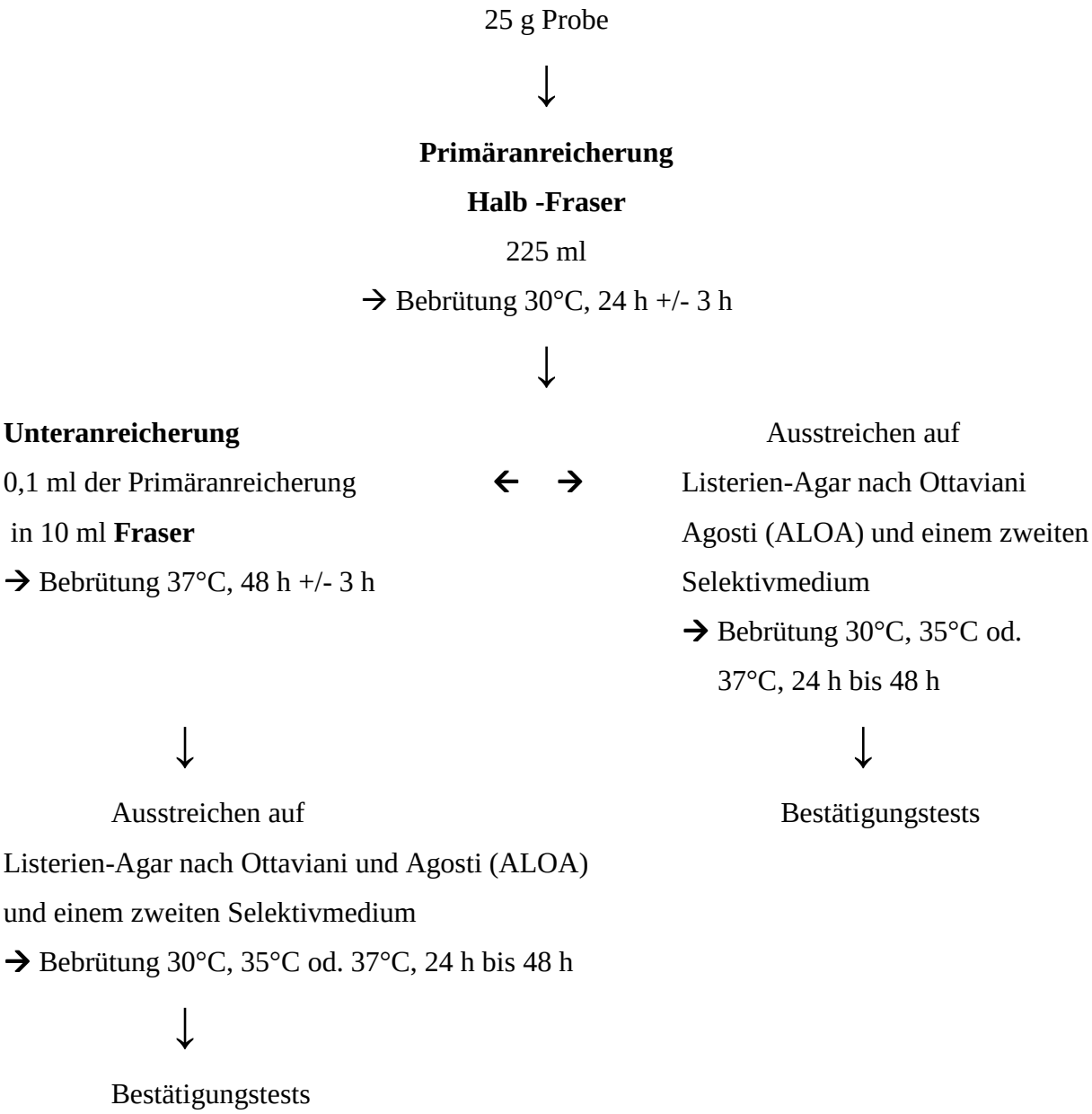

Abb. 2: Schematische Darstellung zum Nachweis von *Listeria monocytogenes* in Milchprodukten nach DIN EN ISO 11290-1:

Tab. 1: Reaktionen zur Differenzierung von *Listeria* spp. (nach Amtl. Sammlung § 64 LFGB)

Spezies	Hämolyse	Säureproduktion		CAMP-Test	
		Rhamnose	Xylose	*S. aureus*	*R. equi*
L. monocytogenes	+	+	-	+	-
L. innocua	-	V	-	-	-
L. ivanovii	+	-	+	-	+
L. seeligeri	(+)	-	+	(+)	-
L. welshimeri	-	V	+	-	-
L. grayi* ssp. *grayi	-	-	-	-	-
L. murrayi* ssp. *murrayi	-	V	-	-	-

V unterschiedliche Reaktion; (+) schwache Reaktion; + Reaktion in mehr als 90 % der Fälle; - keine Reaktion; *S. aureus = Staphylococcus aureus* ; *R. equi = Rhodococcus equi* ; *L. = Listeria*

2.2.2 Immunologische Verfahren

Da die immunologischen Verfahren nicht im direkten Zusammenhang mit dieser Arbeit stehen, sollen hier nur die Prinzipien kurz beschrieben und auf eine ausführliche Beschreibung verzichtet werden.

Diese Verfahren beruhen auf Antigen-Antikörper-Reaktionen mit Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes. Als Markersubstanzen werden radioaktive Isotope, Enzyme, Hemmstoffe von Enzymen, fluorogene Substrate, Fluoreszenzfarbstoffe oder metallische Ionen verwendet, wobei sich Antigen-Antikörper-Reaktionen mit enzymmarkierten Reagenzien (Enzymimmunoassay-EIA, Enzyme Linked Immunosorbent Assay-ELISA) als wesentlich sensitiver erwiesen haben. *Listeria*-spezifische Antikörper reagieren beispielsweise mit Zelloberflächen-Proteinen, Stoffwechselprodukten oder Virulenzfaktoren spezifisch und ermöglichen so einen Nachweis von *Listeria monocytogenes* oder der Gattung *Listeria*. Entsprechende Nachweissysteme wurden z.B. in Form von indirektem ELISA, Sandwich-ELISA, indirektem Immunfluoreszenztest, Radioimmunoassay oder Latex-Agglutinationstests entwickelt und sind mittlerweile als kommerzielle Test-Kits erhältlich, die entweder spezifisch die Gattung *Listeria* (z.B. Pathalert *Listeria*, Merck; VIDAS *Listeria*, bio merieux; VIP *Listeria*, Biocontrol) oder *Listeria monocytogenes* (z.B. Pathalert *Listeria monocytogenes*, Merck; VIDAS *Listeria monocytogenes*, bio merieux) erfassen. Da die Nachweisgrenze der meisten Testsysteme oberhalb einer Keimzahl von 10^5 KbE/ml liegt, ist ein vorgeschaltetes in der Regel zweistufiges Anreicherungsverfahren unumgänglich, um entsprechende Kontaminationen in den Proben nachweisen zu können.

2.3 Molekularbiologische Verfahren

2.3.1 Direkte DNA-Hybridisierung

Mit der direkten DNA-Hybridisierung wird die Eigenschaft von DNA-Molekülen ausgenutzt mit komplementären Nukleotidsequenzen über Wasserstoffbrückenbindungen spezifische und stabile Bindungen zu bilden. Dabei wird die doppelsträngige DNA zunächst durch Hitze-, Säure- oder Alkalibehandlung denaturiert, so dass die DNA in Einzelsträngen vorliegt. Durch spezifische enzym-, fluoreszenz- oder radioaktivmarkierte Oligonukleotide oder einzelsträngige DNA-Fragmente von 15 bis 1000 Basen Länge, die als Gensonden fungieren, erfolgt dann eine Hybridisierung mit der komplementären Sequenz der denaturierten DNA (DATTA et al., 1990; WAGNER et al., 1998). Durch Auswahl geeigneter Zielsequenzen, wie zum Beispiel dem *hly*-Gen, kann eine spezifische Detektion erfolgen.
Nach SCHEU et al. (1998) sind für den Nachweis allerdings relativ hohe *Listeria monocytogenes*-Keimzahlen von 10^5 bis 10^6 KbE/ml erforderlich. Gut bewährt haben sich die kommerziell erhältlichen Testkits der Firmen Gene-Trak und bioMerieux (AccuProbe) dagegen für die Identifizierung verdächtiger Kolonien bei kulturellen Nachweisen (BECKER et al., 1998)

2.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

2.3.2.1 Allgemeines

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) steht ein relativ wenig zeitaufwendiges Verfahren zur Untersuchung von Lebensmitteln auf Anwesenheit von Mikroorganismen zur Verfügung. Es beruht auf der in vitro Amplifikation bestimmter Abschnitte des bakteriellen Genoms, wobei, im Gegensatz zu den kulturellen Nachweismethoden, auch lebende nichtkultivierbare Zellen nachgewiesen werden können (CANDRIAN, 1995). Dazu werden ein Primerpaar, jeweils komplementär zu den bekannten, flankierenden DNA-Abschnitten der Zielsequenz, die vier Desoxyribonucleosidtriphosphate (dGTP, dATP, dCTP und dTTP bzw. dUTP), sowie eine hitzestabile DNA-Polymerase benötigt. Mit dem vorher aufgereinigtem Probenmaterial als Matrize wird die PCR in einem Thermocycler durchgeführt. Hierbei wird der Reaktionsansatz genau festgelegten, zyklischen Temperaturveränderungen ausgesetzt, in denen die DNA-Doppelstränge denaturiert werden, die Primer mit dem komplementären DNA-Abschnitt hybridisieren und die Polymerase vom 3´-Ende ausgehend einen komplementären DNA-Strang synthetisiert. Eine Rehybridisierung des ursprünglichen DNA-

Doppelstranges wird durch den Zusatz der Primer in großem Überschuss verhindert. Diese drei Schritte, Strangtrennung, Hybridisierung der Primer und DNA-Synthese, müssen mehrmals nacheinander (25-50-mal) wiederholt werden, wobei die neu gebildeten DNA-Stränge wieder als Matrize dienen. So erreicht man nach mehreren Zyklen eine annähernd exponentielle Vermehrung der Zielsequenz (STRYER, 1995). Es wird nur eine annähernd exponentielle Vermehrung der Zielsequenz erreicht, da die Bedingungen für eine exponentielle Amplifizierung des Zielproduktes sowohl am Anfang wie auch am Ende der Reaktion nicht optimal sind und so nur eine 70-80%ige Effizienz der PCR erreicht wird. Eine typische PCR-Reaktion verläuft demzufolge in den ersten Zyklen, bei denen die Matrizenmenge noch sehr gering ist, linear, steigt anschließend exponentiell an und erreicht in der letzten Phase der Reaktion ein Plateau, da die Enzymaktivität nach einer bestimmten Zeit nachlässt und auch die amplifizierten DNA-Abschnitte teilweise nicht mehr mit den Oligonukleotid-Primern, sondern untereinander hybridisieren. Zur Detektion des so gewonnen Amplikons werden schließlich Techniken wie Gelelektrophorese oder DNA-Hybridisierung angewendet.

2.3.2.2 Detektionsmethoden

Die am weitesten verbreitete Methode zur Detektion der Amplifikationsprodukte ist die Auftrennung mittels Elektrophorese auf Agarosegelen mit Anfärbung durch Ethidiumbromid und anschließender Auswertung unter UV-Licht. Durch Mitführen eines DNA-Längenstandards (DNA-Leiter) kann die Länge der Amplikons ermittelt und mit dem gesuchten Fragment verglichen werden. Ethidiumbromid ist ein interkalierender Farbstoff, der mit UV-Licht einer Wellenlänge 256-366 nm angeregt werden kann und in einem sichtbaren Bereich bei 590 nm orangerot fluoresziert. Dies macht man sich bei der Auswertung mittels UV-Transluminator und computergestützter bildgebender Verfahren zunutze (BESSESEN et al., 1990; FLUIT et al., 1993; COORAY et al., 1994).
Daneben werden Hybridisierungsanalysen der PCR-Produkte durchgeführt. Dazu werden die Amplifikate auf Membranen übertragen (BESSESEN et al., 1990; BSAT & BATT, 1993; FLUIT et al., 1993), wo sie mit spezifischen einzelsträngigen Gensonden hybridisieren und so detektiert werden können. Markiert werden die Sonden mit verschiedenen Substanzen, wie radioaktiven Isotopen (z.B. ^{32}P), Fluoreszenzfarbstoffen, Digoxigenin, Biotin, Meerrettichperoxidase, alkalischer Phosphatase oder Acridinestern. Je nach Art der

Markierung erfolgt die Detektion dann mittels Radiographie, Kolorimetrie oder Chemiluminiszenz.

BLAIS und PHILLIPE, 1993 setzten eine für das *hlyA*-Gen von *Listeria monocytogenes* spezifische RNA-Sonde ein und detektierten die RNA-DNA Hybriden mit einem Anti-RNA-DNA-Hybrid-Antikörper in einem Enzymimmuno-Assay. Vorteile der Methode sind nach Angabe der Autoren, die erhöhte Stabilität der RNA-DNA-Hybriden im Vergleich zu den DNA-DNA-Hybriden, sowie eine bessere Spezifität, da die Anti-RNA-DNA-Antikörper nicht mit unspezifisch gebundener RNA reagieren. Die Untersuchungen zeigten außerdem, dass dieses System deutlich sensitiver war, als die konventionelle Agarosegel-Elektrophorese.

Während bei den bisher beschriebenen Detektionsmethoden nach der eigentlichen PCR-Reaktion der Nachweis der Produkte immer noch weitere Arbeitsschritte, wie das Auftragen auf Gele oder Membranen, Anfärbung oder Markierung mit gelabelten Sonden erfordert, so entfallen, aufgrund der Verwendung von fluoreszenzfarbstoffmarkierten Sonden im PCR-Ansatz, bei der Real-Time PCR weitere Behandlungen der PCR-Produkte. Die kontinuierliche Zunahme der Amplifikationsprodukte wird während der gesamten PCR durch Messung der Emission der Fluorophore detektiert (BASSLER et al. 1995; NORTON & BATT, 1999; NOGVA et al. 2000; HEIN et al., 2001).

2.3.2.3 *Listeria monocytogenes* und *Listeria* spp. spezifische Zielsequenzen

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Primer für den spezifischen Nachweis von *Listeria monocytogenes* beziehungsweise auch den kombinierten Nachweis mit *Listeria innocua* als Indikatorkeim entwickelt. Die Basis für die Auswahl der Primer stellen vornehmlich Gene dar, die für verschiedene Virulenzfaktoren kodieren (siehe auch **2.1.4**). Dabei wurden mittlerweile, vor allem für Real-Time PCR Anwendungen, die meisten Primer, je nach Zielstellung der Untersuchung, auf der Grundlage verschiedener Abschnitte des *hly*- oder des *iap*-Gens entwickelt. So lässt sich auf der Basis der *iap*-Gensequenzen, mittels entsprechender Primer und PCR, eine Identifikation entweder des Genus *Listeria* im Allgemeinen, Gruppen verwandter *Listeria* spp., oder aber ein spezifischer Nachweis von *Listeria monocytogenes* durchführen (BUBERT et al., 1992).

Das *hly*-Gen kommt, anders als das *iap*-Gen, außer bei *Listeria monocytogenes* nur noch bei *Listeria ivanovii* und *Listeria seeligeri* vor, so dass durch die Auswahl entsprechender Abschnitte mit möglichst wenig Homologie zu den Listeriolysin-Genen dieser beiden *Listeria* spp. ein spezifischer Nachweis für *Listeria monocytogenes* erreicht wird.

2.3.2.4 PCR-Systeme

Ausgehend von dem Ansatz die Nachweiszeit für *Listeria monocytogenes* in Lebensmitteln zu verkürzen, wurden verschiedene Variationen der PCR-Methode beschrieben, die die Sensitivität und Spezifität steigern sollen, oder auch eine Quantifizierung der Listerien ermöglichen.

In der „nested-PCR“ werden zwei Primerpaare in normalerweise zwei aufeinanderfolgenden PCR´s eingesetzt. Das zweite Primerpaar hybridisiert in einer zweiten PCR innerhalb des in der ersten PCR amplifizierten Produktes und erhöht so sowohl wesentlich die Spezifität, indem unspezifische Produkte der ersten PCR unberücksichtigt bleiben als auch die Sensitivität, da sehr geringe Mengen der Amplifikationsprodukte aus der ersten PCR durch die zweite PCR auf nachweisbare Mengen vervielfältigt werden können (LEVIN, 2003). BSAT & BATT (1993) kombinierten einen „nested-PCR assay“ mit einem „dot-blot assay“ und waren so in der Lage aus unaufbereiteten Zell-Lysaten 2-25 KbE von *Listeria monocytogenes* pro PCR nachzuweisen. Eine Modifikation dieser PCR-Methode stellt die sogenannte „seminested-PCR“ dar, in der nur ein Primer für die zweite PCR innerhalb der amplifizierten Sequenz liegt und der andere Primer aus der ersten PCR stammt. Aufgrund der hohen Kontaminationsgefahr durch PCR-Produkte aus der ersten PCR, ist die „nested-PCR“ jedoch gerade für Routineuntersuchungen nur bedingt geeignet.

Die „Multiplex-PCR“ verwendet zwei (FURRER et al., 1991) oder mehr Primerpaare (COORAY et al., 1994) in einer PCR. Dies ermöglicht, je nach Auswahl der Primer, zum einen die Detektion verschiedener Serovare, die durch ein Primerpaar eventuell nicht nachgewiesen würden, das Screening mehrerer *Listeria* spp. in einem PCR-Ansatz oder den simultanen Nachweis von *Listeria monocytogenes* mit weiteren Pathogenen wie Salmonellen und Shigatoxin bildenden *Escherichia coli* (BHAGWAT A., 2003). FURRER et al. (1991) ermittelten für ihren „Multiplex-PCR-Assay“ in Reinkulturen eine Nachweisgrenze von 10 Zellen, sowie für den Direktnachweis aus Milch 10 Zellen von *Listeria* monocytogenes pro 10 ml, während COORAY et al. (1994) in einer Multiplex-PCR mit drei Primerpaaren ein Nachweis erst ab $4x10^3$ KbE/ml Milch gelang.

Ein PCR-Assay, der die Unterscheidung zwischen lebensfähigen und nicht lebensfähigen Zellen ermöglicht, ist die reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR). Hierbei wird die Fähigkeit der reversen Transkriptase ausgenutzt, mit Hilfe entsprechender Oligonukleotidprimer zur mRNA komplementäre DNA-Stränge zu bilden, die dann wiederum als Matrize für die DNA-Polymerase dienen. Da die mRNA nur in lebensfähigen Zellen vorkommt, sieht man hierin

einen Ansatz falsch-positiven Ergebnissen durch Amplifikation aus nicht lebensfähigen Zellen freigesetzter DNA zu begegnen. NORTON & BATT (1999) setzten die RT-PCR in einem modifiziertem 5´-Nuklease Assay (siehe unten) ein und konnten einen deutlichen Zusammenhang zwischen Fluoreszenzentwicklung und Anzahl lebender *Listeria monocytogenes*-Zellen feststellen. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit der mRNA und der dadurch erforderlichen schnellen RNA-Aufbereitung sollen die RT-PCR Methoden häufig weniger sensitiv sein als PCR-Methoden, die auf einem DNA-Nachweis beruhen (SCHEU et al., 1998). Inzwischen stehen jedoch auch für die Isolierung von RNA zuverlässige Methoden zur Verfügung.

Die Real-Time PCR ermöglicht auch eine Quantifizierung der Ziel-DNA. Hierbei wird die Entstehung der PCR-Produkte während der Amplifikation durch Messung der Fluoreszenz verfolgt. Die Quantifizierung basiert meist auf der Berechnung eines Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem sogenannten Threshold Cycle oder C_T-Wert. Der C_T-Wert ist als jener PCR-Zyklus definiert, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Die Quantifizierung der DNA-Menge beruht dabei nicht auf der absoluten Menge an PCR-Produkt, sondern auf der Kinetik der PCR-Reaktion. Dafür verwendet man als Bezugspunkt den C_T-Wert, da zu diesem Zeitpunkt die Amplifikation exponentiell verläuft und es in dieser Phase der PCR-Reaktion keine limitierenden Faktoren, wie Primer- oder Nukleotidmangel, nachlassende Enzymaktivität oder Inhibition der Reaktion durch PCR- Produkte gibt.

Die einfachste Real-Time Methode beruht auf der Zugabe des interkalierenden Farbstoffes SybrGreen®. Dieser lagert sich unspezifisch in Doppelstrang-DNA ein, wodurch es mit fortschreitender Bildung von PCR-Produkten zu einem Fluoreszenzanstieg kommt. Wegen der Unspezifität des Fluorophors ist allerdings eine Unterscheidung zwischen korrektem Produkt und Artefakt oder Primerdimeren, die während der PCR-Reaktion auch einen Fluoreszenzanstieg verursachen können, nicht möglich. Diese Differenzierung wird erst durch eine, im Anschluss an die PCR durchgeführte, Schmelzkurvenanalyse ermöglicht. Durch schrittweisen Temperaturanstieg kommt es zu einer Denaturierung der DNA-Doppelstränge entsprechend ihrer jeweiligen Schmelzpunkte in ihre Einzelstränge. Die daraus resultierende Fluoreszenzabnahme wird aufgezeichnet. Anhand der Schmelztemperaturen kann man so zwischen spezifischen Produkten und Primerdimeren unterscheiden, da Primerdimere bei niedrigeren Temperaturen denaturieren als die größeren PCR-Produkte. Mutationen der Zielsequenz können jedoch ebenfalls abweichende Schmelztemperaturen aufweisen.

Eine Verbesserung der Spezifität kann durch das Design von spezifischen Hybridisierungssonden erreicht werden. NOGVA et al. (2000) detektierten in ihrem auf dem Listeriolysin O-Gen von *Listeria monocytogenes* basierenden 5´-Nuklease Assay spezifisch alle 65 untersuchten *Listeria monocytogenes* Isolate. Alle anderen untersuchten *Listeria* spp. und Spezies anderer Bakterien-Genera ergaben kein positives Signal. BASSLER et al. (1995) erzielten bei ihren Untersuchungen vergleichbare Ergebnisse. Der Taq-Man- oder auch 5´-Nuklease-Fluoreszenztest basiert auf der Hydrolyse einer internen fluoreszenzfarbstoffmarkierten Sonde. Hierbei wird die endogene 5´→3´ Nukleaseaktivität der *Taq*-DNA-Polymerase ausgenutzt, eine Sonde, die mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen markiert ist und während der PCR innerhalb des Amplikons hybridisiert, während des Fortschreitens der Strangsynthese wieder von der Matrize zu verdrängen und hydrolytisch abzuspalten. Der Reporterfarbstoff (z.B. 6-Carboxyfluoreszein [FAM], Tetrachloro-6-Carboxyfluoreszein oder Hexachloro-6-Carboxyfluoreszein) ist kovalent an das 5´-Ende der Sonde gebunden und der Quencherfarbstoff (z.B. 6-Carboxytetramethylrhodamine [TAMRA]) zwei oder mehr Basen strangabwärts des Reporterfarbstoffes. Solange die Sonde intakt ist, interagieren die beiden Farbstoffe so, dass der Quencher die Fluoreszenzenergie des Reporters absorbiert und so die Emission des Reporterfarbstoffes gehemmt wird. Wird während der Amplifikation die Sonde hydrolysiert, erfolgt eine Zunahme der Fluoreszenzintensität des Reporters, die messbar wird und nach jedem Zyklus gemessen wird. Diese Intensitätsänderung der Fluoreszenz steht in Zusammenhang mit der Menge des PCR-Produktes und, unter geeigneten Bedingungen, auch mit der Menge der Matrize. Eine Weiterentwicklung der TaqMan-Sonden sind die Molecular Beacons (WILFINGSEDER & STOIBER. 2002). Hierbei handelt es sich ebenfalls um spezifische Hybridisierungssonden, die aber eine Haarnadelstruktur mit eigenkomplementären Enden aufweisen, so dass Reporterfarbstoff und Quencher direkt benachbart liegen. Ein Problem bei den TaqMan-Sonden ist, dass sie unter Umständen ungünstige Strukturen bilden können, so dass der Abstand zwischen Reporter und Quencher zu groß wird und somit die Fluoreszenzemission des Reporterfarbstoffes nicht mehr vollständig unterdrückt werden kann. Die Haarnadelstruktur der Molecular Beacons dagegen ist so lange stabil, bis die Probe an der spezifischen Zielsequenz hybridisiert. Dies führt dann zu einer Konformationsänderung und damit auch zur Fluoreszenzemission des Reporters, die wiederum nach jedem Zyklus über das optische System des Real-Time PCR-Gerätes detektiert wird.

In Tabelle 2 findet sich eine Zusammenstellung von Real-Time PCR-Systemen zum Nachweis von *Listeria monocytogenes*.

Tab. 2: Real-Time-PCR-Systeme für den Nachweis von *Listeria monocytogenes*

Probenmaterial	**Zielsequenz**	**Nachweissystem**	**Sensitivität/ Ergebnis**	**Referenz**
Reinkulturen	Listeriolysin O-Gen	5´-Nuklease Assay; post PCR Detektion der Fluoreszenz im Lumineszenz-Spektrophotometer	50 KbE/ml	BASSLER et al. (1995)
Reinkulturen	Listeriolysin O-Gen	reverse Transcriptase-5´ Nuclease Assay	Versuche zur Differenzierung zw. toten u. lebenden Zellen	NORTON & BATT (1999)
Reinkulturen Wasser Magermilch Rohmilch	Listeriolysin O-Gen	TaqMan	6-60 KbE/PCR 60 KbE/PCR $6\text{-}6x10^3$ KbE/PCR (abhängig v. d. Extraktion)	NOGVA et al. (2000)
Reinkulturen Milch	*iap*-Gen	TaqMan-PCR	6 Kopien/Reaktion bzw. ca. $3x10^6$ Kopien/Reaktion in Milch	Hein et al. (2001)
verschiedenes Frischgemüse	ohne Angabe	BAX-PCR®-Kit modifiziert für Multiplex-PCR; Sybr Green mit Schmelzkurvenanalyse	10^2-10^3 KbE/ml	BHAGWAT (2003)
Fleischprodukte	Listeriolysin O-Gen	Filtration, Chelex-100 DNA-Aufreinigung, Real-Time PCR	100 KbE/g	RODRIGUEZ-LAZARO et al. (2004)

Tab. 2 Fortsetzung: Real-Time-PCR-Systeme für den Nachweis von *Listeria monocytogenes*

Probenmaterial	**Zielsequenz**	**Nachweissystem**	**Sensitivität/ Ergebnis**	**Referenz**
Reinkulturen	Listeriolysin O-Gen	Microchip mit automatischer DNA-Aufreinigung und Real-Time PCR (SYBRGreen)	10^4-10^7 Keime	CADY et al. (2004)
Reinkulturen	Listeriolysin O-Gen *iap*-Gen	AmpliFluor Real-Time PCR	30 KbE/ml	RODRIGUEZ-LAZARO et al. (2004)
Mischkulturen von *L. monocytogenes* u. *Listeria* spp	23S rDNA Listeriolysin O-Gen	Duplex Real-Time PCR-Assay (TaqMan) zum kombinierten Nachweis	Differenzierung von *Listeria* spp. u. *L. monocytogenes* in Mischkulturen erfolgreich	RODRIGUEZ-LAZARO et al. (2004)
Schnittkäse	Listeriolysin O-Gen	Differenzierung lebender u. toter Zellen: über Ethidiummonoazid-Bromid; Real-Time PCR	10-100 KbE/g	RUDI et al. (2005)

2.3.2.5 Potentielle PCR-Störfaktoren bei Analysen aus Lebensmitteln

Verschiedene Faktoren können die PCR so beeinflussen, dass falsch positive oder falsch negative Ergebnisse entstehen. Falsch negative Ergebnisse können durch die Anwesenheit von Substanzen, die mit dem für die Aktivität der Polymerase wichtigen Mg^{2+} einen Komplex bilden, vorkommen. Auch ein Abbau der Zielsequenzen und Primer durch Nukleasen (RNase, DNase) oder eine direkte Hemmung der DNA-Polymerase sind möglich (SCHEU et al., 1998). Weiterhin kann der Verlust von Ziel-DNA durch die DNA-Extraktion (BHADURI & COTTRELL, 2001) zu fehlerhaften PCR-Ergebnissen führen. Allein die verschiedenen Komponenten der Probenmatrix und die Vielfalt der Lebensmittel stellen ein wesentliches Problem dar. ROSSEN et al. (1992) zeigten beispielsweise eine vollständige Inhibition der PCR durch Weichkäse, die erst durch eine Extraktion mit heißem NaOH/SDS signifikant reduziert werden konnte. Weitere Substanzen mit negativem Einfluss auf die PCR sind Caseinbestandteile, die während der PCR koagulieren, Calciumionen (SCHEU et al., 1998), Nukleinsäuren von Bakterien der Begleitflora oder von Matrixbestandteilen (GOLDSTEYN et al., 1991), Proteinasen (Trypsin) in Frischmilch (POWELL et al., 1994), Glykogen und Fette (WILSON, 1997) sowie Komponenten von Selektivanreicherungsmedien, wie Eisenammoniumcitrat, Aesculin oder Acriflavin (SCHEU et al. 1998). BASSLER et al. (1995) stellten in ihrem Real-Time PCR-Assay eine Überlagerung des Emissionsspektrums von FAM durch Acriflavin bei einer Wellenlänge von 518 nm fest. Bei den Selektivsubstanzen Cycloheximid und Nalidixinsäure trat dieser Effekt nicht auf. Ein ähnliches Ergebnis erhielten FLUIT et al. (1993) bei Zusatz von Frasermedium zum PCR-Ansatz. Diese Arbeitsgruppe konnte ebenfalls eine Hemmung der *Taq*-Polymerase durch Matrixbestandteile, Komponenten der Anreicherungsmedien oder große Mengen an DNA feststellen, was zu falschnegativen Ergebnissen führte. Obwohl zahlreiche Substanzen als verantwortlich für die Beeinflussung der PCR identifiziert worden sind, bleiben die spezifischen Wirkungsprinzipien zum Teil noch hypothetisch (LI & MUSTAPHA, 2002). Mögliche Erklärungen bestehen in der Hemmung der Zellyse beziehungsweise der Zerstörung oder Bindung der Nukleinsäuren. Um falsch negative Ergebnisse durch Inhibition der PCR ausschließen zu können, werden daher zunehmend interne Positivkontrollen in die PCR-Methoden integriert (BANSAL et al., 1996; RODRIGUEZ-LÁZARO et al., 2005)

Insgesamt ist der direkte Nachweis von *Listeria monocytogenes*, zum einen wegen der oben angesprochenen Störfaktoren und zum anderen durch die im Vergleich zur Begleitflora relativ niedrigen Keimzahlen und der ungleichmäßigen Verteilung in der Matrix, schwierig

(GOLDSTEYN et al., 1991). Diese Probleme werden durch Einschaltung von Anreicherungsschritten, Aufreinigung auf Silicasäulchen (SIMON et al., 1996; ROSSEN et al., 1992) oder dem Einsatz von an paramagnetische Beads gebundenen, spezifischen Antikörpern versucht auszuschalten. Durch selektive Anreicherungsschritte werden sowohl die inhibitorischen Komponenten der Proben verdünnt als auch die Zielorganismen auf detektierbare Mengen vermehrt.

Ein immer wieder diskutierter Nachteil der PCR sind falsch positive Ergebnisse durch nicht lebensfähige Zellen. So erhielten ALLMANN et al. (1995) noch fünf Wochen nach Zugabe hitzeabgetöteter *Campylobacter jejuni* zu Rohmilch ein positives PCR-Ergebnis, ohne Abschwächung des Signals. Besonders Versuche zum direkten PCR-Nachweis aus pasteurisierten Milchprodukten ergaben falsch positive Ergebnisse durch Amplifikation von DNA aus nicht lebensfähigen Zellen (SCHEU et al., 1998). Zur Unterscheidung von lebensfähigen und nicht lebensfähigen Zellen entwickelten NORTON & BATT (1999) einen 5´-Nuklease Assay, in dem sie eine in vitro transkribierte *hlyA* spezifische mRNA in einer reversen Transkriptase-PCR (RT-PCR; siehe auch Kap. **2.3.2.2**) einsetzten. Einen weiteren Ansatz zur Unterscheidung zwischen lebensfähigen und nicht lebensfähigen Zellen lieferten RUDI et al. (2005). Sie erarbeiteten einen PCR-Assay mit einer Ethidiummonoazid-Bromid (EMA) Anfärbung. EMA dringt selektiv in membrangeschädigte Zellen ein und bindet dort an die DNA, die dadurch inaktiviert wird und so in der PCR nicht mehr amplifiziert wird.

2.3.2.6 Probenvorbereitung für die PCR und DNA-Extraktion

Zur Vermeidung falsch positiver oder falsch negativer Ergebnisse in der PCR ist, aus den im vorherigen Abschnitt angeführten Gründen, eine entsprechende Vorbehandlung der Lebensmittelproben unumgänglich. Der direkte PCR-Nachweis aus Lebensmittelproben ist aufgrund der niedrigen nachzuweisenden Keimzahlen (1 KbE/25 g), der ungleichmäßigen Verteilung in der Probenmatrix (GOLDSTEYN THOMAS et al., 1991) und den Einflüssen der verschiedenen Probenbestandteile (FLUIT et al., 1993; SCHEU et al., 1998; LI & MUSTAPHA, 2002; AZNAR & ALARCON, 2003) nur schwer möglich. Daher wird in der Regel mindestens ein Anreicherungsschritt durchgeführt. Nach Homogenisierung der Lebensmittelprobe erfolgt eine Anreicherung in einem selektiven Medium, meist über 24 h. Die gängigsten Medien sind *Listeria* Enrichment Broth, Fraser (FLUIT et al., 1993), *Listeria* repair broth (BASSLER et al., 1995), Universal-Pre-Enrichment Broth (BAHDURI & COTTRELL, 2001) oder Halbfraser (AZNAR & ALARCÓN, 2003), aus denen dann die

DNA-Präparation für die PCR-Reaktion durchgeführt wird. Der Vorteil der Anreicherung ist die Vermehrung der Zielkeime auf ein sicher detektierbares Niveau sowie die Ausverdünnung der hemmenden Probenkomponenten (NIEDERHAUSER et al., 1992). Es werden also lebensfähige Keime vermehrt, so dass das unter Abschnitt **2.3.2.5** angeführte Problem der Herkunft der Zielsequenzen von lebensfähigen oder nichtlebensfähigen Zellen weitgehend ausgeschaltet wird (SCHEU et al., 1998). Allerdings findet keine Vermehrung der lebensfähigen aber nicht kultivierbaren Zellen statt, die damit einem PCR-Nachweis entgehen können.

Die meisten in der Literatur beschriebenen Protokolle zur Anreicherung und Behandlung der Proben basieren auf Untersuchungen, die mit künstlich kontaminierten Lebensmittelproben durchgeführt wurden, ohne eine Validierung mit natürlich kontaminierten Proben. Nach Meinung verschiedener Autoren (NIEDERHAUSER et al., 1992; CANDRIAN, 1995) ist die Übertragung dieser Protokolle auf Nachweismethoden für *Listeria monocytogenes* in natürlich kontaminierten Lebensmitteln problematisch. Unvorteilhafte pH-Werte, die Exposition zu hoher Salzkonzentrationen, Tiefgefrieren oder Erhitzen können bewirken, dass die Bakterien in natürlich kontaminierten Lebensmitteln weniger lebensfähig oder auch wesentlich intensiver mit der Matrix verbunden sind.

Es sind also effiziente Methoden zur Behandlung der Proben gefordert, um das volle Potential der PCR für den Nachweis von Listerien in Lebensmitteln auszuschöpfen. Dabei ist eine Separation der Listerien von den Probenbestandteilen, eine möglichst weitgehende Beseitigung mit der Matrix verbundener inhibitorischer Komponenten, eine Verkleinerung des Probenvolumens und eine möglichst hohe Konzentration der Zielkeime nötig. Dazu wurden unter anderem der Einsatz von Enzymen (Lysozym, Proteinase K), verschiedenen Detergentien, Zentrifugation und Filtration, Adsorption der DNA an Silicagel, flüssige Zwei-Phasen-Systeme (LANTZ et al., 1994) sowie die Separation der Zielorganismen durch antikörperbeschichtete paramagnetische Partikel beschrieben. Das von LANTZ et al. (1994) untersuchte Zwei-Phasen-System soll die Sensitivität des ansonsten problematischen PCR-Nachweises aus Weichkäse erhöhen. In dänischem blauem Castillo konnten so *Listeria monocytogenes* Keimzahlen von 10^4 KbE/g detektiert werden. Das System besteht aus zwei flüssigen Phasen, die unter anderem Polyethylenglykol und Dextran enthalten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die inhibitorischen Bestandteile zum größten Teil in der Polyethylenglykol-Phase partitionieren lassen und so den PCR-Nachweis nicht mehr stören.

Die Methode der Filtration zur Separation der Pathogene von der Probenmatrix hat sich als wenig erfolgreich erwiesen, da sie relativ viele limitierende Faktoren aufweist. So können zum einen größere Partikel der Proben den Filter verstopfen und zum anderen besteht die Gefahr, dass auch PCR-Inhibitoren mit den Bakterien konzentriert werden und so die Sensitivität der PCR vermindern (STEVENS & JAYKUS, 2004).

Um die Zielorganismen vor der DNA-Extraktion selektiv zu isolieren, kann die immunomagnetische Separation eingesetzt werden (FLUIT et al., 1993; SKJERVE et al., 1990). Dabei werden paramagnetische Partikel („Beads“) eingesetzt, die mit spezifischen Antikörpern gegen Zelloberflächenantigene von *Listeria monocytogenes* beschichtet sind. Nach Inkubation der Beads mit Probenmaterial erfolgt die Auftrennung von Probenmatrix und „Bead-*Listeria*-Komplexen“ in einem Magnetständer. Die Beads werden an der Gefäßwand separiert und der verbliebene Überstand kann abgenommen werden, so dass im Idealfall alle Zielzellen aus der Anreicherung separiert werden. Nach einem oder mehreren Waschschritten kann dann die Extraktion der DNA aus den Bakterienzellen durchgeführt werden.

Das grundlegende Schema zur DNA-Extraktion besteht aus mehreren Schritten und sieht mit zahlreichen Modifikationen wie folgt aus. Zunächst erfolgt eine Pelletierung der Probenbestandteile und Bakterien durch Zentrifugation. Nach Abnehmen des Überstandes wird das resultierende Pellet in verschiedenen Puffer-Medien, wie TE-Puffer oder PCR-Puffer (enthält KCl und Tris-HCl), resuspendiert, um anschließend einen Zellaufschluss und Proteinverdau durch Zugabe von Lysozym, Proteinase K und Erhitzen auf 95 °-100 °C durchzuführen. Durch abschließendes Zentrifugieren werden noch störende Komponenten pelletiert und die Nukleinsäuren im Überstand abpipettiert. Zur weiteren Aufreinigung der DNA können eine Präzipitation mit Ethanol oder Isopropanol und erneute Waschschritte eingeschoben werden. Abweichungen und Modifikationen dieses Schemas zur Anpassung an die jeweilige Probenmatrix und die gewählte PCR-Methode finden sich bei nahezu jeder Arbeitsgruppe, so dass hier nicht auf alle Unterschiede eingegangen werden soll. Allgemein bestehen diese Unterschiede in Variationen der Pufferzusammensetzung, Anzahl der Zentrifugations- und Waschschritte, sowie dem Zusatz von Detergentien wie Triton X-100 (AGERSBORG et al., 1997), Sarkosyl (Sodiumlaurylsarcosinat) (GOLDSTEYN THOMAS et al., 1991), PBS-Tween 20 (LONGHI et al., 2003) oder SDS (Sodiumdodecylsulfat) (BSAT & BATT, 1993) zur Verbesserung des Reinheitsgrades der extrahierten DNA. Neben diesen grundlegenden Extraktionsschemata wurden auch speziellere Verfahrensweisen, angefangen von der Verwendung besonderer Chemikalien bis hin zu Methoden, die auf der Verwendung

polyklonaler Antikörper basieren, entwickelt. So werden zur Erhöhung des Reinheitsgrades der extrahierten DNA Extraktionen mit Phenol-Chloroform (HEIN et al., 2001) oder Phenol-Chloroform-Isoamyl-Alkohol nach WHEATCROFT & WATSON (1988) (BLAIS & PHILLIPPE, 1993), Guanidium-Thiocyanat nach PICHTER et al. (1989) (BANSAL et al. 1996), Ethanol (BLAIS & PHILLIPPE, 1993) und Isopropanol (BSAT & BATT, 1993) eingesetzt. COX et al. (1998) wendeten unter anderem für die Extraktion aus Reinkulturen eine Modifikation der Mikrowellenmethode nach GOODWIN & LEE (1993) an. Von zahlreichen Anbietern werden mittlerweile auch fertige Extraktionskits kommerziell vertrieben, wie zum Beispiel das DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden Deutschland), DNA DIRECT (Dynal AS, Oslo Norwegen), GeneReleaser™ (BioVentures, Murfeesboro, TN USA), PrepMan™ Ultra sample preparation reagent (PE Applied Biosystems, Foster City CA. USA), High Pure PCR Template Preparation kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis IN. USA), um nur einige zu nennen. Dabei gibt es, abhängig von der Art der untersuchten Proben, Unterschiede in der Effizienz der verschiedenen Systeme. So verglichen LI & MUSTAPHA (2002) mehrere DNA-Präparationsmethoden für den Nachweis von Salmonellen in Hackfleisch und Hühnerfleisch. Die Arbeit zeigte die mangelnde Effizienz des GeneReleaser™-Kits im Vergleich zum PrepMan™ Ultra für den Nachweis von *Salmonella typhimurium*. Bei der Extraktion mit dem GeneReleaser™ gelang der PCR-Nachweis nur bis zu einer Keimzahl von $4x10^6$ KbE/g, während mit dem PrepMan™ Ultra Keimzahlen bis zu $4x10^3$ KbE/g detektiert werden konnten. Sowohl AZNÁR & ALARCON (2003) als auch CADY et al. (2005) erzielten gute Ergebnisse bei der DNA-Extraktion aus Rindfleischproben mit dem DNeasy® Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden Deutschland).

Eine Methode zur spezifischen Separation von Listerien-DNA aus Anreicherungskulturen von homogenisierten Lebensmittelproben erarbeiteten NIEDERHAUSER et al., 1994, indem sie ein Oligonukleotid, das zu einem Abschnitt des *hly*-Gens komplementär ist, an paramagnetische Partikel koppelten. Dazu wurden die Homogenisate mit den enthaltenen Bakterien zentrifugiert, das resultierende Pellet durch Zusatz von Lysis-Puffer (enthielt unter anderem KCl, Tris-Hydrochlorid, Triton X-100, $MgCl_2$ und Lysozym), Proteinase K, Kochen und Zentrifugation behandelt. Die denaturierte DNA wurde dann mit dem Oligonukleotid-Bead-Komplex hybridisiert, so separiert und konnte dann in der PCR eingesetzt werden.

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Reagenzien und Nährmedien

- Midi ABgarose (ABgene®, Art.-Nr. AG-0300/B)
- Columbia-Agar mit Schafblut Plus (Oxoid, Art.-Nr. PB5039A)
- PALCAM-Agar (Oxoid, Art.-Nr.: P 05104 A)
- ALOA-Agar (AES Laboratoires, Art.-Nr. 207312)
- Fraser-Basismedium (Oxoid CM 895)
- Hirn-Herz-Bouillon (Merck, Art.-Nr. 1.10493.0500)
- Phosphatpuffer (PBS): 0,01 mol/l mit 0,12 mol/l Natriumchlorid, pH 7,3
- PBS mit 0,1 % *Tween* 20
- Trypton Soya Bouillon mit Hefeextrakt (Oxoid L21 856108)
- Ethidiumbromidlösung (0,1%):
  200 µl Ethidiumbromidlösung (Sigma E 1385) in 100 ml
  2-fach deionisiertem Wasser (Millipore, Milli-Q®, Fa. Biocel)
- DNA-Längenstandard *Phi*X174 *Hae*III (Biometra, 100-796)
- dNTP Set (100µmol/dNTP) (ABgene®, Art.-Nr. AB-0315)
- Gel Loading Solution (Sigma Chemie, Art.-Nr. G2526-5ML)
- Thermoprime Plus DNA Polymerase (ABgene®, Art.-Nr. AB-0301/B)
- Super-paramagnetische Beads mit C-terminal cell wall binding domains (CBD 500 bzw. CBD 118) beschichtet: Eidgenössische Technische Hochschule Zürich; Institut für Lebensmittel- und Ernährungswissenschaften
  Prof. Dr. Martin J. Loessner
- PrepMan™ Ultra Reagenz (PE Applied Biosystems)
- DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden Deutschland)
- Mastermix (TaqMan Universal PCR Mastermix, Applied Biosystems 4324018 ABgene Absolute QPCR ROX Art.-Nr. AB1138/A)

- Die verwendeten Primer und Sonden wurden in Auftragssynthese von OligoFactory, Weiterstadt beziehungsweise von MWG Biotech, Ebersberg hergestellt.

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

- Safe-Lock Tubes 1,5 ml (Eppendorf AG, Art.-Nr. 0300 120.086)
- Safe Guard Filterspitzen 0,5-10 µl Eppendorf (peQLab, Art.-Nr. 81-1011)
- Safe Guard Filterspitzen 1-100 µl Universal (peQLab, Art.-Nr. 81-1030)
- Safe Guard Filterspitzen 100-1000 µl Universal (peQLab, Art.-Nr. 81-1050)
- 0,2 ml Thermo-Tubes (ABgene®, Art.-Nr. AB 0337)
- Thermo-Fast® 96 Detection Plate (ABgene®, Art.-Nr. AB-1100)
- Micro Amp® Optical Caps (Perkin Elmer Applied Biosystems Division, Art.-Nr.: N801-0935

3.1.3 Bakterienstämme und Anzuchtbedingungen

Alle verwendeten Bakterienstämme stammen aus der Stammsammlung des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch der LMU München. Es wurden sowohl gut charakterisierte Typ-Stämme als auch Isolate aus der Routineuntersuchung von Milcherzeugnissen verwendet. Die Bakterien wurden 24 h in Hirn-Herz-Bouillon (BHI, Merck) bei 37 °C angezüchtet und anschließend die DNA extrahiert.

3.1.4 Geräte

- Waage (Sartorius, L2200P)
- Aqua bidest. Anlage: Millipore Milli-Q®, Fa. Biocel
- Blockheizgerät (Thermomixer comfort, Eppendorf)
- ABI Prism 7700 Sequence Detector (PE Applied Biosystems)
- Computer: Power Macintosh G3; Software Sequence Detection Software 1.9.
- Elektrophoresekammer: (Agagel Mini und Midi, Biometra®, biomed Analytik GmbH Göttingen, Deutschland)
  Stromquelle: Electrophoresis Power Supply EPS 200, Fa. Pharmacia Biotech
- Gelauswertung: Geldokumentation Video 8-Entry (Biostep, Jahnsdorf)
- Magnetrührer mit Heizplatte (Ikamag® RCT, Janke+Kunkel GmbH&Co. KG, IKA-Labortechnik, Stufen Deutschland)
- Magnetständer für Eppendorfgefäße (Promega)
- Reagenzglasschüttler (Vortex Genie 2™, Scientific Industries INC.,

Bohemia N.Y. U.S.A).

- Thermocycler (PCR Express, Hybaid Limited U.K.)
- Zentrifuge (klein) (Biofuge pico, Heraeus)
- Zentrifuge (Multifuge 1 S-R, Heraeus)

3.2 Methodik

3.2.1 Adaptierung einer TaqMan-PCR zum Nachweis von *Listeria monocytogenes* und *Listeria innocua* nach HEIN et al. (2001)

Um das Forschungsziel dieser Arbeit möglichst rasch zu erreichen, wurde zunächst eine bereits publizierte Real-Time PCR-Methode zum Nachweis von *Listeria monocytogenes* ausgewählt, die dann an die Fragestellung des Forschungsvorhabens angepasst werden sollte. Besonders geeignet dazu erschien ein von HEIN et al. (2001) erarbeitetes System auf der Basis von TaqMan-Sonden, mit dem *Listeria monocytogenes* und *Listeria innocua* unter Verwendung der gleichen Sonde und des gleichen Rückwärtsprimers nachgewiesen werden können. Lediglich die Vorwärtsprimer sind hier für eine Spezies spezifisch.

3.2.1.1 Methodik

Mehrere *Listeria monocytogenes*-Stämme, sowie je ein Stamm der Spezies *Listeria innocua, Listeria welshimeri, Listeria ivanovii, Listeria seeligeri* und *Listeria grayi* ssp. *grayi* wurden wie unter 3.1.4 beschrieben angezüchtet und eine Extraktion der DNA durchgeführt.

DNA-Extraktion

Die Extraktion der DNA erfolgte unter Verwendung des DNeasy Tissue Kits der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers. Von jedem Stamm wurden 200 µl der flüssigen Anzucht für zehn Minuten bei 5000 x g zentrifugiert und das resultierende Pellet in 180 µl Extraktionspuffer (Tris-HCl 0,2 mol/l, pH 8,0) mit Lysozym (20 mg/ml) aufgenommen. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurden die Proben mit 25 µl einer Proteinase K-Lösung versetzt und 200 µl Puffer AL zugesetzt. Nach weiteren 30 Minuten Inkubation bei 70 °C wurden 200 µl Ethanol (96%) zugegeben. Anschließend wurde die Probenlösung auf eine Silicasäule aufgetragen und für eine Minute bei 6000 x g zentrifugiert. Die Säule wurde mit zwei verschiedenen Waschpuffern je einmal gewaschen und für eine

Minute bei 6000 x g zentrifugiert. Die DNA wurde schließlich mit 200 µl Elutionspuffer eluiert. Die Extrakte wurden entweder direkt in der PCR eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

Durchführung der PCR

Die PCR wurde zunächst wie von den Autoren beschrieben durchgeführt. Parallel dazu wurden Versuche mit einem kommerziell vertriebenen vorkonfektionierten Reagenziengemisch („Mastermix“, TaqMan Universal Mastermix, Applied Biosystems) durchgeführt, dem nur noch Primer und Sonden, sowie die Proben-DNA zugegeben werden müssen. Dieses Produkt wurde speziell für die TaqMan-PCR entwickelt und hat sich bei anderen TaqMan-Anwendungen gut bewährt. Die Verwendung eines vorkonfektionierten Reaktionsgemisches reduziert den Zeitaufwand für die Vorbereitung der PCR und gewährleistet eine bessere Standardisierbarkeit von Routineuntersuchungen.
Als zusätzliche Kontrolle wurde bei einigen Versuchen eine klassische PCR unter Verwendung der gleichen Primer, jedoch ohne Zugabe der TaqMan-Sonde, durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden auf 2%igen Agarosegelen aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und im UV-Licht bei einer Wellenlänge von 302 nm visualisiert.

Oligonukleotidsequenzen

Vorwärtsprimer *L. monocytogenes*	LIM2	cta aag ggg gaa tct ccc tt
Vorwärtsprimer *L. innocua*	In3	cac taa caa tgc gag cgc aag
Rückwärtsprimer	LIMRE	cca ttg tct tgc gcg tta at
Sonde	LMS2	FAM-ctt ctg gcg cac aat acg cta gca ct-TAMRA

Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die klassische PCR:

10x Puffer:	5 µl
dNTP:	200 nM
$MgCl_2$:	2-8 mM
Vorwärtsprimer:	50-900 nM
Rückwärtsprimer:	50-900 nM
Gelatine:	0,001%
Taq-Polymerase:	5 U
Probe:	2 µl
A. bidest.:	ad 50 µl

Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die TaqMan-PCR:

Universal Mastermix:	25 µl
Vorwärtsprimer:	300 nM
Rückwärtsprimer:	300 nM
Sonde:	200 nM
Probe:	2 µl
A. bidest.:	ad 50 µl

PCR-Protokoll:

Sowohl die klassische als auch die TaqMan-PCR wurden unter Einhaltung der von HEIN et al. (2001) beschriebenen Bedingungen mit dem Gerät ABI Prism 7700 durchgeführt.

Temperatur	**Zeit**	**Zyklen**
95 °C	10 min	1
95 °C	15 sec	45
68 °C	1 min	

3.2.1.2 Ergebnisse

Bei der Auswertung der TaqMan-PCR nach HEIN et al. (2001) zeigte sich, dass positive Proben nur eine sehr schwache Fluoreszenzentwicklung erreichten. Daraus resultierte eine sehr flache Amplifikationskurve, was auf eine ineffektiv ablaufende PCR-Reaktion hindeutet, in der pro Zyklus nur wenig des Amplifikationsproduktes gebildet wird. Auch die Spezifität des Nachweises war nicht gegeben, da sowohl im Nachweissystem für *Listeria monocytogenes* als auch in dem für *Listeria innocua* jeweils alle anderen getesteten *Listeria* spp. ein positives Signal erbrachten.

3.2.1.3 Versuche zur Optimierung der TaqMan-PCR nach HEIN et al. (2001)

Nachdem die ersten Versuche mit dieser Methode unbefriedigend verliefen, wurden systematisch die Reaktionsbedingungen und die Zusammensetzung der Reagenzien verändert, um eine Optimierung der Bedingungen zu erreichen. Dazu wurden zunächst die Konzentrationen der Vorwärts- und Rückwärtsprimer in unterschiedlichen Konzentrationen kombiniert und nach Festlegung der optimalen Konzentrationen, die Konzentration der Sonde eingestellt. Wegen der schwachen Fluoreszenzentwicklung wurden verschiedene Chargen der Reagenzien getestet, sowie Sonden mehrerer Hersteller verglichen. Ebenfalls wurde die Gewinnung und Aufbereitung der DNA-Extrakte modifiziert. Dazu wurde ein weiteres, kommerziell erhältliches Reagenz (PrepMan Reagenz, Applied Biosystems) verwendet und zusätzlich vergleichend eine klassische Phenol-Chlorophorm-Extraktion durchgeführt.

Ergebnis

Auch nach umfangreichen Optimierungsversuchen konnten mit der von HEIN et al. (2001) beschriebenen Methode bezüglich Effizienz der PCR-Reaktion, Sensitivität und Spezifität keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden, so dass aus diesem Grund völlig neue TaqMan-Nachweise für Listerien entwickelt wurden. Dabei wurde ein Nachweis für *Listeria* spp. und ein spezifischer Nachweis für *Listeria monocytogenes* erstellt.

3.2.2 Erstellung neuer TaqMan-Systeme für den Nachweis von Listerien

3.2.2.1 Genusspezifischer Nachweis für Listerien

Oligonukleotidsequenzen

Als Zielgen des Listerien-Screenings wurde das für das Protein p60 kodierende *iap*-Gen gewählt, das bei allen *Listeria*-Spezies vorkommt. Zunächst wurden die Sequenzen der verschiedenen *Listeria*-Spezies aus der Datenbank GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html) gegeneinander abgeglichen und homologe Bereiche, die für einen gattungsspezifischen Nachweis geeignet erschienen, gesucht. Die Auswahl der Primer und Sonden erfolgte mit Hilfe des Software-Programms PrimerExpress (Applied Biosystems). Die Sonde wurde mit 6-Carboxy-Fluoreszein (FAM) als Reporter- und 6-Carboxy-Tetramethylrhodamin (TAMRA) als Quencherfarbstoff markiert.

Vorwärtsprimer	FP1615	ccaactacatttgattgctctggtt
Sonde	ListP	FAM-ttccacgtacttctggcgcacaat-TAMRA
Rückwärtsprimer	RP 1758	aaagaatactaaatcaccaggttttgc

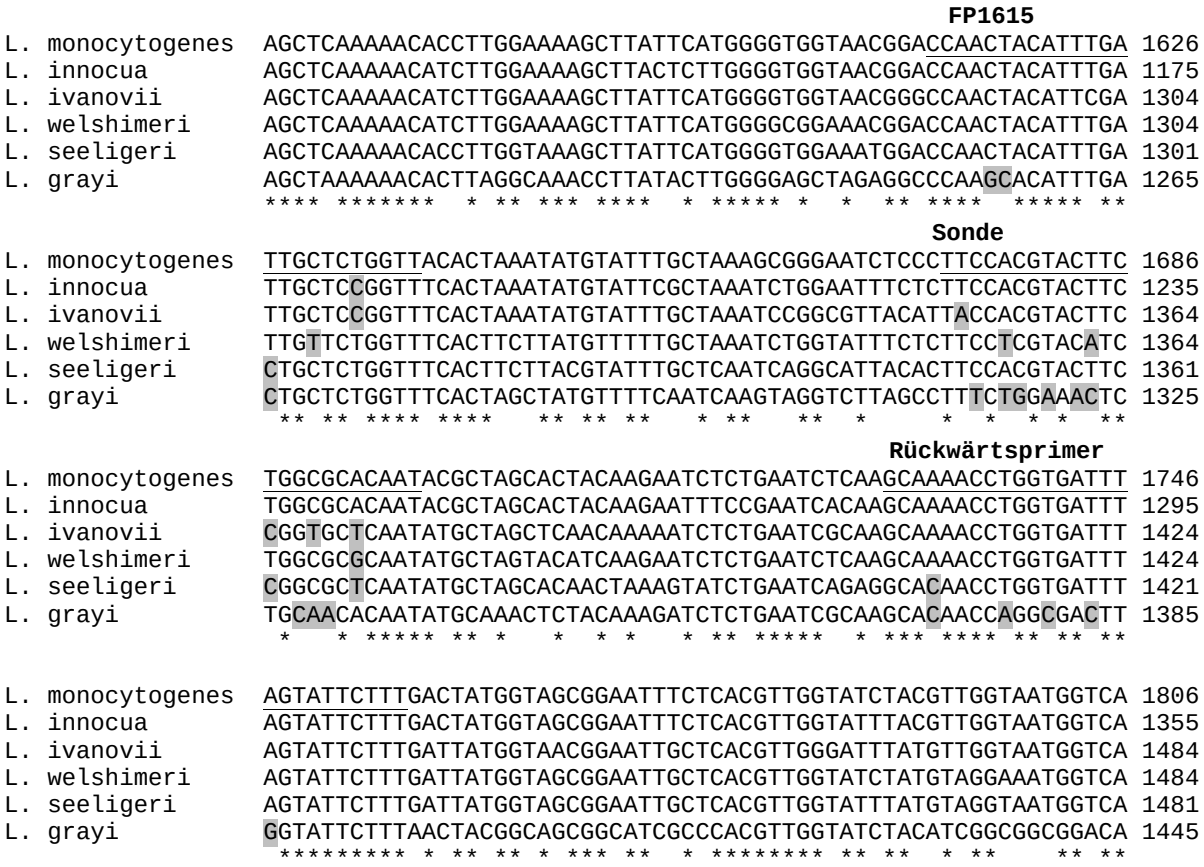

Abb. 3: Position von Primern und Sonde im *iap*-Gen (unterstrichen). Sequenzen: Genbank Nr. X52268 (*Listeria monocytogenes*), X52268 (*Listeria innocua*), M80350 (*Listeria ivanovii*), M80354 (*Listeria welshimeri*), M80353 (*Listeria seeligeri*), M80352 (*Listeria grayi* ssp. *grayi*). Von der Sequenz des jeweiligen Oligonukleotids abweichende Basen sind grau hinterlegt.

Bakterienstämme und Anzuchtbedingungen

Die für die Versuche verwendeten Bakterienstämme wurden zunächst auf Schafblutagar ausgestrichen, für 24h bei 37°C bebrütet und im Anschluss eine Kolonie in Hirn-Herz-Bouillon (BHI) überführt. Nach einer Anzucht von weiteren 24 h bei 37 °C erfolgte die DNA-Extraktion.

DNA-Extraktion

Zur Untersuchung von Reinkulturen wurde eine einfache Kochextraktion aus der Flüssigkultur durchgeführt. Dazu wurden aus 1 ml einer Übernachtkultur die Zellen durch Zentrifugation pelletiert, das Pellet zweimal mit A. bidest. gewaschen und in 100 µl A. bidest. aufgenommen. Anschließend wurde durch Erhitzen auf 100 °C für 10 min. die DNA freigesetzt.

Durchführung der PCR

Zunächst wurden orientierende Versuche zur Eignung der Primer und Sonden mit klassischer PCR durchgeführt. Nach positiven Ergebnissen wurde die TaqMan-PCR unter Verwendung des TaqMan Universal Mastermix von Applied Biosystems etabliert.
Die PCR wurde unter Einhaltung der für das TaqMan-System empfohlenen Bedingungen in Form einer Zwei-Schritt-PCR mit dem Gerät ABI Prism 7700 (PE Applied Biosystems, Foster City USA) durchgeführt.

Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die TaqMan-PCR:

Universal Mastermix:	25 µl
Vorwärtsprimer:	300 nM
Rückwärtsprimer:	300 nM
Sonde:	200 nM
Probe:	2 µl
A. bidest.:	ad 50 µl

PCR-Protokoll für die TaqMan-PCR:

Temperatur	**Zeit**	**Zyklen**
95 °C	10 min	1
95 °C	15 sec	40
60 °C	1 min	

Bei jeder PCR-Reaktion wurden sechs Negativkontrollen mit A. bidest. als Probe mitgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der ABI Prism Software von Applied Biosystems (Version 1.6.3).

3.2.2.2 Spezifischer Nachweis von *Listeria monocytogenes*

Für den spezifischen Nachweis von *Listeria monocytogenes* wurde das Listeriolysin O-Gen *hlyA* gewählt. Dieses Gen kommt außer bei *Listeria monocytogenes* nur bei *Listeria ivanovii* und *Listeria seeligeri* vor. Um Sequenzen mit möglichst großen Abweichungen zu den Listeriolysin O-Genen von *Listeria ivanovii* und *Listeria seeligeri*, sowie mit möglichst wenigen Mutationen innerhalb der verschiedenen *Listeria monocytogenes*-Stämme zu bestimmen, wurde ein Abgleich mit den in der GenBank vorhandenen Sequenzen durchgeführt. Geeignete Oligonukleotide wurden unter Verwendung des Programms Primer Express ausgewählt.

Oligonukleotidsequenzen

Vorwärtsprimer: hlyA FP1: ggg aaa tct gtc tca ggt gat gt
Rückwärtsprimer: hlyA RP1: ttt gcg gag ccw ccg taa at
Sonde: hlyA S : FAM-caa ata tca tca aaa att ctt cct tca aag ccg t-TAMRA

Material und Methodik entsprachen, soweit nicht gesondert aufgeführt, den unter **3.2.2.1** beschriebenen Bedingungen. Vor einer Etablierung des TaqMan-Systems wurde auch hier eine erste Überprüfung der Primer mittels klassischer PCR und elektrophoretischer Detektion durchgeführt.

<u>Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die TaqMan-PCR:</u>

Universal Mastermix:	25 µl
Vorwärtsprimer:	300 nM
Rückwärtsprimer:	300 nM
Sonde:	200 nM
Probe:	2 µl
A. bidest.:	ad 50 µl

PCR-Protokoll für die TaqMan-PCR:

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	10 min	1
95 °C	15 sec	40
60 °C	1 min	

3.2.3 Überprüfung der Spezifität der Listeriennachweise

3.2.3.1 Screening auf *Listeria*-Spezies

Für die Versuche wurden 19 *Listeria monocytogenes*-Stämme aller relevanter Serovare (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 4b und 4d), 23 Stämme der Spezies *Listeria innocua*, sechs Stämme von *Listeria welshimeri*, zehn Stämme von *Listeria ivanovii*, neun Stämme von *Listeria seeligeri* sowie drei Stämme der Spezies *Listeria grayi* ssp. *grayi* verwendet. Daneben wurden DNA-Extrakte von zwölf Bakterienspezies anderer Gattungen untersucht.

DNA-Extraktion

Zur Untersuchung von Reinkulturen erfolgte die DNA-Extraktion durch Kochextraktion wie unter **3.2.2.1** beschrieben.

Ergebnisse

Bei Überprüfung der Primer mittels klassischer PCR reagierten die DNA-Extrakte aller getesteten *Listeria*-Stämme mit Ausnahme von *Listeria grayi* ssp. *grayi* positiv.
Die TaqMan-PCR zum Screening auf *Listeria*-Spezies erfasste alle getesteten Stämme der Spezies *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* und *Listeria seeligeri*. Zusätzlich wurden zwei von sechs getesteten Stämmen *Listeria welshimeri* erfasst. DNA-Extrakte von Stämmen der Spezies *Listeria ivanovii* und *Listeria grayi* ssp. *grayi* reagierten dagegen in dem Testsystem negativ. Keine der untersuchten Bakterienspezies anderer Gattungen ergab ein falschpositives Ergebnis (**Tab. 3** und **4**).

Tabelle 3: Überprüfung der TaqMan-PCR zum Screening auf *Listeria*-Spezies mit DNA-Extrakten aus Reinkulturen von Stämmen verschiedener *Listeria* spp.

Spezies	Serovar	Anzahl	positiv
L. monocytogenes	4b	6	6
	4d	2	2
	4e	1	1
	3b	1	1
	1/2a	4	4
	1/2b	1	1
	1/2c	3	3
	unbekannt*	1	1
	gesamt	19	19
L. innocua	6a	6	6
	6b	6	6
	unbekannt*	11	11
	gesamt	23	23
L. ivanovii	unbekannt*	10	0
L. seeligeri	1/2b	2	2
	3b	1	1
	4c	2	2
	6b	4	4
	gesamt	9	9
L. welshimeri	6a	2	0
	1/2a	1	1
	1/2b	1	1
	unbekannt*	2	0
	gesamt	6	2
L. grayi ssp. *grayi*	unbekannt*	3	0

* Bei Stämmen unbekannter Serovarietät handelt es sich überwiegend um Isolate aus der Routineuntersuchung von Milchprodukten

Tabelle 4: Spezifität des TaqMan-Nachweises zum Screening auf *Listeria* spp.

Spezies	Stamm	Ergebnis
Citrobacter freundii	P110	negativ
Enterobacter aerogenes	P117	negativ
Enterobacter cloacae	P144	negativ
	P24	negativ
Pantoea agglomerans	P38	negativ
Shigella flexneri	P150	negativ
Escherichia coli	H57	negativ
Klebsiella pneumoniae	H5	negativ
Staphylococcus aureus	MHI 369	negativ
Salmonella	MHI 930	negativ
Bacillus cereus	MHI 105	negativ
	MHI 88	negativ

3.2.3.2. Erweiterung der erfassten Listerienspezies durch Verwendung eines interkalierenden Farbstoffes (SybrGreen®) anstelle der TaqMan-Sonden

Da bei der Verwendung der TaqMan-Sonde zwar die in der Milchindustrie relevanten Listerienspezies, nicht aber das komplette Genus *Listeria* nachgewiesen werden können, wurden weitergehende Versuche durchgeführt, bei denen an Stelle der TaqMan-Sonde der interkalierende Farbstoff SybrGreen® eingesetzt wurde. Da dieser Farbstoff nicht die Sequenzspezifität der TaqMan-Sonde aufweist und unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet, wurde durch eine Schmelzkurvenanalyse im Anschluss an die PCR verifiziert, ob das korrekte Amplikon vorlag.

Ergebnisse

Bei Verwendung von SybrGreen® wurde mit allen *Listeria* spp., außer *Listeria grayi* ssp. *grayi*, ein positives Signal erreicht.

3.2.3.3 Spezifischer Nachweis von *Listeria monocytogenes*

Die Überprüfung der Spezifität des Nachweises für *Listeria monocytogenes* erfolgte analog zu Abschnitt **3.2.3.1**.

Ergebnisse

Die TaqMan-PCR zum spezifischen Nachweis von *Listeria monocytogenes* erfasste alle getesteten Stämme von *Listeria monocytogenes* und reagierte mit keiner anderen Spezies falsch positiv (**Tab. 5**).

Tabelle 5: Spezifität des TaqMan-Nachweises für *Listeria monocytogenes*

Spezies	Serovar	Anzahl	positiv
L. monocytogenes	4a	1	1
	4b	8	8
	4c	1	1
	4d	2	2
	4e	1	1
	3a	2	2
	3b	1	1
	3c	1	1
	1/2a	6	6
	1/2b	6	6
	1/2c	3	3
	unbekannt*	2	2
	gesamt	34	34
L. innocua	6a	6	0
	6b	6	0
	unbekannt*	11	0
	gesamt	23	0
L. ivanovii	unbekannt*	10	0
L. seeligeri	1/2b	2	0
	3b	1	0
	4c	2	0
	6b	4	0
	gesamt	9	0
L. welshimeri	6a	2	0
	1/2a	1	0
	1/2b	1	0
	unbekannt*	2	0
	gesamt	6	0
L. grayi ssp. *grayi*	unbekannt*	3	0

* Bei Stämmen unbekannter Serovarietät handelt es sich überwiegend um Isolate aus der Routineuntersuchung von Milchprodukten

3.2.4 Sensitivität der TaqMan-Nachweise

Zur Überprüfung der Nachweisempfindlichkeit der TaqMan-PCR für *Listeria monocytogenes* wurden dezimale Verdünnungen von Reinkulturen verschiedener *Listeria monocytogenes*-Stämme in Ringer-Lösung erstellt, unter der Annahme, dass eine Übernachtkultur in BHI ca. 10^9 KbE/ml enthält. Diese Annahme basierte auf orientierenden Versuchen zur Keimdynamik, die im Vorfeld durchgeführt wurden (Ergebnisse nicht dargestellt). Parallel wurden die tatsächlichen Keimzahlen durch Ausplattieren auf PALCAM-Agar ermittelt.
Es zeigte sich, dass der Nachweis eine Konzentration von 10^4-10^5 KbE/ml beziehungsweise unter Berücksichtigung der Probenaufbereitung ca. 10^2-10^3 Kopien pro PCR-Ansatz erfordert. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 6** dargestellt.

Tabelle 6: Nachweis von *Listeria monocytogenes*

Stamm	**Konzentration in KbE/ml**					
	10^9	**10^6**	**10^5**	**10^4**	**10^3**	**10^2**
1144	+	+	+	-	-	-
1168	+	+	+	-	-	-
364/03	+	+	+	+	-	-

Nachweis von *Listeria monocytogenes* in Anwesenheit hoher Konzentrationen an *Listeria innocua*

Zusätzlich wurde untersucht, ob die Sensitivität des Nachweises von *Listeria monocytogenes* durch hohe Konzentrationen von DNA aus *Listeria innocua* beeinträchtigt wird. Dazu wurde eine dezimale Verdünnungsreihe des DNA-Extraktes eines Stammes von *Listeria monocytogenes* im Parallelansatz einmal direkt und einmal mit Zusatz des DNA-Extraktes einer unverdünnten Kultur von *Listeria innocua* (ca. 10^9 KbE/ml) untersucht. Die C_t-Werte der beiden Ansätze unterschieden sich nicht wesentlich (**Tab. 7**). Der Nachweis von *Listeria monocytogenes* wird durch die gleichzeitige Anwesenheit hoher Konzentrationen an DNA aus *Listeria innocua* also nicht beeinträchtigt.

Tabelle 7: Einfluss hoher Konzentrationen an DNA aus *Listeria innocua* auf den Nachweis von *Listeria monocytogenes*: Vergleich der C_t-Werte mit und ohne Zusatz von DNA aus *Listeria innocua* zum PCR-Ansatz

	Konzentration *L. monocytogenes* (KbE/ml)						
	10^9	10^8	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3
ohne *L. innocua*	20,99*	24,18	28.01	31,41	35,01	38,43	-
mit *L. innocua*	20,4	23,96	27,66	31,18	34,73	37,89	-

* C_t-Wert: PCR-Zyklus (interpolierter Wert), ab dem ein positives PCR-Signal gemessen wurde

3.2.5 Versuche zur Anwendbarkeit der TaqMan-Nachweise für die Untersuchung von Milchprodukten

3.2.5.1 Methodik

Nach der Etablierung der Listeriennachweise anhand von Reinkulturen wurde die Anwendbarkeit für die Untersuchung komplexer Probenmaterialien untersucht. Dazu wurden Proben pasteurisierter Milch sowie von Standardsorten verschiedener Käsegruppen mit Listerien kontaminiert. Im Einzelnen wurden folgende Probenmatrizes verwendet: pasteurisierte Vollmilch, Frischkäse (Speisequark, 20% Fettanteil), Weichkäse (Camembert, Limburger, Romadur), halbfester Schnittkäse (Butterkäse), Schnittkäse (Gouda) sowie Hartkäse (Emmentaler).
Jeweils 25 g Probe wurden mit 100 µl einer Übernachtkultur eines *Listeria*-Stammes versetzt und die Probe 24 h bei 30 °C in Halb-Fraser-Medium bebrütet. Es wurden sechs Stämme der Spezies *Listeria monocytogenes* sowie fünf Stämme der Spezies *Listeria innocua* mit jeweils unterschiedlichen Serovarietäten verwendet. Von jeder Probe wurde zusätzlich eine unkontaminierte Negativkontrolle mitgeführt, die sowohl mit der TaqMan-PCR als auch mit dem kulturellen Referenzverfahren nach DIN EN ISO 11290-1 untersucht wurde.

Die Extraktion der DNA erfolgte zunächst unter Verwendung des DNeasy Tissue Kits nach Anleitung des Herstellers (siehe **3.2.1.1**). Diese Methode birgt aufgrund der Verwendung von deckellosen Säulchen die Gefahr von Kreuzkontaminationen infolge von Aerosolbildung während der Zentrifugationsschritte. Zudem ist die Durchführung relativ arbeitsaufwendig. Daher wurde als Alternative das PrepMan™ Ultra Reagenz (Applied Biosystems) getestet, für

das nur wenige Arbeitsschritte erforderlich sind und bei dem die Zentrifugationsschritte ausschließlich in geschlossenen Gefäßen durchgeführt werden.
Für die Durchführung wird nach Herstellerangaben 1 ml Anreicherungskultur 3 min bei 16 000 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 200 µl PrepMan™ Ultra Reagenz resuspendiert. Anschließend werden die Proben 10 min bei 99 °C im Heizblock inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (3 min, 16 000 x g) kann der Überstand direkt in der PCR eingesetzt werden oder der Extrakt bei 4 °C bis zu vier Wochen gelagert werden.

Die DNA-Extrakte wurden sowohl mit der TaqMan-PCR zum spezifischen Nachweis von *Listeria monocytogenes* als auch mit der PCR zum Screening auf *Listeria* spp. untersucht.

3.2.5.2 Ergebnisse

Das PrepMan™ Ultra Reagenz erwies sich als gut geeignet für die Extraktion der DNA aus den untersuchten Milchprodukten. Mit dem anfangs verwendeten DNeasy® Tissue Kit traten dagegen wiederholt Probleme mit Kreuzkontaminationen auf. Für alle weiteren Versuche wurde daher das PrepMan™ Ultra Reagenz verwendet.
In allen künstlich kontaminierten Proben konnten die Listerien mittels TaqMan-PCR korrekt nachgewiesen werden. Die Effizienz der PCR-Reaktionen wurde durch die verschiedenen Probenmatrizes nicht nachteilig beeinflusst. Die gemessenen C_t-Werte waren praktisch identisch mit den Werten für Reinkulturen.

3.2.6 Nachweis niedriger Listerien-Konzentrationen in Milchprodukten

3.2.6.1 Methodik

Der Gesetzgeber fordert die Abwesenheit von *Listeria monocytogenes* in 25 g Probe. Daher müssen die Nachweisverfahren in der Lage sein, auch sehr niedrige Keimzahlen nachzuweisen. Da natürlich kontaminierte Proben nicht zur Verfügung standen, wurden künstliche Kontaminationen verschiedener Produkte mit *Listeria monocytogenes* durchgeführt. Es wurden zwei verschiedene Stämme von *Listeria monocytogenes* und ein Stamm von *Listeria innocua* für die Versuche verwendet. Die Reinkulturen wurden über Nacht bei 37 °C in BHI angezüchtet und eine dezimale Verdünnungsreihe der Kulturen

hergestellt. Dabei wurde eine Ausgangskeimzahl im Bereich von 10^9 KbE/ml angenommen (siehe Abschnitt **3.2.4**) und ausgehend davon Verdünnungen mit angenommenen Konzentrationen von 1-10 und 10-100 KbE/ml hergestellt. Die tatsächliche Keimkonzentration wurde durch Ausplattieren eines Aliquots dieser Verdünnungen auf PALCAM-Agar überprüft.

Als Probenmaterial wurden pasteurisierte Vollmilch, Camembert und Limburger verwendet. Von jeder Probe wurden 25 g im Dreifachansatz, jeweils mit 1-10 und 10-100 KbE/ml eines jeden Listerienstammes, kontaminiert und 20 h in Halbfraser-Bouillon bei 30 °C bebrütet. Parallel dazu wurde von jeder Probe, ebenfalls im Dreifachansatz, eine Leerprobe mitgeführt. Nach 20 h wurde aus jedem Ansatz ein Aliquot von 1 ml entnommen und die DNA mittels PrepMan™ Ultra-Reagenz extrahiert. Zusätzlich wurde ein weiteres Aliquot auf PALCAM-Agar ausgestrichen, um die Listerienkeimzahl zu bestimmen. Der restliche Halbfraser-Ansatz wurde weitere 28 h bebrütet und anschließend nochmals 1 ml Anreicherungskultur für die PCR aufbereitet.

Die DNA-Extrakte wurden sowohl mit der TaqMan-PCR zum spezifischen Nachweis von *Listeria monocytogenes*, als auch mit der TaqMan-PCR zum Screening auf *Listeria* spp. untersucht.

3.2.6.2 Ergebnisse

In mit niedrigen Keimzahlen künstlich kontaminierten Milchprodukten konnten nach 48 h Anreicherung Keimzahlen von 1-10 KbE/25 g beziehungsweise ml von beiden Testsystemen in jedem Fall nachgewiesen werden (**Tab. 8** und **9**). Die Nachweissicherheit nach 20 h Anreicherung war sowohl abhängig von dem verwendeten Bakterienstamm als auch von der Probenmatrix. In pasteurisierter Milch wurden nach 20 h Anreicherung fast alle dotierten Proben als positiv erkannt. Bei Rotschmierekäse reagierte dagegen nach 20 h noch ein großer Teil der Proben negativ oder nicht eindeutig positiv. Auch bei Camembert war ein relativ hoher Anteil negativer oder fraglicher Ergebnisse festzustellen. PCR-Nachweise von *Listeria* spp. in den beiden letztgenannten Käsesorten sind, aufgrund der teilweise hemmenden Wirkung der Begleitflora auf das Listerienwachstum, häufig problematisch. Dafür sprechen auch die Ergebnisse der kulturellen Untersuchung der Proben (Ergebnisse nicht dargestellt). Hier wurde eine zum Teil starke Überwachsung der Listerien mit Keimen aus der Begleitflora festgestellt. Während in pasteurisierter Milch nach 20 h Anreicherung bereits Listerien-

Konzentrationen im Bereich von 10^4-10^5 KbE/ml erreicht wurden, lagen die Konzentrationen in Weich- und Rotschmierenkäse mit 10^2-10^3 KbE/ml um zwei Zehnerpotenzen niedriger.

Tabelle 8: TaqMan-PCR zum Screening auf *Listeria* spp. Untersuchung von künstlich kontaminierten Milchprodukten nach Anreicherung (jeweils Dreifachansatz) in Halb-Fraser über 20 beziehungsweise 48 h. Stamm 364/03 und 1144: *Listeria monocytogenes*; Stamm 414/03: *Listeria innocua*

Stamm	**KbE/25g**	**Milch**		**Camembert**		**Limburger**	
		20 h	48 h	20 h	48 h	20 h	48 h
364/03	1-10	+/+/+	+/+/+	(+)/(+)/(+)	+/+/+	-/(+)/(+)	+/+/+
	10-100	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+
1144	1-10	+/(+)/+	+/+/+	-/(+)/+	+/+/+	-/-/(+)	+/+/+
	10-100	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/(+)/(+)	+/+/+
414/03	1-10	+/+/(+)	+/+/+	(+)/(+)/+	+/+/+	-/-/(+)	+/+/+
	10-100	+/+/+	+/+/+	+/+/(+)	+/+/+	+/(+)/(+)	+/+/+
	0	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-

+: positives Ergebnis; -: negatives Ergebnis; (+): fragliches Ergebnis (C_T-Werte > 36)

Tabelle 9: Untersuchung künstlich mit *Listeria. monocytogenes* kontaminierter Milchprodukte nach Anreicherung (jeweils Dreifachansatz) in Halb-Fraser über 20 beziehungsweise 48 h mit dem TaqMan-Nachweis für *Listeria monocytogenes*.

Stamm	**KbE/25 g**	**Milch**		**Camembert**		**Limburger**	
		20 h	48 h	20 h	48 h	20 h	48 h
364/03	1-10	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	-/(+)/(+)	+/+/+
	10-100	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	(+)/(+)/(+)	+/+/+
1144	1-10	+/(+)/+	+/+/+	-/(+)/(+)	+/+/+	-/(+)/(+)	+/+/+
	10-100	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/+/+	+/(+)/(+)	+/+/+

+: positives Ergebnis; -: negatives Ergebnis; (+): fragliches Ergebnis (C_T-Werte > 36)

3.2.7 Integration einer internen Positivkontrolle

3.2.7.1 Methodik

Bedingt durch den hohen Gehalt an Proteinen und verschiedenen Ionen in Milch und Milchprodukten können PCR-Nachweise in diesen Probenmatrizes oft mit Problemen behaftet sein (siehe Abschnitt **2.3.2.5**). Zwar haben sich die TaqMan-Nachweise bei allen durchgeführten Versuchen als robust gegenüber Probenbestandteilen erwiesen, aber um eine mögliche Inhibition der PCR durch Probenbestandteile sicher ausschließen zu können, ist die Verwendung einer internen Positivkontrolle (IPC) erforderlich. Hierbei handelt es sich um eine PCR-Reaktion, die gleichzeitig mit der eigentlichen Nachweisreaktion im selben Reaktionsansatz abläuft. Durch ein positives Ergebnis der IPC wird angezeigt, dass in dem Ansatz eine PCR-Reaktion ohne Beeinträchtigung ablaufen kann.

Um die Zahl der erforderlichen Reagenzien möglichst niedrig zu halten, wurde für beide Nachweise die gleiche IPC verwendet. Dazu wurde ein kommerziell erhältliches Primer/Sonden-System der Firma Applied Biosystems, das für die Verwendung als IPC in verschiedenen TaqMan-Nachweisen optimiert wurde, verwendet. Die IPC-Sonde ist mit einem Reporterfarbstoff (VIC) markiert, der Fluoreszenz einer anderen Wellenlänge emittiert als die Nachweis-Sonden für die Listerien, so dass beide Signale gleichzeitig detektiert

werden können. Sowohl das Primer/Sonden-System als auch die dazugehörige DNA wurden dem Reaktionsgemisch für die TaqMan-PCR nach Vorgabe des Herstellers direkt zugesetzt.

Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die TaqMan-PCR unter Verwendung einer internen Positivkontrolle (IPC):

Universal Mastermix:	25 µl
Vorwärtsprimer:	300 nM
Rückwärtsprimer:	300 nM
Sonde:	200 nM
Probe:	2 µl
10x Exo IPC Mix:	5 µl
50x Exo IPC DNA:	1 µl
A. bidest.:	ad 50 µl

Die IPC wurde begleitend zu den Kontaminationsversuchen mit verschiedenen Milchprodukten in einer TaqMan-PCR eingesetzt. Dabei kamen immer ein kompletter TaqMan-PCR-Ansatz ohne IPC und ein Ansatz mit IPC, jeweils der gleichen Probenmatrix, auf einer Mikrotiterplatte zum Einsatz, um eventuelle Beeinflussungen der IPC auf die PCR-Reaktion ermitteln zu können. Es wurden drei *Listeria monocytogenes*-Stämme sowie fünf *Listeria innocua*-Stämme unterschiedlicher Serovarietäten in folgenden Probenmatrizes untersucht: pasteurisierte Vollmilch, Frischkäse (Doppelrahmfrischkäse, Speisequark, 20% Fettanteil), Weichkäse (Camembert, Bavaria Blue, Romadur), halbfester Schnittkäse (Butterkäse) und Schnittkäse (Gouda).

Mögliche Ergebnisse einer PCR-Reaktion beim Einsatz einer internen Positivkontrolle (IPC):

IPC	Listerien-Nachweis	Resultat
+	-	negativ
+	+	positiv
-	+	positiv
-	-	Inhibition ?

3.2.7.2 Ergebnisse

Die verwendetet IPC war ohne Sensitivitätsverlust oder eine negative Beeinflussung der PCR-Kinetik sowohl für den spezifischen Nachweis von *Listeria monocytogenes* als auch für das Screening auf *Listeria* spp. in allen untersuchten Probenmatrizes einsetzbar. Des Weiteren zeigte sich keine negative Beeinflussung der PCR-Reaktion der IPC durch Probenbestandteile.

3.2.8 Übertragbarkeit der TaqMan-Nachweise auf andere Real-Time PCR Plattformen

Die Versuche zur Entwicklung und Anwendbarkeit der TaqMan-Nachweise wurden auf dem Gerät ABI Prism 7700 der Firma PE Applied Biosystems durchgeführt, einem der ersten Real-Time PCR-Geräte.

Im Rahmen von Vorführungen anderer Real-Time Geräte am Institut für Hygiene und Technologie der Milch wurde die Übertragbarkeit der Listerien-Nachweise auf diese Geräte getestet. Dazu wurden dezimale Verdünnungen von DNA-Extrakten von Listerien-Reinkulturen vergleichend auf dem ABI Prism 7700 und den anderen Real-Time PCR Geräten untersucht und die Effizienz der PCR-Reaktionen verglichen.

Die Nachweise waren ohne weitere Adaptation auf dem Gerät MX 3000 der Firma Stratagene, sowie auf dem i-Cycler® der Firma BioRad einsetzbar.

Für die Verwendung auf dem LightCycler der Firma Roche war, aufgrund der völlig anderen Temperaturkinetik dieses Gerätes, eine Anpassung des Temperatur-Zeit-Programmes und eine Modifikation der Probenaufbereitung erforderlich. DNA-Extrakte, die unter Verwendung der PrepMan™ Ultra Reagenz hergestellt worden waren, konnten im LightCycler nicht unverdünnt untersucht werden. Auch extrem hohe Konzentrationen an Listerien-DNA ergaben kein positives Signal. Die Extrakte mussten mindestens 1:1 mit A. dest. verdünnt werden. Als optimales Temperatur-Zeitprogramm für die Amplifikation erwies sich eine Zwei-Schritt-PCR mit 10 sec. Denaturierung bei 95 °C und 45 sec. Annealing/Elongation bei 60 °C.

3.2.9 Verkürzung der Nachweiszeit durch Separation der Listerien mittels paramagnetischer listerienbindender Partikel und anschließender nicht selektiver Anreicherung

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass die TaqMan-Nachweise geeignet sind, um *Listeria* spp. auch in komplexen Lebensmitteln, respektive Milchprodukten, nachzuweisen. Sehr niedrige Keimzahlen von 1-10 KbE/25 g führen jedoch erst nach 48 h Anreicherung zuverlässig zu einem positiven PCR-Ergebnis. Da für die praktische Anwendung im Routinelabor möglichst kurze Nachweiszeiten wichtig sind, wurde in weiteren Versuchen eine Methode entwickelt, die Anreicherungszeit durch den Einsatz superparamagnetischer listerienbindender Partikel, die mit der zellwand-bindenden Domäne (CBD) von Lysinen *Listeria*-spezifischer Phagen beschichtet sind, zu verkürzen.
Die Listerien wurden mit Hilfe der superparamagnetischen Partikel aus einer Übernachtanreicherung isoliert (CBD-magnetische Separation, CBD-MS) und anschließend noch einmal in einem nicht selektivem Medium mit optimalen Wachstumsbedingungen für einige Stunden auf Keimzahlen angereichert, die einen zuverlässigen PCR-Nachweis ermöglichen.

3.2.9.1 Materialien

Die verwendeten paramagnetischen listerienbindenden Partikel CBD 500 und CBD 118 wurden freundlicherweise von Prof. Lössner, Institut für Lebensmittel- und Ernährungswissenschaften der ETH Zürich zur Verfügung gestellt. CBD 500 und CBD 118 aus den Phagen A500 beziehungsweise A118 binden jeweils spezifisch an unterschiedliche Serovare verschiedener Listerien-Spezies (**Tab.: 10**).

Tabelle 10: Spezifität von CBD 500 und CBD 118 für unterschiedliche Serovare verschiedener Listerien-Spezies (nach LOESSNER et al., 2002)

CBD 118	*L. monocytogenes* 1/2a; 1/2b; 1/2c *L. seeligeri* 1/2b, 3b *L. welshimeri* 1/2b (*L.grayi* ssp. *grayi*)
CBD 500	*L. monocytogenes* 4a; 4b; 4c; 4d; 4e *L. ivanovii* 5 *L. innocua* 6a; 6b *L. welshimeri* 6a (*L. grayi* ssp. *grayi*)

3.2.9.2 Methodik

Als Probenmatrizes wurden für die Versuche Limburger, pasteurisierte Milch, Salzlake und Umfeldproben untersucht. Insgesamt wurden Versuche mit vier gut untersuchten *Listeria monocytogenes*-Stämmen unterschiedlicher Serovarietäten durchgeführt.
Zunächst wurden die *Listeria monocytogenes* Stämme über Nacht bei 37 °C in BHI angezüchtet und anschließend dezimale Verdünnungsreihen in Ringer-Lösung, ausgehend von einer Keimzahl von 10^9 Keimen/ml in der Übernachtkultur, angefertigt. Die homogenisierten Proben wurden dann jeweils im Doppelansatz mit 1-10 beziehungsweise 10-100 KbE/ml kontaminiert und für 20 h in Halb-Fraser-Medium bei 30 °C bebrütet. Flüssige Umfeldproben (Gullywasser) wurden zuvor zentrifugiert, der Überstand verworfen und das verbleibende Pellet in ca. 25 ml Halbfraser-Medium aufgenommen. Die weitere Behandlung der Proben verlief analog zu den Lebensmittelproben. Im Anschluss an die Bebrütung wurde die CBD-MS durchgeführt. Begleitend wurden die tatsächlichen Keimzahlen der Übernachtkulturen kulturell durch ausplattieren auf PALCAM-Agar ermittelt. Um eventuell auftretende Verluste an *Listeria*-Zellen durch die magnetische Separation oder den mit der CBD-MS verbundenen Waschschritt zu beziffern, wurde aus dem Überstand und der Waschlösung ebenfalls eine Keimzahlbestimmung durchgeführt.

CBD-MS

Nach 20 h Inkubation wurde von jedem Ansatz ein Aliquot von 1 ml entnommen und zunächst der CBD-MS unterzogen. Dazu wurde die entnommene Anreicherung mit jeweils 20 µl einer Suspension der, für das jeweilige Serovar des verwendeten *Listeria monocytogenes*-Stammes spezifischen CBD-Beads versetzt und für eine Stunde in einem Überkopfrotator bei ca. 20 rpm inkubiert. Während dieser Inkubation binden sich die CBD-Beads spezifisch an die Zellwände der Listerien, so dass diese anschließend durch den Einsatz eines Magnetständers von dem Anreicherungsmedium und der Probenmatrix getrennt werden können. Die CBD-Bead-*Listeria monocytogenes*-Komplexe separieren sich an der magnetnahen Gefäßwand und der verbleibende Überstand kann vorsichtig abgenommen werden. Vom Überstand wurden dezimale Verdünnungen erstellt und davon, zur Überprüfung der Effektivität der magnetischen Separation bezüglich eventueller Zielzellenverluste, jeweils 100 µl auf PALCAM-Agar ausplattiert, um eine Keimzahlbestimmung durchzuführen. Die separierten Bead-*Listeria*-Komplexe wurden einem Waschschritt mit 1 ml PBS-*Tween* (0,1 %) unterzogen, wieder im Magnetständer aufgetrennt und jeweils 100 µl von dezimalen Verdünnungen der Waschlösung ebenfalls zur Keimzahlbestimmung auf PALCAM-Agar ausgespatelt. Die Bead-*Listeria*-Komplexe wurden nun in 1 ml TSB+Y-Boullion resuspendiert und zur Erhöhung der Keimzahl für weitere drei Stunden bei 37 °C bebrütet. Im Anschluss daran wurde die DNA-Extraktion mit dem PrepMan™ Ultra Reagenz, wie in Abschnitt **3.2.5.1** beschrieben, durchgeführt.

Obwohl orientierende Versuche zur Entwicklung der Keimzahl über einen Zeitraum von drei bis fünf Stunden eine Zunahme der Keimzahlen nach einer Bebrütungszeit von fünf Stunden um ca. eine Zehnerpotenz im Vergleich zu einer Bebrütung von drei Stunden zeigten, war eine Bebrütungszeit von drei Stunden für einen effektiven Nachweis ausreichend und wurde so für die weiteren Untersuchungen gewählt. Dadurch konnten alle Arbeitsgänge von der CBD-MS bis zur Auswertung der PCR in einem Arbeitstag untergebracht werden und somit ein maximaler Zeitgewinn für die Routineuntersuchung erreicht werden.

Durchführung der PCR

Die TaqMan-PCR wurde analog zu den in Abschnitt **3.2.2.2** beschriebenen Bedingungen in dem Gerät ABI Prism 7700 durchgeführt.

3.2.9.3 Ergebnisse

Keimzahlen nach 20 h Anreicherung bei 30 °C in Halb-Fraser-Medium

In mit 1-10 KbE/ml kontaminierten Proben wurden nach 20 h Anreicherung bei 30 °C in Abhängigkeit vom Spezies, Stamm, Serovar und Probenmatrix Listerienkeimzahlen im Bereich von $5x10^3$ bis $1x10^5$ KbE/ml ermittelt.
Wurden die Proben mit 10-100 KbE/ml kontaminiert, lagen die ermittelten Keimzahlen nach 20 h bei 30 °C im Bereich von $6x10^4$ bis $1x10^6$ KbE/ml.

Effizienz der CBD-MS

Die CBD-MS von *Listeria monocytogenes* erwies sich als zuverlässige und effiziente Methode zur Separation der Listerien aus dem Anreicherungsmedium. Voraussetzung dafür sind eine ausreichend lange Inkubationszeit, während der die CBD-Beads an die *Listeria* Zellen binden, sowie eine große Sorgfalt bei der Abnahme des Überstandes, um keine gebundenen Zellen mit abzunehmen.
Die Keimzahlbestimmungen des Überstandes nach magnetischer Separation sowie der Waschlösung zeigten nur geringfügige Verluste an *Listeria*-Zellen. So lag der durchschnittliche Verlust bei einem Inokulum von 1-10 KbE/ml im Überstand bei 0,31 % beziehungsweise bei 0,16 % ausgehend von 10-100 KbE/ml. Etwas höhere *Listeria*-Zell-Verluste konnten mit 0,7 % (Inokulum 1-10 KbE/ml) beziehungsweise 0,55 % (Inokulum 10-100 KbE/ml) in der Waschlösung festgestellt werden. Damit war keine Beeinträchtigung der Sensitivität des TaqMan-Nachweises aufgrund der Vorbehandlung der Proben mit der CBD-MS zu erwarten.

Einflüsse der CBD-MS auf die TaqMan-PCR

Orientierende Vorversuche zeigten, dass die Anwesenheit der CBD-Beads bei der DNA-Extraktion mittels PrepMan™ Ultra Reagenz keinen störenden Einfluss hat und auch die TaqMan-PCR durch die so gewonnenen Extrakte nicht beeinträchtigt wird.

Ein Vergleich der PCR-Ergebnisse von DNA-Extrakten aus der Voranreicherung (Halb-Fraser nach 20 h Bebrütung) und von Extrakten nach CBD-MS und anschließender nicht-selektiver Anreicherung in TSB+Y zeigte eine deutliche Verbesserung der TaqMan-PCR Ergebnisse bei letzterer Variante. So war ein positives Ergebnis der TaqMan-PCR bis zu sechs PCR-Zyklen früher detektierbar, als bei der gleichen Probe mit DNA-Extraktion nach 20 h Anreicherung (**Tab. 11**).

Hinsichtlich der Sensitivität zeigte sich durch den Einsatz der CBD-MS eine deutliche Verbesserung für den TaqMan-Nachweis von *Listeria monocytogenes* aus komplexen Probenmatrizes. So konnten durch den Einsatz dieser Methode, im Gegensatz zur alleinigen PrepMan™ DNA-Präparation nach 20 h Anreicherung (siehe Abschnitt **3.2.5.2**), in allen mit 1-10 und 10-100 KbE/25 ml beziehungsweise g kontaminierten Milchprodukten und Umfeldproben *Listeria monocytogenes* zuverlässig nachgewiesen werden (**Tab.: 12**). Die gesamte Nachweiszeit, einschließlich CBD-MS, nicht selektiver Anreicherung und TaqMan-PCR, lag bei ca. 29 h (20 + 1 h CBD-MS Inkubation + 1 h Handling + 3 h TSB-Y + 30 min DNA-Extraktion + 2,5 h PCR + 1 h Handling/Auswertung (**Tab.: 13**).

Die Keimkonzentrationen in der Halbfraser Bouillon lagen nach 20 h, abhängig von dem verwendeten *Listeria monocytogenes*-Stamm und der Probenmatrix, im Bereich von $7{,}3x10^{2}$-$1{,}0x10^{5}$ KbE/ml. Nach der nicht-selektiven Anreicherung in TSB-Y wurden Keimkonzentrationen von $3{,}4x10^{4}$-$2{,}3x10^{5}$ KbE/ml erreicht. Fragliche oder falschnegative Resultate traten nicht mehr auf. Die Kombination aus CBD-MS, nicht selektiver Anreicherung und DNA-Extraktion mit der PrepMan™ Ultra Reagenz erwies sich somit als eine sensitive und praktikable Methode für den Nachweis auch geringer Ausgangskontaminationen von *Listeria monocytogenes* in verschiedenen Probenmatrizes.

Tabelle 11: Untersuchung von künstlich kontaminierten Milchprodukten und Umfeldproben nach Anreicherung (jeweils im Doppelansatz) in Halb-Fraser über 20 h, CBD-MS und nicht-selektiver Anreicherung in TSB+Y (3 h 37 °C) mittels TaqMan-PCR zum Nachweis von *Listeria monocytogenes*.

KbE/ 25 ml	**Milch**	**Gullywasser**	**Salzlake**
1-10	+/+	+/+	+/+
10-100	+/+	+/+	+/+

Tabelle 12: Vergleichende Darstellung der Keimzahlen und PCR-Ergebnisse (C_t-Werte) nach 20 h Anreicherung und nach 20 h Anreicherung mit anschließender CBD-MS und nicht selektiver Anreicherung in TSB-Y über 3 h.

Probenmatrix	**Stamm**	**KbE/25 g bzw. ml**	**Keimzahlen 20 h Halb-Fraser**	**Keimzahlen 20 h Halb-Fraser CBD-MS+ 3 h TSB-Y**	**C_t-Wert**	
					20 h Halb-Fraser	**20 h Halb-Fraser CBD-MS+ 3 h TSB-Y**
pasteurisierte Milch	1109	1-10	$1{,}3x10^4$	$1{,}9x10^4$	37,51	36,73
		1-10	$1{,}1x10^4$	$9{,}9x10^3$	38,58	38,05
Gullywasser	1144	1-10	$1{,}0x10^5$	$2{,}3x10^5$	34,10	27,03
		1-10	$6{,}8x10^4$	$1{,}7x10^5$	34,81	28,90
		10-100	$4{,}4x10^5$	$1{,}6x10^6$	30,89	26,35
		10-100	$6{,}1x10^5$	$9{,}0x10^5$	29,38	25,77
Gullywasser	1144	1-10	$3{,}3x10^4$	$9{,}3x10^4$	36,10	29,17
		1-10	$8{,}1x10^4$	$1{,}5x10^5$	36,15	28,73
		10-100	$1{,}1x10^6$	$1{,}9x10^6$	31,03	26,03
		10-100	$8{,}8x10^5$	$1{,}1x10^6$	32,11	25,65
Salzlake	1144	1-10	$7{,}3x10^2$	$3{,}4x10^4$	40,00	34,41
		1-10	0	0	40,00	40,00
		10-100	$1{,}4x10^4$	$4{,}7x10^4$	36,34	29,60
		10-100	$1{,}7x10^4$	$5{,}4x10^5$	36,49	31,43

Tabelle 13: Vergleich der Nachweiszeit für *Listeria monocytogenes* mit und ohne Einsatz der CBD-MS.

Arbeitsschritte	**Mit CBD-MS**	**Ohne CBD_MS**
Anreicherung in Halb-Fraser	20 h	48 h
CBD-MS	2 h	
nicht-selektive Anreicherung in TSB-Y	3 h	
DNA-Extraktion	1 h	1 h
Real-Time PCR	3 h	3 h
Gesamtnachweiszeit	**Ca. 29 h**	**Ca. 52 h**

4 Diskussion

Die amtliche Untersuchungsmethode nach § 64 LFGB zum Nachweis von *Listeria monocytogenes* in Milch und Milchprodukten dauert einschließlich aller Bestätigungsreaktionen bis zu zwölf Tage, ein negatives Ergebnis liegt frühestens nach fünf Tagen vor. Vor allem bei Produkten mit kurzer Haltbarkeit, aber auch im Hinblick auf hohe Lagerkosten sind Verfahren wünschenswert, die ein rasches Screening auf das Vorhandensein von *Listeria monocytogenes* und damit eine schnellere Freigabe von Rohstoffen und Produktionschargen erlauben. Für die betriebliche Eigenkontrolle ist weiterhin die Überprüfung von Umfeldproben und Produkten auf *Listeria* spp. von Bedeutung, da der Nachweis apathogener *Listeria*-Spezies einen Hinweis auf Mängel in der Betriebshygiene geben kann. In den letzten Jahren gab es daher verstärkt Bestrebungen die Nachweiszeit für Listerien zu verkürzen.

In den meisten Veröffentlichungen diente die PCR als methodischer Ansatz zur Optimierung des Nachweises. Dabei stellten Milchprodukte als komplexe Matrizes in vielen Fällen ein Problem für das empfindliche Nachweissystem der PCR dar. ROSSEN et al. (1992) stellten eine vollständige Inhibition der PCR durch Bestandteile von Weichkäse fest, die erst durch Vorbehandlung der Weichkäseproben reduziert werden konnte. Des Weiteren erwiesen sich Caseinbestandteile, die während der PCR koagulieren, Calciumionen (SCHEU et al., 1998), Nukleinsäuren von Bakterien der Begleitflora oder Matrixbestandteilen (GOLDSTEYN et al., 1991), Proteinasen (Trypsin) in Frischmilch (POWELL et al., 1994) sowie Glykogen und Fette (WILSON, 1997) als problematisch. Weitere Probleme für den effizienten Nachweis von *Listeria monocytogenes* in Milchprodukten stellen die, im Vergleich zur Begleitflora, niedrigen Listerien-Keimzahlen, deren ungleichmäßige Verteilung in der Probenmatrix sowie inhibitorische Wirkungen der Begleitflora auf das Listerienwachstum dar. Diesem Problem wird mit unterschiedlichen Vorbehandlungen der Proben und selektiven Anreicherungsschritten begegnet.

4.1 Entwicklung von TaqMan PCR-Methoden für den Nachweis von *Listeria* spp. und von *Listeria monocytogenes*

Auch in der vorliegenden Arbeit war es das Ziel, mittels PCR eine Verkürzung des Listerien-Nachweises in Milchprodukten zu ermöglichen. Allerdings sollten die Vorteile der Real-Time PCR in der Form einer TaqMan-PCR ausgenutzt werden. Die entscheidenden Vorteile des

TaqMan-Systems liegen darin, dass die gesamte Auswertung automatisiert ist und keine weiteren Arbeitsschritte, wie Gelelektrophorese, Hybridisierungsreaktion oder ELISA erforderlich sind. Da die Reaktionsgefäße nach Ablauf der PCR nicht mehr geöffnet werden müssen, ist das Risiko einer Kontamination mit Amplifikaten, das bei vielen auf der PCR beruhenden Techniken ein großes Problem darstellt, minimiert. Als zusätzlichen Sicherheitsfaktor gegenüber einer Kontamination mit Amplifikaten enthalten kommerziell hergestellte, vorkonfektionierte Reagenziengemische, die speziell für das TaqMan-System optimiert wurden, häufig Uracil-N-Glycosidase. Anstelle des Nukleotidbausteins dTTP wird hierbei das Analogon dUTP verwendet, das von der Polymerase in alle Amplifikate eingebaut wird. Das dem Mastermix zugesetzte Enzym spaltet bei einer Temperatur von 50 °C alle dUTP-haltigen Polynukleotide und verhindert so eine Reamplifikation von PCR-Produkten.
Das Enzym selbst wird bei dem initialen Denaturierungsschritt der PCR inaktiviert.
Die Verwendung einer Sonde stellt sicher, dass Fehlamplifikate kein falsch positives Signal verursachen können. Eine zusätzliche Verifizierung positiver Ergebnisse, zum Beispiel durch Restriktionsverdau der Amplifikate, wie sie für PCR-Methoden mit elektrophoretischer Detektion der Amplifikate gefordert wird, erübrigt sich dadurch. Zudem ermöglicht die TaqMan-PCR in der Regel einen empfindlicheren Nachweis als die Gelelektrophorese, da die fluoreszenzoptische Messung niedrigere DNA-Konzentrationen detektiert als die Ethidiumbromidfärbung.
Die Konzeption im Mikrotiterplattenformat erlaubt, je nach Bedarf, einen hohen Probendurchsatz. Außerdem zeichnet sich das TaqMan-System bei den bisher publizierten Methoden durch eine hohe Zuverlässigkeit und Sensitivität aus und wird zudem als robust beschrieben (CHEN et al., 1997)

Um den beteiligten Unternehmen möglichst schnell umsetzbare Methoden zur Verfügung zu stellen, wurde zunächst versucht, eine in der Literatur beschriebene TaqMan-PCR-Methode mit Oligonukleotiden aus dem *iap*-Gen an die Fragestellung des Forschungsvorhabens zu adaptieren (HEIN et al., 2001). Diese Methode eignete sich jedoch auch nach umfangreichen Optimierungsversuchen nicht als Grundlage für eine Routinemethode, so dass völlig neue TaqMan-PCR Nachweise etabliert wurden.

Das häufig für den Listeriennachweis verwendete Gen *iap*, das bei allen *Listeria*-Spezies vorkommt, ermöglicht durch die Auswahl bestimmter Genabschnitte und entsprechender Primer eine Detektion des Genus *Listeria*, von Gruppen von *Listeria* spp., oder aber auch

spezifisch von *Listeria monocytogenes* (BUBERT et al., 1992). Der in der vorliegenden Arbeit entwickelte TaqMan-Nachweis zum Listerien-Screening war so konstruiert worden, dass innerhalb des Amplikons ein variabler Sequenzabschnitt enthalten ist, in dem die verschiedenen Listerienspezies stärker voneinander abweichen. In diesen Abschnitt wurde ein Primer gelegt, der den spezifischen Nachweis von *Listeria monocytogenes* gewährleisten sollte. Somit musste lediglich der Vorwärtsprimer gewechselt werden, um entweder spezifisch *Listeria monocytogenes* oder *Listeria* spp. nachzuweisen. Sonde und Rückwärtsprimer waren für beide Anwendungen gleich.

Der Nachweis auf Basis des *iap*-Gens erwies sich als gut geeignet für das Screening auf *Listeria* spp. Mit *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* und *Listeria seeligeri* werden die wichtigsten milchhygienisch relevanten Listerienspezies erfasst. Bei den anfänglichen Versuchen mit klassischer PCR hatte sich gezeigt, dass die verwendeten Primer alle *Listeria*-Spezies außer *Listeria grayi* ssp. *grayi* erfassen. Von den hochkonservierten Abschnitten des *iap*-Gens, die einen sehr hohen Grad an Übereinstimmung aller Spezies aufweisen, entsprach keiner den spezifischen Anforderungen an eine TaqMan-Sonde. Deshalb wurden die Primer in hochkonservierte Abschnitte gelegt und bei der Sonde wenige Abweichungen toleriert (**Abb. 3**)

Daher erschien die Verwendung von SybrGreen®, einem interkalierenden Farbstoff, der sich unspezifisch an doppelsträngige DNA anlagert, ein geeigneter Ansatz, um bei speziellen Fragestellungen auch den Nachweis des gesamten Genus *Listeria* zu ermöglichen. Dieses bestätigte sich bei der Untersuchung von DNA-Extrakten der verschiedenen Listerienspezies mit der Screening-PCR unter Verwendung von SybrGreen®. Alle Listerienspezies mit Ausnahme von *Listeria grayi* ssp. *grayi* ergaben ein positives Signal. Ob das korrekte Amplifikat gebildet wurde oder ein falsch positives Signal vorliegt, kann durch eine Schmelzkurvenanalyse im Real-Time PCR-Gerät mit einem zusätzlichen Zeitaufwand von etwa 15 min abgeklärt werden. Somit liegt ein geeignetes alternatives Testformat vor, mit dem das gesamte Genus *Listeria* außer *Listeria grayi* ssp. *grayi* erfasst wird. Die Interpretation der Daten erfordert allerdings in diesem Fall etwas mehr Erfahrung.

Der für den spezifischen Nachweis von *Listeria monocytogenes* konstruierte Primer konnte jedoch nicht überzeugen, da immer wieder schwache Kreuzreaktionen mit anderen *Listeria*-Spezies auftraten. Als Zielgen für den spezifischen Nachweis von *Listeria monocytogenes* wurde daher das Listeriolysin-Gen *hlyA* gewählt, das neben *Listeria monocytogenes* nur *Listeria ivanovii* und *Listeria seeligeri* aufweisen. Durch einen Abgleich mit in der GenBank

vorhandenen Sequenzen wurde sichergestellt, dass Primer und Sonde in Abschnitten liegen, in denen möglichst große Abweichungen zu den Listeriolysin-Genen von *Listeria ivanovii* und *Listeria seeligeri* bestehen und zugleich bei *Listeria monocytogenes* möglichst wenige Mutationen vorkommen, um so eine größtmögliche Spezifität für den Nachweis von *Listeria monocytogenes* zu erreichen. Keiner der getesteten Stämme anderer Listerien-Spezies reagierte falsch positiv. In den Rückwärtsprimer wurde eine Wobble-Position (T/A) eingebaut, da ein großer Teil der in der GenBank publizierten *hlyA*-Sequenzen von *Listeria monocytogenes*-Stämmen an dieser Position anstelle eines T ein A aufweisen. Durch die Wobble-Position wurde die Wahrscheinlichkeit reduziert, dass infolge dieser Sequenzabweichung manche *Listeria monocytogenes*-Stämme von den Primern nicht erfasst werden. Von den 34 im Zusammenhang mit der Sensitivitätsprüfung des Nachweises getesteten *Listeria monocytogenes*-Stämmen unterschiedlicher Serovarietäten reagierten alle positiv.

Hinsichtlich der Sensitivität zeigte sich anhand der Untersuchungen an Reinkulturen, dass sowohl die TaqMan-PCR zum Listerien-Screening als auch die für den spezifischen Nachweis von *Listeria monocytogenes* für einen zuverlässigen Nachweis von *Listeria monocytogenes* Keimkonzentrationen im Bereich von 10^4-10^5 KbE/ml erfordern. Keimzahlen, die für einen direkten Listeriennachweis in Milchprodukten erforderlich sind, lagen im gleichen Bereich. Das entspricht, unter Berücksichtigung der Probenaufbereitung und der PCR-Bedingungen, 10^2-10^3 KbE/PCR. Allerdings waren in den mit 1-10 KbE/25 g beziehungsweise 1-10 KbE/25 ml artifiziell kontaminierten Proben von Milch und Milchprodukten, Anreicherungszeiten von bis zu 48 h nötig, um die erforderlichen Keimzahlen zu erreichen und einen sicheren Nachweis zu gewährleisten. Nach 48 h Anreicherung reagierte aber keine der mit niedrigen Keimzahlen kontaminierten Proben mehr falsch negativ. Lange Anreicherungszeiten waren insbesondere bei Camembert und Weichkäse mit Rotschmiere erforderlich. Der Nachweis von Listerien in diesen Käsearten ist besonders problematisch, da hier inhibitorische Einflüsse der Käseflora das Wachstum der Listerien hemmen (SULZER und BUSSE, 1991; LOESSNER, 2000).

Mit den entwickelten Methoden konnten vergleichbare Sensitivitäten wie mit in der Literatur beschriebenen Real-Time PCR-Methoden zum Nachweis von Listerien erreicht werden. NOGVA et al. (2000) konnten mit der von ihnen eingesetzten TaqMan-PCR

6-6x10^3 KbE/PCR in Magermilch nachweisen. BASSLER et al.(1995) benötigten für ein positives Ergebnis der TaqMan-PCR 10^2 KbE/PCR. Bei einer von RODRIGUEZ-LAZARO

et al. (2004) entwickelten Methode waren dagegen bereits drei Kopien für ein positives PCR-Ergebnis ausreichend. Mittels ihrer Real-Time PCR gelang es RUDI et al. (2005) 10-100 KbE/g in Schnittkäse nachzuweisen. Allerdings erfolgte hier die künstliche Kontamination des untersuchten Schnittkäses nur über eine Oberflächenbehandlung, so dass es zu keiner intensiven Verbindung der Keime mit der Matrix kommen konnte. Dies entspricht zwar teilweise dem Verlauf einer natürlichen Kontamination mit *Listeria monocytogenes*, jedoch berücksichtigt es nicht die Möglichkeit problematischer Interaktionen zwischen den Keimen und der Probenmatrix für den Nachweis.

Für die DNA-Extraktion aus Anreicherungskulturen der verschiedenen Milchprodukte hat sich die Verwendung des PrepMan Ultra Reagenz gut bewährt. Bei dieser Probenaufbereitung war die Effizienz der PCR-Reaktion ähnlich der von Reinkulturen. Störende Matrixeffekte wurden nicht beobachtet. Dagegen ergaben sich bei Verwendung des DNeasy Tissue Kits, das auf der Verwendung von Silicasäulchen basiert, wiederholt Probleme mit Kreuzkontaminationen. Grundsätzlich sind für die Routinediagnostik Methoden vorzuziehen, die kostengünstig, gut standardisierbar und relativ wenig arbeitsaufwendig sind. Auch in dieser Hinsicht ist das PrepMan Ultra Reagenz dem DNeasy Tissue Kit überlegen.

4.2 Verkürzung der Nachweiszeit durch Kombination der TaqMan-PCR mit einer Methode zur spezifischen Separation der Listerien

Die für den Nachweis von niedrigen Listerien-Zahlen erforderlichen Anreicherungszeiten waren bei einigen Milchprodukten mit 48 h relativ lang. Eine deutliche Verkürzung der Nachweiszeit wäre für die Anwendung der Nachweissysteme in der Routinediagnostik wünschenswert. Aus diesem Grund wurde die TaqMan-PCR mit einer neuen Technik zur Separation von Listerien kombiniert.

Diese, als CBD-MS bezeichnete, Technik beruht auf dem Einsatz modifizierter Lysine Ply 500 und Ply 118, die von den *Listeria*-Phagen A500 beziehungsweise A118 gebildet werden.

Die Phagenlysine verfügen über einen lytischen und über einen zellwand-bindenden Anteil, wobei letzterer für eine spezifische Separation der Listerien genutzt werden kann. Der C-Terminus, als eine der beiden funktionellen Domänen, enthält die zellwand-bindende Domäne (CBD) und ist für die Spezifität verantwortlich (LOESSNER et al., 2002). Die Proteine werden gentechnisch in *E. coli* exprimiert und können durch Modifikation am N-Terminus an super-paramagnetische Partikel gebunden werden. CBD500 und CBD118 binden jeweils spezifisch an unterschiedliche Serovare verschiedener Listerien-Spezies (**Tab.: 10**;

LOESSNER et al., 2002). Durch eine Kombination beider CBD wird praktisch das gesamte Genus *Listeria* erfasst. Um Material einzusparen, wurde bei den Versuchen mit künstlicher Kontamination jeweils nur der CBD-Typ eingesetzt, der den verwendeten *Listeria*-Stamm erfasste.

Der Einsatz der CBD-MS erwies sich als positiver Ansatz zur Verbesserung der Listerien-Nachweise in Milchprodukten. Durch Einschalten dieses Verfahrens zwischen Selektivanreicherung und DNA-Extraktion ließ sich die Nachweiszeit deutlich verkürzen(Gesamtnachweiszeit 29 h im Vergleich zu 52 h ohne CBD-MS). Ein wesentlicher Vorteil der CBD-MS ist die Möglichkeit der Abtrennung der zu detektierenden Listerien von potentiell die PCR beeinflussenden Lebensmittelbestandteilen und von der Begleitflora in den Proben. Wenn die Listerien über CBD-MS magnetisch separiert werden, liegen sie bedingt durch die hohe Spezifität der CBD-MS in Reinkultur vor (KRETZER, 2006) und können anschließend einer Anreicherung in einem nichtselektiven Medium mit optimalen Wachstumsbedingungen unterzogen werden. Dadurch liegen Listerien-Keimzahlen in einem sicher detektierbaren Niveau nach kürzerer Anreicherungszeit vor. Durch die CBD-MS konnte die Nachweiszeit auf ca. 29 h verkürzt werden. Eine selektive Anreicherung von 48 h, wie sie ohne CBD-MS für komplexere Probenmatrizes erforderlich war, um einen sicheren Nachweis der Listerien in verschiedenen Milchprodukten zu gewährleisten, war nicht mehr notwendig. Da die Bindung der Listerien an die CBD irreversibel ist, war es wichtig zu überprüfen, ob die Anwesenheit der CBD-beschichteten Magnetpartikel die DNA-Extraktion oder die Real-Time PCR beeinträchtigt. Ein negativer Einfluss auf die DNA-Präparation beziehungsweise die PCR-Reaktion war dabei nicht feststellbar.

Unter den zahlreichen Arbeiten zur Verbesserung der Effektivität des Listerien-Nachweises findet sich als vergleichbarer Ansatz die immunomagnetische Separation (IMS), bei der durch den Einsatz spezifischer Antikörper, die ebenfalls an Magnetpartikel gekoppelt werden, versucht wird *Listeria monocytogenes* spezifisch zu isolieren.

Die CBD-MS erwies sich in der vorliegenden Arbeit der IMS als überlegen, da die Zielzellverluste bei der Probenaufbereitung im Vergleich zu publizierten Methoden unter Verwendung der IMS deutlich geringer ausfielen. So erreichten UYTTENDAELE et al. (2000) nach dem Einsatz von Dynabeads® Anti-Listeria nur Wiederfindungsraten von ca. 5 %. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von FLUIT et al. (1993), in denen die immunomagnetische Separation nach 48 h Anreicherung mit der PCR kombiniert wurde. Hier wurden ebenfalls nur Wiederfindungsraten für *Listeria monocytogenes* von 5-15 % erreicht. UYTTENDAELE et al. (2000) sehen für den Einsatz der

immunomagnetischen Separation zur Isolierung und Konzentration von *Listeria monocytogenes* aus Käse die hohe Viskosität der Suspension aus konzentrierten Bakterien und kleinen Probenpartikeln als problematisch an. Dies führte zu Problemen bei der magnetische Separation der Dynabeads®, wodurch nur eine teilweise Wiederfindung der Dynabeads® und damit der Listerien ermöglicht werden konnte. Auch vorherige Zentrifugationsschritte und Verdünnungen der Suspension konnten zu keiner Verbesserung der Detektion niedriger Keimzahlen führen. Diese Probleme traten beim Einsatz der CBD-MS nicht auf und auch die Verlustraten waren mit Raten von 0,16-0,31 % im Überstand beziehungsweise 0,55-0,7% in der Waschlösung vernachlässigbar gering.

Für die Anwendbarkeit der Methode in der Routine war die Integration einer internen Positivkontrolle (IPC) in den PCR-Ansatz wichtig. Eventuell PCR-inhibierende Einflüsse von Probenbestandteilen, wie zum Beispiel der hohe Gehalt an Proteinen und verschiedenen Ionen in Milch und Milchprodukten und daraus resultierende falsch negative Ergebnisse lassen sich so erkennen. Denn die PCR der IPC läuft unabhängig von der PCR für den Listerien-nachweis in dem selben Reaktionsgefäß ab, so dass eine fehlende Amplifikation der IPC auf hemmende Einflüsse von Probenbestandteilen hindeutet und so eine Fehlinterpretation der PCR in Form eines falschnegativen Ergebnisses vermieden werden kann. Somit lässt sich kostengünstig mit geringem materiellem Aufwand die Verlässlichkeit der Untersuchungsergebnisse erheblich verbessern.

Da mittlerweile zahlreiche Real-Time PCR-Geräte von unterschiedlichen Herstellern auf dem Markt sind, erwies es sich als sinnvoll für die Umsetzung der TaqMan-Nachweise in die Praxis, die Kompatibilität und Übertragbarkeit auf andere Real-Time PCR-Geräte zu untersuchen. Daher erfolgten im Rahmen von Vorführungen anderer Real-Time Geräte verschiedener Hersteller am Institut, Versuche zur Übertragbarkeit des TaqMan-Nachweissystemes. So wurden Geräte der Firmen Roche-Diagnostics (LightCycler®), Stratagene (MX 3000®), sowie BioRad (i-Cycler®) getestet. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Real-Time Geräten liegen unter anderem in der Bauweise, den Lichtquellen, mit denen die Fluorophore angeregt werden, sowie den Durchsatzraten. Für die Vergleichsuntersuchungen wurden dezimale Verdünnungen von DNA-Extrakten von *Listeria*-Reinkulturen vergleichend auf dem ABI 7700 und den anderen Real-Time Geräten untersucht und die Effizienz verglichen.

Die Nachweise waren ohne weitere Adaptation auf dem Gerät MX 3000® der Fa. Stratagene und auf dem i-Cycler® der Fa. BioRad einsetzbar.

Für die Verwendung auf dem LightCycler® der Fa. Roche waren aufgrund der völlig anderen Temperaturkinetik dieses Gerätes eine Adaptation des Temperatur-Zeit-Programms und eine Modifikation der Probenaufbereitung erforderlich. Da das Gerät der Fa. Roche über längere Zeit zur Verfügung stand, wurden, neben den Untersuchungen mit *Listeria*-Reinkulturen, auch künstlich kontaminierte Proben von Milchprodukten untersucht.

Sowohl der Listerien-Nachweis mit Reinkulturen, als auch der in Milchprodukten erwies sich, unter Berücksichtigung des modifizierten PCR-Programmes und der erforderlichen Verdünnung der Extrakte, als gut auf den LightCycler® übertragbar.

Insgesamt wurden somit im Rahmen dieser Arbeit zuverlässige Real-Time PCR-Methoden sowohl für den Nachweis von *Listeria monocytogenes* als auch für den Nachweis von *Listeria* spp. entwickelt. Beide Nachweise können sowohl mit 48 h Anreicherung als auch in verkürzter Form mit der CBD-MS angewendet werden und ermöglichen so eine erheblich kürzere Untersuchungszeit als der kulturelle Nachweis nach § 64 LFGB. Obwohl der Einsatz der CBD-MS keinerlei Probleme für die TaqMan-PCR mit sich brachte, ist, trotz der positiven Ergebnisse, zur Überprüfung der Anwendbarkeit auf andere Milchprodukte sowie Umfeldproben eine weitere Validierung erforderlich.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Real-Time PCR-Verfahren auf Basis des TaqMan-Systems für die Detektion von *Listeria* spp. und von *Listeria monocytogenes* entwickelt und hinsichtlich der Anwendbarkeit für den Nachweis von Listerien in Milcherzeugnissen und Umfeldproben überprüft.

Der genusspezifische Nachweis für *Listeria* spp. erfasst mit *Listeria monocytogenes, Listeria innocua* und *Listeria seeligeri* die wichtigsten und am häufigsten in Milchprodukten nachgewiesenen Listerienspezies. Wenn im gleichen Nachweissystem anstelle der fluoreszenzmarkierten TaqMan-Sonde der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SybrGreen verwendet wird, kann das gesamte Genus *Listeria*, mit Ausnahme von *Listeria grayi* ssp. *grayi*, nachgewiesen werden. Der speziesspezifische Nachweis für *Listeria monocytogenes* erfasst alle getesteten Stämme dieser Spezies (n = 34) und reagierte mit keiner anderen Spezies falsch positiv. Bei der Untersuchung von Reinkulturen waren für beide Nachweissysteme Keimzahlen von 10^4-10^5 KbE/ml für einen sicheren Nachweis erforderlich.

Nach der erfolgreichen Etablierung der Nachweise für Reinkulturen wurden künstlich kontaminierte Milchprodukte untersucht. Es wurden sowohl unproblematische Matrizes wie pasteurisierte Vollmilch als auch Produkte mit einem hohen Gehalt an Begleitflora wie Weichkäse untersucht. Hierbei waren für einen zuverlässigen Nachweis niedriger Listerienzahlen von 1-10 KbE/g, aufgrund inhibitorischer Einflüsse einiger Probenmatrizes sowie der Begleitflora auf das Listerienwachstum, Anreicherungszeiten in Halb-Fraser von bis zu 48 h erforderlich. Eine negative Beeinflussung der PCR-Nachweise durch Probenbestandteile wurde nicht beobachtet, wenn die Proben mit dem PrepMan Ultra™ Reagenz aufbereitet wurden.

Eine deutliche Verkürzung der Nachweiszeit in problematischen Probenmatrizes konnte durch Separation der Listerien aus der selektiven Anreicherungskultur mittels paramagnetischer Partikel, die mit listerienbindenden Proteinen aus *Listeria*-spezifischen Phagen beschichtet sind (CBD-MS; KRETZER, 2006), erreicht werden. Die separierten Listerien wurden nach einem kurzen nicht selektiven Anreicherungsschritt (3 h in Trypton-Soja- Bouillon mit Hefeextrakt) mit dem PrepMan Ultra Reagenz aufbereitet und in der PCR eingesetzt. Mit dieser Methode konnte die selektive Anreicherung auf 20 h und die Gesamtnachweiszeit auf 29 h reduziert werden.

6 Summary

Shortening and optimization of the detection of Listeria in dairy products using real-time PCR

In this project real-time PCR methods based on the TaqMan principle for the detection of *Listeria* spp. and of *Listeria monocytogenes* have been developed and tested for their applicability for the detection of Listeria in dairy products and environmental samples.

The genus specific system detects with *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, and *Listeria seeligeri* the Listeria which are most important and most frequently present in dairy products. If in this system the intercalating dye SybrGreen is used instead of the TaqMan probe, it is possible to detect the complete genus *Listeria* with the exception of *Listeria grayi* spp. *grayi.* The species specific detection system for *Listeria monocytogenes* detected all tested strains of this species (n = 34) and did not react false positive with strains of any other species. When using pure cultures, for both detection systems bacterial counts of 10^4-10^5 cfu/ml have been necessary for reliably positive results.

After the methods had been established by using pure cultures, artificially contaminated dairy products have been tested. Uncritical matrices like pasteurized milk have been used as well as products with high numbers of accompanying flora as soft cheese. For the reliable detection of low numbers of Listeria of 1-10 cfu/g, up to 48 h enrichment culture in half Fraser bouillon was necessary, due to inhibitory effects of some matrices and of the accompanying flora on the listerial growth rate. No inhibitory effects of sample components on the PCR have been noticed, when using the PrepMan Ultra reagent for sample preparation.

The detection time in problematic matrices could be considerably shortened, when the Listeria were separated from the enrichment culture by paramagnetic particles which were coated with Listeria binding proteins from *Listeria* specific phages (CBD-MS, KRETZER, 2006). After a short non selective enrichment culture (3 h in tryptic soy broth) the separated Listeria have been extracted with the PrepMan Ultra reagent and tested with the PCR. With this method the selective enrichment culture could be reduced to 20 h and the total detection time was 29 h.

7 Literaturverzeichnis

AGERSBORG, A., R. DAHL, I. MARTINEZ. 1997.
Sample preparation and DNA extraction procedures for polymerase chain reaction identification of *Listeria monocytogenes* in seafoods.
Int. J. Food Microbiol. 35: 275-280

ALLMANN, M., C. HÖFELEIN, J. LÜTHY, R. MEYER, C. NIEDERHAUSER, B. WEGMÜLLER, U. CANDRIAN. 1995.
Polymerase chain reaction (PCR) for detection of pathogenic microorganisms in bacteriological monitoring of dairy products.
Res. Microbiol. 146: 85-97

AZNAR, R., B. ALARCÓN. 2003.
PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity.
J. Appl. Microbiol. 95: 958-966

BANSAL, N. S., F. H. Y. MCDONELL, A. SMITH, G. ARNOLD, G. F. IBRAHIM. 1996.
Multiplex PCR assay for the routine detection of *Listeria* in Food.
Int. J. Food. Microbiol. 33: 293-300

BASSLER, H. A., S. J. A. FLOOD, K. J. LIVAK, J. MARMARO, R. KNORR, C. A. BATT. 1995.
Use of a Fluorogenic Probe in a PCR-Based Assay for the Detection of *Listeria monocytogenes*.
Appl. Environ. Microbiol. 61: 3724-3728

BECKER, H., G. SCHALLER, S. EBERHARDT, M. FAROUQ, E. MÄRTLBAUER. 1998.
Nachweis einiger pathogener Mikroorganismen in Lebensmitteln mit kommerziellen Testkits-Teil 2: Nachweis von Listerien.
Arch. Lebensmittelhyg. 49: 30-34

BEUMER, R. R., W. C. HAZELEGER. 2002.
Listeria monocytogenes: diagnostic problems.
FEMS Immunology and Medical Microbiology 35 (2003): 191-197

BESSESEN, M. T., Q. LUO, H. A. ROTBART, M. J. BLASER and R. T. ELLISON III. 1990
Detection of *Listeria monocytogenes* by Using the Polymerase Chain Reaction.
Appl. Environ. Microbiol. 56: 2930-2932

BHADURI, S., B. COTTRELL. 2001
Sample preparation methods for PCR detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* on beef chuck shoulder using a single enrichment medium.
Molecular and Cellular Probes 15: 267-274

BHAGWAT, A. A. 2003.
Simultaeneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains by real-time PCR.
Int. J. Food Microbiol. 84: 217-224

BLAIS, B. W., L. M. PHILLIPE. 1993.
A Simple RNA Probe System for Analysis of *Listeria monocytogenes* Polymerase Chain Reaction Products.
Appl. Environ. Microbiol. 59: 2795-2800

BSAT, N., C. A. BATT. 1993.
A combined modified reverse dot-blot and nested PCR assay for the specific non-radioactive detection of *Listeria monocytogenes*.
Mol. Cell. Probes 7: 199-207

BUBERT, A., S. KÖHLER and W. GOEBEL. 1992.
The Homologous and Heterologous Regions within the *iap* Gene Allow Genus- and Species-Specific Identifikation of *Listeria* spp. by Polymersase Chain Reaction.
Appl. Environ. Microbiol. 58: 2625-2632

CADY, N. C., S. STELICK, M. V. KUNNAVAKKAM, C. A. BATT. 2005.
Real-Time PCR detection of *Listeria monocytogenes* using an integrated microfluidics platform.
Sensors and Actuators B 107: 332-341

CANDRIAN, U. 1995.
Polymerase chain reaction in food microbiology.
J. Microbiol. Meth. 23: 89-103

CHEN, S., A. YEE, M. GRIFFITH, C. LARKIN, C. T. YAMASHIRO, R. BEHARI, CH. PASZKO-KOLVA, K. RAHN, S. A. DE GRANDIS. 1997.
The evaluation of a fluorogenic polymerase chain reaction assay for the detection of *Salmonella* species in food commodities.
Int. J. Food Microbiol. 35: 239-250

COORAY, K. J., NISHIBORI, T., XIONG, H.; MATSUYAMA, T., FUJITA, M.; MITSYAMA, M. 1994.
Detection of multiple virulence-associated genes of *Listeria monocytogenes* by PCR in artificially contaminated milk samples.
Appl. Environ. Microbiol. 60: 3023-3026

COX, T., C. FRAZIER, J. TUTTLE, S. FLOOD, L. YAGI, C. T. YAMASHIRO, R. BEHARI, C. PASZKO, R. J. CANO. 1998.
Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in dairy samples utilizing a PCR-based fluorogenic 5´ nuclease assay.
J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 21: 167-174

CUMMINS, A. J., A. K. FIELDING, J. MCLAUCHLIN. 1994.
Listeria ivanovii infection in a patient with AIDS.
J. Infect. 28: 89-91

DATTA, A. R., B. A. WENTZ, J. RUSSEL. 1990.
Cloning of the Listeriolysin O Gene and Development of Specific Gene Probes for *Listeria monocytogenes*.
Appl. Environ. Microbiol. 56: 3874-3877

FARBER, J. M. and P. I. PETERKIN 1991.
Listeria monocytogenes, a Food-Borne Pathogen
Microbiological Reviews, Sept. 1991, p. 476-511

FLUIT, A. C., R. TORENSMA, M. J. C. VISSER, C. J. M. AARSMAN, M. J. J. G. POPPELIER, B. H. I. KELLER, P. KLAPWIJK and J. VERHOEF. 1993.
Detection of *Listeria monocytogenes* in Cheese with the Magnetic Immuno-Polymerase Chain Reaction Assay.
Appl. Environ. Microbiol. 59: 1289-1293

FURRER, B., CANDRIAN, U., HOEFELEIN, C. H., LEUTHY, J. 1991.
Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by in vitro amplification of haemolysin gene fragments.
J. Appl. Bacteriol. 70: 372-379

GELLIN, B. G., C. V. BROOME, W. F. BIBB, R. E. WEAVER, S. GAVENTA, L. MASCOLA and THE LISTERIOSIS STUDY GROUP. 1991
The epidemiology of listeriosis in the United States 1986.
Am. J. Epidemiol. 133: 392-401

GOLDSTEYN THOMAS, E. J., R. K. KING, J. BURCHAK, V. P. J. GANNON. 1991.
Sensitive and Specific Detection of *Listeria monocytogenes* in Milk and Ground Beef with the Polymerase Chain Reaction.
Appl. Environ. Microbiol. 57: 2576-2580

GOODWIN, D., S. LEE. 1993.
Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR.
Biotechniques 15: 438-444

GRAY, M. L. and A.H. KILLINGER. 1966.
Listeria monocytogenes and listeric infections
Bacteriol. Rev. 30: 309-382

HEIN I., D. KLEIN, A. LEHNER, A. BUBERT, E. BRANDL, M. WAGNER. 2001.
Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay.
Res. Microbiol. 152: 37-46

HENRY, B. S. 1933.
Dissociation in the genus Brucella.
J. Infect. Dis. 52: 374-402

JONES, D. and H. P. R. SEELIGER. 1987.
International Committee on Systematic Bacteriology - Subcommittee on the Taxonomy of Listeria, Brochothrix and Erysipelothrix.
Minutes of the meeting, September 7-8, 1986, Manchester
Int. J. Syst. Bacteriol. 37: 176

JUTTILA, J. R., S. I. NIEMALA and J. HIRN. 1988.
Minimum growth temperature of *Listeria monocytogenes* and non haemolytic Listeria.
J. Appl. Bacteriol. 65: 321-327

KLIMA, R. A. and T. MONTVILLE. 1995.
The regulatory and industrial responses to listeriosis in the USA: A paradigm for dealing with emerging foodborne pathogens.
Trends Food. Sci. Techn. 6: 87-93

KRETZNER, J.W. 2006.
Novel Bacteriophage-Based Detection Methods for *Listeria* in Foods.
Diss. ETH Zürich No 16483

LANTZ, P.-G., F. TJERNELD, E. BORCH, B. HAHN-HÄGERDAL, P. RADSTRÖM. 1994.
Enhanced Sensitivity in PCR Detection of *Listeria monocytogenes* in Soft Cheese through Use of an Aqueous Two-Phase System as a Sample Preparation Method.
Appl. Environ. Microbiol. 60: 3416-3418

LEVIN, R. E. 2003.
Application of the Polymerase Chain Reaction for Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods: A Review of Methodology.
Food Biotechn. 17: 99-116

LI, Y., A. MUSTAPHA. 2002.
Evaluation of four template preparation methods for polymerase chain reaction-based detection of *Salmonella* in ground beef and chicken.
Lett. Appl. Microbiol. 35: 508-512

LOESSNER, M. J., R. B. INMAN, P. LAUER, R. CALENDAR. 2000.
Complete nucleotide sequence, molecular analysis and genome structure of bacteriophage A118 of *Listeria monocytogenes*: implications for phage evolution.
Mol. Microbiol. 35: 324-340

LOESSNER, M. J., K. KRAMER, F. EBEL, S. SCHERER. 2002
C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates.
Mol. Microbiol. 44: 335-349

LONGHI, C., A. MAFFEO, M. PENTA, G. PETRONE, L. SEGANTI, M. P. CONTE. 2003.
Detection of *Listeria monocytogenes* in Italian-style soft cheeses.
J. Appl. Microbiol. 94: 879-885

MC LAUCHLIN, J. 1990.
Human listeriosis in Britain, 1967-85 a summary of 722 cases. 2. Listeriosis in non-pregnant individuals, a changing pattern of infection and seasonal incidence.
Epidemiol. Infect. 104: 191-201

MCLAUGHLIN J., R. T. MITCHELL, W. J. SMERDON, K. JEWELL. 2004.
Listeria monocytogenes and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods.
Int. J. Food Microbiol. 92: 15-33

MURRAY, E. G. D., R. A. WEBB and M. B. R. SWANN. 1926.
A disease of rabbits characterized by large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undiscribed bacillus, *Bacterium monocytogenes* (n. sp.).
J. Pathol. Bacteriol. 29: 407-439

NIEDERHAUSER, C., U. CANDRIAN, C. HÖFELEIN, M. JERMINI, H.-P. BÜHLER, J. LÜTHY. 1992.
Use of Polymerase Chain Reaction for Detection of *Listeria monocytogenes* in Food.
Appl. Environ. Microbiol. 58: 1564-1568

NIEDERHAUSER, C., J. LÜTHY, U. CANDRIAN. 1994.
Direct detection of *Listeria monocytogenes* using paramagnetic bead DNA extraction and enzymatic DNA amplification.
Molecular and Cellular Probes 8: 223-228

NIEMAN, R. E. and B. LORBER. 1980.
Listeriosis in adults: a changing pattern.
Report of eight cases and review of the literature 1968-1978.
Rev. Infect. Dis. 2: 207-227

NOGVA, H. K., K. RUDI, K. NATERSTAD, A. HOLCK, D. LILLEHAUG. 2000
Application of 5´-Nuclease PCR for Quantitative Detection of *Listeria monocytogenes* in Pure Cultures, Water, Skim Milk, and Unpasteurized Whole Milk.
Appl. Environ. Microbiol. 66: 4266-4271

NORTON, D. M.; C. A. BATT. 1999.
Detection of Viable *Listeria monocytogenes* with a 5´ Nuclease PCR Assay.
Appl. Environ. Microbiol. 65: 2122-2127

PITCHER D. G., N. A. SAUNDERS, R. J. OWEN. 1989.
Rapid extraction of bacterial genomic DNA with Guanidium Thiocyanate.
Let. Appl. Microbiol. 8: 151-156

PORTNOY, D. A., T. CHAKRABORTY, W. GOEBEL, P. COSSART. 1992.
Molecular Determinants of *Listeria monocytogenes* Pathogenesis.
Inf. and Imm. 60: 1263-1267

POWELL, H. A., C. M. GOODING, S. D. GARRETT, B. M. LUND, R. A. MCKEE. 1994.
Inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the Polymerase Chain Reaction.
Let. Appl. Microbiol. 18: 59-61

ROCOURT, J., A. SCHRETTENBRUNNER, H. HOF, E. P. ESPACE. 1987.
Listeria seeligeri, a new species of the genus *Listeria*.
Pathol. Biol. 35: 1075-1080

ROCOURT, J., 1988.
Taxonomy of the genus Listeria
Infection 16 (Suppl. 2): S89-S91

ROCOURT, J., P. BOERLIN, F. GRIMONT, C. JAQUET, J. C. PIFFARETTI. 1992.
Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*.
Int. J. Syst. Bacteriol. 42: 171-174

RODRIGUEZ-LÁZARO, D., M. HERNÁDEZ, M. PLA. 2004.
Simultaneous quantitative detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* using a duplex real-time PCR-based assay.
FEMS Microbiology Letters 233: 257-267

RODRIGUEZ-LÁZARO, D., A. JOFRÉ, T. AYMERICH, M. HUGAS, M. PLA. 2004.
Rapid Quantitative Detection of *Listeria monocytogenes* in Meat Products by Real-Time PCR.
Appl. Environ. Microbiol. 70: 6299-6301

RODRIGUEZ-LÁZARO, D., M. D´AGOSTINO, A. HERREWEGH, M. PLA, N. COOK, J. IKONOMOPOULOS. 2005.
Real-Time PCR-based methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in water and milk.
Int. J. Food Microbiol. 101: 93-104

ROSSEN L., P. NORSKOV, K. HOLMSTROM, O. F. RASMUSSEN. 1992.
Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions.
Int. J. Food Microbiol. 17: 37-45

RUDI, K., K. NATERSTAD, S. M. DROMTORP, H. HOLO. 2005.
Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* on gouda-like cheeses by real-time PCR.
Let. Appl. Microbiol. 40: 301-306

SCHEU, P. M., K. BERGHOF, U. STAHL. 1998.
Detection of pathogenic and spoilage micro-organisms in food with the polymerase chain reaction.
Food Microbiol. 15: 13-31

SCHMIDT-WOLF, G., H. P. R. SEELIGER and A. SCHRETTEN-BRUNNER. 1987.
Menschliche Listeriose Erkrankungen in der BRD 1969-1985.
Zentrbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. Ser. A 265: 472-486

SEELIGER, H. P. R., 1984.
Modern taxonomy of the Listeria group - relationship to its pathogenicity.
Clin. Invest. Med. 7: 217-221

SIMON, M. C., D. I. GREY, N. COOK. 1996.
DNA extraction and PCR methods for the detection of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon.
Appl. Environ. Microbiol. 62: 822-824

SKJERVE, E., L. M. RORVIK, O. OLSVIK. 1990.
Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods by Immunomagnetic Separation.
Appl. Environ. Microbiol. 56: 3478-3481

STEINMEYER, S. 1988.
Untersuchungen zu Pathogenität, Hitzeresistenz und Acriflavinempfindlichkeit von Listerienstämmen.
Diss. med. vet., München

STEVENS, K. A., L.-A. JAYKUS. 2004
Bacterial Separation and Concentration from Complex Sample Matrices: A Review.
Crit. Rev. Microbiol. 30: 7-24

STRYER, L. 1995:
Die Erforschung der Gene.
In: STRYER, L.: Biochemie, S. 138-139.
Spektrum Akad. Verl. 1996: Heidelberg, Berlin, Oxford

SULZER, G., M. BUSSE. 1991.
Growth.Inhibition of *Listeria* spp. on camembert cheese by bacteria producing inhibitory substances.
Int. J. Food Microbiol. 14: 287-296

UYTTENDAELE, M., I. VAN HORDE, J. DEBEVERE. 2000
The use of immuno-magnetic separation (IMS) as a tool in a sample preparation method for direct detection of *L. monocytogenes* in cheese.
Int. J. Food Microbiol. 54: 205-212

WAGNER, M., M. SCHMID, S. JURETSCHKO, K.-H. TREBESIUS, A. BUBERT, W. GOEBEL, K.-H. SCHLEIFER. 1998.
In situ detection of a virulence factor mRNA and 16S rRNA in *Listeria monocytogenes*.
FEMS Microbiol. Let. 160: 159-168

WALKER, S. J. and M. F. Stringer. 1987.
Growth of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* at chill temperatures.
J. Appl. Bacteriol. 63: R20

WHEATCROFT R., R. J. WATSON. 1988.
A positive strain identification method for *Rhizobium meliloti*.
Appl. Environ. Microbiol. 54: 574-576

WILFINGSEDER, D. and H. STOIBER. 2002.
Quantifizierung von PCR-Produktmengen durch real-time PCR-Verfahren.
Antibiotika Monitor 18. Jahrgang 1/2/02

WILSON, I. G. 1997.
Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification.
Appl. Environ. Microbiol. 63: 3741-3751

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich

bei Herrn Prof. Dr. E. Märtlbauer für die Überlassung des Themas und der Bereitstellung der Materialien,

beim Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) und dem Bundesministerium für Wirtschaft und Arbeit/AiF für die finanzielle Unterstützung,

bei Frau Dr. Ch. Bürk für die gute Betreuung und die Bewahrung des Überblicks,

bei den Mitarbeitern des Instituts für Hygiene und Technologie der Milch der LMU München für die Beantwortung der vielen Fragen sowie der Bereitschaft der praktischen Unterstützung,

ein ganz besonderer Dank gilt Frau Susanne Eberhardt und Frau Ute Ritzerfeld für den moralischen Beistand sowie die überaus kompetente und zielgerichtete Unterstützung bei speziellen kulturellen und praxisnahen Fragestellungen, ohne die so manches Problem ungelöst geblieben wäre,

bei meinen Eltern für die aufgebrachte Geduld, sowie bei meiner Schwester für das Korrekturlesen

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Vor- und Familienname:	Matthias Völzke
Geburtstag:	30.12.1974
Geburtsort:	Brake/Unterweser
Eltern:	Manfred Völzke und Karin Völzke, geb. Toepsch

Schulbildung:

September 1981 bis Juli 1985:	Grundschule „Marienschule Kleve“
August 1985 bis Juni 1995:	Johanna-Sebus-Gymnasium in 47533 Kleve mit Abitur
Oktober 1995 bis Juli 1996:	Wehrdienst

Berufsausbildung:

November 1996 bis April 2002:	Studium der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
September 1997:	Vorphysikum
September 1998:	Physikum
September 1999:	erster Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung
Oktober 2000:	zweiter Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung
April 2002:	dritter Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung

Berufstätigkeit:

Ab Mai 2002:	Nachtdienstvertretungen in der Tierärztlichen Klinik Dr. Röcken in Starnberg; Dissertation im Institut für Hygiene und Technologie der Milch der Ludwig-Maximilians-Universität München in Oberschleißheim
Juni 2005:	Sprechstundenvertretung in der Kleintierpraxis Dr. Beate Benedikt in Odelzhausen
seit Oktober 2005:	Assistent in der Tierärztlichen Klinik für Kleintiere Dr. Bitter in Oldendorf