



Nachweis von lebendigen Bakterien (mittels 'in-Kultur' real-time Detection)

SOP281

(2. Version)

Änderungen:

Version	Änderungen	Grund
2	Überarbeitung der Medien	Zum Teil werden Medien von anderen Anbietern verwendet. Überarbeitung der Bestellnummern.

Verfasser: C. Bagutti

Die Entwicklung dieser Methode wurde zum Teil durch das BAG finanziert.

Erstellt		Freigegeben		Version-Nr.:	Dateiname:
am	durch	am	durch		
26/7/17	Bz	30.7.13	EL	2	SOP281_2-4289708338.doc

1 EINLEITUNG

1.1 ZWECK

Diese Methode beschreibt ein Routineverfahren zur Ermittlung der Lebendigkeit von Bakterien aus Flüssigkeiten (z.B. Wischproben).

1.2 ANWENDUNGSBEREICH

Wird der Gehalt einer bestimmten Bakterien-DNA in einer Flüssigkeit mittels 'real-time' PCR Detektionssystem bestimmt, kann mit dieser Methode festgestellt werden, ob ein Teil dieser DNA von noch lebenden Bakterien stammt. Die DNA Extraktion erfolgt dabei nach einer in SOP337 beschriebenen Methode und die 'real-time' PCR wird gemäss des entsprechenden Spezies-spezifischen Verfahrens durchgeführt (z.B. SOP280, SOP330).

Bei den Flüssigkeiten handelt es sich z.B. um Wischproben, die gemäss SOP279 von Laboroberflächen gewonnen wurden. In diesem Fall kann die ursprüngliche Menge DNA in der Wischprobe als Grad der Kontamination angesehen werden. Mit dem hier beschriebenen Verfahren kann danach zusätzlich festgestellt werden, ob sich mindestens zum Teil noch lebendige Bakterien in diesen Wischproben befinden.

2 PRINZIP

Das Prinzip der 'in-Kultur' 'real-time' PCR basiert auf der Zunahme der DNA während des Wachstums der Bakterien in einer Anreicherungskultur. Um eine Zunahme feststellen zu können, wird vor der Anzucht eine Nullpunktsprobe (= **Direktprobe**) genommen. Die Suspension oder im Falle von Wischproben, die von der Laboroberfläche gewonnene Bakteriensuspension (SOP279), wird danach unter Wachstumsbedingungen inkubiert. Dies erfolgt je nach Spezies gemäss Lebensmittelhandbuch oder der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) zwischen 8 und 48 Stunden. Nach der Inkubation wird die sogenannte **Anreicherungsprobe** entnommen.

Von beiden Proben wird gemäss SOP337 die DNA extrahiert und mittels 'real-time' PCR-Verfahren (z.B. für *Campylobacter* SOP280; für *Pseudomonas aeruginosa* SOP330) die Menge an Spezies-spezifischer DNA gemessen. Eine Zunahme dieser DNA, d.h. eine Verringerung des cT Wertes in der PCR Amplifikation wird als positiver Lebendnachweis gewertet. Dieser weist darauf hin, dass in der ursprünglichen Flüssigkeit mindestens zum Teil noch lebendige Bakterien vorhanden waren. Eine Vergrößerung oder ein Gleichbleiben des cT Wertes hingegen lässt darauf schliessen, dass in der Direktprobe nur DNA von toten oder zerstörten Bakterien nachgewiesen worden ist.

3 PRÜFEINRICHTUNGEN

(Wenn nicht mit einem * markiert, können auch Materialien, Geräte, Chemikalien und Lösungsmittel anderer Lieferanten resp. Hersteller verwendet werden.)

3.1. MATERIAL & GERÄTE

(Kunststoff- und Glasmaterialien müssen vor der Verwendung sterilisiert werden. Die Verwendung von aerosolgeschützten Pipettenspitzen dient als Schutz vor Kontamination.)

- Vortex (z.B. Merck)
- diverse Kolbenhubpipetten
- Latex- oder Nitrilhandschuhe (puderfrei)
- Verbrauchsmaterial:
 - aerosolgeschützte Pipettenspitzen (diverse)
 - 15 ml granulierte Plastikröhrchen mit verschraubbarem oder einklickbarem Plastikdeckel (Typ Falcon; z.B. Fischer Scientific Art. Nr. N47188)
 - Eppendorf Reaktionsgefässe 1.5 ml
 - Drigalski (z.B. Milian Art. Nr. CO174CS05)
- Brutschrank (z.B. MMM Medcenter Typ Incucell 55)

3.2 REAGENZIEN

(Es sind grundsätzlich analysenreine, für die Molekularbiologie geeignete Reagenzien zu verwenden.)

- Spezifisches (Anreicherungs)Medium, welches für das Wischprozedere verwendet wird (Bsp.):

Spezies	Medium	möglicher Lieferant
Campylobacter [#]	Campylobacter Enrichment Broth (CEB) mit Skirrow Antimicrobial Supplement mit Campylobacter Growth Suppl.	Masciabrunelli Biolife 401286B2 Masciabrunelli Biolife 421840016 Masciabrunelli Biolife 421840021
Salmonella	Peptone Wasser	Oxoid BO1067S
P. aeruginosa		
S. aureus	Tryptone Soya Broth (TSB)	Oxoid BO0351M
S. pneumoniae*		

- Spezifischer Agar, welcher für das Ausstreichen der Referenzkurve verwendet wird (Bsp.):

Spezies	Agarplatten	möglicher Lieferant
Campylobacter [#]	Campyloset	Biomérieux 43361
Salmonella		
P. aeruginosa	Blutagar (Columbia Agar mit Schafsblut)	Oxoid PB5039A
S. aureus		
S. pneumoniae*		

[#] Benötigt ein mikroaerophile Inkubationsmilieu z.B. GENbag microaer-Beutel in Anwesenheit eines 'Gas generating'-Sachets (Biomérieux 45532).

* Benötigt ein 5% CO₂ Inkubationsmilieu z.B. GENbag CO₂-Beutel in Anwesenheit eines 'Gas generating'-Sachets (Biomérieux 45533).

3.3 LÖSUNGEN

- Bakteriensuspension (Referenzprobe): frische (d.h. am Tag vor der Probenahme angesetzte dichte Suspension mit einem unbestimmten Titer der nachzuweisenden Bakterien.

→ Eine Referenzprobe muss in jedem Fall mitgeführt werden. Wenn jedoch die Umrechnung der c_T-Werte in Genomkopien oder 'cfu'-Äquivalente bereits gewährleistet ist (z.B. bei Verwendung eines Referenzplasmides oder wenn vorgängig SOP279 verwendet wurde, in welcher dieser Arbeitsschritt beschrieben ist), kann der folgende Schritt weggelassen werden:

Von der Referenzprobe wird eine über mindestens 6 Zehnerpotenzen reichende Verdünnungsreihe im Suspensionsmedium erstellt. Jede der Verdünnungen muss das gleiche Gesamtvolumen besitzen wie dasjenige der Probensuspensionen.

4 AUSFÜHRUNG

4.1 ENTNAHME DER NULLPUNKTSPROBE (= DIREKTPROBE)

- Alle zu untersuchenden Suspensionen (inkl. Referenzprobe) werden vor der Bearbeitung durch kurzes 'Vortexen' (ca. 2 sec.) oder durch 'auf-und-ab' Pipettieren gemischt (ACHTUNG: Es muss dabei vermieden werden, dass die Suspension den Deckel der Röhren kontaminiert!).
- Daraus werden 200 µl entnommen und jeweils in ein Eppendorf Röhren transferiert. Diese entsprechen den Nullpunktproben (Direktproben) und werden bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C aufbewahrt.
- Aus der Referenzprobe werden zusätzlich 200 µl entnommen und auf ein dem Bakterientyp entsprechendes Agarmedium ausgestrichen.

4.2 ENTNAHME DER ANREICHERUNGSPROBE

- Alle Bakteriensuspensionen (inkl. Referenzprobe) werden gemäss den Erfordernissen der nachzuweisenden Bakterienspezies im Brutschrank inkubiert.

Bsp. für Inkubationsbedingungen:

Spezies	Inkubationsbedingungen
Campylobacter	37°C, 36 Std., micro-aerophil
Salmonella	37°C, 12 Std., aerob
P. aeruginosa	37°C, 12 Std., aerob
S. aureus	37°C, 12 Std., aerob
S. pneumoniae	37°C, 12 Std., 5% CO ₂

- Nach der Inkubationszeit werden jeweils 200 µl entnommen und in ein Eppendorf Röhrchen transferiert. Diese entsprechen den Anreicherungsproben. Sollten die Proben nicht direkt weiterverarbeitet werden, können sie bei -20°C aufbewahrt werden.
- Jeweils ein 200 µl 'Aliquot' der Direktprobe und der Anreicherungsprobe sämtlicher Bakteriensuspensionen werden danach für die DNA Extraktion gemäss SOP337 bereitgestellt.
- Die mit der Referenzprobe bebrüteten Agarplatten werden kontrolliert. Sollte eine serielle Verdünnung der Referenzprobe durchgeführt worden sein, werden die gewachsenen Kolonien ausgezählt.

5 HINWEISE ZUR QUALITÄTSSICHERUNG

In jeder Analysenreihe müssen folgende Kontrollen mitgeführt werden:

- eine **Negativkontrolle** (eine Probe, welche die gleichen Verfahrensschritte durchlaufen hat wie die Probensuspensionen, die aber mit Sicherheit keine der nachzuweisenden Bakterien oder DNA enthält (z.B. Puffer). Die Negativkontrolle muss negativ sein, ansonsten ist eine Kontamination bei der DNA-Extraktion zu vermuten.
- eine **Positivkontrolle** (=Referenzprobe: eine frische Suspension bzw. eine serielle Verdünnung der nachzuweisenden Bakterien, welche die gleichen Verfahrensschritte durchlaufen hat wie die Probensuspensionen). Die Positivkontrolle muss eine sichtbare Amplifikation und ein eindeutiges Wachstum auf Agar ergeben, ansonsten muss ein Fehler im Analyseverfahren vermutet werden.

Wenn die Kontrollen nicht das gewünschte Resultat ergeben, müssen die Resultate dieser Versuchsreihe verworfen und die Untersuchung, allenfalls nach Ergreifen geeigneter Massnahmen, wiederholt werden.

6 VALIDIERUNGSUNTERLAGEN

Die Validierungsunterlagen bilden ein eigenes Dokument, um eine problemlosere Anpassung zu ermöglichen.

7 LITERATUR

Lebensmittelhandbuch, Kapitel 56 Mikrobiologie

<http://www.dsmz.de/species/strains.htm>: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)