

Schnelldiagnostik hygienerrelevanter Erreger in der Lebensmittelverarbeitung

Projekträger: INNO – WATT
Reg. Nr.: IW070081

Laufzeit: 01.01.07 – 30.06.09

Zielsetzung

In den vergangenen Jahren sind auf Ebene der EU eine Reihe von Rechtsnormativen erlassen worden, welche eindeutig Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz in den Mittelpunkt stellen.

- ◆ Verordnung (EG) Nr. 2073/2005

1. Gewährleistung eines hohen Schutzniveaus für die Gesundheit der Bevölkerung
2. Beurteilung der Akzeptanz von Lebensmitteln, deren Herstellungs-, Handhabungs- und Vertriebsverfahren anhand mikrobiologischer Kriterien
3. Einhaltung/Definition mikrobiologischer Grenzwerte

verstärkte Eigenkontrollmaßnahmen
seitens der Betriebe

regelmäßig
risikobasiert
ausreichend oft

schwerpunktmäßig zu untersuchen sind
Lebensmittel auf Lebensmittelsicherheits-
und Prozesshygienekriterien

Salmonellen
Listeria monocytogenes
E.coli

Projektvorhaben:

Schnelldiagnostik vor Ort

Das von Fleisch und Fleischerzeugnissen ausgehende Risiko könnte wesentlich realistischer bewertet, Schlussfolgerungen für die Intensität der Überwachungsmaßnahmen abgeleitet, hygienische Schwachpunkte schnell und objektiv erkannt werden.

Anhand der mikrobiologischen Parameter kann eine Beurteilung des Wareneingangs erfolgen.

RNA – Immunocapture Verfahren

- ◆ Vereinigung der Spezifität und Sensitivität molekularbiologischer Testsysteme mit der Schnelligkeit eines Immunoassays
- ◆ Ausgangspunkt bildet ein von der Firma SCAN BEC entwickeltes Verfahren (MP basierte FastScan-RNA-Hybridisierungsverfahren)

◆ Verfahrensbeschreibung

1. Probenaufarbeitung- spez. Nährmedium

2. Zellyse – Lysepuffer

3. Analyse der bakteriellen rRNA

- Nachweis der RNA anhand spezieller enzymmarkierter Fänger- und Nachweissonden durch Sandwichhybridisierung

- Immobilisation an Streptavidin beschichteter MTP

- Zugabe des Enzyms Meerrettichperoxidase
Kopplung an Digoxigenin markierte
Nachweissonde
- Zugabe eines chromogenen Substrates →
Sichtbarmachen des geb. Konjugates
- photometrische Auswertung durch
Absorbtionsmessung im Photometer
(ELISA-Reader)

Bestehende FastScan rRNA Nachweis-Technik

Festphase mit Streptavidin



Abb.1: schematisch Darstellung des Immunocapture Verfahrens auf der Basis von immobilisiertem Streptavidin

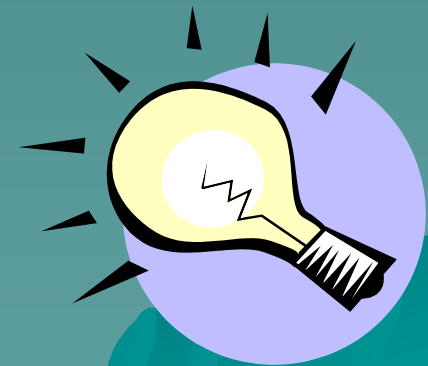
◆ Vorteile des Systems

- geringer Zeitaufwand 2.5 Stunden
- Nachweis lebender Keime
- hohe Sensitivität und Spezifität

◆ Nachteile des Systems

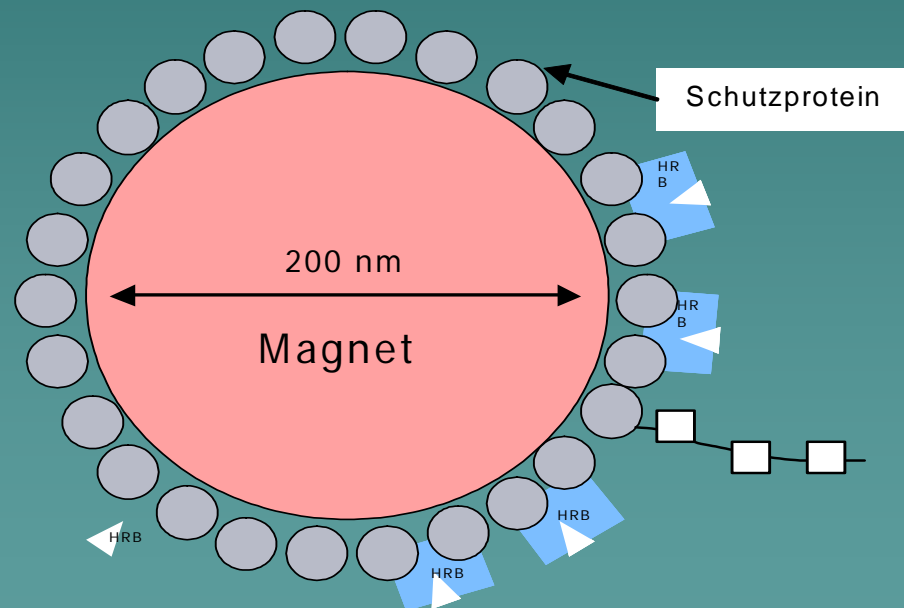
- nicht zur vor Ort Analytik geeignet
 - hoher apparativer Aufwand
 - selektive Anreicherung
 - offenes System

- ◆ Ausgehend von diesem RNA Hybridisierungs - verfahren und in Kombination mit anderen neuartigen Technologiebausteinen, multifunktionellen Magnetpartikeln und der Immunocapture Technologie soll diese Limitation überwunden und ein entsprechend schnelles preiswertes **vor Ort Verfahren** bereitgestellt werden.



- ◆ **Magnetpartikel** werden heute vielfältig zur Extraktion von Biomolekülen eingesetzt
Dazu wird in der Regel ein Rezeptor an die Oberfläche gekoppelt. Im vorliegenden Projekt ist dies eine RNA-Sonde.
- ◆ Kopplung an Nachweissonde
- ◆ Co - Immobilisation von Meerrettichperoxidase (HRP) → RNA - Extraktionspartikel und polymere Enzymmarkierung
- ◆ anlegen eines Magnetfeldes - verbesserter Stofftransport

Abb. 1: multifunktionelles Magnetpartikel; das Partikel weist neben den magnetischen Eigenschaften eine immobilisierte spezifische RNA-Sonde und immobilisierte Meerrettichperoxidase (HRP) auf



◆ Hybridisierungssonden

1. Fängersonde: Hapten gekoppelt

2. Nachweissonde: MB+HRP gekoppelt

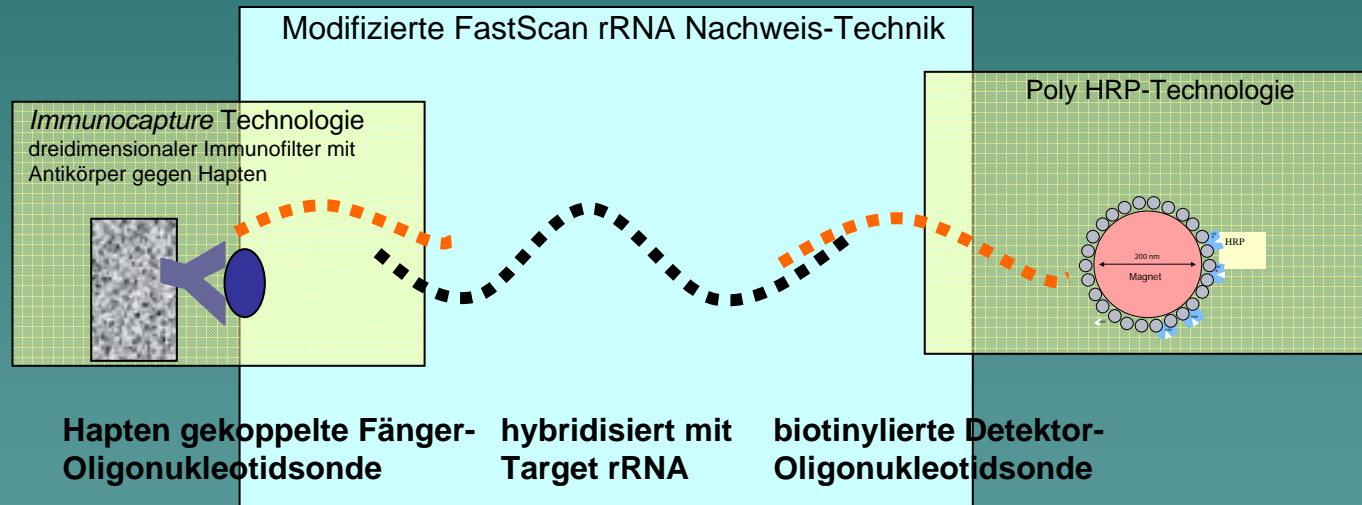


Abb. 2: Schematische Darstellung des finalen RNA Hybridisierungskomplexes auf einem Immunocapture Filter zum Nachweis von spezifischer RNA

- ◆ Das MP-basierte FastScan Verfahren soll durch den Einsatz von haptenmarkierten Sonden auf dreidimensionale Filter mit immobilisierten Fängerantikörpern übertragen werden.

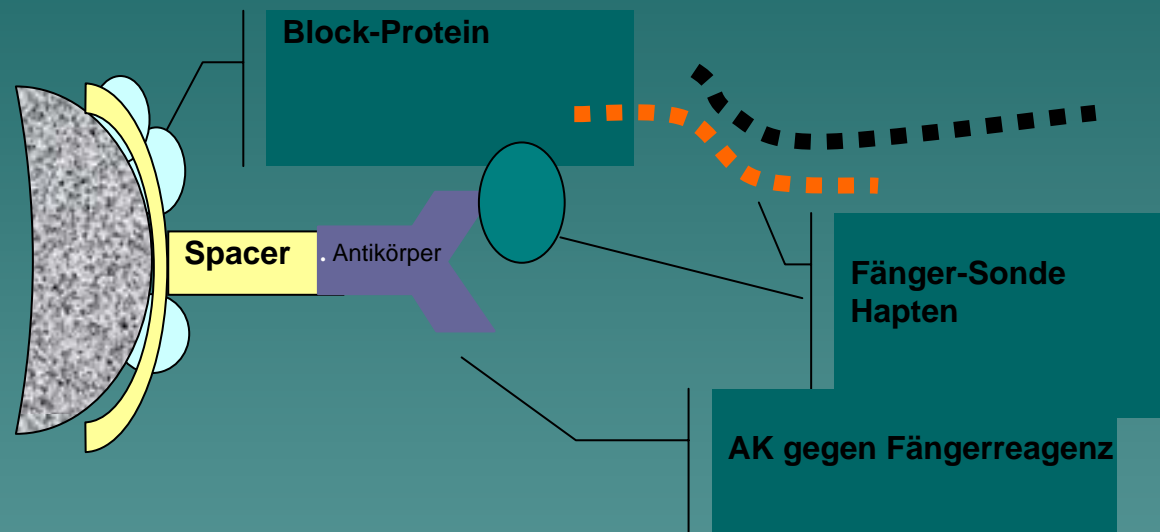


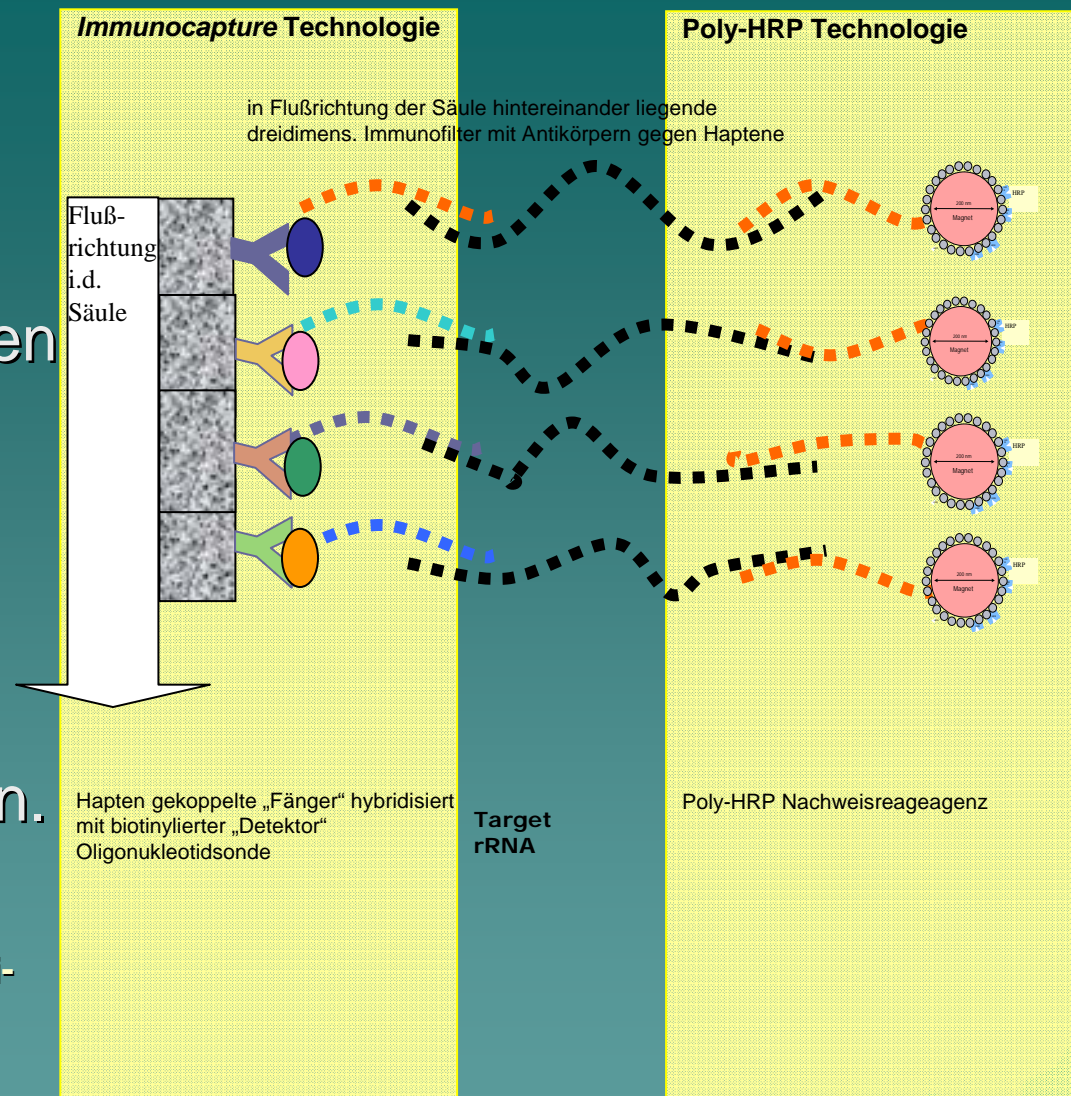
Abb. 3: Der RNA-Sondenkomplex wird auf einen 3-dimensionalen Immunofilter mit immobilisiertem anti-Haptenantikörper gegeben und im Durchfluss spezifisch gebunden

- ◆ Die 3D Immunofiltration ist ein Verfahren, bei dem poröse Sintermaterialien zur Immobilisierung von biologischen Rezeptoren eingesetzt werden. Eine Bindung von Liganden erfolgt in der Regel ähnlich wie bei der Chromatographie im Durchfluss.
- ◆ Eine hohe Konzentration der Rezeptoren in der 3-dimensionalen Matrix ermöglicht sehr hohe Bindungsgeschwindigkeiten.

- ◆ Im Rahmen des Projektes soll dieses Verfahren für die Simultananalyse von 3 Analyten ausgelegt werden. Dazu ist der Einsatz von mehreren Haptenen und entsprechend mehreren hintereinander geschalteten 3D Immunofiltern mit immobilisierten anti-haptenen AK erforderlich.
- ◆ Das System ist äußerst flexibel.
Je nach Markierung der Sonden ist die Beladung der Säulen und des AK-Konjugates variierbar.

Durch Kombination verschiedener Markierungen und AK - Konjugate ist es möglich, Multiplex-Analysen durchzuführen und somit parallel in nur einem Test mehrere verschiedene Mikroorganismen nachzuweisen und gleichzeitig zu identifizieren.

Abb.4: Schematische Darstellung des Immunocaptureverfahrens als Multiparameterverfahren auf Basis von verschiedenen Haptenen und entsprechenden Immunofiltern



- ◆ Detektion der Komplexe

Diese erfolgt auf Basis einer HRP/TMP Reaktion, durch Zugabe von präzipitierenden TMP erfolgt eine spezifische Anfärbung des Filters, die in einer Streulichtanordnung detektiert werden kann.

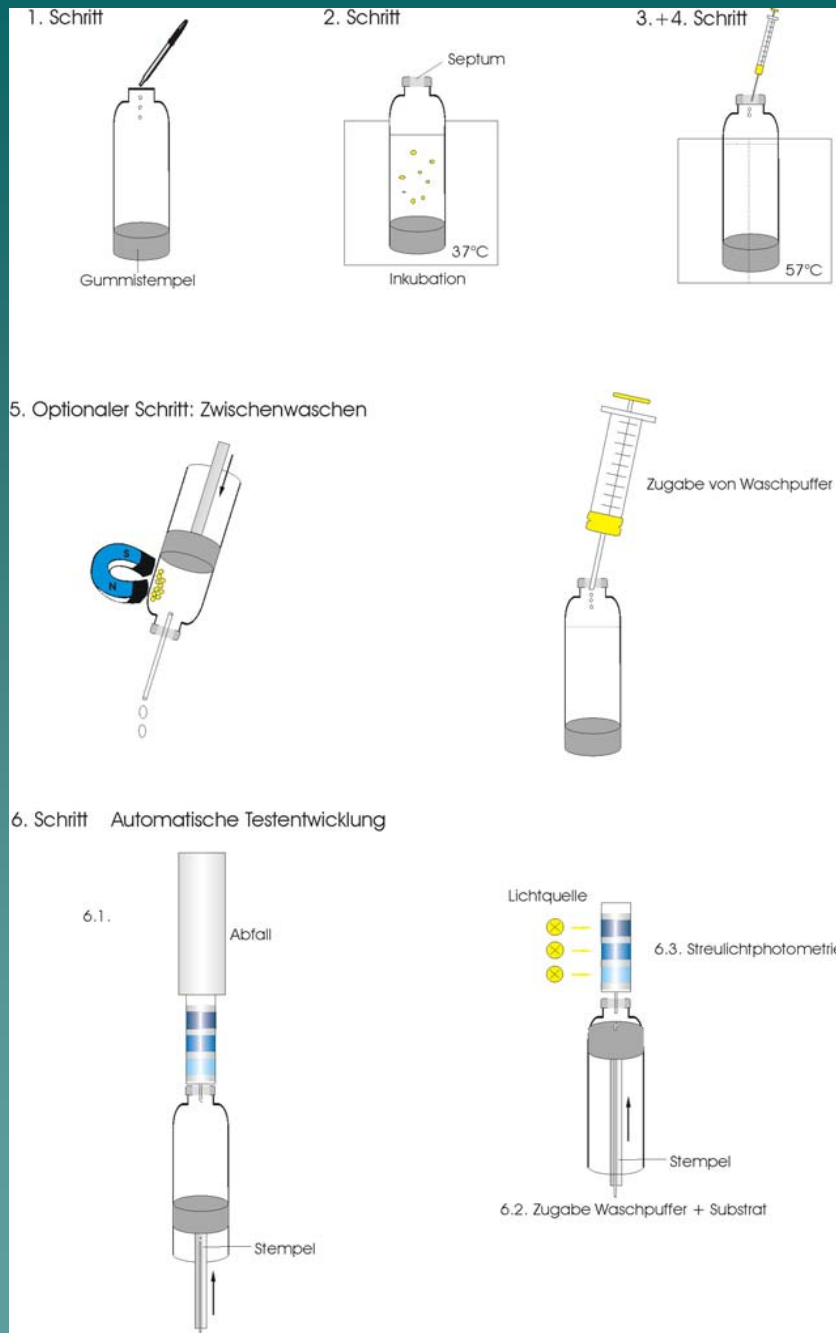
- ◆ Analysegerät und Testkartusche

Alle biochemischen Entwicklungsvorgänge können in Mikrosäulen durchgeführt werden. In diese können drei Immunofilter eingesetzt und mit Hilfe eines dreilagigen Streulichtphotometer ausgelesen werden.

◆ Testdurchführung

1. Probenahme: Fleischsaft oder andere flsg. Probe wird in Revitalisierungskartusche pipettiert.
2. Revitalisierung: Kartusche mit Probe und unspezifischem Nährmedium verschließen und bei 37 ° C für 2-4 h inkubieren mit anschließender Zentrifugation.
3. Zellyse: über ein Septum wird Lysepuffer in die Kartusche injiziert, 10 min. Inkubation → Lyse und Abtötung der Zellen (unterstützt durch Ultraschall)

4. Hybridisierung: Über das Septum wird die Magnetpartikeldispersion und Sondenlösung zugegeben und 20 min bei 57°C inkubiert. Durch ein äußeres magnetisches Wechselfeld wird ein Rütteleffekt erzeugt.
5. RNA – Extraktion: In der Kartusche erfolgt die magnetische Abtrennung der MB markierten Sondenhybride von der Substratlösung und die Neudispersierung in Waschpuffer.
6. Immobilisation – Die Probenlösung wird auf den AK beschichteten Filter gegeben, hier erfolgt die Bindung zwischen AK und den haptenmarkierten Sondenhybriden.
7. Photometrie: Durch Zugabe eines chromogenen Farbstoffes bilden sich Farbstoffkomplexe, photometrisch quantifiziert.



◆ Testautomatisierung

Dosierung von Waschpuffer und Substratlg. erfolgt durch eine Nadel, die das Septum der Kartusche penetriert.

Der Bodenstempel der Kartusche soll mit Hilfe einer Dosiermechanik bewegt werden, wodurch die Probenlg. in den Immunofilter gedrückt wird. Die ersten Designentwürfe sollen im Projektverlauf weiter präzisiert werden.

Abb. 4 : Illustration des Assayablaufes unter Verwendung von Wegwerfteilen

◆ Vorteile des Systems

- hohe Aussagekraft (hohe Spezifität und Sensitivität)
- schnelle Diagnostik, ca. 11-24 h, signifikante Zeitersparnis
- falsch positive Ergebnisse können nahezu ausgeschlossen werden
- ausschließlicher Nachweis von lebenden Zellen
- kontaminationsfreie Probenbearbeitung ohne selektive Anreicherung der Mikroorganismen

- gleichzeitiger Nachweis verschiedener Mikroorganismen
- niedrige Geräte – und Analysekosten
- Möglichkeit des Einsatzes außerhalb des Labors

◆ Technisches Risiko

- Hauptrisiko liegt in der Komplexität des Vorhabens
- Verwendung von einigen wenigen etablierten Technologiebausteinen
- Die Synthese von biokatalytisch aktiven Magnetkonjugaten ist eine völlig neue Technik. Die zur Abschätzung des Risikos notwendigen Erfahrungen können erst im Verlauf des Projektes gesammelt werden.

- Die separate Durchführung der Modellassays unproblematisch, bei Kombination der verschiedenen Tests kann es zu gegenseitigen Kreuzreaktionen kommen
- Zusätzlich sind unspezifische Wechselwirkungsphänomene denkbar, die in Pufferoptimierungsstudien ausgeschaltet werden müssen.