

## Von der bunten Reihe zum molekularen Fingerprint – eine Zeitreise durch 75 Jahre Mikrobiologie, von den Anfängen der Kulmbacher Fleischforschung bis heute

S. LICK und L. KRÖCKEL

Die Aufgaben der Mikrobiologie in der Fleischforschung haben sich seit der Gründung der Reichsanstalt für Fleischwirtschaft in Berlin im Jahre 1938 kaum verändert. Damals wie heute bestehen sie in Untersuchungen zur mikrobiologischen Sicherheit und Qualität von (nicht) verarbeiteten Produkten und der Forschung zu aktuellen Problemen.

Damals wie heute werden für die Kultivierung von Mikroorganismen flüssige und feste Nährmedien benötigt, es werden Verdünnungsreihen angefertigt und Kolonien gezählt (Abb. 1). Die Analysemethoden, die dann im Anschluss angewendet werden, haben sich dagegen sehr verändert. Die Mikrobiologie von heute ist im Gegensatz zu früher eine Mikrobiologie der Hightech-Geräte geworden. Die meisten Arbeiten beginnen mit der Erstellung einer Gesamtkeimzahl eines Produktes, um etwas über die Qualität und die Haltbarkeit aussagen zu können. Keimzahlen können aber in der Regel nur einen allgemeinen Eindruck vermitteln. Was sich nun darunter verbirgt, ist von entscheidendem Interesse. Handelt es sich um normale Verderbskeime, um Pathogene oder sind es erwünschte Starter- bzw. Schutzkulturen. Eine korrekte Identifizierung von Mikroorganismen ist daher wichtig, sowie in bestimmten Fällen ihre Differenzierung auf Stammebene, wie im Weiteren zu sehen sein wird.



Abb. 1: Bakteriologisches Labor um 1950 aus der Zentralforschungsanstalt für Fleischwirtschaft in Kulmbach – Archiv.

### Kurzer historischer Überblick

Die enormen Fortschritte auf dem Gebiet Nukleinsäureanalytik des 20sten Jahrhunderts haben die Arbeit der Mikrobiologie entscheidend beeinflusst. Es lohnt sich, auf diese wissenschaftlichen Erkenntnisse, einen kurzen Rückblick zu werfen.

Im Jahre 1938 war noch gänzlich unklar, dass die Nukleinsäure als sogenanntes vererbbares Prinzip anzusehen ist, bzw. die Baupläne ganzer Lebewesen in dem Nukleinsäuremolekül gespeichert werden. Es existierten Anhänger verschiedener Fraktionen und die Anhänger der Proteinfraktion waren der Meinung, dass Nukleinsäure, die aus nur 4 Bausteinen besteht, was damals bereits bekannt war, nicht die Komplexität wie Proteine (20 verschiedene Bausteine, dreidimensionale Strukturen) besitzen würde, um solche Informationen überhaupt speichern zu können. Berühmt sind die bahnbrechenden Experimente mit pathogenen und apathogenen Streptococccen-Stämmen von Griffith 1928 und Avery 1944, die genau in diese Zeit fallen. Sie gelten bis heute als ein Beispiel für herausragende Logik in der Experimentierkunst. Avery konnte 1944 endgültig mit Hilfe neu entdeckter und gereinigter Enzyme wie Proteinasen und Nukleasen bestätigen, dass es sich bei der Nukleinsäure um das vererbbare Prinzip handelt. Es folgten weitere entscheidende Arbeiten 1952 von Hershey und Chase mit radioaktiv markierten Viren, einmal waren die Proteine, ein andermal war die Nukleinsäure markiert. Dadurch konnte festgestellt werden, welche Stoffgruppe bei der Infektion auf Bakterien übertragen wurde. Watson und Crick postulierten 1952 die Doppelhelix und 1958 isolierte Kornberg erstmals eine DNA-Polymerase, ohne die eine spätere DNA-Sequenzierung (Sanger-Sequenzieren) oder die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) nicht durchführbar wäre. 1965/66 erfolgte die Entschlüsselung des genetischen Codes im Labor von Nirenberg und Khorana. 1976-79 entwickelten Maxam und Gilbert chemische Methoden und Sanger enzymatische Methoden zur Sequenzierung von Nukleinsäuren und erhielten dafür auch den Nobelpreis. Ein weiterer wichtiger Meilenstein war 1981, als ein automatisches Verfahren zur DNA-Synthese entwickelt wurde. Wer lässt nicht heute Oligonukleotide für vielfältige Anwendungen wie Hybridisierungen, PCR-Primer, Microarrays, synthetisieren, eine nahezu alltägliche Routine. 1985 erfand Mullis die sogenannte Polymerase-Ketten-Reaktion, die bereits früher schon im Labor von Nirenberg und Khorana entdeckt, aber wieder in Vergessenheit geraten war. Mullis erhielt dafür 1993 den Nobelpreis. Diese Technologie erfüllt eines der Hauptbedürfnisse der Molekularbiologie, nämlich ausreichende Mengen Probenmaterial, d. h. Nukleinsäure für nachfolgende Untersuchungen, *in vitro* herstellen zu können. 1996 erfolgte die vollständige Entschlüsselung des Hefe-Genoms und es begann das Genomzeitalter. 1996 war auch das Jahr, in dem „Dolly“ das erste aus somatischen Zellen geklonte Tier am Roslyn Institut in Edinburgh erzeugt worden war. Im Jahre 2003 wurde nach ca. 10 jähriger Arbeit die Fertigstellung der Sequenzierung des menschlichen Genoms verkündet, im Jahre 2006 erfolgte die Publikation der Rohdaten sowie auch der Annotation der Gene. Ab da beginnt endgültig die sogenannte Postgenomära.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in der zweiten Hälfte des 20sten Jahrhunderts die Grundlagen für entscheidende Techniken wie Klonieren, Gensonden, Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), und Sequenzierung gelegt wurden, die die mikrobiologische Arbeit im Labor vollständig revolutioniert haben (LEWIN, 1994 und 2008).

### **Kultivierung und phänotypische Tests**

Auch die Entwicklung chromogener **Zusätze** in Selektivagarmedien hatten die Arbeit der Mikrobiologen über die Jahre sehr erleichtert. Solche Zusätze in Kombination mit den für die jeweiligen Mikroorganismen spezifischen Substraten bewirken, dass die Kolonien der fraglichen Art selektiv angefärbt werden und damit bereits so eine Artidentifizierung möglich wird. In der Regel erfolgt aber die Isolierung von Einzelkolonien nach Koloniemorphologie und lichtmikroskopischer Untersuchung durch eine geübte Fachkraft. Das Ziel ist immer, Reinkulturen zu erhalten, die dann weiter untersucht werden können. Diese Reinkulturen werden sogenannten phänotypischen Tests unterzogen. Da sind z. B. Oxidase- und Katalasetests, Gasbildung, Beweglichkeit, Pigmentierung etc. zu nennen und natürlich die Verwertung von unterschiedlichen Kohlenstoffquellen. Ein ausgesuchtes Sortiment von verschiedenen Zuckern und einem passenden Farbstoffindikator werden jeweils einzeln in Reagenzröhrchen oder Mikrotiterplatten mit einer Reinkultur beimpft und inkubiert. Der Indikator zeigt durch Farbumschlag an, ob eine Verwertung stattfindet oder nicht – das nennt man die „bunte Rei-

he“ (Abb. 2). Mehr oder weniger umfangreiche Tabellen bzw. Matrizes dieser spezifischen biochemischen Umsetzungen lassen dann einen Rückschluss auf die Spezies zu. Solche Tests wurden im Labor schon sehr lange durchgeführt, aber erst 1970 wurde die erste miniaturisierte „bunte Reihe“ von der Firma Biomerieux kommerziell vertrieben. Diese war allerdings eher auf medizinisch relevante Keime ausgerichtet und nicht in der Lage, lebensmittel- bzw. fleischrelevante Mikroorganismen zuverlässig einzuordnen. Eine wichtige und vielzitierte Arbeit aus Kulmbach beschäftigte sich z. B. mit der Identifizierung von Milchsäurebakterien aus Fleisch und Fleischprodukten (SCHILLINGER und LÜCKE, 1987) und hat bis heute ihre Aktualität nicht verloren.

Diese Tests sind aus keinem mikrobiologischen Labor wegzudenken. Ein großer Nachteil aber ist, dass sie sehr zeitaufwendig sind.



Abb. 2: Bunte Reihe – Mikrotiterplatten oder kommerzielle Streifen enthalten verschiedene Kohlenstoffquellen und sind versetzt mit Farbstoffindikatoren. Nach Beimpfung mit einer Bakterienreinkultur und Verwertung der entsprechenden C-Quelle zeigen die einzelnen Reaktionsgefäße (k)einen Farbumschlag.

## DNA basierende Techniken

In den 80er und 90er Jahren kamen DNA basierende Techniken für die Identifizierung auf. Woese (Urbana, Illinois) führte erstmals die ribosomalen Gene als sogenannte „molecular clock“ der Evolution ein, was zu heftigen Diskussionen in der Fachwelt führte. Der Vorteil dieser Gene ist, dass sie bei allen Mikroorganismen vorhanden sind. Es existieren konservierte und variable Regionen, die sich somit für vergleichende Sequenzanalysen heranziehen lassen. Im Jahre 1990 postulierten Woese und Kandler auf Basis dieser Sequenzanalysen einen phylogenetischen Baum mit drei Domänen – die Archaea wurden erstmals als dritte Domäne zwischen Pro- und Eukaryoten positioniert (WOESE *et al.* 1990, WHEELIS *et al.* 1992). Die Arbeitsgruppe um Schleifer und Ludwig, als Nachfolger von Kandler (TU-München) sowie auch Stackebrandt, dem ehemaligen Leiter der DSMZ (Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig), publizierten unzählige Arbeiten zur Identifizierung auf der Basis der ribosomalen Gene. Diese Ergebnisse liefern wesentliche Grundlagen für alle, die auf dem Gebiet der Identifizierung arbeiten.

In der Folge bemühten sich viele Arbeitsgruppen, schnellere Nachweismethoden zu entwickeln, die sowohl auf ribosomale Gene wie auch auf Strukturgene abzielten. Sie sollten auch in gemischten mikrobiellen Kulturen aus Lebensmitteln ohne Anreicherung bzw. Kolonievereinzelung ein schnelles Identifizierungsergebnis erbringen. Eine solche Arbeit aus dem MRI betrifft z. B. die Identifizierung von *Lactobacillus delbrueckii* und der zugehörigen Subspezies mit Hybridisierungssonden und PCR (LICK *et al.* 2000).

## Molekulare Typisierung - molekularer Fingerabdruck oder „fingerprint“

Der Ausdruck leitet sich von dem Fingerabdruck ab, der für eine Person einzigartig ist und ausschließlich bei dieser Person vorkommt. Der Begriff wurde auf molekulare Ebene übertragen und liefert Informationen über die sogenannte klonale Herkunft eines (Mikro-)Organismus. Das bedeutet, wenn zwei (Mikro-)Organismen identische oder sehr ähnliche Muster aufweisen, dass sie zu einem bestimmten Zeitpunkt auseinander hervorgegangen sind. Rein zeitlich gesehen werden hier jüngere Zeiträume betrachtet (Monate, Jahre, Jahrzehnte). Dies steht im Gegensatz zu Methoden, die auf rRNA-Gene abzielen. Hier finden Veränderungen nur sehr langsam statt, und man betrachtet evolutionäre Entwicklungen über sehr lange Zeiträume (Jahrtausende).

Mit molekularen Fingerprints können bestimmte Fragestellungen ganz pragmatisch untersucht werden, wie z. B. i) handelt es sich um eine identische Starterkultur, ii) benutzt ein Hersteller die Starterkultur eines anderen Konkurrenten, iii) hat sich ein Bakterienstamm nach vielmaligem Passagieren/Kultivieren verändert. Es können iv) epidemiologische Untersuchungen durchgeführt werden, ob ein ähnliches/identisches Muster bei Bakterienisolaten aus dem verdorbenen Lebensmittel und der erkrankten Person vorliegt oder v) waren die Desinfektionsmaßnahmen wirksam? Bei Lebensmittel- oder fleischverarbeitenden Betrieben treten immer wieder gefürchtete „Hauskeime“ auf, die zur Kontamination der Produkte führen können und die man trotz intensiver Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen nicht loswerden kann. Handelt es sich nun um eine Neuinfektion oder ist es ein „alter“ Keim?

Was ist nun eigentlich die Grundlage für diese Typisierungen? Betrachtet man eine Bakterienzelle, so kann diese verschiedene sogenannte mobile genetische Elemente enthalten (Abb. 3). Dies können extrachromosomal vorliegende Plasmide sein oder sie können auf dem Chromosom selbst als sogenannte egoistische genetische Elemente vorkommen. Das können lysogene Phagen, Insertionselemente, Transposonen oder auch repetitive Elemente sein, die bei jeder Replikation des Genoms Veränderungen verursachen. Diese Veränderungen der chromosomalen Organisation können mit molekularen Methoden nachgewiesen werden. Verschiedene Methoden haben allerdings unterschiedliche Vor- und Nachteile und liefern auch eine unterschiedliche Auflösung, was die Veränderungen betrifft. Betrachtet man die taxonomische Einordnung der sogenannten Sub- oder Feintypisierungen, so bewegt man sich in der Regel unterhalb der Art- bzw. Speziesebene, sprich auf der Individual- oder Stammebene. Aber das ist nicht in jedem Falle so, es hängt jeweils von der angewandten Technik ab, wie aus den nachfolgenden Beispielen ersichtlich wird.

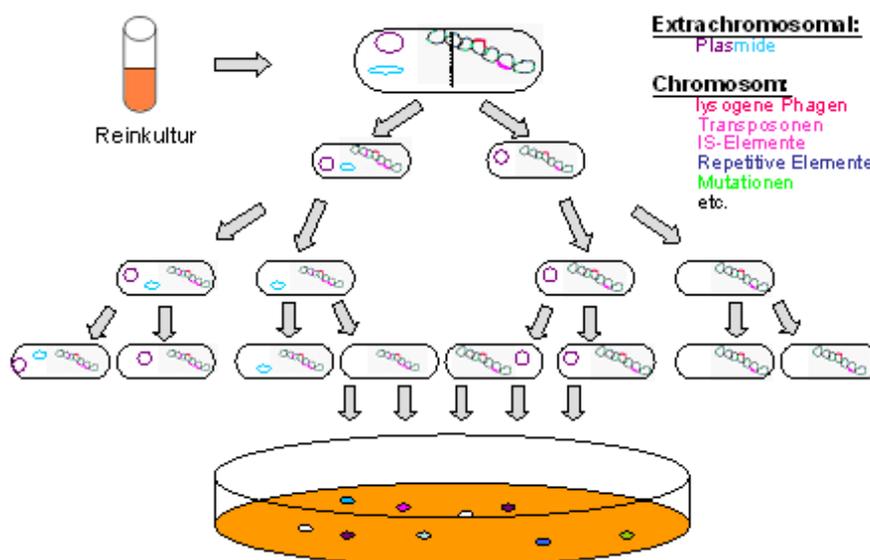


Abb. 3: Schematische Darstellung von möglichen genetischen Veränderungen während der Bakterienteilung bzw. der DNA-Replikation

Die ältesten Typisierungen sind die Serotypisierungen oder Serovarbestimmungen. Publikationen gibt es etwa seit den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts. Es handelt sich um Antikörperreaktionen gegen Oberflächen- oder Flagellenproteine der betroffenen Bakterien. Die Bezeichnungen werden immer noch verwendet, zunehmend wird aber versucht, diese mit molekularen Methoden zu ersetzen.

Phagentypisierung existiert seit den 50er Jahren und wurde vor allem bei Staphylococccen und Streptococccen angewendet. Man benötigt Sets verschiedener Bakteriophagen, die unterschiedliche Spezifität gegen unterschiedliche Stämme einer Bakterienart besitzen und diese lysieren oder eben auch nicht. An Hand der Lysemuster lässt sich ein spezieller Stamm dann ermitteln. Wie unschwer zu erkennen ist, benötigt man eine mehr oder weniger umfangreiche, genau definierte Phagensammlung, um solche Techniken überhaupt durchführen zu können.

Ab ca. 1970 wurden Proteine zur Typisierung herangezogen, SDS-Gelelektrophorese wurde durchgeführt und MLEE (multi locus enzyme electrophoresis) kam in Mode. Dabei wurden einzelne Enzyme gezielt gereinigt, elektrophoretisch in Polyacrylamidgelen aufgetrennt und die Muster verschiedener Stämme miteinander verglichen.

Ende der 90er Jahre und Anfang des 21. Jahrhunderts fand zunehmend eine andere Methode Eingang in die Labore, das MALDI-TOF, die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) und Massenspektrometrie mit Flugzeitanalysator (time of flight, tof). Sie stellt ebenfalls Proteinmuster dar und hier vor allem ribosomale Proteine, die am häufigsten in einer wachsenden Zelle vorkommen. Sie dient aber nicht zur Subtypisierung, sondern zur schnellen Arterkennung. Inzwischen stehen mehr als 150 Geräte in Deutschland, die vor allem auch in der medizinischen Diagnostik in Krankenhäusern eingesetzt werden (BRAGA et al. 2013).

Ende der 80er und 90er Jahre kamen zunehmend DNA basierende Fingerprint-Methoden auf. Zunächst ist RFLP (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) zu nennen. Es wird hochmolekulare Gesamt-DNA mit Restriktionsenzymen (molekulare Scheren) verdaut und man erhält sehr viele Banden, die schlecht oder nicht voneinander zu trennen sind, was das ganze sehr unübersichtlich macht. Eine Verbesserung einer RFLP stellte daher PFGE dar (Pulsfeldgelektrophorese), bei der sogenannte „rare cutter“ eingesetzt werden, Restriktionsenzyme, die selten schneiden (Abb. 4). Die vergleichsweise großen Fragmente werden in einem gepulsten elektrischen Feld über Nacht aufgetrennt (ca. 20 Stunden), was zusätzlich die Laufstrecke der Moleküle erheblich verlängert. Zudem ist ab einer bestimmten Molekülgröße (etwa ab 40 kbp) eine Auftrennung in einem konstanten elektrischen Feld nicht mehr möglich und richtet sich nur noch nach der Pulszeit. Man erhält eine übersichtliche Anzahl von Fragmenten, die auch mit dem Auge auswertbar sind.

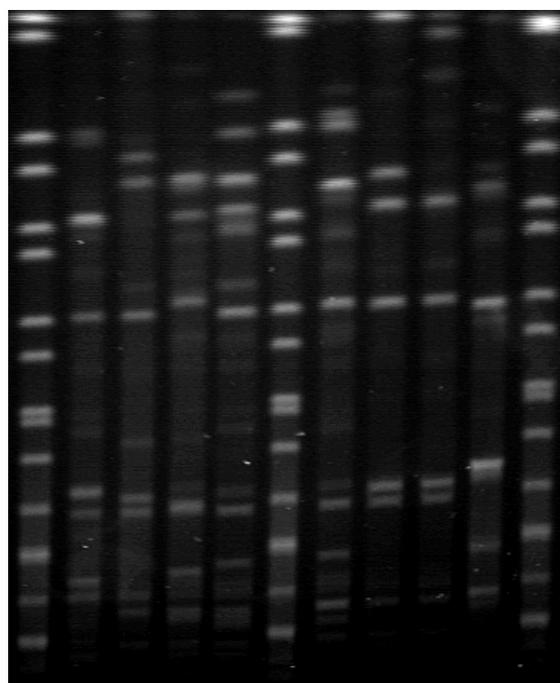


Abb. 4: *Listeria monocytogenes* PFGE Muster mit *Pst*I verdaut. Auf Bahn 1,6,11 sind Längenvergleichsstandards aufgetragen

Da es sich um eine sehr gut reproduzierbare Methode handelt, wird sie bis heute routinemäßig verwendet und ist auch für internationale Datenbanken geeignet (PulseNet USA, PulseNet Europe). Eine andere Variante des RFLP stellt die Ribotypisierung (Ribotyping) dar. Hochmolekulare Nukleinsäure wird mit Restriktionsenzymen verdaut, geblottet und anschließend mit Gensonden auf der Basis ribosomaler Gene hybridisiert. Das dient ebenfalls zur Reduktion der Bandenmuster. Dies war eine der ersten Techniken, die Mitte der 1990er Jahre weitgehend automatisiert wurde (Ribotyper).

Plasmidmuster wurden und werden gerne zur Ergänzung herangezogen. Sind aber natürlich nur dann von Nutzen, wenn diese auch vorhanden sind, denn nicht alle Bakterien haben extrachromosomale Elemente (Abb. 5).

Microarrays sind eine Art spezialbehandelter Objektträger, auf die hunderte oder sogar tausende von Hybridierungs sonden im Mikroformat aufgetragen sind. Jede Sonde steht für eine bestimmte genetische Eigenschaft. Diese lassen sich gut heran ziehen, um in einem einzigen Experiment (eine umgekehrte Hybridisierung) eine Vielzahl von Eigenschaften bei einem Organismus gleichzeitig zu überprüfen (Abb. 6).

Die meisten der vorgenannten Methoden lassen sich nicht uneingeschränkt oder nur mit erheblichen Vorkenntnissen über die jeweiligen Mikroorganismen, die man untersuchen möchte, durchführen. Eine Ausnahme bildet hier nur die PFGE.

Die nachfolgenden Methoden sind PCR-basierende Methoden. Auch mit PCR-Produkten können RFLPs angefertigt werden, d. h. PCR-Produkte werden mit Restriktionsenzymen verdaut und es werden individuelle Bandenmuster erzeugt (PCR-RFLPs). Es hängt von der Art der verwendeten Zielgene ab, ob sie eher zur Speziesidentifizierung oder zur Subtypisierung geeignet sind. Wenn rRNA-Gene herangezogen werden, nennt sich das ARDRA (amplified rNA restriction analysis) und ist für Spezieszuordnung geeignet (VANEECHOUTTE *et al.* 1995). Ein Beispiel für den ersteren Fall wäre z. B. *fla* A-Typisierung bei *Campylobacter jejuni*, bei der Flagellen-Gene mit Hilfe für eine Subtypisierung herangezogen werden (NACHAMKIN *et al.* 1996) (Abb. 7).

Die folgenden Techniken lassen sich ohne nähere Kenntnisse der zu bearbeitenden Mikroorganismen vornehmen und sind zudem recht kostengünstig.

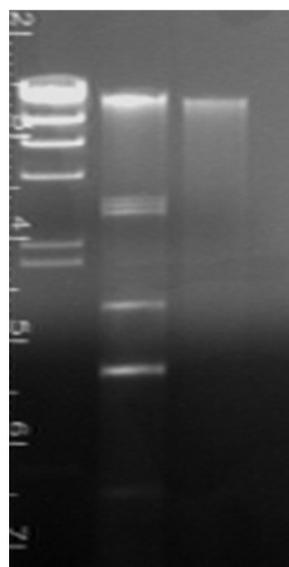


Abb. 5: *Stachybotrys chartarum* Plasmidmuster. Spur 1: Lambda-Längenstandard; Spur 2 und 3: Stämme mit und ohne Plasmide

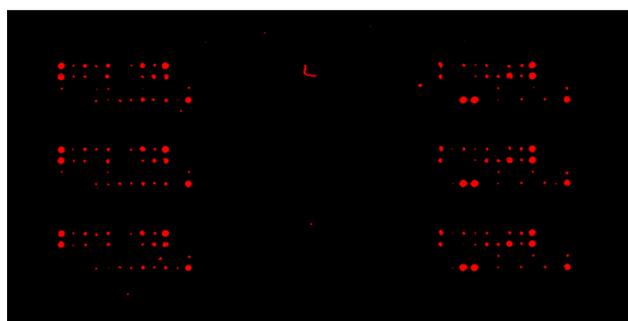


Abb. 6: Microarray von Milchsäurebakterien in Triplets angeordnet

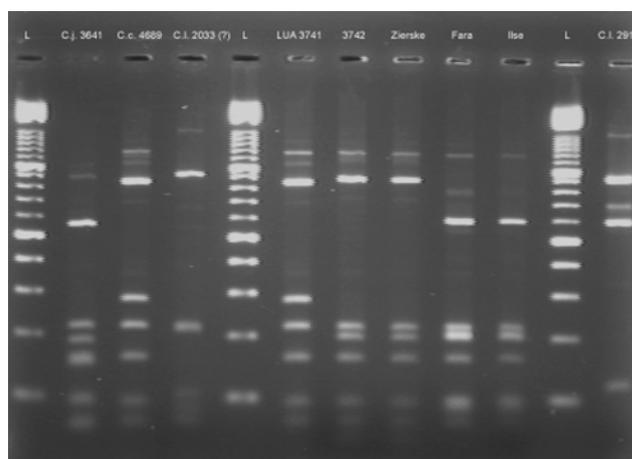


Abb. 7: PCR-RFLP: *Campylobacter jejuni* isolate aus Kühen *fla*-A Restriktionsanalyse zur Typisierung auf Stammebene mit *Dde*I; auf Bahn 1, 5, 11 sind Längenvergleichsstandards aufgetragen.

AFLP (amplified fragment length polymorphism) ist von VOS *et al.* (1995) veröffentlicht worden. Ein Restriktionsverdau von hochmolekularer DNA wird mit anschließender PCR kombiniert. Die ersten PCR-Primer richten sich z. T. gegen die Schnittstellen und führen zusätzlich artifizielle Primerbindungsstellen für ein 2. Primerpaar ein, was auf diese Weise die Fingerprintmuster reduziert und zuverlässiger macht.

Eine weitere Subtypisierung nennt sich RAPD – PCR (randomly amplified polymorphic DNA). Als Primer können random Primer (zufällige Hexa- oder Nonamere) dienen, die zufällig verteilt auf der Ziel-DNA binden. Bei M13-Typisierung wurden Sequenzen bzw. das ganze Genom des M13-Phagen als Primer eingesetzt (UPCROFT 1991, WEI *et al.* 1992). Es können auch zwei, drei oder mehr Primer eingesetzt werden, die unter wenig stringenten Anlagerungsbedingungen mehrfach unspezifisch binden und dann Bandenmuster ergeben. Es ist klar, dass diese Methode sehr stark abhängig ist von einer exakten Standardisierung, der Qualität der eingesetzten Nukleinsäure, den Polymerasen, den PCR-Geräten und der Routine der durchführenden Personen.

In der rep-PCR macht man sich die Tatsache zunutze, dass sogenannte repetitive Elemente (kurze Sequenzwiederholungen) bei Gram-Positiven (BOX-Elemente bei *Streptococcus pneumoniae*) bzw. Gram-negativen Bakterien (ERIC-Elemente bei *E. coli*) auf dem Genom verteilt sind. Diese Sequenzen setzt man als PCR Primer unter wenig stringenten Annealingbedingungen ein, um unterschiedliche Bandenmuster zu erhalten. So lässt sich sehr gut eine Artdifferenzierung bzw. auch Artzuordnung vornehmen, wenn Muster von geeigneten Vergleichsstämmen vorliegen (VERSALOVIC *et al.* 1991), (Abb. 8).

Auf diese Weise ist es gelungen, in enger Zusammenarbeit mit einem Auftragslabor (VFG-Labor, Versmold, A. Bantleon) eine neue Art von Milchsäurebakterien aus Fleisch zu isolieren, zu charakterisieren und neu zu benennen: *Lactobacillus versmoldensis* (KROECKEL *et al.* 2003).

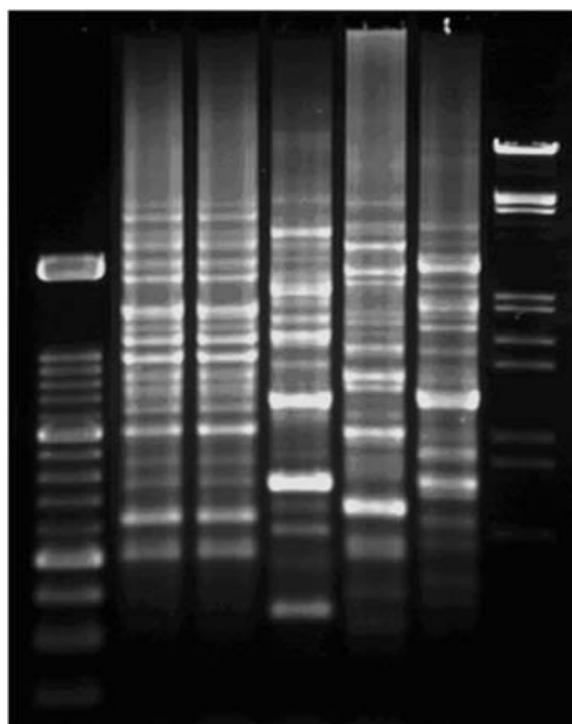


Abb. 8: Genetischer Fingerabdruck Box-rep PCR von verschiedenen Pseudomonadenstämmen aus Fleisch. Auf Bahn 1, 7 sind Längenvergleichsstandards aufgetragen

Eine andere, neuere Methode der Subtypisierung kombiniert PCR und Sequenzierung. Sie wird MLST (multi locus sequencing typing) genannt. Wenn Virulenzgene verwendet werden, heißt es dann MVLST (multi virulence locus typing). Kurze PCR-Amplifikate von mindestens 6 - 8 ausgewählten Genen, die über ein Genom verteilt sind, werden amplifiziert (ca. 500 bp) und sequenziert. Die Nukleotidaustausche zwischen den Stämmen werden verglichen. Jedem einzigartigen Allel werden Nummern zugeteilt und die Kombination von Zahlen ergibt dann einen sogenannten Stammtyp, der auf diese Weise leicht zu benennen ist. Die Software zur Bearbeitung bzw. Datenbanken mit bereits publizierten Methoden einer Vielzahl von Pathogenen ist z. B. unter [www.pubmlst.org](http://www.pubmlst.org) (K. JOLLEY, Oxford) zu finden. Als Beispiel wurde MVLST von *Listeria monocytogenes* nach einer Veröffentlichung von ZHANG *et al.* (2004) schematisch dargestellt (Abb. 9).

Eine weitere sehr aktuelle Methode nennt sich MLVA (multi locus variable number of tandem repeats analysis). Sie beruht auf der PCR-Amplifikation von sogenannten „tandem repeats“. So nennt man kurze Sequenzwiederholungen, die „in tandem“, d. h. direkt hintereinander

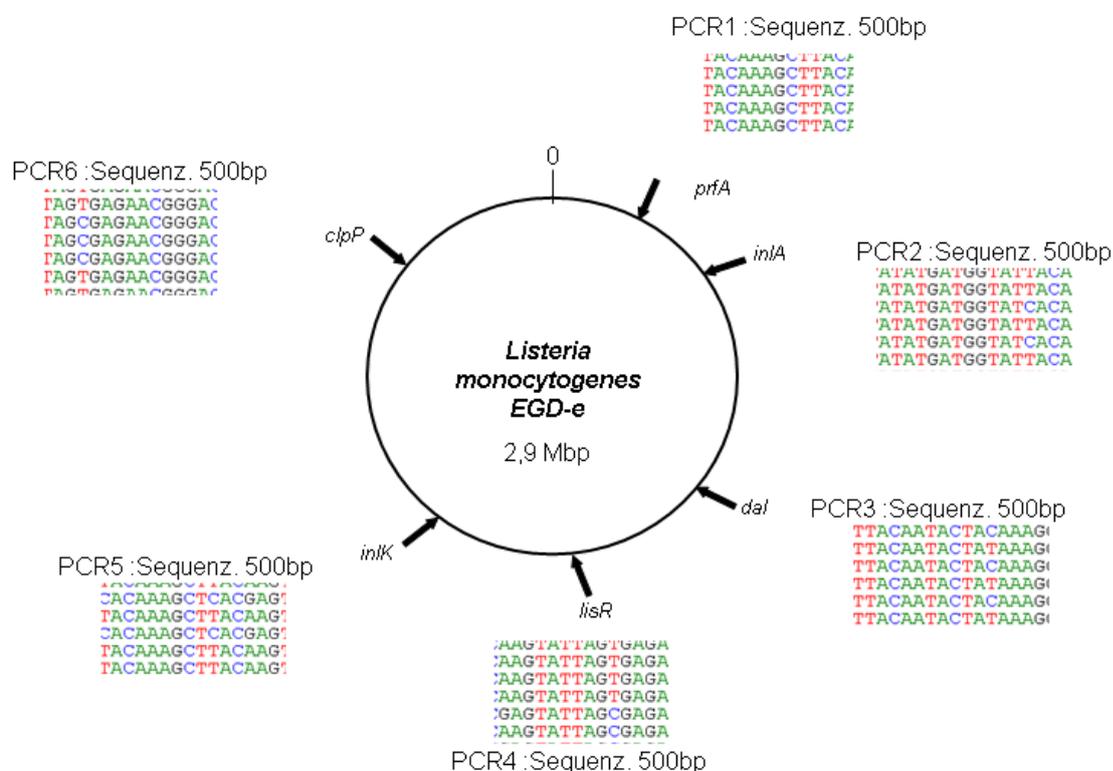


Abb. 9: Schematische Darstellung von MVLST – multi virulence locus sequence typing. Lokalisation der betroffenen Virulenzgene auf dem Genom von *Listeria monocytogenes*, von denen jeweils ein Teil vielfältigt und im Anschluss sequenziert wird (nach ZHANG *et al.* 2004).

vorkommen. Je mehr kurze Sequenzwiederholungen, desto länger ist das erzeugte Amplifikat. Diese lassen sich dann gelelektrophoretisch oder mit Hilfe von Kapillarelektrophorese auftrennen. Die errechnete Anzahl von Wiederholungen wird ebenfalls numerisch für jede Sequenzwiederholung wiedergegeben. Beispielhaft ist die MLVA nach MURPHY *et al.* (2007) bei *Listeria monocytogenes* dargestellt (Abb. 10, 11). Inzwischen existieren „online tools“ zum Durchsuchen von ganzen Genomen nach solchen Sequenzwiederholungen (z. B. [www.minisatellites.u-psud.fr](http://www.minisatellites.u-psud.fr)). Sie zeigen z. B. auch die flankierenden Regionen an, so dass die Auswahl geeigneter Primer erleichtert wird.

### „High throughput“ Methoden – Hochdurchsatzmethoden

Der Trend im letzten Jahrzehnt geht in die Richtung, immer mehr Proben immer schneller zu bearbeiten. Das wird durch Miniaturisierung der Experimente sowie durch zunehmende Automatisierung in allen Arbeitsschritten und natürlich auch in der Datenverarbeitung erreicht.

Seit 2000 und verstärkt seit 2005 hat das MALDI-TOF MS Protein Fingerprinting (siehe oben) die Labore der Mikrobiologie erobert. Nach Kultivierung auf festen Nährböden lassen sich Kolonien bzw. Reinkulturen relativ schnell auf Speziesebene identifizieren, da inzwischen ausreichende Datenbanken mit Vergleichskeimen existieren und mit den Geräten zur Verfügung stehen. Die Methode ist vergleichsweise robust und nicht abhängig von der Kultivierung auf einem speziellen Nährboden. Das erübrigt viele Tests und hilft bei einer schnel-

len Identifizierung. Es lassen sich leicht mehrere hundert Spektren/Identifizierungen pro Tag generieren (Abb. 12). Diese Methode erwies sich bei der Untersuchung von Mikroorganismen von aufgeschnittenen und verpacktem Rohschinken als sehr hilfreich (ALBERT *et al.* 2011).

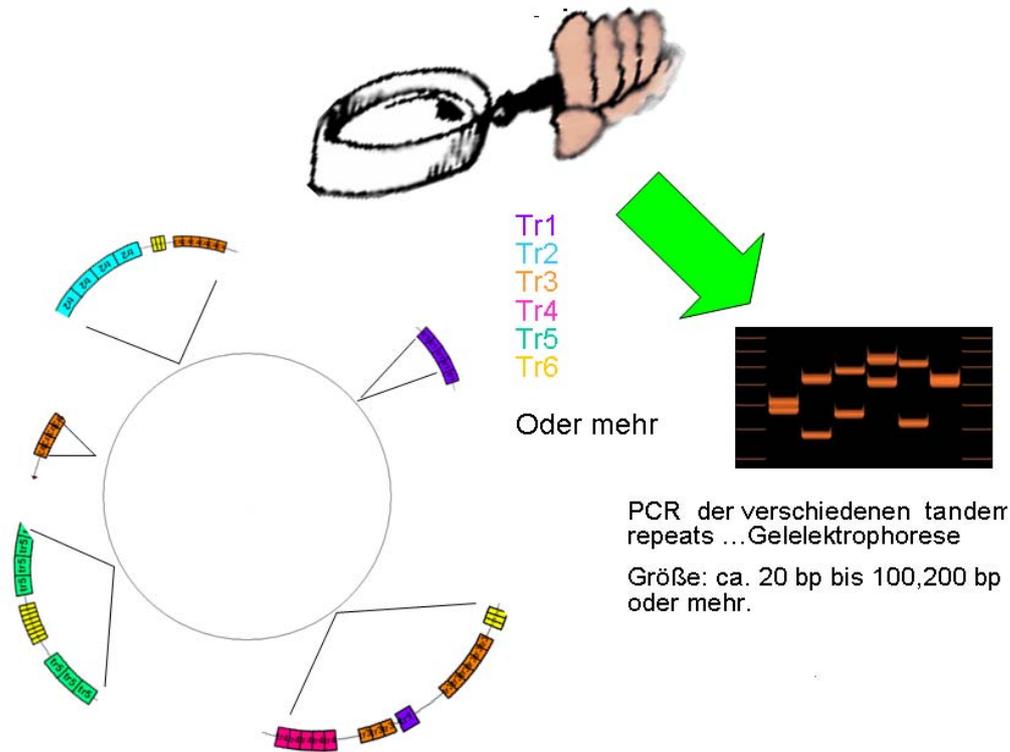


Abb. 10: Schematische Darstellung der MLVA – multi locus variable number of tandem repeats analysis. Tr steht für tandem repeat, kurze Sequenzwiederholungen, die auf einem Genom verteilt sein können

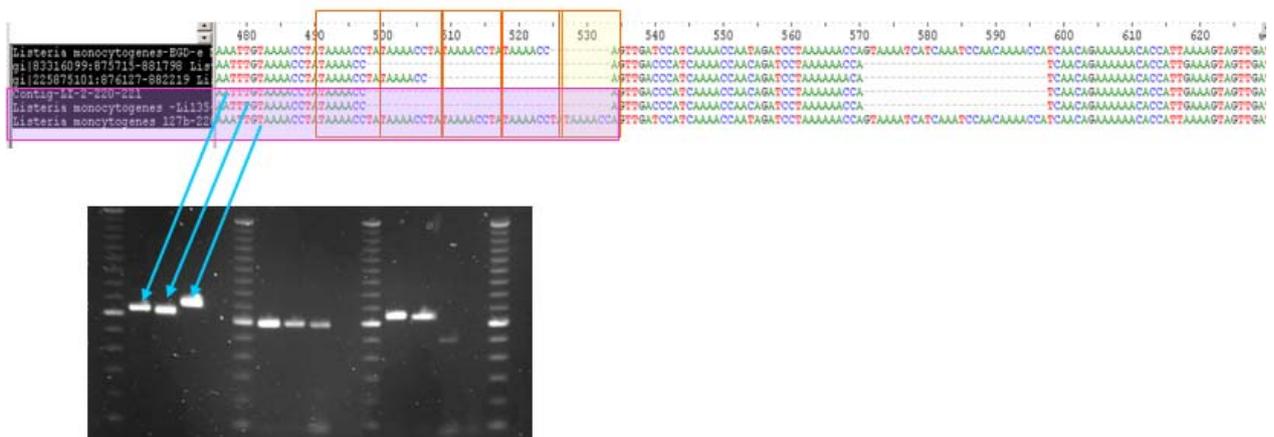


Abb. 11: Darstellung der MLVA beispielhaft mit *Listeria monocytogenes* (nach MURPHY *et al.* 2007) auf Sequenz ebene und nach Agarosegelelektrophorese. Tr1: *taaaacct*.

Eine der rasantesten Weiterentwicklungen der letzten Jahre hat bei der Nukleinsäuresequenzierung stattgefunden. In den 1980er und 90er Jahren wurde noch mit radioaktiven Isotopen später dann mit Fluoreszenzfarbstoffen gearbeitet, große Polyacrylamidgele mussten mühselig gegossen werden und die Sequenzen wurden von Röntgenfilmen per Auge abgelesen. Die Leselängen per Lauf betrug etwa 300 - 400 bp. Im Vorfeld mussten umfangreiche Klonie-

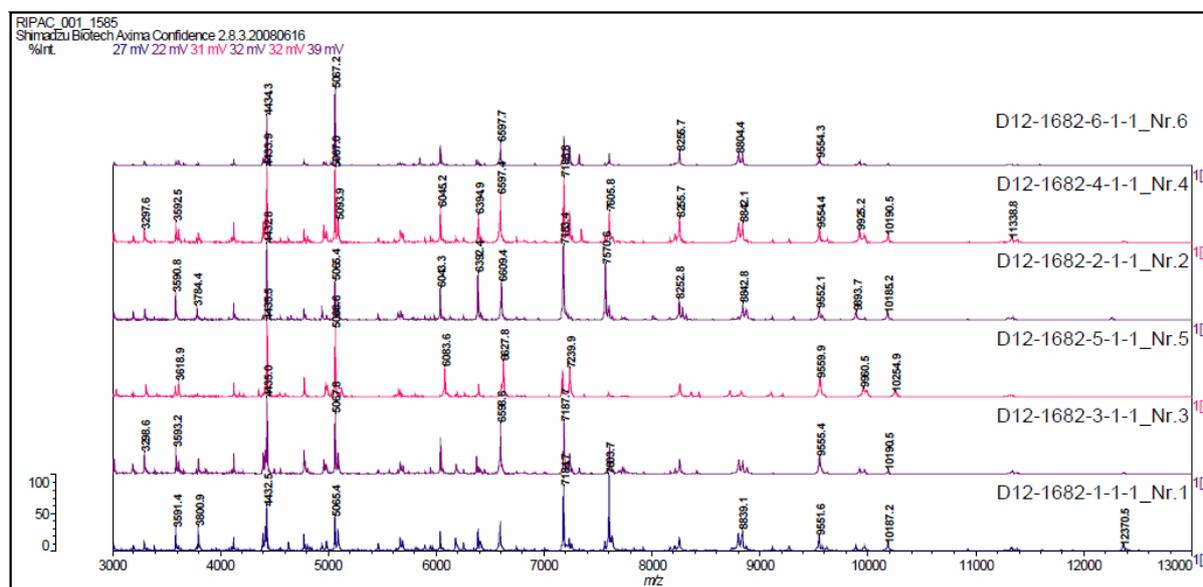


Abb. 12: MALDI-TOF Spektren von 6 *Pseudomonas*-Isolaten aus Fleisch

rungen zur Anreicherung der betroffenen Nukleinsäurefragmente und Reinigungen von Probenmaterial durchgeführt werden. Heute stehen ganze Säle voller Sequenzierautomaten bei Firmen, die die Auftragssequenzierungen nach neuesten Erkenntnissen für den wissenschaftlichen Anwender durchführen. Neue Technologien das sogenannte NGS oder „next generation sequencing“ – Sequenzierung der nächsten Generation - sind seit wenigen Jahren massiv auf dem Vormarsch. Sie bedienen sich der Pyrosequenzierung (Sequenzierung durch DNA-Synthese) und sind dabei, die altbewährten Sequenzierungstechniken (Synthese durch Kettenabbruch nach Sanger) abzulösen. Dazu gehören die 454 GS FLX Titanium und Illumina/ Solexa Technologie. Bei beiden ist kein Klonieren mehr nötig. Nach Fragmentierung werden die zu sequenzierenden Nukleinsäurefragmente vereinzelt und mit ausgeklügelten Primer- und Adapter-Technologien entweder mit Hilfe von klonaler Amplifikation (Ölimmersions-PCR) oder Bridge Amplifikation in sogenannten Clustern vermehrt. In weniger als 12 Stunden können etwa 500 Mbp (500 Millionen Basenpaare) oder mehr sequenziert werden. Aber auch die Biochemie, die für die Leselängen verantwortlich ist, wird ständig verbessert. In der Regel liefert die Titanium-FLX-Technologie längere Leselängen (500 bp und mehr) und ist daher für die spätere Bioinformatik, d. h. die Zusammensetzung der überlappenden Fragmente aus unbekanntem (Mikro-) Organismen zu einem Gesamt-Genom besser geeignet. Illumina-Sequenzieren ist zwar kostengünstiger, wird aber auf Grund der kurzen Leselängen (100 – 150 bp) eher zur Resequenzierung eingesetzt, d. h. Sequenzierung von Organismen, bei denen die Genomstruktur bereits bekannt ist.

Noch vor kurzem dauerte es mehrere Jahre, das Genom eines Bakteriums komplett zu sequenzieren und zu annotieren (ALTERMANN *et al.* 2005). Heute ist das technisch in nur wenigen Tagen möglich. Das hatte die Aufklärung des Genoms von EHEC O104:H4 bei dem „Sprossen“-Ausbruch 2011 um die Gruppe von Karch gezeigt (ROHDE *et al.* 2011). Als Typisierung mit der höchsten Auflösung kann man nun die Sequenzierung betrachten. Es können Veränderungen auf dem Genom direkt sichtbar gemacht werden und mit der Wirkung in Zusammenhang gebracht werden. Keine der oben aufgeführten Typisierungsmethoden kann diese Auflösung erreichen.

Aber damit nicht genug. Unterschiedliche Sequenzierungstechnologien der dritten Generation, wie Ion-Torrent-Technologie oder SMRT (single molecule real-time sequencing) sind bereits in der Vorbereitung. Es herrscht inzwischen ein regelrechter Krieg auf diesem Gebiet, da für die Zukunft ein großer Markt mit viel Kapital zu erwarten ist. Nukleinsäuresequenzierung ist ein wichtiges diagnostisches Tool geworden, dessen Bedeutung in naher Zukunft noch steigen wird. Das betrifft sowohl Mikroorganismen als auch die humane Diagnostik.

## Ausblick

Als ultimative Typisierung lässt sich die Sequenzierung eines gesamten Genoms betrachten. Umfangreiche Datenbanken, die allen offen zugänglich sind in Kombination mit Hochdurchsatztechnologien und die stetige Weiterentwicklung einer bedienerfreundlichen Bioinformatik erlauben bereits jetzt den Austausch an Methoden und Typisierungsmustern, die die Aufklärung von Ausbrüchen auch überregional kurzfristig ermöglichen.

In der Natur und im Lebensmittel finden sich meist komplexe mikrobielle Gesellschaften, die auf noch ungeklärte Weise vielfältig zusammenwirken. Seit einiger Zeit hat sich daraus eine neue wissenschaftliche Disziplin entwickelt, die sogenannte „systems biology“ oder Systembiologie, die sich mit diesem komplizierten Zusammenwirken befasst. Die Sequenzierung ganzer Metagenome, d. h. aller vorhandenen Arten, die zu einem bestimmten Zeitpunkt existieren, ermöglicht bisher ungeahnte Einblicke.

Nichtsdestotrotz wird es auch in Zukunft bei der Charakterisierung einzelner Bakterien notwendig sein, einen polyphasischen Identifizierungsansatz zu wählen, d. h. mehrere Methoden mit verschiedenen Zielrichtungen parallel anzuwenden. Bakterien sind im Hinblick auf den Stoffwechsel sehr flexibel, ihre Umsetzungen bei der Fermentation oder bei der Lagerung von Lebensmitteln spielen für den Geschmack eine entscheidende Rolle. Somit wird auch in Zukunft die bunte Reihe für eine Bestimmung des Phänotyps nicht überflüssig werden.

## Dank

Unser Dank gebührt den hervorragenden technischen Assistenzen von Frau J. Popp für die Box-PCR, Eric PCR, M13-PCR, Frau H. Loske für die *Listeria monocytogenes* MLVA, MLST und V. Kluge für die *Listeria monocytogenes* PFGE Muster, der Vet.med. Frau E. Riemenschneider für die *Stachybotrys chartarum* Plasmidmuster, den Bibliothekarinnen Frau Lochmann und Frau Stöcker für die Bereitstellung der historischen Dokumente und der Fotografin des MRI-Kulmbach Frau Dresel für die Anfertigung der Bilder im Labor.

## Literatur

Albert, T., Grosse-Herrenthey, A., Lange-Starke, A., Kroeckel, L. (2011): Identification of staphylococci from sliced raw ham. *Mitteilungsblatt der Fleischforschung Kulmbach* 50, S. 153–162

Altermann, E., Russell, W. M., Azcarate-Peril, M. A., Barrangou, R., Buck, B. L., McAuliffe, O., Souther, N., Dobson, A., Duong, T., Callanan, M., Lick, S., Hamrick, A., Cano, R., Klaenhammer, T. R. (2005): Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3906-3912

Campos Braga, P. A, Tata, A., dos Santos, V. G., Barreiro, J. R., Schwab, N. V., dos Santos, M. V., Eberlin, M. N., Ferreira, C. R. (2013): Bacterial identification: from the agar plate to the mass spectrometer. *Rsc Advances* 3:994–1008

Harrington, C. S., Moran, L., Ridley, A. M., Newell, D. G., Madden, R. H. (2003): Inter-laboratory evaluation of three flagellin PCR/RFLP methods for typing *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: the CAMPYNET experience. *J Appl Microbiol* 95:1321–1333

Kroeckel, L., Schillinger, U., Franz, C. M., Bantleon, A., Ludwig, W. (2003): *Lactobacillus versmoldensis* sp. nov., isolated from raw fermented sausage. *Int J Syst Evol Microbiol* 53:513–517

- Lick, S., Brockmann, E., Heller, K. J. (2000): Identification of *Lactobacillus delbrueckii* and subspecies by hybridization probes and PCR. *Sys Appl Microbiol* 23:251–259
- Lick, S. (2003): Review: Typing systems for lactobacilli. *Milchw.-Milk Science Intern* 58:256–260
- Lewin, B., Genes, V., Oxford University Press and Cell Press, New York, (1994)
- Lewin, B., Genes, IX, Jones and Bartlett Publishers, London, UK, (2008)
- Murphy, M., Corcoran, D., Buckley, J. F., O'Mahony, M., Whyte, P., Fanning, S. (2007): Development and application of Multiple-Locus Variable number of tandem repeat Analysis (MLVA) to subtype a collection of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* 115:187-194
- Nachamkin, I., Ung, H., Patton, C. M. (1996): Analysis of HL and O serotypes of *Campylobacter* strains by the flagellin gene typing system. *J Clin Microbiol* 34:277-281
- Rohde, H. *et al.* (2011): Open-Source Genomic Analysis of Shiga-Toxin-Producing *E. coli* O104:H4. *N Engl J Med* 365:718-724
- Schillinger, U., Luecke, F.-K. (1987): Identification of *Lactobacilli* from Meat and Meat Products. *Food Microbiol (London)* 4:199-208
- Upcroft, P. (1991): DNA fingerprinting of the human intestinal parasite *Giardia intestinalis* with hypervariable minisatellite sequences. *EXS* 58:70-84
- Vaneechoutte, M., Dijkshoorn, L., Tjernberg, I., Elaichouni, A., de VP, Claeys, G., Verschraegen, G. (1995): Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *J Clin Microbiol* 33:11-15
- Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J. R. (1991): Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucl. Acids Res* 19:6823-6831
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res* 23:4407-4414
- Wei, M. Q., Groth, D. M., Mendis, A. H., Sampson, J., Wetherall, J. D., Grubb, W. B. (1992): Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with an M13 repeat probe. *J Hosp Infect* 20:233-245
- Wheelis, M. L., Kandler, O., Woese, C. R. (1992): On the nature of global classification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:2930-2934
- Woese, C. R., Kandler, O., Wheelis, M. L. (1990): Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:4576-4579
- Zhang, W., Jayarao, B. M., Knabel, S. J. (2004): Multi-virulence-locus sequence typing of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 70:913-920