

Polymerase-Kettenreaktion in der bakteriologischen Lebensmitteldiagnostik am Beispiel von *Listeria monocytogenes* = Polymerase chain reaction in bacteriological food analysis : *Listeria monocytogenes* as an example

Autor(en): **Candrian, U. / Niederhauser, Ch. / Höfelein, Christiane**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **82 (1991)**

Heft 6

PDF erstellt am: **12.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982430>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

U. Candrian¹, Ch. Niederhauser¹, Christiane Höfelein¹, H.P. Bühler², U. Müller² und J. Lüthy¹, Institut für Biochemie¹, Universität Bern, und Kantonales Laboratorium², Bern

Polymerase-Kettenreaktion in der bakteriologischen Lebensmitteldiagnostik am Beispiel von *Listeria monocytogenes*

Polymerase Chain Reaction in Bacteriological Food Analysis:
Listeria monocytogenes as an Example

Einleitung

Zu Beginn der siebziger Jahre beschrieben *Khorana* und Mitarbeiter (1) eine Idee zur *in vitro* Replikation von Desoxyribonukleinsäure (DNA) mittels Oligonukleotiden, Nukleotiden und einer DNA-Polymerase. Nach der Hitzedenaturierung eines DNA-Duplexes zu Einzelsträngen wird in der Gegenwart eines Überschusses an zwei Oligonukleotiden (komplementär zu den Einzelsträngen, sogenannte Primer) abgekühlt. Die resultierenden Einzelstrang-Primer-Komplexe können mittels einer DNA-Polymerase durch DNA-Neusynthese aus den Nukleotiden in zwei komplette DNA-Duplex-Moleküle übergeführt werden. Wie dieselbe Arbeitsgruppe in ersten Experimenten (2) zeigen konnte, führt die zyklische Wiederholung dieses Ansatzes zu einer Anreicherung des spezifischen, durch die Primer definierten DNA-Stückes. In der Folge geriet diese Idee zur Vervielfältigung von spezifischen DNA-Fragmenten in Vergessenheit. Dies vermutlich deshalb, weil zu dieser Zeit Oligonukleotide nur äusserst schwer zugänglich waren. Zu Beginn der 80er Jahre änderte sich dies mit der kommerziellen Einführung der DNA-Synthese-Maschinen. Die Methode wurde von der Gruppe *Erlich* (3, 4) weiter ausgearbeitet und in eine praktisch brauchbare Form gebracht. Als Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) revolutionierte sie in den letzten Jahren die Molekularbiologie. Die Methode erlaubt, innert weniger Stunden aus wenigen Molekülen der Erbsubstanz DNA Milliarden von Kopien eines gewünschten Fragments zu erzeugen. Als sogenannte *in vitro* Klonierung macht die PCR beispielsweise das internationale Projekt zum Sequenzieren des menschlichen Genoms überhaupt erst möglich. Die sich dank der PCR in der molekularbiologischen Forschung ergebenden Möglichkeiten sind unzählig und wurden in bereits

drei Laborhandbüchern beschrieben (57). Die vorliegende Arbeit soll die Anwendung der PCR als diagnostisches Instrument in verschiedenen Bereichen und anhand eines praktischen Beispiels erläutern.

Prinzip der PCR

Die PCR erlaubt das Erkennen eines bestimmten kurzen DNA-Stückes (100 bis einige Tausend Basenpaare) unter einer Vielzahl verschiedener DNA-Fragmente und eine hochspezifische Anreicherung dieses Fragmentes. In gewissem Masse imitiert diese *in vitro* Vervielfältigungsmethode die DNA-Replikationsmaschinerie einer lebenden Zelle. Die PCR-Vervielfältigung benötigt zwei Oligonukleotide, die den zu multiplizierenden DNA-Abschnitt flankieren und derart an die zwei komplementären DNA-Stränge binden können, dass ihre 3'-Enden gegeneinander zeigen. Im ersten Schritt des ersten Vervielfältigungszyklus wird die als Matrize vorliegende DNA durch Erhitzen auf 95 °C in ihre Einzelstränge zerlegt (Abb. 1, Z1/S1). Anschliessend wird im zweiten Schritt des ersten Zyklus auf ca. 55 °C abgekühlt. Dies erlaubt den im Überschuss vorliegenden Primern, an die komplementären Abschnitte der Einzelstränge zu hybridisieren (Abb. 1, Z1/S2). Im dritten

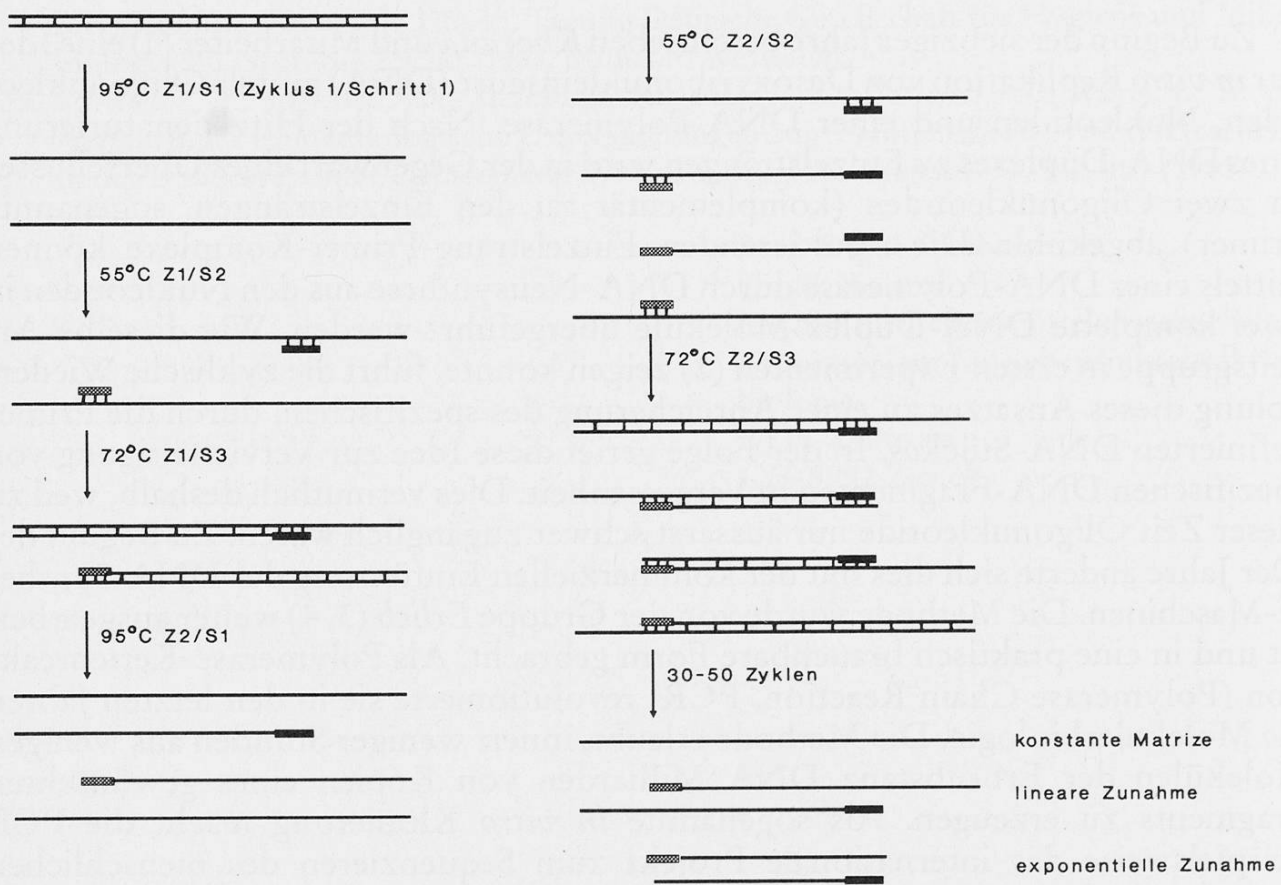


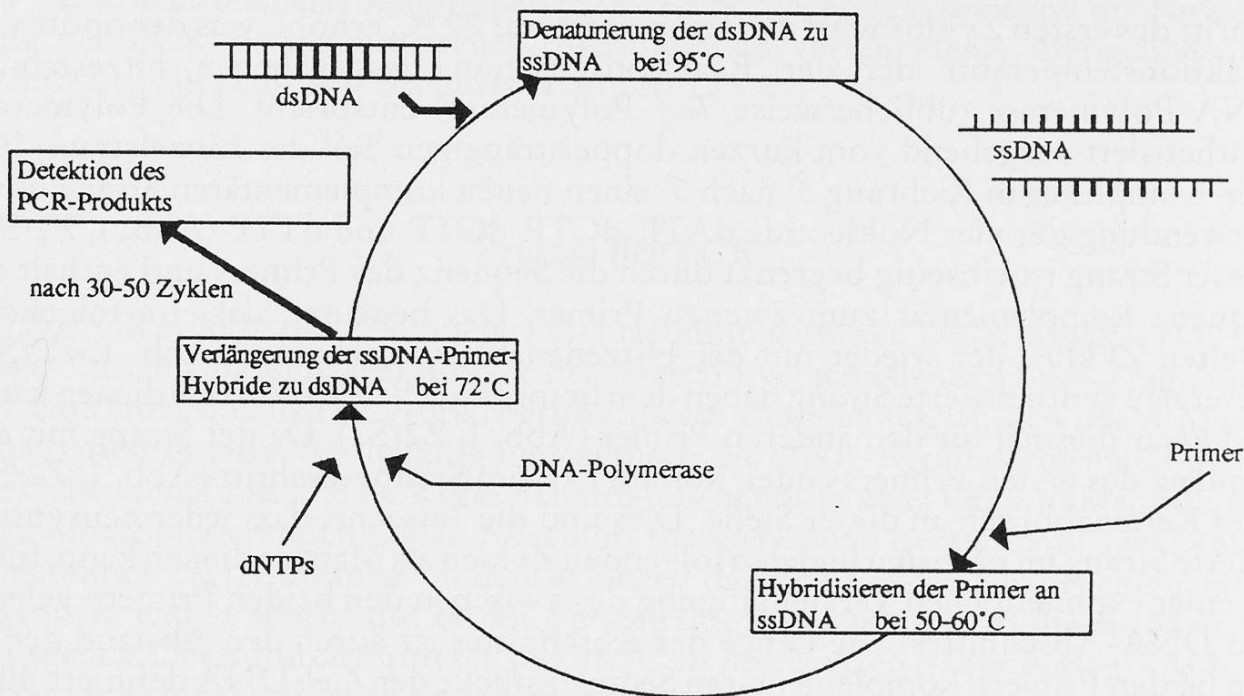
Abb. 1. Mechanismus der Polymerase-Kettenreaktion

Schritt des ersten Zyklus wird die Temperatur auf 72 °C erhöht, was der optimalen Reaktionstemperatur der der Reaktionsmischung zugegebenen hitzestabilen DNA-Polymerase (üblicherweise *Taq* Polymerase) entspricht. Die Polymerase synthetisiert ausgehend vom kurzen doppelsträngigen Teil des Einzelstrang-Primer-Komplexes in Richtung 3' nach 5' einen neuen komplementären Strang unter Verwendung der vier Nukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP (Abb. 1, Z1/S3). Dieser Strang ist einseitig begrenzt durch die Sequenz des Primers und enthält die Sequenz komplementär zum zweiten Primer. Das bedeutet, dass im folgenden zweiten Zyklus, der wieder mit der Hitzedenaturation beginnt (Abb. 1, Z2/S1), dieser neu synthetisierte Strang neben dem ursprünglichen als Matrize dienen kann, und zwar diesmal für den anderen Primer (Abb. 1, Z2/S2). Da der Strang mit der Sequenz des ersten Primers endet, kommt es beim Syntheseschritt (Abb. 1, Z2/S3) zum Kettenabbruch an dieser Stelle. Dies und die Tatsache, dass jeder neusynthetisierte Strang im nächsten und den folgenden Zyklen als Matrize dienen kann, führt zu einer exponentiellen Vervielfältigung des zwischen den beiden Primern gelegenen DNA-Abschnittes. Die Länge des Abschnittes ist durch den Abstand der zu den beiden Primern komplementären Sequenzstücke der Ziel-DNA definiert. Eine Zusammenfassung des Reaktionsablaufes und der Charakteristika der PCR findet sich in Abbildung 2.

Diagnostische Anwendung der PCR

Die Anwendung der PCR als Analysenmethode ist in verschiedenen Gebieten denkbar. Neben dem Einsatz in der forensischen Medizin (8–10), dem Überwachen von genetisch veränderten Mikroorganismen in der Umwelt (11) und der Analyse von verfälschten Lebensmitteln (12) ist vor allem die Bedeutung in der Diagnostik von Erbkrankheiten und von Infektionskrankheiten wichtig (7). Zu letzterer gehört auch der Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln und Umweltproben.

Weit fortgeschritten ist die PCR-Diagnostik auf dem Gebiet der Virologie. PCR-Methoden liegen für den Nachweis von wichtigen Gruppen menschenpathogener Viren wie Herpesviren, Hepatitisviren, Retroviren, Papillomaviren und Enteroviren in klinischem Material vor (5–7). Dagegen fehlen Protokolle für den Nachweis in Umweltproben. Die Zahl der Arbeiten betreffend den Nachweis von menschenpathogenen Parasiten ist demgegenüber sehr beschränkt (13–20). Beträchtlich ist die Anzahl von pathogenen Bakterien, die bisher mittels PCR analysiert wurden (Tabelle 1). Die in diesen Arbeiten üblicherweise gewählte Vorgehensweise ist das Ausarbeiten von spezifischen und sensitiven PCR-Tests anhand roher Lysate von reinen Bakterienstämmen oder deren DNA. Ein beträchtlicher Anteil der Publikationen beinhaltet bereits Protokolle zur Analyse von klinischem Material, in welchem die Bakterien oft in relativ grosser Zahl vorliegen. Demgegenüber stellt die Analyse von Lebensmitteln und auch Wasser erhöhte Anforderungen an die Sensitivität. So fordert beispielsweise für die Schweiz die Verordnung über die



Wichtige Charakteristika der PCR:

- Für jeden der beiden Einzelstränge wird ein Primer verwendet. Die beiden Primer begrenzen mit ihren 3'-Enden nach innen das zu vervielfältigende DNA-Stück.
- Neu synthetisierte DNA-Stränge dienen in den folgenden Zyklen als zusätzliche Vorlage zu Komplementierung.
Dies führt zu einer exponentiellen Vervielfältigung des Ziel-DNA-Stücks.
- Die Länge und die Nukleotidsequenz der Primer bestimmen neben der Höhe der Hybridisierungstemperatur die Spezifität der Reaktion.
- Die Verwendung von hitzestabilen Polymerasen erlaubt die Automatisierung der repetitiven Temperaturzyklen.

Abb. 2. Die Polymerase-Kettenreaktion im Überblick

Die Zugabe von Primern, Polymerase und dNTPs erfolgt einmal vor Beginn des ersten Zyklus

hygienisch-mikrobiologischen Anforderungen an Lebensmittel, Gebrauchs- und Verbrauchsgegenstände vom 1. Juli 1987 mit Änderung vom 25. Februar 1988, dass *Listeria monocytogenes* in 10 g Lebensmittel nicht nachweisbar sein darf.

Das Erkennen eines einzelnen Bakteriums beziehungsweise einer einzelnen Zielsequenz aus einer komplexen 10-g-Lebensmittelprobe in einer 100- μ l-PCR übersteigt deren Potential, weil es in der Regel nicht gelingen wird, dieses einzelne Zielmolekül aus der komplexen Lebensmittelmatrix zu isolieren. Das Problem lässt sich prinzipiell dadurch lösen, dass als Zielsequenz für die PCR ein Gen gewählt wird, das im betreffenden Bakteriengenom in mehreren Kopien vorliegt. Zu diesem Ansatz liegen zurzeit noch keine praktischen Erfahrungen vor. Ein zweiter, praktisch bereits erprobter Ansatz zur Lösung dieses Problems ist der Einbezug von Kultivierungsschritten vor der PCR-Analyse. Dazu liegen vier Publikationen vor:

Tabelle 1. In der Literatur beschriebene PCR-Methoden zur Erkennung von pathogenen Bakterien

Organismus	Literaturstellen
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	21
<i>Aeromonas hydrophila</i>	22
<i>Bordetella pertussis</i>	23
<i>Borrelia burgdorferi</i>	24–29
<i>Brucella</i> ssp.	30
<i>Chlamydia psittaci</i>	31
<i>Chlamydia trachomatis</i>	32–35
<i>Chlamydia</i> ssp.	36, 37
<i>Clostridium difficile</i>	38–40
<i>Escherichia coli</i> , enterohämorrhagische	41–44
<i>Escherichia coli</i> , enterotoxigene	45–53
<i>Haemophilus influenzae</i>	54
<i>Helicobacter pylori</i>	55, 56
<i>Legionella pneumophila</i>	57–60
<i>Legionella</i> ssp.	60
<i>Listeria monocytogenes</i>	61–66
<i>Listeria</i> ssp.	62
<i>Mycobacterium bovis</i>	67, 68
<i>Mycobacterium leprae</i>	69–73
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	68, 74–84
<i>Mycobacterium</i> ssp.	68, 85, 86
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	87
<i>Salmonella typhi</i>	88, 89
<i>Salmonella typhimurium</i>	90
<i>Salmonella</i> ssp.	91
<i>Shigella</i> ssp.	47, 91–93
<i>Staphylococcus aureus</i>	94–96
<i>Treponema</i> ssp.	97
<i>Vibrio cholerae</i>	98
<i>Vibrio vulnificus</i>	99
<i>Yersinia enterocolitica</i>	100, 101
<i>Yersinia</i> ssp.	102

der Nachweis von *Shigella flexneri* in Salat (93), von *Vibrio vulnificus* in Austern (99), von *Staphylococcus aureus* in Milchpulver (96) und von enterotoxischen *Escherichia coli* in Hackfleisch (52). Von allen Arbeitsgruppen wurden die entsprechenden Analysenprotokolle (Kultivierung, Probenaufarbeitung für PCR) anhand von künstlich kontaminierten Lebensmittelproben ausgearbeitet. Dazu wurden jeweils frische Kulturen mit voll lebensfähigen Bakterien verwendet. Dies bedeutet aber, dass die derart erarbeiteten Protokolle für natürlich kontaminierte Lebensmittel, die Bakterien mit in der Regel reduzierter Lebensfähigkeit enthalten, noch zu validieren sind. Als Vergleichsmethode eignet sich dazu die klassische Kultivie-

rungsmethode. Dass eine solche Validierung tatsächlich notwendig ist, beweisen unsere eigenen, im nächsten Kapitel vorgestellten Arbeiten zum Nachweis von *Listeria monocytogenes* in verschiedensten Lebensmitteltypen.

Ein zur Kultivierung alternativer Ansatz ist der Versuch des direkten Bakterien-nachweises in Lebensmitteln oder Wasser durch PCR. Dabei wird natürlich eine reduzierte Sensitivität in Kauf genommen, die aber in Zukunft durch verbesserte Isolationsmethoden wieder verbessert werden kann. Vorausgesetzt, dass spezifische Situationen wie beispielsweise das intrazelluläre Vorliegen von Bakterien berücksichtigt werden, ist dabei das Verwenden von künstlich kontaminierten Proben zur Ausarbeitung von Analysenprotokollen zulässig. In einem derartigen Ansatz isolierten Notermans und Mitarbeiter (64) aus listerienhaltigem Käse die gesamte Proben-DNA und analysierten diese mittels PCR auf spezifische Sequenzen von *Listeria monocytogenes*. Aus zwei Gründen lieferte dieser Ansatz keine reproduzierbaren Resultate und muss daher als Misserfolg betrachtet werden. Erstens wurden zusammen mit der DNA Faktoren isoliert, die die PCR hemmten und die nur durch extensive Reinigungsschritte entfernt werden konnten. Ein zweites Problem ist bei diesem Vorgehen die grosse Menge von mitisolierter, unspezifischer Proben-DNA, die die spezifischen DNA-Sequenzen derart verdünnt, dass in einer 100- μ l-PCR schlichtweg nicht genug DNA (max. 10 μ g) eingesetzt werden kann, um ein positives Resultat zu erhalten.

Das Problem lässt sich dadurch lösen, dass an Stelle von DNA die Bakterienpopulation isoliert wird. Einfaches Waschen der prinzipiell durch Zentrifugation erhaltenen Bakterien und ihr Aufschluss mittels physikalischer oder enzymatischer Methoden bringt ihre DNA in eine Form, die von der PCR akzeptiert werden kann. Derartige Protokolle wurden von der Gruppe Atlas für *Legionella pneumophila* (58) und *Escherichia coli* (91) ausgearbeitet. Die Nachweisgrenze betrug im Fall von *Escherichia coli* weniger als 10 Bakterienzellen pro 100 ml Trinkwasser. In unserem Labor wurde eine analoge Methode für den Nachweis von *Escherichia coli* in Trink- und Oberflächenwasser entwickelt (53). Bedingt durch Schwebestoffe stellte das Oberflächenwasser besondere Anforderungen, die durch Filtrationsschritte gelöst wurden. Die Nachweisgrenze lag im Bereich von 20 Zellen pro 100 ml und die Methode lieferte Resultate, die in guter Übereinstimmung mit der Kultivierungsmethode waren (53). Darüber hinaus entwickelten wir ein Protokoll zum direkten Nachweis von *Escherichia coli* in Weichkäse, das ebenfalls auf der Isolation intakter Bakterien ohne Kultivierungsschritte beruht (53). Diese Methode eignet sich besonders zum Nachweis von enterotoxigenen *Escherichia coli*, da diese Organismen unter den Selektivbedingungen der klassischen Kultivierungsmethoden die auf Plasmiden lokalisierten Toxingene verlieren können (50). Solche Stämme konnten zudem bisher nur als Reinstämme mittels Tierversuchen, Zellkulturtesten oder immunologischen Methoden erkannt werden. Es gelang uns, mit der PCR-Methode in zwei Proben von Weichkäse der Varietät Vacherin Mont-d'Or, die mit mehreren Hunderttausend *Escherichia coli* pro g verunreinigt waren (bestimmt mittels klassischer Kultivierung), enterotoxigene *Escherichia coli* in einer Konzentration von etwa 1000 pro g nachzuweisen (53). Der Versuch, mittels Kultivierung enterotoxigene Stämme aus den beiden Proben zu isolieren, blieb erfolglos. In

weiteren Experimenten entwickelten wir ein Protokoll zum direkten Nachweis von *Listeria monocytogenes* in künstlich kontaminierter pasteurisierter Milch, das eine Nachweisgrenze von 10 Bakterien pro 10 ml aufweist (65).

Nachweis von *Listeria monocytogenes* in Lebensmitteln mittels PCR

Zurzeit sind die DNA-Sequenzdaten von drei Virulenzgenen von *Listeria monocytogenes* bekannt. Dies sind: das für ein Invasionsprotein kodierende Gen *iap* (103), das Haemolysingen *hlyA* (104) und ein Gen, das für eine Metalloprotease kodiert und als *mpl* (105) oder *prtA* (106) bezeichnet wurde. Wir entwickelten *iap*- und *hlyA*-PCR-Systeme, die mit ca. 100 *Listeria monocytogenes*-Stämmen aller bekannten Serotypen validiert wurden (65, 66). Die negative Validierung erfolgte mit den weiteren Spezies des Genus *Listeria* (zum Beispiel *Listeria ivanovii* und *Listeria seeligeri* jedoch ohne *Listeria murrayi*) und mit zahlreichen weiteren Bakterienpezies (65, 66 und nicht publizierte Resultate). Kürzlich arbeiteten wir auch noch einen *mpl*-PCR-Test aus, der gegenwärtig validiert wird (Ch. Höfelein, nicht publizierte Resultate). In Abbildung 3a sind die Resultate einer PCR, in der alle drei Gene in einem einzigen Ansatz (Multiplex-PCR), ausgehend von reinen Stämmen vervielfältigt wurden, durch elektrophoretische Trennung in einem Agarosegel dargestellt. Die Visualisierung der DNA-Fragmente erfolgte mittels Ethidiumbromid und UV-Licht. Die PCR-Primer wurden so definiert, dass das *mpl*-Fragment eine Länge von 342 Basenpaaren (bp), das *hlyA*-Fragment eine von 234bp und das *iap*-Fragment eine Länge von 131bp aufweisen (Abb. 3a, Bahnen 2–5). Die getesteten Serotypen *Listeria monocytogenes* 1/2a (Bahn 2), 1/2b (Bahn 3), 1/2c (Bahn 4) und 4b (Bahn 5) ergaben alle die erwarteten drei DNA-Fragmente. Verdauung der Fragmente mit der *TaqI*-Restriktionsendonuklease erlaubt es, den Serotyp 4b von den anderen drei Serotypen zu unterscheiden (vorläufige Resultate mit einer begrenzten Anzahl von Stämmen erhalten). In Abbildung 3b wurde das unverdaute *mpl*-Fragment in Bahn 1 geladen. Die restlichen Bahnen enthalten die mit *TaqI* verdauten Fragmente der 4 erwähnten Serotypen. Der Vergleich der Bahnen 2–4 (Serotypen 1/2a, 1/2b, 1/2c) mit der Bahn 5 (4b) belegt, dass der Serotyp 4b im Gegensatz zu den anderen Serotypen in diesem Genfragment keine *TaqI*-Schnittstellen enthält. Ähnlich ist die Situation im Fall der *hlyA*-PCR, bei der ebenfalls der Serotyp 4b spezifisch erkannt werden kann (Abb. 3c). Das 234bp-Fragment, das von den Serotypen 1/2a, 1/2b und 1/2c erhalten wird, enthält 3 *TaqI*-Schnittstellen, die die folgenden kleineren Fragmente ergeben: 131bp, 55bp, 33bp und 15bp (Bahnen 2–4, die kleinsten Fragmente sind im Agarosegel nicht sichtbar). Demgegenüber weist das DNA-Fragment des Serotyps 4b nur zwei Schnittstellen auf, die DNA-Stücke der Grössen 186bp, 33bp und 15bp ergeben (Abb. 3, Bahn 5). Im *iap*-Fragment liegen keine sogenannten *TaqI*-Restriktionspolymorphismen vor, die eine Unterscheidung der Serotypen erlauben würden (Abb. 3d).

Für die Bestimmung von *Listeria monocytogenes* in Lebensmitteln wurden die *iap*- und *hlyA*-PCR in der Form eines Duplexsystems gewählt (66). Um eine

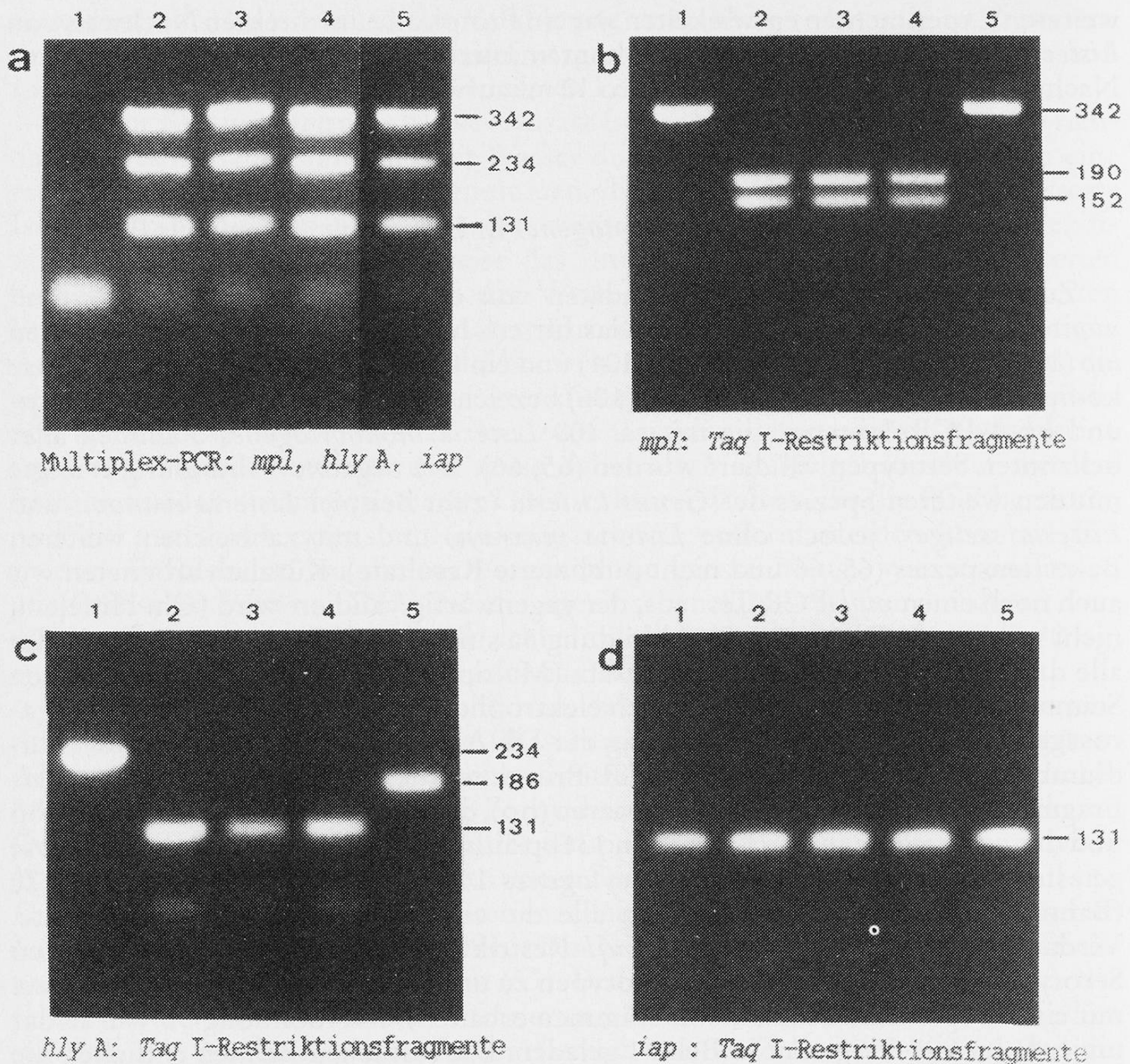
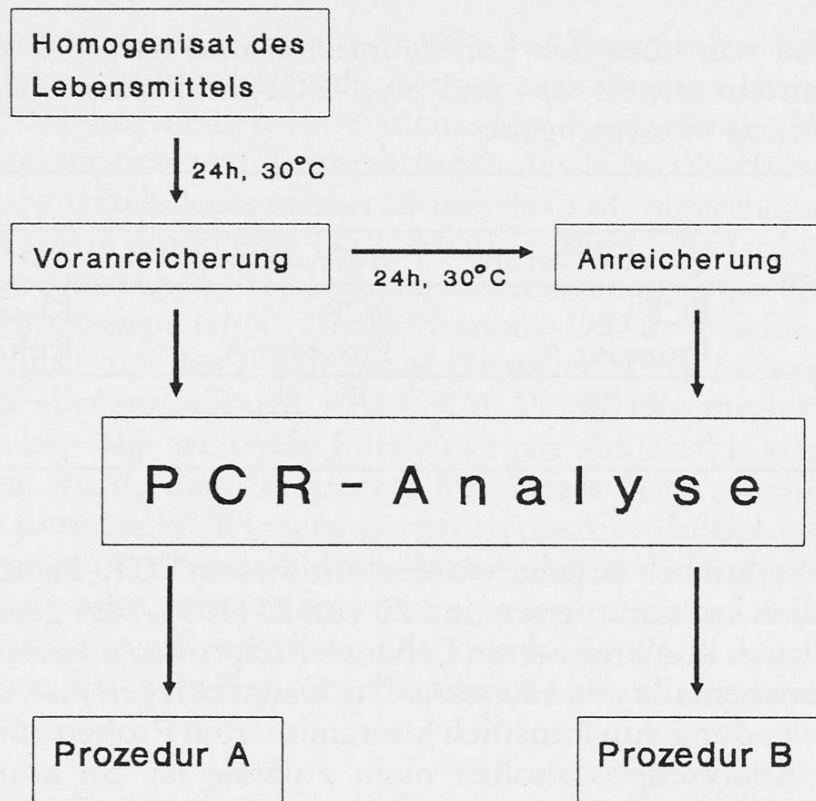


Abb. 3. Analyse von *Listeria monocytogenes* Amplifikationsprodukten mittels Agarosegelelektrophorese. Ca. 10^5 Listerien wurden mittels Lysozym/Proteinase-K-Behandlung aufgeschlossen und wie beschrieben 50 *iap*-, *hlyA*- und/oder *mpl*-PCR-Zyklen unterworfen (65). Abb. 3a: Multiplex-PCR: 342bp *mpl*-Fragment, 234bp *hlyA*-Fragment, 131bp *iap*-Fragment. Abb. 3b: *TaqI*-Restriktion von *mpl*-Fragmenten. Abb. 3c: *TaqI*-Restriktion von *hlyA*-Fragmenten. Abb. 3d: *TaqI*-Restriktion von *iap*-Fragmenten. Bahnen: 1, Negativkontrolle in Abb. 3a und unverdaute Fragmente in Abb. 3b–d; 2, *Listeria monocytogenes* 1/2a; 3, *Listeria monocytogenes* 1/2b; 4, *Listeria monocytogenes* 1/2c; 5, *Listeria monocytogenes* 4b. Ziffern auf der rechten Seite der einzelnen Teilabbildungen bezeichnen die Fragmentgrößen in Basenpaaren (bp). Bei der intensiven kurzen Bande (<100 bp) in Bahn 1 der Abbildung 3a (Negativkontrolle) handelt es sich um ein sogenanntes Primer-Primer-Artefakt, das häufig bei Abwesenheit von Ziel-DNA entsteht.



- 1:100 Verdünnung der Kultur
- enzymatischer Aufschluss
- PCR
- Gelelektrophorese

- 5fache Anreicherung durch Zentrifugation
- enzymatischer Aufschluss
- PCR
- Gelelektrophorese

Abb. 4. Schema der Analyse von Lebensmitteln auf *Listeria monocytogenes* (Anreicherungs-schritte gemäss Schweiz. Lebensmittelbuch)

ausreichende Sensitivität zu erreichen und um in Übereinstimmung mit der klassischen Methodik nach Schweizerischem Lebensmittelbuch (107) primär kultivierbare Bakterienzellen zu erfassen, wurde ein Protokoll mit kulturellen Anreicherungs-schritten ausgearbeitet. Die einzelnen Kultivierungsschritte und die Aufarbeitungsbedingungen sind in Abbildung 4 schematisch dargestellt. Daraus geht hervor, dass im Prinzip vier Protokolle erarbeitet wurden: Analyse der Voranreicherung mittels Prozedur A oder der 500fach sensitiveren Prozedur B mit einem Zeitaufwand von total zwei Tagen und Analyse der Anreicherung mit Prozedur A oder Prozedur B mit einem Zeitaufwand von total drei Tagen. Die Validierung der Protokolle erfolgte durch den Vergleich mit der klassischen Kultivierung (66). Die Auswahl der analysierten Proben umfasste Milch und Milchprodukte, Rohfleisch, Brühwurstwaren, Geflügel, Gemüse, Fisch und Schalentiere. Ein Teil der Proben wurde mit frischen Übernachtskulturen mit 1 CFU bis zu 10^9 CFU *Listeria monocytogenes* pro 10 g Lebensmittel künstlich kontaminiert. Das wichtigste Ergebnis ist die perfekte Übereinstimmung zwischen den Resultaten erhalten mit dem PCR-Protokoll Anreicherung/Prozedur A und der klassischen Kultivierungsme-

Tabelle 2. Analyse von künstlich kontaminierten und natürlich belassenen Lebensmitteln mittels *iap*- und *hlyA*-PCR und klassischer Kultivierung auf *Listeria monocytogenes*

Anzahl Proben anal.	künstl. Kontamination	Anzahl Proben positiv		
		Voranreicherung	Anreicherung	Anreicherung
		PCR Prozedur A	PCR Prozedur A	Klassische Kultivierung
75	ja	73	75	75
345	nein	3	20	20

thode. Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, wurden mit diesem PCR-Protokoll 75 von 75 (100%) der künstlich kontaminierten und 20 von 20 (100%) der gemäss klassischer Kultivierung natürlich kontaminierten Lebensmittelproben erkannt. Zwei weitere Resultate sind aber ebenfalls von Interesse. Die Daten belegen klar, dass wie bereits dargelegt die Verwendung von künstlich kontaminierten Proben zur Ausarbeitung von endgültigen Analysenprotokollen nicht zulässig ist. So konnten mit dem schnellsten und einfachsten PCR-Protokoll Voranreicherung/Prozedur A zwar 73 aus 75 (97%) der künstlich kontaminierten Proben richtig erkannt werden. Für natürlich kontaminierte Proben ergab dieses Protokoll aber lediglich 3 positive aus 20 kulturell positiven Proben (15%). Die zusätzliche Analyse der Voranreicherung und Anreicherung von 100 Proben (Auswahl aus den 345 in Tabelle 2 aufgeführten Proben) mit der Prozedur B ergab eine gute Übereinstimmung mit der Prozedur A. Mit der Methode Voranreicherung/Prozedur B konnte in einer einzelnen kulturell negativen Probe eine natürliche Kontamination an *Listeria monocytogenes* nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass die Anreicherung (100fache Verdünnung gegenüber der Voranreicherung) negativ ausfiel, lässt auf eine Kontamination mit nicht kultivierbaren Listerien schliessen. Zusammenfassend kann man festhalten, dass das PCR-Protokoll Anreicherung/Prozedur A die klassische Kulturmethode ersetzen kann. Sind zusätzlich Aussagen über eine allfällige Kontamination mit nicht kultivierbaren *Listeria monocytogenes* erwünscht, eignet sich die Durchführung der PCR-Protokolle Voranreicherung/Prozedur B und Anreicherung/Prozedur B.

Fallbeispiel: *L. monocytogenes* in Brühwurstwaren

Die Lebensmittelkontrolle ist bei ihrer Aufgabe zum Schutz der Gesundheit des Konsumenten dringend darauf angewiesen, Verunreinigungen von Lebensmitteln durch Krankheitserreger möglichst rasch und sicher zu erkennen und entsprechende Massnahmen anordnen zu können. Für den Nachweis von *Listeria monocytogenes* steht den Kantonalen Laboratorien die Methode im Schweizerischen Lebens-

mittelbuch Kapitel 56 zur Verfügung (107). Im Kantonalen Laboratorium Bern werden seit einiger Zeit sämtliche auf Listerien zu prüfende Lebensmittel zusätzlich mit PALCAM-Selektivmedien untersucht. Die Beurteilung der Proben erfolgt anhand der vorgeschriebenen Testreaktionen des Schweizerischen Lebensmittelbuches und wird zusätzlich abgesichert durch das Kolonieverhalten auf PALCAM-Selektivmedien sowie durch eine PCR-Analyse. Sämtliche Isolate werden ausserdem zur Serotypisierung an die nationale Listerienzentrale geschickt.

So wurden zum Beispiel im Frühjahr/Sommer 1991 in verschiedenen Sorten von offenem Aufschnitt aus der Filiale eines Grossverteilers *Listeria monocytogenes* nachgewiesen (Lebensmittelbuch, PALCAM, PCR). Die anschliessende Untersuchung von Proben aus weiteren Filialen ergab zahlreiche zusätzliche positive Befunde. Weiter wurde dann verpackte Stückware vom zuständigen regionalen Verteilzentrum untersucht. Wiederum wurden positive Proben gefunden. Entsprechende Abklärungen im Produktionsbetrieb belegten die angenommene weit verbreitete Kontamination mit *Listeria monocytogenes*. Sofort wurden umfassende betriebliche Massnahmen getroffen. Die durch die PCR mögliche Bestätigung erlaubte in diesem Fall dem Kantonschemiker Bern ein sehr rasches Eingreifen.

Beurteilung der PCR

Wie jede Methode weist auch die PCR einige Schwachpunkte auf, für die aber ein realistisches Lösungspotential besteht. Das wichtigste Problem, bedingt durch die hohe Empfindlichkeit, ist gegenwärtig die Möglichkeit von falsch positiven Resultaten, verursacht durch Kontamination von Probenmaterial mit PCR-Produkten aus vorangehenden Reaktionen. Eine raffinierte Idee zur Lösung des Problems stammt von Longo et al. (108). Erste praktische Erfahrungen mit der Methodik, die im folgenden beschrieben werden soll, sind durchaus ermutigend. Die entscheidende Massnahme ist der Ersatz von dTTP in der Vervielfältigungsreaktion durch den Nukleotidbaustein dUTP. Dies führt dazu, dass sich jedes PCR-Produkt prinzipiell von jeder natürlichen, zu bestimmenden Ziel-DNA unterscheidet (dUTP findet sich in natürlicher DNA nicht). Dieser Unterschied lässt sich ausnützen, indem die kompletten PCR-Reaktionsmischungen (inkl. allfälliger Ziel-DNA) mit dem Enzym Uracil-DNA-Glycosylase behandelt werden. Dieses Reparaturenzym ist in der Lage, aus dUTP-DNA Uracil herauszuschneiden. Dadurch werden in kontaminierender DNA aus früheren Reaktionen Einzelstrangbrüche induziert, die ihre Vervielfältigung während der PCR verhindern. Durch Erhitzen kann die Glycosylase inaktiviert werden, so dass keine Beeinträchtigung der nachfolgenden Vervielfältigungsreaktion stattfindet. Dagegen wird natürliche dTTP-DNA durch das Enzym nicht geschädigt.

Ein Unsicherheitsfaktor bei der Anwendung der PCR ist die Bestimmung allfällig toter Bakterien. Dieses Problem kann wie erwähnt durch Kultivierungsschritte umgangen werden. Ein alternativer Ansatz ist die Isolation von lebenden Bakterien, die gewaschen und erst dann aufgeschlossen (Freisetzung der DNA) und

in der PCR eingesetzt werden. Dadurch wird DNA von toten Bakterien, die nach dem Absterben lysieren und ihre DNA freisetzen, eliminiert. Im weiteren ist eine Bestimmung lebender Bakterien prinzipiell durch sogenannte RNA-PCR (PCR nach Umwandlung von RNA in cDNA durch Reverse Transcriptase) möglich. Da jedoch die Stabilität von bakteriellen mRNAs sehr gering ist, scheint dieser Ansatz nicht erfolgsversprechend.

Eine weitere Schwierigkeit, die vor allem bei toxischen Bakterien eine Rolle spielen könnte, ist der mögliche Widerspruch zwischen dem Vorliegen der genetischen Information und der tatsächlichen Fähigkeit zur Toxinproduktion. Vorliegende Resultate deuten aber auf eine gute Übereinstimmung zwischen Genotyp und Phänotyp hin (49, 50). Selbst wenn dies nicht der Fall wäre, wäre die Relevanz der gegenwärtigen Toxinbestimmungsmethoden gegenüber dem genetischen Potential zur Toxinbildung und damit zur Gefährdung des Menschen kritisch zu beurteilen.

Die wichtigsten Vorteile der PCR-Diagnostik sind sicher die kurze Analysenzeit und die Möglichkeit zur Bestimmung von schwer kultivierbaren Mikroorganismen. So ermöglicht das beschriebene Listerienprotokoll einen Zeitgewinn von mindestens zwei Tagen gegenüber der herkömmlichen Methodik. Dies bringt einerseits dem Konsumenten erhöhte Sicherheit und andererseits den Produktionsbetrieben durch Reduktion der Quarantänezeit Kosteneinsparungen. Im Vergleich zur serologischen Identifikation weist die PCR ebenfalls einige Vorteile auf. So sind die Reagenzien sehr leicht zugänglich und deren Vorratshaltung ist im Gegensatz zu Seren problemlos. Die Verwendung von Tieren fällt dahin und die Spezifität lässt sich durch die Primerdefinition praktisch beliebig steuern, so dass die für Antiseren typischen Probleme von Kreuzreaktionen wegfallen. Die PCR lässt sich ferner unabhängig von Diagnostikzentren durchführen, wodurch logistische und Schnittstellen-Probleme (Versand, Übermittlungsfehler) eliminiert werden. Für die Qualitätskontrolle in Lebensmittelbetrieben entfällt im Falle des Direktnachweises die Kultivierung und Anreicherung pathogener Bakterien. Schliesslich sei darauf hingewiesen, dass die PCR in der Zukunft wohl weitgehendst automatisiert werden wird, was eine ausgezeichnete Kosteneffizienz erwarten lässt.

Schlussfolgerungen

Die PCR ist seit etwa fünf Jahren in einer für verschiedene Probleme einsetzbaren Form zugänglich. In dieser kurzen Zeit hat die Methode zu einer Revolution der molekularbiologischen Grundlagenforschung geführt. Die Methode wird in der mikrobiellen Lebensmittelanalytik erst seit zwei bis drei Jahren verwendet. In dieser Zeit wurden bereits vielversprechende Resultate erzielt. Nach weiteren Verbesserungen (Elimination der Kultivierung, automatisierter Nachweis der Reaktionsprodukte) wird die PCR vermutlich auch in Teilgebieten der Nahrungsmittelmikrobiologie nach Jahrzehnten der kleinen Fortschritte wesentliche Veränderungen bewirken.

Dank

Wir danken *P. Burkhalter* für die Abbildungen 1 und 2.

Zusammenfassung

Das Potential der PCR-Diagnostik für die mikrobiologische Lebensmittelanalytik wird anhand publizierter Arbeiten evaluiert. Die Methodik wird am Beispiel des Nachweises von *Listeria monocytogenes* in Nahrungsmitteln näher beschrieben und mit der klassischen Kultivierungstechnik verglichen. Ein Fallbeispiel zeigt die Einsatzmöglichkeiten eines PCR-Tests. Die praktische Anwendung der PCR-Methodik im Lebensmittelbereich wird diskutiert.

Résumé

Le potentiel de diagnose de la méthode PCR pour l'analyse microbiologique des denrées alimentaires a été évaluée à l'aide de travaux publiés. La méthode est décrite à l'exemple de détection de *Listeria monocytogenes* dans les aliments. Elle a également été comparée à la technique microbiologique classique. Un exemple de contamination démontre les possibilités d'utilisation d'un test PCR. L'application de la méthode sera discutée en ce qui concerne les denrées alimentaires.

Summary

The potential application of PCR analysis in food microbiology is reviewed and evaluated. An assay for the detection of *Listeria monocytogenes* in food is described and validated by comparison with results obtained by classical *in vitro* culture. The role of this assay in managing a case of widespread food contamination is described. The impact of PCR on microbiological food analysis is discussed.

Literatur

1. Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I. and Khorana, H.G.: Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replication and short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J. Mol. Biol.* **56**, 341–361 (1971).
2. Panet, A. and Khorana, H. G.: Studies on polynucleotides. The linkage of deoxyribo-polynucleotide templates to cellulose and its use in their replication. *J. Biol. Chem.* **249**, 5213–5221 (1974).
3. Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N.: Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350–1354 (1985).
4. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487–481 (1988).

5. Erlich, H. A. (ed): PCR technology. Principles and applications for DNA amplification. Stockton Press, New York 1989.
6. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J. (eds): PCR protocols. A guide to methods and applications. Academic Press, San Diego 1990.
7. Rolfs, A., Schumacher, H. C. and Marx, P. (eds): PCR topics. Usage of polymerase chain reaction in genetic and infectious diseases. Springer-Verlag, Berlin 1991.
8. Higuchi, R., von Beroldingen, C. H., Sensabaugh, G. F. and Erlich, H. A.: DNA typing from single hairs. *Nature* **332**, 543–546 (1988).
9. Bugawan, T. L., Saiki, R. K., Levenson, C. H., Watson, R. M. and Erlich, H. A.: The use of non-radioactive oligonucleotide probes to analyze enzymatically amplified DNA for prenatal diagnosis and forensic HLA typing. *Bio/Technology* **6**, 943–947 (1988).
10. Hagelberg, E., Gray, I. C. and Jeffreys, A. J.: Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. *Nature* **352**, 427–429 (1991).
11. Steffan, R. J. and Atlas, R. M.: DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples. *Appl. Environm. Microbiol.* **54**, 2185–2191 (1988).
12. Candrian, U. und Lüthy, J.: Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik. *Chimia* **45**, 49–52 (1991).
13. Wahlberg, J., Lundeberg, J., Hultman, T., Holmberg, M. and Uhlen, M.: Rapid detection and sequencing of specific invitro amplified DNA sequences using solid phase methods. *Mol. Cell. Probes* **4**, 285–297 (1990).
14. Mirelman, D., Bracha, R., Rozenblatt, S. and Garfinkel, L. I.: Repetitive DNA elements characteristic of pathogenic *Entamoeba histolytica* strains can also be detected after polymerase chain reaction in a cloned nonpathogenic strain. *Infect. Immun.* **58**, 1660–1663 (1990).
15. McLaughlin, G. L., Vodkin, M. H. and Huizinga, H. W.: Amplification of repetitive DNA for specific detection of *Naegleria fowleri*. *Clin. Microbiol.* **29**, 227–230 (1991).
16. Gottstein, B., Deplazes, P., Tanner, I. and Skaggs, J. S.: Diagnostic identification of *Taenia saginata* with the polymerase chain reaction. *Transact. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* **85**, 248–249 (1991).
17. Kain, K. C. and Lanar, D. E.: Determination of genetic variation within *Plasmodium falciparum* by using enzymatically amplified DNA from filter paper disks impregnated with whole blood. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 1171–1174 (1991).
18. Petersen, E., Borre, M. and Vuust J.: Allele-specific analysis of *Plasmodium falciparum* genes by the polymerase chain reaction. *Mol. Immunol.* **28**, 183–185 (1991).
19. Weiss, L. M., Udem, S. A., Salgo, M., Tanowitz, H. B. and Wittner, M.: Sensitive and specific detection of toxoplasma DNA in an experimental murine model – use of *Toxoplasma gondii* specific cDNA and the polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.* **163**, 180–187 (1991).
20. Wakefield, A. E., Guiver, L., Miller, R. F. and Hopkin, J. M.: DNA amplification on induced sputum samples for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet* June 8, 1378–1379 (1991).
21. Sirois, M., Lemire, E. G. and Levesque, R. C.: Construction of a DNA probe and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 1183–1187 (1991).
22. Pollard, D. R., Johnson, W. M., Lior, H., Tyler, S. D. and Rozee, K. R.: Detection of the aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 2477–2481 (1990).

23. Glare, E. M., Paton, J. C., Premier, R. R., Lawrence, A. J. and Nisbet, I. T.: Analysis of a repetitive DNA sequence from *Bordetella pertussis* and its application to the diagnosis of pertussis using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 1982–1987 (1990).
24. Malloy, D. C., Nauman, R. K. and Paxton, H.: Detection of *Borrelia burgdorferi* using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 1089–1093 (1990).
25. Nielsen, S. L., Young, K. K. Y. and Barbour, A. G.: Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by the polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes* **4**, 73–79 (1990).
26. Persing, D. H., Telford III, S. R., Rys, P. N., Dodge, D. E., White, T. J., Malawista, S. E. and Spielman, A.: Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in museum specimens of *Ixodes dammini* ticks. *Science* **249**, 1420–1423 (1990).
27. Rosa, P. A., Hogan, D. and Schwan, T. G.: Polymerase chain reaction analyses identify two distinct classes of *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 524–532 (1991).
28. Lebech, A.-M., Hindersson, P., Vuust, J. and Hansen, K.: Comparison of *in vitro* culture and polymerase chain reaction for detection of *Borrelia burgdorferi* in tissue from experimentally infected animals. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 731–737 (1991).
29. Guy, E. C. and Stanek, G.: Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Pathol.* **44**, 610–611 (1991).
30. Fekete, A., Bantle, J. A., Halling, S. M. and Sanborn, M. R.: Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *J. Appl. Bacteriol.* **69**, 216–227 (1990).
31. Rasmussen, S. and Timms, P.: Detection of *Chlamydia psittaci* using DNA probes and the polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol. Lett.* **77**, 169–175 (1991).
32. Dutilh, B., Bebear, R. P., Vekris, A., Bonnet, J. and Garret, M.: Specific amplification of a DNA sequence common to all *Chlamydia trachomatis* serovars using the polymerase chain reaction. *Res. Microbiol.* **140**, 7–16 (1989).
33. Griffais, R. and Thibon, M.: Detection of *Chlamydia trachomatis* by the polymerase chain reaction. *Res. Microbiol.* **140**, 139–141 (1989).
34. Bobo, L., Coutlee, F., Yolken, R. H., Quinn, T. and Viscidi, R. P.: Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* cervical infection by detection of amplified DNA with an enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 1968–1973 (1990).
35. Pao, C. C., Kao, S. M., Wang, H. C. and Lee, C. C.: Intraamniotic detection of *Chlamydia trachomatis* deoxyribonucleic acid sequences by polymerase chain reaction. *Amer. J. Obstetrics Gynecol.* **164**, 1295–1299 (1991).
36. Pollard, D. R., Tyler, S. D., Ngo, C. W. and Rozee, K. R.: A polymerase chain reaction (PCR) protocol for the specific detection of *Chlamydia* spp. *Mol. Cell. Probes* **3**, 383–389 (1989).
37. Watson, M. W., Lambden, P. R. and Clarke, I. N.: Genetic diversity and identification of human infection by amplification of the chlamydial 60-kilodalton cysteine-rich outer membrane protein gene. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 1188–1193 (1991).
38. Wren, B. W., Clayton, C. L. and Tabaqchali, S.: Nucleotide sequence of *Clostridium difficile* toxin A gene fragment and detection of toxigenic strains by polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol. Lett.* **70**, 1–6 (1990).
39. Wren, B. W., Clayton, C. and Tabaqchali, S.: Rapid identification of toxigenic *Clostridium difficile* by polymerase chain reaction. *Lancet* February 17, 423 (1990).
40. Kato, N., Ou, C.-Y., Kato, H., Bartley, S. L., Brown, V. K., Dowell, J. R. and Ueno, K.: Identification of toxigenic *Clostridium difficile* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 33–37 (1991).

41. Karch, H. and Meyer, T.: Single primer pair for amplifying segments of distinct shigalike toxin genes by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 2751–2757 (1989).
42. Pollard, D. R., Johnson, W. M., Lior, H., Tyler, S. D. and Rozee, K. R.: Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 540–545 (1990).
43. Pollard, D. R., Johnson, W. M., Lior, H., Tyler, S. D. and Rozee, K. R.: Differentiation of shiga toxin and vero cytotoxin type 1 genes by polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.* **162**, 1195–1198 (1990).
44. Johnson, W. M., Pollard, D. R., Lior, H., Tyler, S. D. and Rozee, K. R.: Differentiation of genes coding for *Escherichia coli* verotoxin 2 and the verotoxin associated with porcine edema disease (VTE) by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 2351–2353 (1990).
45. Olive, D. M., Atta, A. I. and Setti, S. K.: Detection of toxigenic *Escherichia coli* using biotin-labelled DNA probes following enzymatic amplification of the heat labile toxin gene. *Mol. Cell. Probes.* **2**, 47–57 (1988).
46. Olive, D. M.: Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* after polymerase chain reaction amplification with a thermostable DNA polymerase **27**, 261–265 (1989).
47. Frankel, G., Giron, J. A., Valmassoi, J. and Schoolnik, G. K.: Multi-gene amplification: simultaneous detection of three virulence genes in diarrhoeal stool. *Mol. Microbiol.* **3**, 1729–1734 (1989).
48. Furrer, B., Candrian, U. and Lüthy, J.: Detection and identification of *E. coli* producing heat-labile enterotoxin type I by enzymatic amplification of a specific DNA fragment. *Lett. Appl. Microbiol.* **10**, 31–34 (1990).
49. Candrian, U., Furrer, B., Höfelein, C., Meyer, R., Jermini, M. and Lüthy, J.: Detection of *Escherichia coli* and identification of enterotoxigenic strains by primer-directed enzymatic amplification of specific DNA sequences. *Int. J. Food Microbiol.* **12**, 339–352 (1991).
50. Candrian, U., Furrer, B., Höfelein, C. and Lüthy, J.: Use of inosine-containing oligonucleotide primers for enzymatic amplification of different alleles of the gene coding for heat-stable toxin type I of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl. Environm. Microbiol.* **57**, 955–961 (1991).
51. Victor, T., du Toit, R., van Zyl, J., Beester, A. J. and van Helden, P. D.: Improved method for the routine identification of toxigenic *Escherichia coli* by DNA amplification of a conserved region of the heat-labile toxin A subunit. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 158–161 (1991).
52. Wernars, K., Delfgou, E., Soentoro, P. S. and Notermans, S.: Successful approach for detection of low numbers of enterotoxigenic *Escherichia coli* in minced meat by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environm. Microbiol.* **57**, 1914–1919 (1991).
53. Meyer, R., Lüthy, J. and Candrian, U.: Direct detection by PCR of *Escherichia coli* in water and soft cheese and identification of enterotoxigenic strains. *Lett. Appl. Microbiol.* Im Druck.
54. van Ketel, R. J., de Wever, B. and van Alphen, L.: Detection of *Haemophilus influenzae* in cerebrospinal fluids by polymerase chain reaction DNA amplification. *J. Med. Microbiol.* **33**, 271–276 (1990).
55. Hoshina, S., Kahn, S. M., Jiang, W., Green, P. H. R., Neu, H. C., Chin, N., Morotomi, M., LoGerfo, P. and Weinstein, I. B.: Direct detection and amplification of *Helicobacter*

- pylori* ribosomal 16S gene segments from gastric endoscopic biopsies. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **13**, 473–479 (1990).
56. Valentine, J. L., Arthur, R. R., Mobley, H. L. and Dick, J. D.: Detection of *Helicobacter pylori* by using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 689–695 (1991).
 57. Bej, A. K., Mahbubani, M. H., Miller, R., DiCesare, J. L., Haff, L. and Atlas, R. M.: Multiplex PCR amplification and immobilized capture probes for detection of bacterial pathogens and indicators in water. *Mol. Cell. Probes* **4**, 353–365 (1990).
 58. Bej, A. K., Mahbubani, M. H. and Atlas, R. M.: Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by polymerase chain reaction and gene probe methods. *Appl. Environm. Microbiol.* **57**, 597–600 (1991).
 59. Mahbubani, M. H., Bej, A. K., Miller, R. D., Atlas, R. M., DiCesare, J. L. and Haff, L. A.: Detection of bacterial mRNA using polymerase chain reaction. *BioTechniques* **10**, 48–49 (1991).
 60. Mahbubani, M. H., Bej, A. K., Miller, R., Haff, L., DiCesare, J. and Atlas, R. M.: Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. *Mol. Cell. Probes* **4**, 175–187 (1990).
 61. Bessesen, M. T., Luo, Q., Rotbart, H. A., Blaser, M. J. and Ellison III, R. T.: Detection of *Listeria monocytogenes* by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environm. Microbiol.* **56**, 2930–2932 (1990).
 62. Border, P. M., Howard, J. J., Plastow, G. S. and Siggins, K. W.: Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* **11**, 158–162 (1990).
 63. Deneer, H. G. and Boychuk, I.: Species-specific detection of *Listeria monocytogenes* by DNA amplification. *Appl. Environm. Microbiol.* **57**, 606–609 (1991).
 64. Wernars, K., Heuvelman, K. J., Chakraborty, T. and Notermans, S. H. M.: Use of polymerase chain reaction for direct detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *J. Appl. Bacteriol.* **70**, 121–126 (1991).
 65. Furrer, B., Candrian, U., Höfelein, C. and Lüthy, J.: Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by *in vitro* amplification of hemolysin gene fragments. *J. Appl. Bacteriol.* **70**, 372–379 (1991).
 66. Niederhauser, C., Candrian, U., Höfelein, C., Jermini, M., Bühler, H.-P. and Lüthy, J.: Use of polymerase chain reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in food. *Appl. Environ. Microbiol.* (in press).
 67. Cousins, D. V., Wilton, S. D. and Francis, B. R.: Use of DNA amplification for the rapid identification of *Mycobacterium bovis*. *Vet. Microbiol.* **27**, 187–195 (1991).
 68. Hance, A. J., Grandchamp, B., Lévy-Frébault, V., Lecossier, D., Rauzier, J., Bocart, D. and Gicquel, B.: Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. *Mol. Microbiol.* **3**, 843–849 (1989).
 69. Hartskeerl, R. A., De Wit, M. Y. L. and Klatser, P. R.: Polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 2357–2364 (1989).
 70. Hackel, C., Houard, S., Portaels, F., van Elsen, A., Herzog, A. and Bollen, A.: Specific identification of *Mycobacterium leprae* by the polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes* **4**, 205–210 (1990).
 71. Plikaytis, B. B., Gelber, R. H. and Shinnick, T. M.: Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium leprae* using a nested-primer gene amplification assay. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 1913–1917 (1990).

72. Williams, D. L., Gillis, T. P., Booth, R. J., Looker, D. and Watson, J. D.: The use of a specific DNA probe and polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. J. Infect. Dis. **162**, 193–200 (1990).
73. Dewit, M. Y. L., Faber, W. R., Krieg, S. R., Douglas, J. T., Lucas, S. B., Montreewasuwat, N., Pattyn, S. R., Hussain, R., Ponnighaus, J. M., Hartskeerl, R. A. and Klatser, P. R.: Application of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in skin tissues. J. Clin. Microbiol. **29**, 906–910 (1990).
74. Brisson-Noel, A., Gicquel, B., Lecossier, D., Lévy-Frébault, V., Nassif, X. and Hance, A. J.: Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. Lancet November **4**, 1069–1071 (1989).
75. Shankar, P., Manjunath, N., Lakshmi, R., Aditi, R., Seth, P. and Shrinivas: Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction. Lancet February **17**, 423 (1990).
76. Eisenach, K. D., Cave, M. D., Bates, J. H. and Crawford, J. T.: Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. J. Infect Dis. **161**, 977–981 (1990).
77. Hermans, P. W. M., Schuitema, A. R. J., van Soolingen, D., Verstynen, C. P. H. J., Bik, E. M., Thole, J. E. R., Kolk, A. H. J. and van Embden, J. D. A.: Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. **28**, 1204–1213 (1990).
78. Pao, C. C., Yen, T. S. B., You, Y. B., Maa, J. S., Fiss, E. H. and Chang, C. H.: Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. J. Clin. Microbiol. **28**, 1877–1880 (1990).
79. Kaneko, K., Onodera, O., Miyatake, T. and Tsuji, S.: Rapid diagnosis of tuberculosis meningitis by polymerase chain reaction (PCR). Neurol. **40**, 1617–1618 (1990).
80. Sjobring, U., Mecklenburg, M., Andersen, A. B. and Miorner, H.: Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. **28**, 2200–2204 (1990).
81. Dewit, D., Steyn, L., Shoemaker S. and Sogin, M.: Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by DNA amplification. J. Clin. Microbiol. **28**, 2437–2441 (1990).
82. Shankar, P., Manjunath, N., Mohan, K. K., Prasad, K., Behari, M., Shrinivas and Abuja, G. K.: Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction. Lancet January **5**, 5–7 (1991).
83. Godfrey-Faussett, P., Wilkins, E. G. L., Khoo, S. and Stoker, N.: Tuberculous pericarditis confirmed by DNA amplification. Lancet January **17**, 176–177 (1991).
84. Fries, J. W. U., Patel, R. J., Piessens, W. F. and Wirth, D. F.: Detection of untreated *Mycobacteria* by using polymerase chain reaction and specific DNA probes. J. Clin. Microbiol. **29**, 1744–1747 (1991).
85. Fries, J. W. U., Patel, R. J., Piessens, W. F. and Wirth, D. F.: Genus-specific and species-specific DNA probes to identify *Mycobacteria* using the polymerase chain reaction. Mol. Cell. Probes **4**, 87–105 (1990).
86. Böddinghaus, B., Rogall, T., Flohr, T., Blöcker, H. and Böttger, E. C.: Detection and identification of *Mycobacteria* by amplification of rRNA. J. Clin. Microbiol. **28**, 1751–1759 (1990).
87. Harasawa, R., Koshimizu, K., Uemori, T., Takeda, O., Asada, K. and Kato, I.: The polymerase chain reaction for *Mycoplasma pulmonis*. Microbiol. Immunol. **34**, 393–395 (1990).

88. Frankel, G., Newton, S. M. C., Schoolnik, G. K. and Stocker, B. A. D.: Intragenic recombination in a flagellin gene: characterization of the *H1-j* gene of *Salmonella typhi*. *EMBO J.* **8**, 3149–3152 (1989).
89. Frankel, G., Newton, S. M. C., Schoolnik, G. K. and Stocker, B. A. D.: Unique sequences in region VI of the flagellin gene of *Salmonella typhi*. *Mol. Microbiol.* **3**, 1379–1383 (1989).
90. Joshi, A. K., Baichwal, V. and Ferro-Luzzi Ames, G.: Rapid polymerase chain reaction amplification using intact bacterial cells. *BioTechniques* **10**, 42–44 (1991).
91. Bej, A. K., Steffan, R. J., DiCesare, J., Haff, L. and Atlas R. M.: Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes. *Appl. Environm. Microbiol.* **56**, 307–314 (1990).
92. Frankel, G., Riley, L., Giron, J. A., Valmassoi, J., Friedmann, A., Strockbine, N., Falkow, S. and Schoolnik, G. K.: Detection of *Shigella* in feces using DNA amplification. *J. Infect. Dis.* **161**, 1252–1256 (1990).
93. Lampel, K. A., Jagow, J. A., Trucksess, M. and Hill, W. E.: Polymerase chain reaction for detection of invasive *Shigella flexneri* in food. *Appl. Environm. Microbiol.* **56**, 1536–1540 (1990).
94. Tokue, Y., Shoji, S., Satoh, K., Watanabe, A. and Motomiya, M.: Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) using polymerase chain reaction amplification. *Tohoku J. Exp. Med.* **163**, 31–37 (1991).
95. Johnson, W. M., Tyler, S. D., Ewan, E. P., Ashton, F. E., Pollard, D. R. and Rozee, K. R.: Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 426–430 (1991).
96. Wilson, I. G., Cooper, J. E. and Gilmour, A.: Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in dried skimmed milk: Use of the polymerase chain reaction for amplification and detection of staphylococcal enterotoxin genes *entB1* and *entC1* and the thermonuclease gene *nuc*. *Appl. Environm. Microbiol.* **57**, 1793–1798 (1991).
97. Noordhoek, G. T., Wieles, B., Vandersluis, J. J. and van Embden, J. D. A.: Polymerase chain reaction and synthetic DNA probes – A means of distinguishing the causative agents of syphilis and yaws. *Infect. Immun.* **58**, 2011–2013 (1990).
98. Palmer, L. M. and Colwell, R. R.: Detection of luciferase gene sequence in nonluminescent *Vibrio cholerae* by colony hybridization and polymerase chain reaction. *Appl. Environm. Microbiol.* **57**, 1286–1293 (1991).
99. Hill, W. E., Keasler, S. P., Trucksess, M. W., Fenf, P., Kaysner, C. A. and Lampel, K. A.: Polymerase chain reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters. *Appl. Environm. Microbiol.* **57**, 707–711 (1991).
100. Wren, B. W. and Tabaqchali, S.: Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by the polymerase chain reaction. *Lancet* September 15, 693 (1990).
101. Fenwick, S. G. and Murray, A.: Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by polymerase chain reaction. *Lancet* February 23, 496–497 (1991).
102. Viitanen, A.-M., Arstila, T. P., Lahesmaa, R., Granfors, K., Skurnik, M. and Toivanen, P.: Application of the polymerase chain reaction and immunofluorescence techniques to the detection of bacteria in *Yersinia*-triggered reactive arthritis. *Arth. Rheumat.* **34**, 89–96 (1991).
103. Köhler, S., Leimeister-Wächter, M., Chakraborty, T., Lottspeich, F. and Goebel, W.: The gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* and its use as a specific probe for *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **58**, 1943–1950 (1990).

104. Mengaud, J., Vicente, M.-F., Chenevert, J., Pereira, J. M., Geoffroy, C., Gicquel-Sanzey, B., Baquero, F., Perez-Diaz, J.-C. and Cossart, P.: Expression in *Escherichia coli* and sequence analysis of the listeriolysin O determinant of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **56**, 766–772 (1988).
105. Domann, E., Leimeister-Wächter, M., Goebel, W. and Chakraborty, T.: Molecular cloning, sequencing, and identification of a metalloprotease gene from *Listeria monocytogenes* that is species specific and physically linked to the listeriolysin gene. *Infect. Immun.* **59**, 65–72 (1991).
106. Mengaud, J., Geoffroy, C. and Cossart, P.: Identification of a new operon involved in *Listeria monocytogenes* virulence: Its first gene encodes a protein homologous to bacterial metalloproteases. *Infect. Immun.* **59**, 1043–1049 (1991).
107. Schweizerisches Lebensmittelbuch. Eidgenössische Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1988/1989.
108. Longo, M. C., Berninger, M. S. and Hartley, J. L.: Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reaction. *Gene* **93**, 125–128 (1990).

Dr. U. Candrian
Laboratorium für Lebensmittelchemie
Institut für Biochemie
Universität Bern
Freiestrasse 3
CH-3012 Bern