

2749 - A

Ontwikkeling van DNA-probes voor de detectie van micro-organismen in de voedingsmiddelenmicrobiologie

H. Hofstra

TNO-Voeding

Inleiding

In een zeer recente publikatie van het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne wordt gesproken van een geschat aantal van 4,5 miljoen gevallen van voedselvergiftiging per jaar in ons land (Hoogenboom-Verdegaal & Notermans, 1990). Slechts een 5 % van deze gevallen zijn zo ernstig dat hulp van de huisarts ingeroepen moet worden. Dit betekent echter nog altijd enige honderdduizenden gevallen per jaar. Voor de overige 95 % betekent het waarschijnlijk één of enkele dagen werk- of schoolverzuim. Daarmee zijn voedselvergiftigingen in onze streken na de gewone verkoudheid waarschijnlijk de voornaamste oorzaak van ziekteverzuim.

De ontwikkeling van snellere bepalingmethoden voor de microbiologische kwaliteit van voedingsmiddelen is daarom van belang voor de volksgezondheid. Ook in economisch opzicht is deze ontwikkeling belangrijk, met het oog op kwaliteitsborging en kosten-beheersing bij productie en opslag. Voortdurende bewaking van de microbiologische kwaliteit tijdens de productie kan directe distributie mogelijk maken en maakt controle van het eindproduct grotendeels overbodig. Zulk onderzoek kan in een productieproces worden ingepast in het HACCP-concept ('Hazard Analysis Critical Control Point'). Hierbij worden specifieke risico's in een productielijn gedefinieerd ('hazard analysis') en op de kritische controlepunten worden passende snelle tests toegepast om zo een integrale bewaking van de productieketen te realiseren.

Een aantal snelle tests, gebaseerd op verschillende meetprincipes, leent zich voor toepassing in de voedingsmiddelensector en in het HACCP-concept (Huis in't Veld et al., 1988). Dit zijn bijvoorbeeld conductometrie, impedimetrie en turbidimetrie, die reeds enigermate ingang in routinematige voedselanalyses hebben gevonden. Deze technieken, die berusten op het detecteren van bacteriële groei in een bepaald medium, kunnen slechts in zeer beperkte mate worden toegepast voor de detectie van specifieke bacteriën. Ook bioluminescentie, de meting van bacterieel ATP, geeft in principe geen andere informatie dan een ruw kiemgetal. Een methode die meer en andere informatie geeft, is de 'direct epifluorescence test' (DEFT). In DEFT worden bacteriën direct in het monster behandeld met een fluorescerende stof, die de levende micro-organismen aankleurt. De bacteriën worden vervolgens geteld met

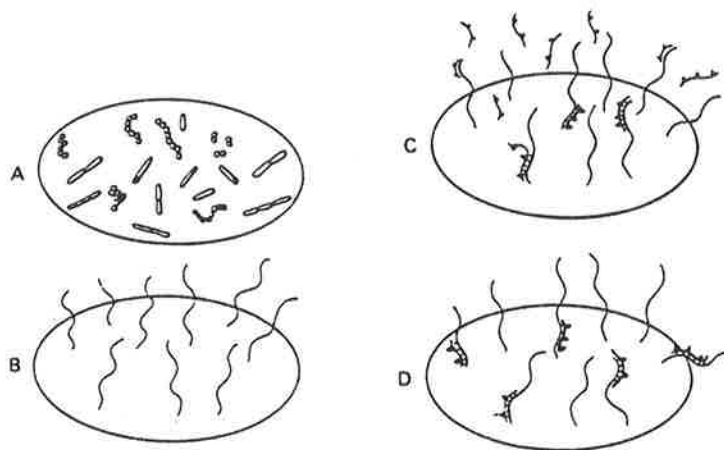
behulp van een fluorescentiemicroscop. Ook DEFT heeft echter nog een beperkte selectiviteit in de bacteriële analyses.

Daarentegen geven methoden gebaseerd op immunologische principes of op nucleïnezuurhybridisaties de mogelijkheid informatie te verkrijgen op alle gewenste niveaus: van een totaal kiemgetal tot bacteriespecies, subspecies en toxine-vormende of anderszins pathogene virulentietypen. DNA- of RNA- diagnostiek detecteert een micro-organisme op het niveau van de genetische code. Expressie van de genen is daardoor niet nodig, zodat toxine-vormende bacteriën kunnen worden aangetoond ook als het toxine (nog) niet gevormd is. De DNA-hybridisatietechnologie is gebaseerd op de specificiteit van DNA-‘probes’ die zijn geconstrueerd uit het erfelijk materiaal van het micro-organisme dat wordt opgespoord en geïdentificeerd.

Toepassingen van DNA-hybridisatietechnologie

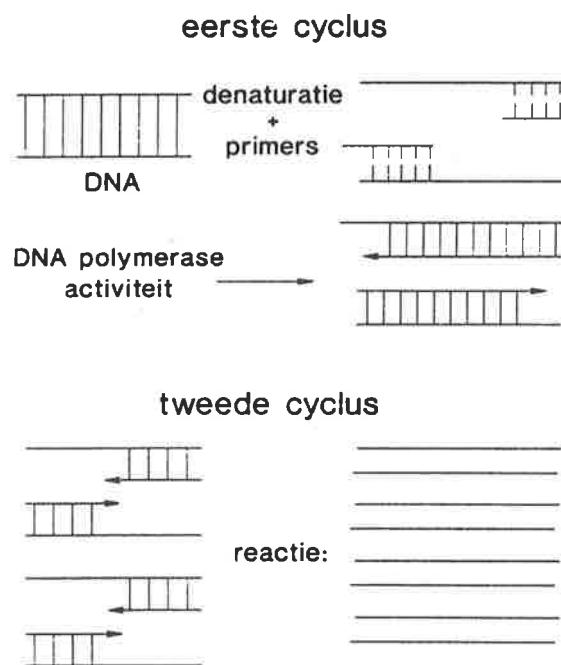
Filterhybridisatie

De meest eenvoudige en tot op heden ook meest gebruikte aanpak is de hybridisatie met een DNA-probe, gelabeld met een radioactieve of niet-radioactieve label. In deze DNA-probetechniek, die de filterhybridisatie- of ‘dot blot’-methode wordt genoemd, worden de bacteriën, of het monster met daarin de bacteriën, op een filter gefixeerd. Na lysis van de bacteriën hecht het DNA zich aan het filter. Vervolgens worden de DNA-‘dots’ behandeld met de gelabelde probes. Als het DNA dat overeenkomt met de probe, op het filter aanwezig is, treedt hybridisatie op en kan de label vervolgens worden aangetoond (figuur 1). In dit type reactie wordt de gevoelig-



Figuur 1. In de filter- of ‘dot blot’-hybridisatietest worden micro-organismen op een filter aangebracht (A). Na lysis van de bacteriën hecht het DNA zich aan de filter (B). Na toevoeging van gelabelde DNA-probes hybridiseren deze met hun complementaire DNA-streng, indien aanwezig (C). Ten slotte kan het gehybridiseerde DNA door middel van de label worden gedetecteerd of gekwantificeerd (D).

heid bepaald door de hoeveelheid bacterieel DNA in het monster en de kwaliteit van de labelingsmethode. De snelheid van de detectie wordt bepaald door de tijd die heengaat met het opkweken of verzamelen van voldoende micro-organismen uit het monster (de monstervoorbereiding). De bepaling zelf kan in ongeveer een dag worden uitgevoerd. Dit is een zeer aanzienlijke bekorting vergeleken met de vier tot zes dagen die een klassieke bepaling voor een micro-organisme vergt. Cruciaal is de monstervoorbewerking. Doordat de voorgekweekte monsters door filtratie op een membraan worden aangebracht, is verstopping van membranen door monstermateriaal een algemeen probleem. Hieronder zal daarop nader worden ingegaan. Bij reingekweekte micro-organismen doen zulke problemen zich niet voor. Daarom is de methode bij uitstek geschikt voor de snelle identificatie van reine bacterieculturen.



Figuur 2. In de polymerase-kettingreactie (PCR) wordt DNA enkelstrengs gemaakt (gedenatureerd) door verhitting. Kleine DNA-probes (primers) worden toegevoegd die op enige afstand van elkaar op de tegenover elkaar liggende strengen hybridiseren. De enzymatische activiteit van een hitte-stabiel DNA-polymerase vult vervolgens de ontbrekende strengen aan vanuit de primers, zodat de oorspronkelijke hoeveelheid specifiek DNA wordt verdubbeld. In de tweede cyclus vindt opnieuw een verdubbeling plaats, enzovoorts.

Amplificatie in vitro

Een toepassing binnen de DNA-hybridisatietechnologie die niet afhankelijk is van de filtreerbaarheid van een monster, is de vermeerdering in vitro van specifieke DNA-fragmenten door middel van de 'polymerase-kettingreactie' ('polymerase chain reaction', PCR; Saiki et al., 1988). In de PCR-techniek wordt het te bepalen DNA-fragment, indien aanwezig, miljoenen malen gekopieerd vanuit twee eindstandige DNA-probes ('primers'; figuur 2). Dit kan het voorkweken van micro-organismen grotendeels overbodig maken. Bovendien geschiedt de vermeerdering in vitro veel sneller dan door kweken, zodat deze bepalingmethode in principe een hoge specificiteit koppelt aan een hoge gevoeligheid en een bepalingstijd van uren in plaats van dagen. PCR-diagnostiek is bij TNO-Voeding momenteel in ontwikkeling voor het detecteren van *Salmonella* spp. en *Campylobacter jejuni*.

Okk bij de toepassing van DNA-vermeerdering in vitro is monstervoorbewerking een belangrijk punt. De methode vereist een zekere minimale zuiverheid van het monster-DNA vóór de start van de PCR. De noodzakelijke monstervoorbewerking loopt daarom sterk uiteen tussen verschillende matrices. Bij de meeste producten zal moeten worden voorgekweekt om de micro-organismen van het produkt te scheiden en DNA van voldoende zuiverheid in handen te krijgen. Voorkweken voor PCR geeft bovendien de mogelijkheid levende bacteriën te onderscheiden van 'dood' bacterieel DNA, dat in een produkt aanwezig kan zijn als gevolg van microbiële besmetting van een grondstof. Ondanks de noodzaak van monstervoorbewerking, lijkt PCR de aangewezen methode voor snelle detectie van micro-organismen.

Tabel 1. Selectie van DNA-probes.

1. 'Random' DNA-fragmenten: specificiteit als criterium voor de selectie
Bacteriën zonder groepsspecifieke virulentie-eigenschappen
<i>Salmonella</i>
<i>Campylobacter</i>
2. Specifieke virulentiefactoren: chromosomaal of plasmide-gecodeerd
Bacteriën met groepsspecifieke virulentie-eigenschappen.
<i>Escherichia coli</i> : enterotoxigeen
<i>Escherichia coli</i> : entero-invasief
<i>Escherichia coli</i> : enterohaemorrhagisch
<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Shigella</i> spp.
<i>Listeria monocytogenes</i>
3. Homologe genen: variabele gebieden in geconserveerde genen
Omp-genen en <i>phoE</i> in Enterobacteriaceae
Ribosomaal RNA-genen
RNA-polymerase-subunits enz. in Eubacteria

Restrictie-enzymanalyses

Een bijzondere toepassing van DNA-analyses is de restrictie-enzymanalyse (RE-analyse). Deze methode is gebaseerd op de lengteverschillen tussen de fragmenten die ontstaan door de digestie van DNA met restrictie-endonucleases. Deze enzymen knippen het DNA op plekken die exact worden bepaald door de basenvolgorde. Kleine verschillen, zoals het verwisselen van één enkele base, resulteren al in lengteverschillen bij de fragmenten die ontstaan door RE-digestie. De verschillen in de 'knippatronen' kunnen zichtbaar worden gemaakt door kleuring of door hybridisatie met DNA-probes. Met een DNA-probe kan men zo specifiek kijken naar lengteverschillen bij restrictiefragmenten in het gebied waaruit de DNA-probe afkomstig is. Men spreekt dan van 'restrictiefragmentlengte-polymorfisme'-analyses (RFLP-analyses). De complexiteit van de RFLP-patronen varieert van één band per patroon tot een zeer complexe streepjescode. In dit laatste geval wordt gesproken van DNA-'fingerprinting'.

Door de grote breedte van het toepassingsgebied kunnen RFLP-analyses worden gebruikt voor identificeren van bacteriële geslachten (genera), soorten (species) en ondersoorten (subspecies), maar ook van klonen van genetisch gemodificeerde organismen (GMO's). RFLP-methoden hebben als nadeel dat ze alleen toe te passen zijn op gezuiverd DNA afkomstig uit reingekweekte organismen en dat de analyse tijdrovend is. Daardoor is de methode geen alternatief voor snelle microbiologische detectiemethoden. Door het hoge oplossende vermogen is de techniek echter zeer geschikt voor de epidemiologie van micro-organismen op stamniveau, zoals pathogenen, industriële micro-organismen of GMO's in industriële processen en in het milieu. In het onderzoek naar de risico's van het gebruik van GMO's is deze monitoring-techniek één van de aangewezen benaderingen.

Ontwikkeling van DNA-probes bij TNO-Voeding

De keuze van het DNA dat als probe wordt gebruikt, hangt sterk af van de gewenste specificiteit (tabel 1). Voor detectie op soortniveau kunnen specifieke probes worden geselecteerd uit een bank van 'random'-fragmenten van het totale DNA van het betreffende micro-organisme. Zeker voor bacteriën die geen duidelijke gemeenschappelijke virulentiefactoren bezitten, zoals *Salmonella* en *Campylobacter*, is dit de aangewezen methode. Wanneer een micro-organisme zich wél onderscheidt door

Tabel 2. Specificiteit van probes ontwikkeld uit *Campylobacter*-DNA.

-
1. *Campylobacter jejuni*
 2. *Campylobacter coli*
 3. *Campylobacter jejuni* en *C. coli*
 4. Thermofiele *Campylobacter*-typen
 5. Eubacteria
-

typische virulentie-eigenschappen, is het gebruik van het DNA dat hiervoor codeert, een logische benadering. Dit geldt bijvoorbeeld voor de vele plasmide-gecodeerde virulentie-eigenschappen van *Escherichia coli*. Het aantonen van pathogene *E. coli*-typen met behulp van probes gebaseerd op deze genen is een welkom alternatief voor de conventionele virulentietests met proefdieren of celkweek, die moeizaam, tijdrovend en/of onethisch zijn (Hofstra & Huis in't Veld, 1988). Een laatste belangrijke bron van probes ligt in de vergelijking van de basenvolgorde van homologe genen in nauw verwante micro-organismen. Homologe genen in verwante bacteriën, bijvoorbeeld de genen voor de buitenmembraaneiwitten in de familie Enterobacteriaceae, hebben gebieden die sterk geconserveerd zijn tijdens de evolutie, terwijl andere gebieden meer variatie vertonen. De variabele gebieden tonen een hoge specificiteit voor het betreffende organisme. Hetzelfde principe is ook van toepassing op ribosomaal RNA. Ook hier worden zeer sterk geconserveerde gebieden afgewisseld door iets meer variabele DNA-volgorde, die als bron voor DNA-probes kunnen worden gebruikt (Giovannoni et al., 1988).

Al deze principes werden ook in dit onderzoek toegepast voor de ontwikkeling van DNA-probes. *Salmonella*-probes werden ontwikkeld uit DNA-fragmenten van verschillende *Salmonella*-typen uit Subgenus I (humaanpathogenen). Een universele *Salmonella*-probe werd geselecteerd en getest door middel van hybridisaties met grote aantallen *Salmonella*-isolaten, andere Enterobacteriaceae en overige micro-organismen. Met deze probe werden tot op heden geen vals-positieve of vals-negatieve resultaten geconstateerd. De nucleotidenvolgorde van deze probe werd volledig opgehelderd. Vervolgens werden, voor de constructie van PCR-‘primers’, geconserveerde gebieden van deze probe in kaart gebracht en vergeleken met de homologe gebieden bij andere *Salmonella*-typen. De nucleotidensequenties van deze gebieden bij verschillende *Salmonella*-typen van subgenus I bleken onderling vrijwel geen verschillen te vertonen. *Salmonella*-typen uit de andere subgenera vertoonden slechts 1 – 3% heterologie. Uit deze fragmenten werden de PCR-primers geselecteerd die nu in het onderzoek ten behoeve van de monstervoorbereiding worden toegepast.

Voor *Campylobacter* werden eveneens probes geselecteerd uit banken met chromosomale DNA-fragmenten uit *C. jejuni* en *C. coli*. Fragmenten uit de banken werden op filters gefixeerd en door hybridisatie met gelabeld DNA van andere *Campylobacter*-soorten geanalyseerd. Fragmenten met de gewenste specificiteit werden verder onderzocht. Er werd speciaal gezocht naar probes die specifiek zijn voor de meest relevante *Campylobacter*-typen: de thermofielen en in het bijzonder *C. jejuni* en *C. coli*. Ook werden probes geselecteerd die met alle thermofielen reageren, of zelfs met alle eubacteriën waarop werd getest (zie tabel 2). Voor het evalueren van de geselecteerde probes werden ze gehybridiseerd met zoveel mogelijk verschillende type-stammen. In deze evaluatie werden met deze probes geen vals-positieve of vals-negatieve resultaten gevonden (van der Plas & Hofstra, 1990).

Van één van de probes werd de nucleotidenvolgorde bepaald. Op basis van deze sequentie werden PCR-primers gesynthetiseerd die werden gebruikt in het onderzoek naar de invoering van PCR-detectie voor *Campylobacter* (van der Plas et al., 1990).

Naast deze probes en primer-sets werden probes ontwikkeld voor de identificatie van de entero-invasieve bacterie *Shigella*. Deze probe detecteert eveneens de entero-invasieve types van *E. coli*. Ook voor enterotoxische *E. coli*-bacteriën zijn probes aanwezig. Ten slotte worden, in samenwerking tussen de Rijksuniversiteit Utrecht en TNO-Voeding, probes ontwikkeld uit de buitenmembraaneiwit-coderende genen van een aantal bacteriën uit de familie Enterobacteriaceae, zoals *Shigella*, *E. coli*, *Proteus*, *Klebsiella* en *Enterobacter* (Spierings et al., 1989). Deze probes zijn met name geschikt voor een snelle identificatie van reingekweekte micro-organismen, zowel in klinische als in andere analytisch-microbiologische routinelaboratoria.

Toepassing van probedetectie op *Salmonella*

Er zijn een aantal toepassingsgebieden voor DNA-hybridisaties in de routine-voedingsmiddelendiagnostiek. De DNA-hybridisaties op filters worden toegepast na een ophoping en/of een selectieve kweek van het micro-organisme. De voorlopige procedure voor monstervoorbewerking voor *Salmonella* is geënt op de klassieke *Salmonella*-bepaling en bestaat uit de volgende stappen:

- een resuscitatie/voorkweek: in gebufferd peptonwater (BPW) van 4 – 6 uur bij 25°C
- toevoeging van driemaal geconcentreerd Rappaport-Vasiliadis-medium (RV-medium) tot de normale concentratie, gevolgd door selectieve kweek op BPW-RV gedurende de nacht bij 37°C
- ‘dot blot’-hybridisatie met 100 µl uit de voorkweek (6 uur).

De totale bepalingstijd is anderhalf tot twee dagen, exclusief eventuele extra behandelingen tussen voorkweek en analyse om de filtreerbaarheid van de monsters te verbeteren. Als maatregelen om filtratie van de monsters mogelijk te maken, werden onder meer getest:

- a) een voorkweek in compartimenten gescheiden door filters
- b) verdunning van het monster in nutriëntmedium en doorkweken om weer op voldoende hoog niveau te komen
- c) isolatie van bacterieel DNA na de voorkweekprocedure.

Deze tests werden onder meer uitgevoerd met melkpoeder, kipfilet, gehakt en cacaoschroot. In het algemeen gaf voorbehandeling c, een snelle isolatie van het bacterieel DNA, een goed resultaat. Melkpoeder en cacaoschroot gaven echter ook na verlengde voorkweek (b) geen problemen meer.

De resultaten geven aan dat een korte resuscitatie en ophoping, gevolgd door een selectieve kweek gedurende de nacht, in de meeste gevallen voldoende bacteriën oplevert om de aan- of afwezigheid van *Salmonella* met een DNA-probe betrouwbaar aan te tonen. Een algemene conclusie is tevens dat voor vrijwel elk product een eigen voorbehandelingsprocedure zal moeten worden vastgesteld.

De probes werden in deze experimenten gelabeld met een niet-radioactieve label, volgens de voorschriften van de fabrikant (Boehringer). De bereikte detectiegrens kwam op 10^4 tot 10^5 *Salmonella*-bacteriën. Ook wanneer in het beginmonster de verhouding tussen *Salmonella* en andere bacteriën (stooflora) 1 op 10^4 tot 1 op 10^5 was, werd *Salmonella* in deze procedure zonder veel problemen aangetoond. Als

stooflora werden in deze experimenten verwante en minder verwante micro-organismen gebruikt, zoals *E. coli*, *Citrobacter freundii* en *Proteus mirabilis*.

Toepassing van de PCR-detectie

De PCR-test draagt de mogelijkheid in zich zeer snel de aan- of afwezigheid van bepaalde bacteriesoorten of virulentietypen te bepalen. Een zeer gering aantal bacteriecellen is voldoende om de reactie te starten. Met reingekweekte *Salmonella enteritidis*, verdund met een fysiologische zoutoplossing, werd met behulp van de huidige PCR-primers voor *Salmonella* een gevoeligheid vastgesteld van 2 – 6 bacteriën per monster van 10 µl. Voor de PCR test voor *Campylobacter* konden met de nu beschikbare primers eveneens minder dan 10 bacteriën per monster worden aangetoond. Het is niet interessant deze detectiegrens verder te verlagen, onder andere omdat het risico van een vals-positief signaal afkomstig van dode cellen of uit de achtergrond bij deze geringe aantallen erg groot wordt.

In de praktijk zullen zelden reingekweekte micro-organismen door middel van PCR worden bepaald. Bekend is dat DNA van onvoldoende zuiverheid PCR kan remmen en dus vals-negatieve resultaten kan veroorzaken. Toepassing van de PCR in de microbiologische routine is daarom een zaak van onderzoek naar de monster-voorbewerking en niet van probe-ontwikkeling. DNA- primers zijn immers reeds beschikbaar voor een redelijk groot aantal bacteriesoorten.

Het toespingsonderzoek voor de PCR-detectie bij *Salmonella* en *Campylobacter* moet leiden tot een minimale voorbehandeling van verschillende monstermatrices voorafgaand aan de PCR-test. Een norm, zoals die bestaat voor *Salmonella*, van minder dan 1 bacterie per 25 gram monster betekent in de praktijk een benodigd besmettingsniveau van 25 000 kiemen per monster bij de start van de PCR-detectie. Voorkweken van monsters blijft dus noodzakelijk, zeker bij lage besmettingsniveaus. In het algemeen is ook hier een resuscitatie/voorkweek van één nacht voldoende om de gewenste bacteriedichtheid te bereiken.

Verder onderzoek naar minimale voorbehandeling van diverse monsters is nu in gang gezet. Om storing van de PCR voor *Salmonella* door monstercomponenten te meten werden experimenten uitgevoerd met een drietal levensmiddelen (melkpoeder, kip en gehakt), met een grondstof (cacaoschroot) en met kippefaeces. Een verdunningsreeks van een 1:10 suspensie van de monsters werd besmet met 10^4 *Salmonella*-bacteriën. Vervolgens werd de PCR- reactie direct in het (verdunde) monster uitgevoerd. De conclusie uit deze voorlopige screening was dat een 1:10 suspensie van melkpoeder de PCR slechts in geringe mate stoorde. Kippemest en gehakt stoorden in sterkere mate, terwijl kippevlees en cacaoschroot verder moesten worden verdund om storing door monstercomponenten te voorkomen.

Verder onderzoek naar de monstervoorbereiding werd in een meer praktijkgerichte opzet uitgevoerd ten behoeve van de PCR- detectie van *Campylobacter*. Om storing door monstercomponenten in een praktijksituatie te testen, werd een eenvoudige PCR-test voor *Campylobacter* opgezet voor kip. Kipfilets werden kunstmatig besmet vanuit een reine culture van *C. jejuni*. De bacteriën werden, na opslag in de koelkast (30 minuten), met pepton-fysiologisch zout van de filet

afgewassen en vervolgens geteld door uitplaten op selectieve bloedagar en getest met PCR.

De efficiëntie van de spoelmethode voor het reisoleren van levende bacteriën bleek, indien bepaald door middel van de telplaten, 50 – 75% te bedragen. Directe toepassing van PCR op de spoelvloeistof van de monsters had geen goed resultaat. Blijkbaar komen ook bij relatief simpele methoden, zoals het oppervlakkig spoelen van kippevlees, reeds voldoende storende componenten vrij om directe PCR negatief te beïnvloeden. Ook hier bleek, zoals bij de 'dot blot'-hybridisatie, een snelle DNA-extractie voorafgaand aan de PCR-test de problemen op te lossen.

De PCR-procedure voor *Campylobacter* kon nog betrouwbaarder worden uitgevoerd door een modificatie in de PCR-test zelf aan te brengen. Dit hield in dat een interne standaard aan het reactiemengsel werd toegevoegd, voorafgaand aan de PCR-test. De interne standaard bestaat uit een kunstmatig, specifiek DNA-fragment waarin een knipplaats voor een restrictie-endonuclease is aangebracht. De standaard wordt met dezelfde efficiëntie nagemaakt als het natuurlijke DNA. Na de PCR-test wordt het geamplificeerde DNA met een restrictie-endonuclease behandeld. De verhouding tussen geknipt DNA van de interne standaard en ongeknipt monster-DNA geeft nu een maat voor de oorspronkelijke besmetting van het monster, onafhankelijk van de efficiëntie van de test. Dit geeft de mogelijkheid de invloed van remmende componenten te meten en tegelijkertijd de PCR-test tot een kwantitatieve bepaling te maken.

Slotconclusies

Experimentele toepassing van de nu beschikbare DNA-analyses, van de eenvoudige filterhybridisatie test tot een kwantitatieve PCR-analyse, op een reeks meer of minder toegankelijke monstermaterialen toont aan dat de monstervoorbereiding het cruciale punt is bij de toepassing van deze moderne en snelle DNA-analyses in de voedingsmiddelenmicrobiologie. De benodigde 'gereedschappen', d.w.z. de DNA-probes en de PCR-primers, hebben we nu voor de meest relevante micro-organismen volop ter beschikking, hoewel ook hier de ontwikkeling voortgaat. Dit geldt zeker voor het gebied van de DNA-patroonontwikkeling (RFLP) voor epidemiologische en monitoring-doeleinden van pathogene, industriële of genetisch gemodificeerde micro-organismen.

In het onderzoek naar een snellere en betere monstervoorbereiding zal de nadruk liggen op de ontsluiting van micro-organismen uit de vaak complexe matrices van de monstermaterialen, of op de snelle isolatie van DNA van voldoende zuiverheid uit de voorgekweekte of bewerkte monsters. Daarbij lijkt de 'dot blot' of filterhybridisatie vooral geschikt voor identificatiedoeleinden, namelijk voor de bevestiging van min of meer reine cultures. PCR-bepalingen en de kwantitatieve PCR echter zullen meer geschikt blijken voor de snelle detectie van bacteriën in een veelheid van monsters.

Literatuur

- Giovannoni, S.J., DeLong, E.F., Olsen, G.J. & Pace, N.R., 1988. Phylogenetic group-specific oligonucleotide probes for identification of single microbial cells. *Journal of Bacteriology* 170: 720 – 726.
- Hofstra, H. & Huis in't Veld, J.H.J., 1988. Methods for the detection and isolation of *Escherichia coli* including pathogenic strains. *Journal of Applied Bacteriology (Symposium Supplement)*: 197S – 212S.
- Hofstra, H., ten Bosch, C., Havekes, M., van der Plas, J. & Huis in 't Veld, J., 1990. Monoclonale antilichamen en DNA hybridisatie in de levensmiddelen microbiologie. *Ware(n)chemicus* 20: 67 – 73.
- Hoogenboom-Verdegaal, A.A.M. & Notermans, S.H.W., 1990. Incidentie en onderzoek Voedselvergiftigingen, een nieuwe aanpak. *Food Management*, juli: 25 – 27.
- Huis in't Veld, J., Hartog, B. & Hofstra, H., 1988. Changing perspectives in food microbiology: Implementation of rapid microbiological analyses in food microbiology. *Food Reviews International* 4: 271 – 329.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R.H., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Ehrlich, H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487 – 491.
- Spierings, G., Hofstra, H., Huis in't Veld, J., Hoekstra, W. & Tommassen, J., 1989. Development of *Enterobacterium*-specific oligonucleotide probes based on the surface-exposed regions of outer membrane proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 3250 – 3252.
- Van der Plas, J. & Hofstra, H. Rapid detection and identification of *Campylobacter* species in food using DNA probes. In: *Agricultural biotechnology in focus in the Netherlands*. Pudoc, Wageningen, in druk.
- Van der Plas, J., Timmer, C., van Rijn, J., Huis in 't Veld, J. & Hofstra, H., 1990. Detectie van *Campylobacter* door middel van de polymerase ketting reactie. *Ware(n)chemicus* 20: 60 – 66.

Dokkum, W. van, D.G. van der Heij (Red.).
Voedsel in beweging.
Symposium 50 jaar voedingsonderzoek TNO,
Utrecht, 3-5 oktober 1990.
Wageningen, Pudoc, 1990.