

MALDI-TOF- MASSENSPEKTROMETRIE IN DER TRINKWASSER- MIKROBIOLOGIE

Veröffentlichungen aus dem
DVGW-Technologiezentrum Wasser

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Zielsetzung des Projekts	3
3	Stand des Wissens	4
3.1	Bakterien-Identifizierung in der Trinkwasser-Mikrobiologie.....	4
3.2	Methoden zur Identifizierung von Bakterien-Isolaten.....	4
3.2.1	Identifizierung von Bakterien-Isolaten über die DNA-Sequenzierung.....	5
3.2.2	Identifizierung von Bakterien-Isolaten mittels MALDI-TOF-MS	6
4	Material und Methoden	9
4.1	Mikrobiologische Methoden.....	9
4.1.1	Nachweis von coliformen Bakterien und <i>E. coli</i>	9
4.1.2	Nachweis von Enterokokken.....	9
4.1.3	Nachweis von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> und thermotoleranten Campylobacter	9
4.2	Molekularbiologische Untersuchungen.....	10
4.2.1	DNA-Extraktion.....	10
4.2.2	PCR zur Sequenzierung.....	10
4.2.3	RAPD-PCR zur Typisierung.....	12
4.2.4	Analytische Trennmethode von PCR-Produkten.....	12
4.2.5	Aufreinigung von PCR-Produkten	12
4.2.6	Sequenzierung	13
4.2.7	Bioinformatische Analyse	13
4.3	Gesamtgenomsequenzierung	13
4.3.1	DNA-Extraktion.....	13
4.3.2	Sequenzierung, Assemblierung und Annotation	13
4.3.3	Phylogenetische Untersuchung	14
4.4	Bakterienidentifizierung über biochemische Eigenschaften	14
4.5	MALDI-TOF MS zur Typisierung und Identifizierung	14
4.5.1	Messung von Isolaten.....	14
4.5.2	Erstellung von Datenbankeinträgen	15
4.5.3	Auswertung der Ergebnisse.....	17
4.6	Untersuchungen zum Einfluss von Kultivierungsmethoden und Wachstumsbedingungen auf die Identifizierungsergebnisse	18
4.7	Vergleichsmessungen zwischen den MALDI-TOF Geräten verschiedener Wasserversorgungsunternehmen	19
5	Ergebnisse und Diskussion	20
5.1	Identifizierung von coliformen Bakterien mittels MALDI-TOF-MS	20
5.1.1	Übersicht über die Untersuchungen zu coliformen Bakterien im Arbeitspaket 1	20
5.1.2	Identifizierung von coliformen Bakterien aus Umweltproben	20
5.1.3	Vergleich Identifizierung durch MALDI-TOF-MS und über biochemische Eigenschaften (VITEK)	21

5.1.4	Vergleich MALDI Sequenzierung	22
5.1.5	Identifizierung von <i>Buttiauxella</i> -Isolaten aus Umweltproben	22
5.1.6	Vergleichende Identifizierung und Typisierung von coliformen Bakterien der Gattung <i>Lelliottia</i> aus Umweltproben	25
5.1.7	Zwischenfazit zur Identifizierung von coliformen Bakterien	26
5.2	Identifizierung von Enterokokken mittels MALDI-TOF-MS.....	27
5.2.1	Übersicht über die Untersuchungen zu Enterokokken im Arbeitspaket 2	27
5.2.2	Identifizierung von Enterokokken aus Umweltproben.....	27
5.2.3	Vergleich von MALDI-TOF-MS und Sequenzierung für Enterokokken	28
5.2.4	Erweiterte Typisierung von Enterokokken mittels Clusteranalyse	28
5.2.5	Fazit zur Identifizierung von Enterokokken	32
5.3	Identifizierung des fakultativen Krankheitserregers <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mittels MALDI-TOF-MS	33
5.3.1	Hintergrund und Übersicht über die Untersuchungen mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
5.3.2	Untersuchungen mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
5.3.3	Fazit zur Identifizierung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
5.4	Identifizierung thermophiler <i>Campylobacter</i> mittels MALDI-TOF-MS.....	38
5.5	Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf die Identifizierungsergebnisse mittels MALDI-TOF-MS	40
5.5.1	Übersicht über die Untersuchungen zum Einfluss von Kultivierungsbedingungen im Arbeitspaket 4	40
5.5.2	Untersuchungen mit coliforme Bakterien	40
5.5.3	Untersuchungen mit Enterokokken	42
5.5.4	Fazit Kultivierungs- und Lagerungsversuche	43
5.6	Vergleichsmessungen zwischen verschiedenen MALDI-Geräten.....	44
5.7	Verbesserung der Identifizierungsergebnisse durch Ergänzung des Datenbestandes	47
5.7.1	Übersicht über die Untersuchungen zur Verbesserung der Identifizierungsergebnisse für coliforme Bakterien im Rahmen von Arbeitspaket 5.....	47
5.7.2	Identifizierung und Typisierung mittels MALDI-TOF MS.....	47
5.7.3	Typisierung mittels RAPD.....	49
5.7.4	Identifizierung mittels MLSA und Genomsequenzierung.....	50
5.7.5	Identifizierung und Typisierung mittels MALDI-TOF MS und R nach der Datenbankerweiterung.....	51
6	Bewertung der MALDI-TOF-MS-Methodik und Empfehlungen für die Praxis	54
6.1	Diskussion der Ergebnisse und Bewertung der MALDI-TOF-MS- Methodik	54
6.2	Empfehlungen für den Einsatz von MALDI-TOF-MS für die Praxis der Wasserversorgung.....	57
7	Danksagung	60
8	Publikationen und Präsentationen der Projektergebnisse	61
9	Literatur	63