

## **Aufschluss von Parasiten-Dauerformen mit der Schwingmühle MM 400 von RETSCH**

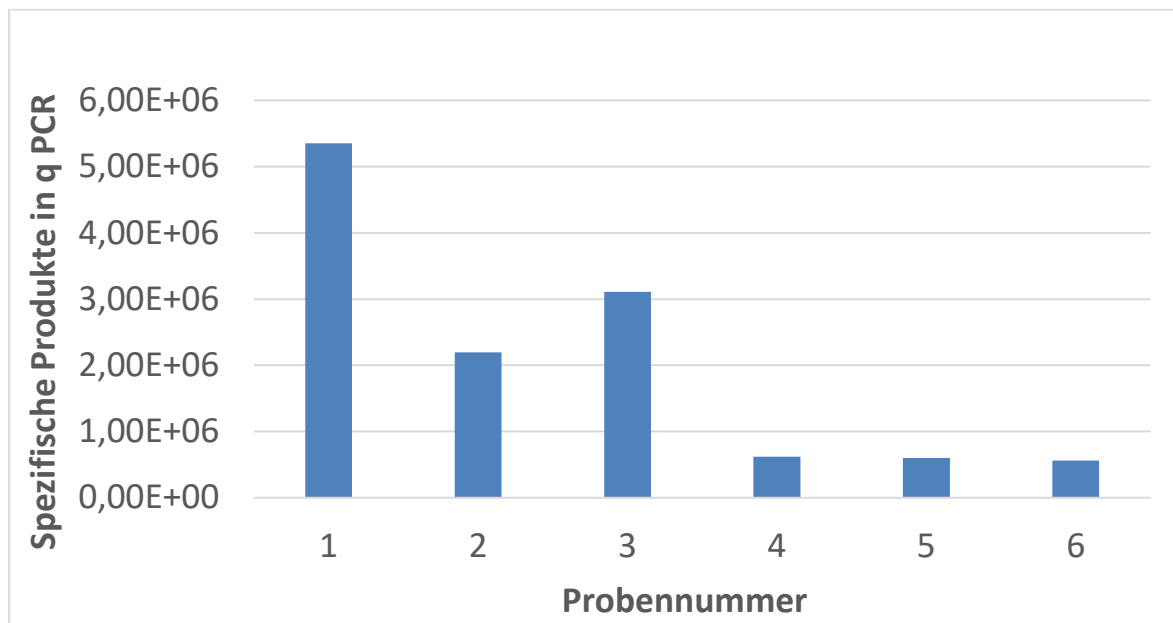
Giardien und Cryptosporidien sind im Wasser vorkommende Parasiten, welche beim Menschen Durchfallerkrankungen verursachen. Sie sind weit verbreitet und stellen in Ländern mit unzureichender Trinkwasseraufbereitung ein großes Problem dar. Beide Spezies durchlaufen einen komplizierten Entwicklungszyklus; im Wasser sind umwelt- und desinfektionsmittelresistente Dauerformen verbreitet, die Giardia-Cysten und Cryptosporidium-Oocysten. Üblicherweise erfolgen Nachweis und quantitative Bestimmung der Parasiten gemäß ISO 15553 „Water Quality – Isolation and Enumeration of Cryptosporidium oocysts and Giardia cysts from water“. Nach dieser Vorschrift erfolgt eine mehrstufige Anreicherung, Immunfluoreszenzfärbung und Auszählung unter dem Mikroskop. Einen alternativen molekularbiologischen Ansatz stellt der Nachweis mittels quantitativer Real-Time Polymeraseketten-Reaktion (RT-PCR) dar. Dazu ist es erforderlich, die Dauerformen aufzuschließen, die DNA anschließend zu extrahieren und die Menge mittels RT-PCR zu bestimmen. Der Aufschluss der sehr stabilen Cysten und Oocysten ist nicht einfach. Verschiedene Techniken sind in der Literatur beschrieben, z. B. Anwendung von Ultraschall oder mehrfaches Einfrieren mit flüssigem Stickstoff und anschließendes Wiederauftauen.

Ein mechanischer Ansatz unter Benutzung der Schwingmühle MM 400 von RETSCH wurde jetzt von einem mikrobiologischen Labor getestet.

### **Zellaufschluss mittels „Bead-Beating“**

Eine sehr effiziente Aufschlussmethode ist das sogenannte „Bead-Beating“, bei dem kleine Glaskugeln in Reaktionsgefäßen Zellsuspensionen durch mechanische Effekte aufschließen. Häufig wird das Reaktionsgefäß dabei über einen Vortexer gehalten, so dass die Zellsuspension mit den Glaskügelchen im Gefäß aufwirbelt und so die Zellen aufgeschert werden. Bei hohen Probanddurchsätzen oder langen Aufschlusszeiten von bis zu 10 Minuten ist diese Methode jedoch zeitaufwändig und fehleranfällig. Reproduzierbarer und schneller geht es mit einer Schwingmühle MM 400 von RETSCH kombiniert mit dem Adapter für bis zu 10 x 2 ml Reaktionsgefäße. Das mikrobiologische Labor stellte insgesamt 6 Ansätze mit  $9 \times 10^1$  Giardia-Cysten und  $1 \times 10^6$  Cryptosporidium-Oocysten je ml her. Von diesen Ansätzen wurde je 1 ml als Probe verwendet. In den ersten drei Proben erfolgte zunächst ein Aufschluss mittels MM 400. Dazu wurde die 1 ml Suspension mit 3,2

g Glasbeads (0,75 mm - 1 mm) in einem Nunc Cryogefäß mit Gewinde gemischt und 3 x für je 10 min bei 30 Hz geschüttelt. Anschließend erfolgte die Isolation der DNA mittels GenUp DNA/RNA Kit nach Herstellerangaben mit einem Volumen von 400 µm und Elution von 100 µm. Die Proben 4-6 wurden als Negativkontrolle nicht mittels Bead-Beating aufgeschlossen, sondern 400 µl direkt mittels Kit lysiert und gereinigt, dann in der qPCR eingesetzt. In dieser wurden je 5 µL Probenvolumen in 20 µL Mastermix verwendet, die Quantifizierung erfolgte über eine 10er Verdünnungsreihe bekannter DNA-Standards. Spezifische Sonden für die Giardia-Cysten und Cryptosporidium-Oocysten kamen zum Einsatz und wurden mit dem BioRad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System gemessen (Abbildung 1). Es ist deutlich zu erkennen, dass der Zellaufschluss mittels Bead-Beating und Zellyse effizienter ist, als der Zellaufschluss mittels Lyserverfahren.



**Abbildung 1:** Spezifische qPCR Produkte von *Cryptosporidium parvum* in 1 mL Probe

### **Vielseitig einsetzbar, die Schwingmühle MM 400 von RETSCH**

Die Schwingmühle MM 400 von RETSCH ist durch umfangreiches Zubehör sehr vielseitig einsetzbar (Abbildung 2), nicht nur für den Zellaufschluss in single-use Gefäßen, wie z.B. in bis zu acht 50 ml Falcon Tubes oder diversen Eppendorf Tubes (maximal 20 Proben gleichzeitig). Ganz gleich ob Pflanzen, Federn, Knochen, Gewebeproben, Tabletten, Holz, Mineralien oder Chemikalien - die MM 400 ist ein bewährter Alleskönner in der Probenvorbereitung. Sie dient zur Fein- und Feinstzerkleinerung auf Partikelgrößen bis 5 µm von sowohl harten, mittelharten, spröden als auch weichen, elastischen oder faserigen Proben. Die Mahlbecher aus Stahl sind zudem für die kryogene Zerkleinerung geeignet. Hierfür bietet RETSCH

das Kryokit an, in dem Becher bei -196°C in flüssigen Stickstoff gekühlt und somit die Probe innerhalb des Bechers versprödet werden kann.



**Abbildung 2:** Schwingmühle MM 400 mit Adapter für 8 x 50 ml Falcons (links) und diverses Zubehör, z.B. Adapter für Eppendorf-Tubes, Mahlbecher und Mahlkugeln (rechts)

### Fazit

Parasiten besitzen mehrere Kerne was zu mehreren positiven Ergebnissen in der qPCR für ein Produkt führen kann. Es können also mehr Parasiten gefunden werden als Cysten eingesetzt wurden. Die besten Ergebnisse in der qPCR lieferten die Proben 1-3 mit vorgeschaltetem Zellaufschluss durch Bead Beating in der MM 400 von RETSCH. Für Cryptosporidien konnte die Wiederfindungsrate durch die Verwendung der Schwingmühle deutlich verbessert werden. Bei den Giardien war dies nicht der Fall, da nur vereinzelte Giardien nachgewiesen wurden.

### Autorin:

Dr. Tanja Butt  
Produktmanagement  
t.butt@retsch.com