

**Entwicklung eines auf Kunststoffpolymeren basierenden Analysesystems zum  
Nachweis von humanpathogenen und Verderbnis erregenden  
Mikroorganismen in Lebensmitteln und weiterführende gruppenspezifische  
Untersuchungen zur Charakterisierung von *Clostridium perfringens***

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Ansgar Ferner

aus

Simmern

Bonn 2004

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Referent: Prof. Dr. Johannes Krämer  
(Abt. Landwirtschaftliche und Lebensmittel-Mikrobiologie,  
Institut für Pflanzenkrankheiten)

Korreferent: Prof. Dr. Erwin Galinski  
(Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie)

Tag der Promotion: 29.11.2004

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

meiner Frau Susanne,  
meinen Eltern

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>EINGESETZTE BAKTERIENSTÄMME</b>	<b>17</b>
<b>2.2</b>	<b>MEDIEN, GERÄTE, CHEMIKALIEN UND SONSTIGE MATERIALIEN</b>	<b>22</b>
2.2.1	Nährmedien	22
2.2.2	Geräte	22
2.2.3	Puffer und Lösungen	23
2.2.4	Kits, Chemikalien, Reagenzien und sonstige Materialien	24
2.2.5	Oligonucleotide	26
2.2.6	Antikörper	26
<b>2.3</b>	<b>MIKROBIOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>27</b>
2.3.1	Kultivierung/Stammhaltung	27
2.3.2	Makroskopie und Mikroskopie von <i>Clostridium perfringens</i>	28
2.3.3	Reverse-CAMP-Test zur Identifizierung von <i>Clostridium perfringens</i>	28
2.3.4	Empfindlichkeit gegen Antibiotika	28
2.3.4.1	Agar-Diffusionsverfahren	29
2.3.4.2	Micronaut-Plattentest	30
2.3.5	Nachweis und Sporulation von <i>Clostridium perfringens</i>	31
2.3.6	Nachweis von <i>Lactobacillus brevis</i>	31
<b>2.4</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>32</b>
2.4.1	Identifizierung und Differenzierung von <i>Clostridium perfringens</i> mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
2.4.2	Realtime-PCR von <i>Salmonella Enteritidis</i>	34
2.4.3	Realtime-PCR von <i>Lactobacillus brevis</i>	35
2.4.4	Auswertung der Realtime-PCR durch Schmelzkurvenanalysen	36
2.4.5	Auswertung der Realtime-PCR durch Gelelektrophorese	37

---

<b>2.5</b>	<b>DIFFERENZIERUNG VON <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i> MIT FT-IR-SPEKTROSKOPIE</b>	<b>37</b>
2.5.1	Kultivierung von <i>Clostridium perfringens</i> für die FT-IR-Spektroskopie	37
2.5.2	Präparation von <i>Clostridium perfringens</i> für die FT-IR-Spektroskopie	37
2.5.3	Messen der Infrarotspektren	38
2.5.4	Auswertung der Spektren	38
<b>2.6</b>	<b>ENTWICKLUNG IMMUNOLOGISCHER ANALYSENSYSTEME</b>	<b>40</b>
2.6.1	Charakterisierung unterschiedlicher Trägermaterialien aus Kunststoff	41
2.6.1.1	Wechselwirkungen von Bakterien mit Kunststoffoberflächen	41
2.6.1.2	Durchflussgeschwindigkeit flüssiger Proben durch Kunststoff-Fritten	43
2.6.1.3	Charakterisierung von Kunststoffkörpern durch Elektronenmikroskopie	43
2.6.1.4	Überprüfung der Bakterien-Rückhaltekapazität von Kunststoff-Fritten	43
2.6.2	Oberflächenmodifikation von Kunststoff-Fritten	44
2.6.2.1	Funktionalisierung von Kunststoffoberflächen durch Oxidation	44
2.6.2.2	Funktionalisierung oxidierter Kunststoffoberflächen durch Silanisierung	45
2.6.2.3	Funktionalisierung silanisierter Kunststoffoberflächen durch Carboxylierung	45
2.6.2.4	Wechselwirkungen von Bakterien mit modifizierten Kunststoffoberflächen	46
2.6.2.5	Bindekapazität von Amino-Affinitätsmodulen gegenüber <i>Lactobacillus brevis</i>	46
2.6.3	Bindung von Antikörpern auf Kunststoff-Fritten	47
2.6.3.1	Absorptive Bindung von Antikörpern mittels Batchbeschichtung	47

2.6.3.2	Absorptive Bindung von Antikörpern mittels Durchflussbeschichtung-----	48
2.6.3.3	Kovalente Bindung von Antikörpern-----	48
<b>2.7</b>	<b>IMMUNOLOGISCHE METHODEN -----</b>	<b>49</b>
2.7.1	Nachweis von Salmonellen mittels Abicap <sup>®</sup> -RED-Test -----	49
2.7.2	Agglutinationstest zum Nachweis einer Antikörper-Antigen-Reaktion -----	50
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE-----</b>	<b>51</b>
<b>3.1</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG VON <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i> -----</b>	<b>51</b>
<b>3.2</b>	<b>DIFFERENZIERUNG ENTEROTOXIN BILDENDER <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i> STÄMME GEGENÜBER NICHT ENTEROTOXIN BILDENDEN STÄMMEN -----</b>	<b>51</b>
3.2.1	Molekularbiologische Differenzierung mittels Duplex-PCR -----	52
3.2.2	Clusteranalyse von FT-IR-Dendrogrammen -----	54
3.2.3	Vergleich der Antibiotikasensitivität Enterotoxin bildender <i>Clostridium perfringens</i> Stämme zu nicht Enterotoxin bildenden Stämmen-----	56
3.2.4	Sporulationsverhalten -----	58
<b>3.3</b>	<b>UNTERSCHIEDSMERKMALE ZWISCHEN <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i> STÄMMEN AUS LEBENSMITTEL- UND PATIENTENISOLATEN -----</b>	<b>60</b>
3.3.1	Molekularbiologische Differenzierung mittels Duplex-PCR -----	60
3.3.2	Clusteranalyse eines FT-IR-Dendrogramms-----	60
3.3.3	Antibiotikasensitivität von <i>Clostridium perfringens</i> Stämmen aus Lebensmittel- und Patientenisolaten-----	62
3.3.4	Sporulationsverhalten -----	64
<b>3.4</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG VON <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i> STÄMMEN VERSCHIEDENEN URSPRUNGS-----</b>	<b>65</b>
3.4.1	Clusteranalyse in einem FT-IR-Dendrogramm-----	65

---

3.4.2	Antibiotikasensitivität bei einer Auswahl von <i>Clostridium perfringens</i> Isolaten verschiedenen Ursprungs -----	67
3.4.3	Sporulationsverhalten -----	69
<b>3.5</b>	<b>EINFLUSS VERSCHIEDENER NÄHRMEDIEN AUF DEN ANTIBIOTIKA-SENSITIVITÄTSTEST (AGARDIFFUSIONSTEST)-----</b>	<b>70</b>
<b>3.6</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG UNTERSCHIEDLICHER TRÄGERMATERIALIEN BEI DER ENTWICKLUNG VON IMMUNOLOGISCHEN ANALYSENSYSTEMEN -----</b>	<b>72</b>
3.6.1	Eigenschaften von Trägermaterialien aus Kunststoff-----	72
3.6.1.1	Wechselwirkungen von Bakterien mit Kunststoffoberflächen -----	72
3.6.1.2	Einfluss von Blockpuffer auf die Wechselwirkungen zwischen Bakterien und Kunststoffoberflächen -----	73
3.6.1.3	Fließeigenschaften flüssiger Proben durch Kunststoff-Fritten -----	75
3.6.1.4	Charakterisierung der Kunststoffkörper durch Elektronenmikroskopie -----	77
3.6.1.5	Überprüfung der Bakterien-Rückhaltekapazität von Kunststoff-Fritten -----	78
3.6.2	Wechselwirkungen von Bakterien mit modifiziertem Kunststoffmaterial -----	80
3.6.3	Einfluss der Lagerung von modifiziertem Kunststoffmaterial auf die Wechselwirkung mit humanpathogenen Bakterien-----	81
<b>3.7</b>	<b>IMMUNOLOGISCHE VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON HUMANPATHOGENEN MIKROORGANISMEN -----</b>	<b>82</b>
3.7.1	Immunologische Verfahren zum Nachweis von <i>Clostridium perfringens</i> -----	83
3.7.1.1	Nachweis von <i>Clostridium perfringens</i> mittels Dot-Blot-ELISA -----	83
3.7.1.2	Nachweis von <i>Clostridium perfringens</i> mittels Durchfluss-ELISA -----	84
3.7.1.3	Überprüfung der Antikörperqualität durch einen Agglutinationstest -----	86

---

3.7.2	Immunologische Verfahren zum Nachweis von <i>Legionella pneumophila</i> -----	86
3.7.2.1	Nachweis von Legionellen mittels Dot-Blot-ELISA -----	87
3.7.2.2	Nachweis von Legionellen mittels Durchfluss-ELISA -----	88
3.7.3	Immunologische Verfahren zum Nachweis von Salmonellen -----	90
3.7.3.1	Nachweis von Salmonellen mittels Abicap®-RED-Test-----	90
3.7.3.2	Nachweis von Salmonellen mittels immunologischer Anreicherung mit anschließender PCR-Detektierung -----	91
<b>3.8</b>	<b>METHODEN ZUR ANREICHERUNG VON MIKROORGANISMEN AUS FLÜSSIGEN LEBENSMITTELN DURCH AFFINITÄTSMODULE-----</b>	<b>93</b>
3.8.1	Anreicherung von <i>Listeria monocytogenes</i> aus Milch mit Affinitätsmodulen -----	94
3.8.2	Anreicherung von Lactobacillen mit aminomodifizierten Kunststoffen-----	95
3.8.2.1	Bestimmung der Aminomodifikation mit der höchsten Rückhaltekapazität -----	95
3.8.2.2	Verfahren zur Anreicherung von <i>Lactobacillus brevis</i> durch aminomodifizierte Kunststoffe mit nachfolgender PCR-Detektierung-----	96
3.8.2.3	Aufnahmekapazität von <i>Lactobacillus brevis</i> eines in loser Form eingesetzten Aminoaffinitäts-Sinterkörpers -----	97
3.8.3	Nachweis von <i>Lactobacillus brevis</i> durch Membranfiltration-----	99
<b>4</b>	<b>DISKUSSION-----</b>	<b>100</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG -----</b>	<b>123</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR -----</b>	<b>125</b>
<b>7</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS -----</b>	<b>138</b>
<b>8</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS -----</b>	<b>141</b>



---

<b>9</b>	<b>ANHANG</b> -----	<b>143</b>
<b>9.1</b>	<b>MORPHOLOGIE DER UNTERSUCHTEN <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i> STÄMME</b> -----	<b>143</b>
<b>9.2</b>	<b>ANTIBIOTIKASENSITIVITÄT VON <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i> (AGARDIFFUSIONSTEST)</b> -----	<b>146</b>
<b>9.3</b>	<b>ANALYSENPROTOKOLLE</b> -----	<b>151</b>
<b>9.4</b>	<b>NACHWEIS VON <i>LEGIONELLA PNEUMOPHILA</i> IN WASSER [INTEGRATION DES ABICAP<sup>®</sup>-ELISA´S ALS SCHNELLMETHODE IN DEN ANALYSENGANG DER EMPFEHLUNG DES UMWELTBUNDESAMTES (BGBL. 11/2000)]</b> -----	<b>154</b>
<b>9.5</b>	<b>DANKSAGUNG</b> -----	<b>155</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

Abicap®	Antibody Immuno Column for Analytical Processes
APPG	Bis(Aminopropoxy)-oligopropylenglykol
APTES	Aminopropylen-triethoxysilan
ATCC	American Typ Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BCYE	Buffered Charcoal Yeast Extract
BGBI.	Bundesgesetzblatt
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
CPE	<i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRCM	Differential Reinforced Clostridial Medium
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
Duplex-PCR	PCR mit zwei Primerpaaren
DVGW	Deutsche Vereinigung des Gas- und Wasserfaches e.V.
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIA	Enzym Immuno Assay
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie
GC	Gaschromatographie
IMMH	Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg
IMMI-Bn	Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Universität Bonn
IMMI-L	Institut für Medizinische Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie der Universität Leipzig
INLAB	Institut für Lebensmittelmikrobiologie, Analytik, Betriebs- und Umwelthygiene
IPB	Institut für Pharmazeutische Biologie
KbE	Kolonie bildende Einheit
Kda	Kilo-Dalton
LMBG	Lebensmittel und Bedarfsgegenstände Gesetz
MHK	Mindest-Hemm-Konzentration
MRS-Agar	Lactobacillus-Agar nach de Man, Rogosa und Sharpe
NCTC	National Collection of Typ Culture

---

ng	nanogramm
NRS	Collection of Nathan R. Smith
NWG	Nachweisgrenze
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PE	Polyethylen
PEM	Perfringens Enrichment Medium
PES	Polyester
plc	Phospholipase C
PMBn	Pharmazeutische Mikrobiologie Bonn
PP	Polypropylen
RCM	Reinforced Clostridial Medium
spp.	Spezies
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TS	Trypton Soja
TSC	Trypton Sulfit Cycloserin
ZISanBw	Zentrales Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr

## 1 EINLEITUNG

Die Veränderung der Lebens- und Eßgewohnheiten der Menschheit hat das Risiko an Lebensmittelvergiftungen zu erkranken wesentlich erhöht. Nicht zuletzt der immer größer werdende Anteil von Ausserhausverpflegern (Gemeinschaftsverpflegung in Kantinen, Mensen, Krankenhäusern; Fastfood-Verpflegung) und die industrielle Lebensmittelherstellung im grossen Maßstab bewirken eine Zentralisierung der Speisenherstellung, die für eine große Anzahl von Personen Risiken in sich bergen (KATASARAS, 1980; KEUSGEN *et al.* 2000; FERNER, 2001; KRÄMER, 2002; ZORN, 2004). Aus mikrobiologischer Sicht sind dabei vor allem die am häufigsten für Erkrankungen verantwortlichen humanpathogenen Mikroorganismen wie Enteritis erregende Salmonellen und *Clostridium perfringens* von Interesse. Aber auch andere, epidemiologisch nicht so häufig auftretende Bakterien wie *Listeria monocytogenes* sind durch ihre hohe Letalitätsrate von Bedeutung. Der schnelle Nachweis und die Identifizierung von humanpathogenen Kontaminanten in Lebensmitteln haben demnach in der modernen mikrobiologischen Lebensmittelanalytik eine zentrale Rolle (TIGGES, 1998; KEUSGEN *et al.* 2000). Im folgenden werden einige Bakterien beschrieben, die aufgrund ihrer Eigenschaften, Vorkommen und epidemiologischen Bedeutung von Interesse sind, bestehende Analysensysteme dargestellt und die Notwendigkeit von leistungsfähigen Schnellmethoden zum Nachweis dieser Mikroorganismen erläutert.

### ***Clostridium perfringens***

Im letzten Jahrzehnt stellte bei den aufgeklärten bakteriellen Lebensmittelvergiftungen *Clostridium perfringens* (lateinisch perfringere, zer- oder durchbrechen), nach *Salmonella* spp. die häufigste Erkrankung dar (ALLEN *et al.*, 1999). Bei seiner Entdeckung (1892) wurde es zunächst mit Gasbrand und einer milden aber chronischen Durchfallerkrankung in Verbindung gebracht. Nach Beschreibungen von KNOX, MACDONALD und MCCLUNG in den vierziger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts, sowie Untersuchungen von HOBBS ab 1953, wurde *Clostridium perfringens* auch mit Lebensmittelvergiftungen assoziiert und dessen diesbezügliche Eigenschaften beschrieben und aufgeklärt. Seit den sechziger Jahren des vorigen Jahrhunderts stieg die Beschreibung des Auftretens von Lebensmittelvergiftungen durch *Clostridium perfringens* stark an. Größere Ausbrüche von Erkrankungen (je über hundert Betroffene) durch Lebensmittel mit *Clostridium perfringens* Kontamination traten in Deutschland nach Genuss von Fleischkonserven und in Papua-Neuguinea nach Verzehr von Schweinefleisch in Erscheinung (HOBBS, 1979; SCHALLEHN, 1988; LABBE, 1989). Zwischen 1993 und 1997 traten in den Vereinigten Staaten von Amerika insgesamt 40 Ausbrüche auf, was insgesamt 4,1 % aller lebensmittelbedingter Erkrankungen ausmachte

(MCCLANE, 2001). In Finnland konnte im Zeitraum zwischen 1975 und 1999 mit 238 Fällen ein noch höherer Prozentsatz (20 %) an Erkrankungen durch *Clostridium perfringens* nachgewiesen werden (LUKINMAA *et al.*, 2002).

*Clostridium perfringens* sind grampositive, teilweise gramlabile, unbewegliche Sporenbildende Stäbchenbakterien (BISPRING & AMTSBERG, 1988; SEIFERT, 1995). Die vegetativen Zellen sind gegenüber Gefriertemperaturen sehr empfindlich, was bei der Untersuchung von Lebensmitteln auf Vorhandensein von *Clostridium perfringens* beachtet werden muss (BAUMGART & BECKER, 2004). Aufgrund von Majortoxinen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\iota$ ), welche die Stämme in unterschiedlicher Zusammensetzung bilden können, wird *Clostridium perfringens* in fünf verschiedene serologische Gruppen von A bis E eingeteilt (STERNE & WARRACK, 1964; STERNE & BATTY, 1975; HOBBS, 1979; LABBE, 1989; PICHARD, 1998). Neben den Major- und Minortoxinen erzeugen etwa fünf Prozent der *Clostridium perfringens* Stämme des Typs A und C ein hitzelabiles Enterotoxin (griechisch enteron, Darm; toxicum, Gift) (KOKAIKUN *et al.*, 1994; SONGER & MEER, 1996; DAUBE *et al.*, 1996). Dieses *Clostridium perfringens* Enterotoxin (CPE) stellt ein 34,3 kDa Polypeptid dar (HAUSSCHILD *et al.*, 1973; GRANUM und SKJELKVALE, 1977; SEQUIRES *et al.*, 1984; RICHARDSON und GRANUM, 1985; MCCLANE, 1997; SARKER *et al.*, 1999; MCCLANE *et al.*, 2000). Dieses Enterotoxin ist für die Entstehung von Lebensmittelvergiftungen (HATHEWAY, 1990; ROOD & COLE, 1991; GRANUM & STEWART, 1993), aber auch für Darmerkrankungen inklusive Antibiotika assoziierte (BORIELLO *et al.*, 1984; BORIELLO & WILLIAMS, 1985; CARMAN, 1997) sowie andere Durchfälle verantwortlich (NILO, 1980; CARMAN, 1997). Es wird während der Sporulation der vegetativen Keime im Darm erzeugt und bei Lyse der Zelle freigesetzt (WERDELING, 1989). Die für Krankheitserscheinungen (Enteritis, wässrige Diarrhöe) notwendige Toxinmenge von etwa 12 ng/g ist bei vegetativen Keimkonzentration von  $> 10^6$  Kolonien bildenden Einheiten (KbE) pro Gramm zu erwarten (SHANDERA *et al.*, 1983; SCHALLEHN, 1988; WENDELING, 1989; KRÄMER, 2002). Keimgehalte in diesem Bereich treten häufig auf, wenn zubereitete Lebensmittel nicht ausreichend gekühlt werden und ein annähernd anaerobes Milieu herrscht, so dass sich die vegetativen Zellen vermehren können (KRÄMER, 2002). *Clostridium perfringens* kommt ubiquitär, vor allem im Erdboden, Wasser und in Konzentration von  $10^2$  bis  $10^4$  im Darmtrakt von Mensch und Tier vor (MÜLLER, 1986; HAHN, 2002). Betroffene Lebensmittel sind hauptsächlich Fleisch und Fleischprodukte. Sie sind aber auch in nahezu allen anderen Lebensmitteln wie Käse, Gewürze, Honig, Sardellen sowie in einer Reihe von Süßspeisen, Suppen und aus Soßen isoliert worden (BAJTAY & LANGFELDT, 2003). Die bei der Zubereitung von Lebensmitteln erzeugten Temperaturen sind oft nicht ausreichend, um hitzeresistente Sporen abzutöten. Untersuchungen haben gezeigt, dass einige Stämme Sporen mit einem  $D_{95}$ -Wert von bis zu 60 Minuten ausbilden

und dass ein Hitzeschock bei 75 °C für 10 Minuten das Auskeimen von Sporen sogar fördern kann (KRÄMER, 2002).

*Clostridium perfringens* ist gegenüber einer ganzen Anzahl an Antibiotika empfindlich. Bei der Behandlung des Gasbranderregers ist die Gabe von Benzylpenicillin am wirkungsvollsten (FEINGOLD, 1980). Bei Patienten mit einer Überempfindlichkeit gegenüber Benzylpenicillin können verschiedene andere Antibiotika eingesetzt werden (TRAUB, 1986). So sind neben zwei weiteren Penicillinen (Amino-, und Acylureido-), Vancomycin und Metronidazol gut wirksame Präparate (RUCKDECHEL, 1992).

### **Verfahren zum Nachweis von *Clostridium perfringens***

Zum quantitativen und qualitativen Nachweis von *Clostridium perfringens* in Lebensmitteln wird in der Routine-Analytik ein Plattengussverfahren mit Trypton-Sulfit-Cycloserin-Agar (TSC-Agar, schwarze Kolonien durch Sulfitreduktion) herangezogen (DE JONG *et al.* 2003). Weitere Nährböden, die Anwendung finden, sind das Perfringens-Enrichment-Medium (PEM) (DEBEVERE, 1979), das Reinforced Clostridial Medium (RCM-Agar) in fester und halbfester Form oder neuere Chromocultmedien (HIRSCH & GRINSTEAD, 1954; ANGELOTTI, 1962; BARNES *et al.*, 1963). Eine Weiterentwicklung des RCM-Mediums ist das Differential-Reinforced-Clostridial-Medium (DRCM-Bouillon), welches in flüssiger Form eingesetzt wird und analog des TSC-Agars eine Schwarzfärbung (Sulfitreduktion/Bildung Eisensulfid) anzeigt (FREAME & FITZPATRICK, 1972, GIBBS, 1973). Um positive Befunde durch nicht sporenbildende Sulfitreduzierer zu vermeiden, wird die beimpfte Bouillon zehn Minuten bei 70 bzw. 75 °C pasteurisiert (DIN 38411; § 35 LMBG L59.00-4). Bei allen hier aufgeführten festen, halbfesten und flüssigen Nährmedien werden zur eindeutigen Identifizierung von *Clostridium perfringens* Bestätigungsverfahren durchgeführt (NEUT *et al.*, 1985; BAUMGART & BECKER, 2004). Dazu stehen eine große Anzahl an Methoden zur Verfügung, die auch in LMBG § 35 Methoden und ISO-Methoden beschrieben sind (RHODEHAMEL & HARMON, 1998). Nach SCHALCH *et al.* (1996) eignet sich besonders die Kombination der Beweglichkeitsprüfung (unbeweglich), der Laktosevergärung (positiv), des Reverse-Camp-Tests ( $\beta$ -Hämolyse, Doppelzonenhämolyse) und der Nachweis der sauren Phosphatase (blauviolette Kolonien nach Behandlung mit Phosphatase-Reagenz). Darüber hinaus stehen die biochemischen Reaktionen einer „Bunten Reihe“ (HOLDEMANN *et al.*, 1977; CATO *et al.*, 1986) und kommerziell erhältliche Systeme, wie z.B. das der Firma LD Innovative Diagnostic Systems (Rapid ANAII), oder der Firma BioMerieux (RapIC-ID-32-A) zur Verfügung. In der Wasseranalytik sind nach der Trinkwasser-Verordnung (2001) zur Identifizierung von *Clostridium perfringens* eine Membranfiltrationen mit anschließender anaerober Bebrütung

auf mCP-Nährboden, gefolgt durch den Nachweis der sauren Phosphatase (BISSON & CABELLI, 1979) vorgeschrieben.

Weitere empfindliche Analysenmethoden zum Nachweis von *Clostridium perfringens* sind die Gaschromatographie (GC) und die Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR). Die GC analysiert entstandene Stoffwechselprodukte, wie leichtflüchtige und schwerflüchtige organische Säuren (MOORE *et al.*, 1966; HOLDEMANN, 1977; RIEKE, 1981, HOFFMANN, 1984; GOTTSCHALK, 1986; GIERCKE-SYGUSCH, 1987) sowie Zellwandbestandteile, wie langkettige Fettsäuren (MOOS & LEWIS, 1967; HEITEFUSS *et al.*, 1991). Die FT-IR erstellt von intakten Bakterien einen so genannten „Fingerabdruck“, der unter anderem die Zusammensetzung und Struktur der Proteine, Membranen, Zellwände und der Nukleinsäuren widerspiegelt (GIESBRECHT *et al.*, 1985; NAUMANN, 1985; HELM *et al.*, 1991 b; HELM, 1992; NAUMANN *et al.*, 1994; HERDING-SOTZECK, 1998). Beide Verfahren sind auf eine standardisierte Probenvorbereitung angewiesen und sind darauf ausgelegt, bereits kulturell angezüchtete Kolonien zu identifizieren.

Ursprüngliche Nachweisverfahren bestimmten das Vorhandensein von Enterotoxin durch einen so genannten Kaninchen-Darmschlingentest, der aus heutiger Sicht sehr aufwendig in der Durchführung und darüber hinaus relativ unempfindlich ist (MCDONEL & DUCAN, 1977; YAMAMOTO *et al.*, 1979; KARASARAS, 1980). Eine erste Alternative zum Tierversuch stellte der Nachweis des Enterotoxins durch Vero-Zellkulturen dar. Dazu können eine ganze Anzahl an Zelllinien verwendet werden, wobei Nierenzellen von afrikanischen Meerkatzen oder Leberzellen von Ratten die gebräuchlichsten sind (MCDONEL, 1980; SKJELKVALE *et al.*, 1980; TOLLESHAUG *et al.*, 1982; JARMUND & TELLE, 1982; HORIGUCHI *et al.*, 1985). Eine Erhöhung der Sensitivität und eine bessere Reproduzierbarkeit ergab eine Anzahl an serologischen Tests. Dazu gehören Verfahren wie die Immunodiffusion und Elektrophorese von STARK & DUNCAN (1972) bzw. DUNCAN & SOMMERS (1972), ein Reverse Passive Hämagglutinationstest nach UNEMURA *et al.* (1973), sowie die Counter-immunelektrophorese von NAIK & DUNCAN (1977), die in den siebziger Jahren des vorherigen Jahrhunderts entwickelt wurden. Des Weiteren wurde in den letzten zwanzig Jahren ein Radioimmunoassay STELMA *et al.* (1983), der Reverse Passive Latexagglutinationstest von HARMON & KAUTTER (1986) bzw. auf Objektträgern von MCCLANE & SNYDER (1987), sowie der Erythroimmunoassay von GERMANI *et al.* (1990) entwickelt.

### **Schnellverfahren zum Nachweis von *Clostridium perfringens***

Die beschriebenen kulturellen und instrumentellen Verfahren benötigen zum Nachweis und zur Identifizierung von *Clostridium perfringens* 24 h bis mehrere Tage. Erkrankungen durch die oft tödlichen Darmbranderreger des Typs C nach Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln (SCHALLEHN, 1988; RODLOFF, 1999; KRÄMER, 2002), oder Infektionen durch Gasbranderreger des Typs A, machen eine schnelle Identifizierung von *Clostridium perfringens* sinnvoll und notwendig. Auch bei Lebensmittelvergiftungen in der Gemeinschaftsverpflegung durch Typ A, die oft einen hohen wirtschaftlichen Schaden durch Arbeitsausfälle und Aufwendung von Krankenkosten (KATASRAS, 1980) bewirken und in Einrichtungen mit immungeschwächten Personen (Altenheime, Krankenhäuser) auch tödlich verlaufen können (PARRY, 1963; SCHALLEHN, 1988; KRÄMER, 2002), ist ein schneller Nachweis von *Clostridium perfringens* wünschenswert.

Die Entwicklung von schnellen Nachweisverfahren zur Identifizierung von mikrobiologischen Kontaminanten in Lebensmitteln ist seit den frühen 80er Jahren von großem Interesse (TIGGES, 1998). Als mikrobiologische Schnelltests werden Methoden angesehen, die nach vier bis zwölf Stunden ausgewertet werden können (JARVIS, 1984). Diese Verfahren sollten eine hohe Spezifität aufweisen, hohe Probenvolumina verarbeiten können und automatisierbar sein. Als prädestinierte Verfahren sind immunologische und molekularbiologische Methoden anzusehen, die in der modernen Lebensmittelmikrobiologie immer mehr Anwendung finden. Auch in der Analytik von *Clostridium perfringens* werden bereits auf Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) und auf der Polymerase-Chain-Reaction (PCR) beruhende Systeme angewendet, die als ausgereift bezeichnet werden können. Für diese Verfahren ist derzeit aber analog der oben beschriebenen Methoden eine aufwendige Probenvorbereitung notwendig, die als Zeit bestimmender Schritt anzusehen ist (KEUSGEN *et al.*, 2000). Eine neue Alternative bietet da die so genannte Antibody Immuno Column for Analytical Processes Technologie (Abicap<sup>®</sup>-Technologie), die auf der immunologischen Separation des zu identifizierenden Antigens mittels Antikörper basiert (TIGGES, 1998). Diese Methode wird bereits in der medizinischen Diagnostik zur Identifizierung von Tetanus (*Clostridium tetani*) eingesetzt. Bei dieser Technologie handelt es sich um ein Durchfluss-System in so genannte Abicap<sup>®</sup>-Säulen (siehe Abbildung 2.3 und 2.8), welche mit Antikörper beschichteten porösen Kunststoffkörpern bestückt sind. Dieses Verfahren ermöglicht es, das zu identifizierende Agens bzw. den Mikroorganismus spezifisch anzureichern und durch eine Farbreaktion (ELISA) direkt auf der Säule oder durch Eluieren und anschließender PCR-Detektion zu identifizieren.



### **Salmonella Enteritidis**

Salmonellen (benannt nach dem amerikanischen Bakteriologen Daniel Salomon, 1900) stellen gramnegative, begeißelte, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien dar. *Salmonella enterica subsp. enterica* Serovar Enteritidis (vereinfachte Schreibweise: *Salmonella* Enteritidis) kommt hauptsächlich im Darmtrakt von Nutztieren (Schwein, Rind, Geflügel), aber auch bei freilebenden Tieren wie Wild, Nager, Vögel, Kaltblüter und Insekten vor. Hauptinfektionsquelle für Nutztiere stellen die in der Massentierhaltung verwendeten Kraftfutter aus kontaminiertem Tiermehl dar. Außerhalb des tierischen Organismus kommen *Salmonella* Enteritidis in offenen Gewässern, Jauchegruben, Brunnenschlamm und gedüngten Böden vor. In Abwässern, mit günstigen Wachstumsbedingungen (Temperatur, Nährstoffe wie Eiweiße, ausreichender Sauerstoffgehalt), können sie sich sogar vermehren. Der Mensch ist in der Regel der Endwirt, kann aber auch als Dauerausscheider fungieren. Kontaminiert wird er hauptsächlich durch die orale Aufnahme tierischer Lebensmittel (GROISMAN & OCHMAN, 1997; MEYER, 1999), wie Rind- und Schweinefleisch, Geflügel, rohe Eier, roheihaltige Produkte (POPPE *et al.*, 1998; PELOW *et al.*, 1999; DURANT *et al.*, 1999), sowie Meeresfrüchte, insbesondere Muscheln. Bei der Aufzucht von Geflügel kommt hinzu, dass durch die Gabe Wachstum fördernder Antibiotika eine ganze Anzahl an *Salmonella* Stämmen Resistenzen ausgebildet haben (WAIN, 1999).

Als Infektionsdosis sind Gehalte von  $10^5$  bis  $10^6$  KBE/g Lebensmittel notwendig. Diese werden in der Regel durch Lagerung von gefährdeten bereits kontaminierten Lebensmitteln bei Temperaturen zwischen 7 und 48 °C erreicht. Bei bestimmten Lebensmitteln reichen auch geringere Keimkonzentrationen zur Erkrankung des Menschen aus, da Bestandteile, wie z.B. Kakaobutter in der Schokolade oder Fett des Eigelbs ein Schutzkolloid bilden, so dass die Bakterien nicht im Verdauungstrakt abgetötet werden (KRÄMER, 2002).

Die Inkubationszeit beträgt im Durchschnitt 20 bis 24 Stunden und äußert sich durch Erbrechen und wässrige Durchfälle. Die Symptome halten etwa ein bis zwei Tage an, können aber, insbesondere bei immungeschwächten Personen und auch bei Kindern, zu schweren Komplikationen mit Sepsis und Meningitis bis hin zum Tode führen (SCHMID, 2000). Als wichtigster Pathogenitätsfaktor der Enteritidis erregenden Salmonellen ist vor allem die Bildung eines Enterotoxins anzusehen. Darüber hinaus sind aber auch die Geißeln, die Fimbrien, die Bildung eines Zytotoxins und Hitzeschockproteins, sowie Lipopolysaccharide und Siderophore als Virulenzfaktoren anzusehen (SELBITZ, 1991; CLARKE und GYLES, 1993). Seit 1992 (195 000 gemeldete Fälle) ist das Auftreten von Salmonellose-Erkrankungen rückläufig. So wurden in Deutschland 1998 erstmals seit der Wiedervereinigung Zahlen von unter 100 000 Erkrankungen gemeldet. Schätzungen gehen davon aus, dass etwa 10 bis 20 % der tatsächlich auftretenden Salmonellosen gemeldet werden (SCHÖNEBERG *et al.*, 1998).

### **Verfahren zum Nachweis von *Salmonella* Enteritidis**

Der Nachweis des Erregers wird in der Regel mit kulturellen Methoden aus dem Lebensmittel oder dem Stuhl betroffener Patienten geführt (BURGHARDT, 1992). Dazu dienen feste und flüssige Selektivnährmedien, welche das Wachstum von Salmonellen fördern und gleichzeitig die Begleitflora hemmen (PIETZSCH, 1981; BISPING & AMTSBERG, 1988). Zur Identifizierung werden verdächtige, Laktose negative Kolonien serologischen und biochemischen Verfahren unterworfen. Die Bestimmung der Unfähigkeit, Laktose zu spalten, kann durch Nährböden wie Brilliantgrün-Phenolrot-Laktose-Saccharose-Agar nach CHRISTENSEN-KAUFMANN, einem Wasserblau-Metachromgelb-Laktose-Agar nach GASSNER, dem Lackmus-LaKtose-Agar nach DRIGALSKI & CONRADI, sowie dem Eosin-Methylenblau-Laktose-Agar nach LEVINE (PIETZSCH, 1981; BISPING & AMSTBERG, 1988; SELBLITZ, 1992) erfolgen. Weitere zur Anwendung kommende Selektivnährmedien sind der Rambach-Agar (RAMBACH, 1990) und der Novobiocin-Brilliantgrün-Glycerol-Laktose-Agar von POISSON (1992). Darüber hinaus wird eine ganze Anzahl an serologischen, immunologischen und molekularbiologischen Verfahren, wie die Impedanz-Messung, die Immunodiffusion, die Fluoreszenz-Messung, ELISA-Verfahren und DNA-Hybridisierungen in der Literatur beschrieben (BEUMER *et al.*, 1991). In den § 35 Methoden des LMBG sind zwei Methoden zum Nachweis von Salmonellen beschrieben. Das kulturelle Verfahren bedient sich zunächst einer Voranreicherung in Peptonwasser, um subletal geschädigte Salmonellen zu reaktivieren. Anschließend erfolgt eine Selektivanreicherung in Rappaport-Vassiliadis bzw. Selenit-Medium, ein Ausstreichen auf Selektivnährböden und eine nachfolgende Differenzierung Laktosenegativer Kolonien mit biochemischen (z.B. so genannte Bunte Reihe) und serologischen (Agglutination mit polyvalenten Antiseren) Methoden (§ 35 LMBG, L 00.00-20). Das zweite Verfahren stellt eine molekularbiologische Methode dar, wobei spezifische Oligonucleotide dazu genutzt werden, Salmonellen mittels PCR nachzuweisen (DIN-Methode 19135:1999-11).

Der Gesetzgeber fordert bei einer Reihe von Lebensmitteln eine Nulltoleranz für Salmonellen. Keine der bisher angebotenen Systeme kann diese Nachweisgrenze ohne eine Voranreicherung (16 bis 20 h) gewährleisten (BUCHANAN & DEROEVER, 1993). Infektionen durch Salmonellen sind die am häufigsten vorkommenden Lebensmittelvergiftungen. Die Entwicklung von Schnellverfahren ist auch hier als sinnvoll und notwendig anzusehen. Die oben beschriebene Abicap<sup>®</sup>-Technologie kann die Möglichkeit aufzeigen, die bisher notwendige Voranreicherung durch eine spezifische immunologische Anreicherung komplett zu ersetzen oder zumindest abzukürzen.

### ***Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* (Gattungsname nach dem Bakteriologen Sir John Lister und griechisch für Monozyten hervorbringen) ist ein grampositives, aerobes bis fakultativ anaerobes, kokkoides, peritrich begeißeltes Kurzstäbchen (SEELIGER & JONES, 1986; BERGEY, 1986; WOESE, 1987). *Listeria monocytogenes* gehört zu der so genannten „Kühlschrankflora“, ist also psychotroph und zeigt bereits ab 0 °C Wachstum auf (SCHMID, 2000; KRÄMER, 2002). Bei einer Wachstumstemperatur von 37 °C bleibt die Flagellinsynthese aus, so dass *Listeria monocytogenes* bei diesen Temperaturen nicht mehr beweglich ist (SCHMID, 2000).

Listerien kommen natürlicher Weise im Erdboden, im Wasser und auf Pflanzen vor (PEARSON, 1970; COYLE *et al.*, 1984). Auch Mensch und Tier können als symptomlose Träger fungieren (ORTEL, 1971). So wurden insgesamt bei über dreißig Warmblütlern, in Arthropoden und Fischen Listerien nachgewiesen (SCHMID, 2000).

Eine Infektion des Menschen durch *Listeria monocytogenes* erfolgt in der Regel durch die Aufnahme kontaminierter Lebensmittel. Anzutreffen sind sie vor allem in Fleisch und Wurstwaren, insbesondere Rohwurst wie Salami, in Geflügel, in Milch und Milchprodukten, insbesondere Rohmilch- und Weichkäse wie Romadur, Camembert und Blauschimmelkäse (DOMINGUEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 1985; FLEMING *et al.*, 1985; CONNER *et al.*, 1986; LOVETT *et al.*, 1987; SILLIKER *et al.*, 1987; FARBER & PETERKIN, 1991).

Das Krankheitsbild der Listeriose zeigt sich durch Kopfschmerzen, Übelkeit, Unterleibsschmerzen und Durchfall, begleitet durch akute Fieberanfälle. Darüber hinaus sind auch Erkrankungen des zentralen Nervensystems (Meningitis, Abszesse im Gehirn, Leber und Milz) zu beobachten (HO *et al.*, 1986; GILLARD *et al.*, 1987). Gefährdet sind Immun geschwächte ältere Personen, aber auch Alkoholiker und Diabetiker. Eine besondere Gefahr gilt auch für schwangere Frauen. So kann der Erreger durch eine intrauterine Infektion zu einer Fehlgeburt oder neonatalen Erkrankung des Neugeborenen führen (SEELIGER, 1961; FARBER & PETERKIN, 1991; KRÄMER, 2002). Die Letalität bei der Infektion durch *Listeria monocytogenes* ist relativ hoch. So starben beispielsweise 1992 bei einem Ausbruch in Frankreich nach Verzehr einer kontaminierten Zungenwurst von 279 Betroffenen (darunter 92 Schwangere) insgesamt 63 Personen, zuzüglich 22 tödlich verlaufene Embryopathien (ROCOURT *et al.*, 1995).

### **Verfahren zum Nachweis von *Listeria monocytogenes***

Beim Verdacht einer Infektion durch *Listeria monocytogenes* kann der Erregernachweis im Blut, Liquor, Lochialsekret, Stuhl oder im Sektionsmaterial erbracht werden (NAUMANN & KRECH, 1992). In Lebensmitteln erfolgt der herkömmliche Weg der Identifizierung über Selektivmedien. So zeigen *Listeria monocytogenes* Kolonien auf Tryptose-Agar unter Schräg-

lichtbestrahlung eine bläulich irisierende Färbung, auf Acroflavin-Nalidixinsäure-Agar gelblich grüne Verfärbungen mit einem blauen Rand und auf Blutagar eine grauweiße Färbung mit einer schmalen Betahämolyse (NAUMANN & KRECH, 1992). Darüber hinaus gibt es noch Selektivnährböden, die in § 35 LMBG Methoden und ISO-Vorschriften beschrieben sind. Dabei handelt es sich um Oxford-Agar (§ 35 LMBG, L 00.00-22; ISO/DIS 10560, 1992) und PALCAM-Agar (§ 35 LMBG, L 00.00-22). Verdächtige Kolonien werden zur weiteren Charakterisierung und Identifizierung biochemischen und serologischen Untersuchungen unterzogen (HAMMER *et al.*, 1988). Dabei werden Merkmale, wie der „Hängende Tropfen“ (typische Taumelbewegung), Kohlenhydrat- und Äskulinspaltung (Api-System) und der CAMP-Test herangezogen, bei dem sich eine verstärkte  $\beta$ -Hämolyse in der Nähe eines Staphylokokken-Impfstrichs auf Blutagar ausbildet (POTEL, 1982; NAUMANN & KRECH, 1992; BAUMGART & BECKER, 2004). Neben den kulturellen Methoden haben sich eine ganze Reihe von immunologischen (ELISA) und molekularbiologischen (Gensonden, PCR) Tests zur Identifizierung von *Listeria monocytogenes* etabliert (MAZURIER *et al.*, 1992; LAWRENZE *et al.*, 1993; WERNARS *et al.*, 1996; JERSEK *et al.*, 1996; BAUMGART, 1999). Auch bei *Listeria monocytogenes* wird in bestimmten Lebensmittelgruppen eine Nulltoleranz gefordert (BUCHANAN & DEROEVER, 1993). Aufgrund der hohen Letalität dieses Erregers ist bei auftretenden Erkrankungen, aber auch für die prophylaktische Untersuchung von industriell hergestellten Lebensmitteln im Rahmen der Qualitäts- bzw. Freigabekontrollen eine schnelle Identifizierung von *Listeria monocytogenes* notwendig. Die oben beschriebene Abicap<sup>®</sup>-Technologie kann auch hier eine alternative Schnellmethode darstellen.

### Legionellen

Die Gattung *Legionella* ist der einzige Genus in der Familie der *Legionellaceae*. Er besteht derzeit aus 42 Arten und 64 Serotypen (BENSON & FIELDS, 1998). Die Entdeckung dieser Gattung erfolgte im Jahre 1976. Bei einem Treffen von Legionärveteranen in Philadelphia hatte sich der Erreger über die Klimaanlage des Hotels verbreitet, wodurch von 4400 Teilnehmern 182 Personen erkrankten, von denen insgesamt 29 verstarben. Nach der Identifizierung des verantwortlichen Bakteriums wurde diesem, im Zusammenhang mit dessen Auftreten, der Name *Legionella pneumophila* gegeben (FRASER *et al.*, 1977; MCDADE *et al.*, 1977). Eine leichtere Form, die in der Regel nicht zum Tode führt, wurde bereits acht Jahre früher bei einem Ausbruch in Pontiac (USA) beobachtet. Diese Infektion zeigte bei den Patienten hohe Fiebertaten auf, wodurch die Namensgebung „Pontiac-Fieber“ entstand (MCDADE *et al.*, 1977; GLICK *et al.*, 1978).

Legionellen sind gramnegative, strikt aerobe Stäbchenbakterien. Sie stellen fakultativ intrazelluläre Bakterien dar, die sich in Mikroorganismen, Amöben oder auch menschlichen

Makrophagen vermehren können (ROWBOTHAM, 1980; BARKER *et al.*, 1992; YAMAMOTO *et al.*, 1992; FIELDS, 1993; KWAIK, 1998). Legionellen sind ausschließlich im Süßwasser aufzufinden. Besonders günstige Wachstumsbedingungen finden sie in Bereichen mit Wasser benetzten Oberflächen, wie z.B. in Leitungssystemen (ROBERT KOCH INSTITUT, 2001). Die Ansteckung erfolgt über Inhalation eines kontaminierten Aerosols, welche vor allem bei Duschen und Klimaanlage erzeugt werden (PAGANO *et al.*, 1999). Untersuchungen haben gezeigt, dass die Keimkonzentration nicht alleine für den Ausbruch einer Erkrankung verantwortlich ist. Da die Aktivierung der Legionella-Virulenzgene intrazellulär erfolgt, werden infizierte Amöben mit der Übertragung der Krankheit in Verbindung gebracht (BRIEN & BHOPAL, 1993). Die Aufnahme von kontaminiertem Trinkwasser in den Verdauungstrakt führt nicht zur Ansteckung. Auch konnte bisher keine Mensch zu Mensch Übertragung festgestellt werden (PANGANO *et al.*, 1999).

Insbesondere Immun-geschwächte Personen erkranken häufiger und schwerer (PEDROBOTET *et al.*, 1998), weshalb Legionellose überwiegend in Altenheimen und Krankenhäusern auftreten (KRAMER *et al.*, 1992; NECHWATAL *et al.*, 1993; JOSEPH *et al.*, 1994; BANGSBORG *et al.*, 1995). Darüber hinaus wurden auch Infektionen in Hotels (MÜHLENBERG, 1993; BELL *et al.*, 1996; JOSEPH *et al.*, 1996) und Schwimm- oder Thermalbädern beobachtet (GAIA *et al.*, 1994; COWELL und SELVEY, 1995; ROCHA *et al.*, 1995) .

Man unterscheidet zwei unterschiedliche Erkrankungen, die durch Legionellen hervorgerufen werden können. Zum einen handelt es sich um die schwerer verlaufende Legionärskrankheit, die eine akute Lungenentzündung sowie cerebrale, renale, intestinale und muskuläre Symptome aufzeigen kann (EDELSTEIN, 1993; SIRE *et al.*, 1994; PAI *et al.*, 1996; STOUT und YU VL, 1997; FAMIGLIETTI *et al.*, 1997; KAPPLER *et al.*, 1997; TEWARI *et al.*, 1997). Als zweite leichtere Form ist das Pontiac-Fieber zu nennen, welches eine nicht pulmonale Legionellose darstellt (GOLDBERG *et al.*, 1989; FENSTERSHEIB *et al.*, 1990; FALLON *et al.*, 1993; LÜTTICHAU *et al.*, 1998). Zweitgenannte Infektion ist durch das Auftreten von hohem Fieber, Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Schwindel bis hin zu einer Diarrhöe charakterisiert. Die Erkrankung kann auch ohne Behandlung nach ein bis drei Tagen abklingen und führt in der Regel nicht zum Tode (PAGANO *et al.*, 1999).

Eine 1997 angefertigte Statistik über die Morbidität und Mortalität der Legionärskrankheit in 24 europäischen Ländern hatte eine Inzidenz von 3,9 Fällen pro Millionen Einwohner bei einer Sterblichkeitsrate von ca. 10 % ergeben (OMS & EWGLI, 1998).

### **Verfahren zum Nachweis von Legionellen**

Die Probenahme, Beurteilung, sowie die Referenzmethode zur Bestimmung von Legionellen in Wasseranlagen ist in der Empfehlung der Trink- und Badewasserkommission von 11/2001 und in der DVGW W 551/552 geregelt (BGBI 11/2000). Bei dieser Referenzmethode handelt es sich um ein kulturelles Verfahren, welches etwa 10 bis 14 Tage für eine abschließende Bewertung benötigt (siehe Anlage A). Dabei werden unter anderem Probenvolumina von 100 ml eingesetzt, die mittels Membranfiltration und anschließender kultureller Anzucht identifiziert und differenziert werden. Weitere Verfahren, die hauptsächlich zum Nachweis einer Infektion des Menschen genutzt werden, sind die direkte Immunofluoreszenz, die Antigene aus Proben des Respirationstraktes entdecken kann; der Enzym Immuno Assay (EIA), um Antigene im Urin nachzuweisen und eine Reihe an serologischen Testverfahren. Darüber hinaus finden noch molekularbiologische Methoden wie die PCR Anwendung (PEGANO *et al.*, 1999).

In den Sommermonaten kommt es gehäuft zu Kontaminationen der Wasserleitungssysteme und Klimaanlage von Gemeinschaftseinrichtungen, wie Schwimmbädern, Krankenhäusern, Altenheimen, Hotelanlagen und Bürogebäuden. Vor allem in südlichen Ländern, wie Spanien (Ausbrüche durch Klimaanlage im Jahre 2002), aber auch in der Bundesrepublik (Krankenhaus in Ostdeutschland, Schwimmbad in Bonn 2003), traten in den vergangenen Jahren erhöhte Verkeimungen auf. Bei der Infektion durch Legionellen sind in der Regel große Personengruppen betroffen. Beim Auftreten von Erkrankungen ist es deshalb notwendig, möglichst schnell die Kontaminationsquelle ausfindig zu machen und zu beseitigen. Die von der Trink- und Badewasserkommission empfohlene Referenzmethode kann mit einer Analysenzeit von bis zu 14 Tagen diese Anforderung nicht erfüllen. Andere herkömmliche Methoden sind derzeit noch nicht in der Lage, die geringe Nachweisgrenze von 1 KbE/ml (gefordert im BGBI 11/2000) und den Einsatz von bis zu 100 ml Probe zu verbinden. Die oben beschriebene Abicap<sup>®</sup>-Technologie beruht auf einem Durchfluss-System und ist somit prinzipiell in der Lage, große Probenvolumina zu verarbeiten. Darüber hinaus besteht grundsätzlich die Möglichkeit, empfindliche Detektionsmethoden wie ELISA-Verfahren und die PCR mit diesem System zu kombinieren, so dass auf dieser Basis die Entwicklung eines Schnelltests zur Identifizierung von Legionellen als erfolgsversprechend angesehen werden kann.

### ***Lactobacillus brevis***

*Lactobacillus brevis* ist ein heterofermentatives, grampositives, unbewegliches Stäbchen, das einzeln oder als Kette auftreten kann und zur Familie der Milchsäurebakterien gehört. Bei der Energiegewinnung kann es aus Acetyl-Phosphat auch Essigsäure bilden, weshalb

es in der Trivalliteratur auch als „Essigsäurebakterium“ bezeichnet wird (SCHLEGEL & ZABOROSCH, 1992; KRÄMER, 2002).

*Lactobacillus brevis* wird bei der Herstellung von Lebensmitteln eingesetzt (SCHLEGEL & ZABOROSCH, 1992). So findet es bei der Erzeugung von Sauerkraut, Brot, Sauerteig und Rohwurst, insbesondere Salami, Anwendung (BELITZ & GROSCH, 1992; KUNZ, 1994; VOGEL *et al.*, 1994; HAMMES & VOGEL, 1997; MÜLLER, 1997).

Neben den nützlichen Eigenschaften tritt diese Spezies auch als Verderbniserreger bzw. als Erzeuger von Fehlgerüchen in Erscheinung. Insbesondere in der Getränkeindustrie, allen voran beim Bier und Wein, können erhebliche sensorische Abweichungen durch Kontamination von *Lactobacillus brevis* festgestellt werden. So ist es in der Lage, Bier anzusäuern, zu trüben oder Acetoin, welches durch Luftsauerstoff in Diacetyl überführt wird, zu erzeugen und so das Aroma signifikant zu verändern (DONHAUSER, 1993). Beim Wein kann *Lactobacillus brevis* zum so genannten Mäuselton (Geruch und Geschmack wie „Mäuseurin“) und durch die Erzeugung von bis zu 5 g/l hohen Essigsäureanteilen (ca. eine Zehnerpotenz über normal) zum so genannten Essigesterton führen, der das Erzeugnis ungenießbar macht (SCHEER, 1994; GAFFNER, 2003).

### **Verfahren zum Nachweis von *Lactobacillus brevis***

Als gängiges Nährmedium wird der MRS-Agar bzw. die MRS-Bouillon verwendet, die unter anderem Hefeextrakt als Wachstoffsstoff aufweist (MAN *et al.*, 1960; DIN 10109; § 35 LMBG, L 06.00-35). Bei der Bestimmung von Verderbniserregern in Fruchtsäften wird auch der Orangenserum-Agar herangezogen. Dieser enthält Orangenserum (Anpassung an das natürliche Milieu des zu untersuchenden Bakteriums) und ebenfalls Hefeextrakt (HAYS, 1951; HAYS & RIESTER, 1952; MURDOCK *et al.*, 1952; MURDOCK & BROKAW, 1958). Neben den kulturellen Verfahren finden zur Identifizierung von *Lactobacillus brevis* auch eine Reihe von molekularbiologischen Verfahren (PCR) Anwendung (SCHÖNLING, persönliche Mitteilung 2003). Bei der Getränkeanalytik werden in der Regel große Probenvolumina zur Feststellung mikrobiologischer Belastungen eingesetzt. Die derzeit verwendete Membranfiltrationstechnik stößt vor allem bei schäumenden und mit Fruchtfleisch versehenen Proben oft an ihre Grenzen. Demnach ist es für die Analytik von flüssigen Lebensmitteln wünschenswert, neue Verfahren zur Isolierung von Mikroorganismen zu entwickeln.

### **Festphasensysteme zum Nachweis lebensmittelrelevanter Mikroorganismen**

In der lebensmittelmikrobiologischen Diagnostik werden immer schnellere und leistungsfähigere Analysensysteme entwickelt. Dabei spielt auch eine immer größer werdende Anzahl an Festphasensystemen eine Rolle. Zum einen werden indirekte aus der lebensmittelchemischen Analytik übernommene Methoden (HPLC, GC, DC) herangezogen, die auf Grundlage der Interaktionen zwischen Festphasen und den zu untersuchenden Analyten beruhen, welche die Mikroorganismen aufgrund ihrer erzeugten Stoffwechselprodukte oder Toxine identifizieren. Zum anderen finden auch direkte Verfahren (z.B. immunologische Verfahren wie ELISA) Anwendung, bei denen Mikroorganismen auf Festphasen (DotBlot-ELISA, Bindung von Bakterien/Viren auf Nitrocellulosefolie) oder immunologisch an mit Antikörper beschichteten Oberflächen (Titerplatten aus Kunststoff, Glasträger) gebunden werden (BECKER & MÄRTLBAUER, 2003). Hierzu kann auch das von der Firma Abion in Jülich in Zusammenarbeit mit der Landwirtschaftlichen und Lebensmittel-Mikrobiologie der Universität Bonn entwickelte und von der Firma Biognosis in Jülich unter anderem für *Clostridium tetani* etablierte Abicap<sup>®</sup>-Verfahren gezählt werden. Hierbei handelt es sich um einen Durchfluss-ELISA, bei dem poröse Polymer-Sinterkörper absorptiv mit spezifischen Antikörpern beschichtet sind (TIGGES, 1998; BIOGNOSIS, 2000) und der Nachweis mittels Sandwich-ELISA erfolgt (siehe auch Seite 5 und Kapitel 2.6 ff. und 3.7 ff.). Eine Kombination immunologischer und chromatographischer Verfahren stellt das Singelpath<sup>®</sup>, auch als Lateral Flow Test bezeichnet, dar. Das Testprinzip beruht auf der GLISA-Methodik (Gold-Labeld Immunosorbent Assay). Dabei wird die Probe in einer Reaktionszone mit Gold markierten Antikörpern auf ein Chromatographiepapier aufgetragen, wodurch ein Antikörper-Antigen-Komplex entsteht. Durch Kapillarkräfte fließt das Reaktionsgemisch in Richtung einer zweiten Reaktionszone in der ein zweiter spezifischer Antikörper gebunden ist. Ein positiver Befund wird durch eine Rotfärbung (erzeugt durch die Goldmarkierung) angezeigt (LANGMANN *et al.* 1999; THOMPSON *et al.* 2001). Neuste auf Festphasen beruhende Verfahren stellen die Biochips dar. Hier können eine Vielzahl von Nachweisen zur selben Zeit in einem Analysengang durchgeführt werden. Kernstück solcher Verfahren sind kleine Kunststoff- oder Glasträger. Hierbei unterscheidet man einmal Systeme, die durch eine direkte Kopplungsreaktion der zu untersuchenden Analyte auf elektronisch oder optisch sensitiven Schichten eine Signalreduktion hervorrufen und so ein Merkmal sofort anzeigen und zum anderen Verfahren, welche die zu identifizierenden Mikroorganismen spezifisch an Sensoren binden, die dann z.B. über eine Fluoreszenzmarkierung detektiert werden können (MRESCHAR, 2000; SCHULZE & MAIER, 2000; KRESPACH-SCHINDLER, 2003; BERNER, 2003).

In der lebensmittelmikrobiologischen Analytik treten in der Regel komplexere Probenmatrices als in der medizinischen Diagnostik auf. Darüber hinaus werden bei der Untersuchung von



Lebensmitteln oftmals Nulltoleranzen der nachzuweisenden Mikroorganismen gefordert (BUCHANAN & DEROEVER, 1993). Gentechnische und immunologische Verfahren sind weites gehend ausgereift und in der Lage, die analytischen Anforderungen der Lebensmittelmikrobiologie zu erfüllen. Für nahezu alle oben aufgeführten Methoden sind derzeit noch aufwendige Probenvorbereitungen notwendig, welche in der Regel den Zeit bestimmenden Schritt eines solchen Verfahrens ausmachen. Zukünftige Entwicklungen müssen das Ziel haben, die Probenaufbereitung zu optimieren. Ein möglicher Ansatz ist die Isolierung bzw. Anreicherung von Mikroorganismen in Form von Durchfluss-Affinitätstechniken, wie sie z.B. bei der Abicap<sup>®</sup>-Technologie angewendet wird.

### Ziele der Arbeit

Bei epidemiologischen Untersuchungen mit dem Verdacht auf Lebensmittelvergiftungen, die durch *Clostridium perfringens* hervorgerufen wurden, ist die Identifizierung Enterotoxin bildender Stämme von zentraler Bedeutung. Unterschiedliche Untersuchungen haben gezeigt, dass Stämme des Typs A, die das Enterotoxin erzeugen können, andere Stoffwechsel und u.a. auch andere Hitzeresistenzen von Sporen aufweisen, als nicht Enterotoxin bildende Stämme (WERDELING, 1989, SARKER *et al.*, 2000). Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, ob weitere vor allem phänotypische Eigenschaften von *Clostridium perfringens* zur Unterscheidung von Enterotoxinbildnern gegenüber nicht Enterotoxin bildenden Stämmen herangezogen werden können. Dazu werden gruppenspezifische Untersuchungen durchgeführt. Dabei soll die FT-IR genutzt werden, Unterschiede in der Zusammensetzung und Struktur der Proteine, Membranen, Zellwände und Nukleinsäuren der einzelnen Stämme festzustellen. Die Bestimmung von Antibiotika Empfindlichkeiten durch Einsatz von Inhibitoren der Zellwandsynthese, der Proteinsynthese und der Nukleinsäuresynthese soll feststellen, ob sich die unterschiedlichen Stoffwechseleigenschaften der Enterotoxin bildenden Stämme auf die Abwehrmechanismen gegen Hemmstoffe auswirken. Da die Bildung des Enterotoxins unmittelbar mit der Sporulation zusammenhängt und insbesondere Lebensmittelvergifter sehr hitzeresistente Sporen bilden, sollen darüber hinaus durch den Einsatz einer DRCM-Bouillon mit Pasteurisation die Sporulationseigenschaften der verschiedenen Stämme näher charakterisiert werden. Analoge Untersuchungen sollen klären, ob *Clostridium perfringens* Stämme aus Lebensmitteln andere Eigenschaften als Patientenisolat aufweisen und der Einfluss von Umweltbedingungen dazu geführt hat, dass sich die Eigenschaften von *Clostridium perfringens* in den letzten 25 Jahren grundsätzlich geändert haben.

In der lebensmittelmikrobiologischen Analyse sind aufgrund von Gesundheitsgefährdungen aber auch zur Abwendung von wirtschaftlichen Schäden, die Analysenzeit und der Einsatz leistungsfähiger Nachweisverfahren von entscheidender Wichtigkeit. Gentechnische und immunologische Verfahren sind weitgehend ausgereift und sind in der Lage, die analytischen Anforderungen der Lebensmittelmikrobiologie zu erfüllen. Diese benötigen jedoch derzeit noch aufwendige Probenvorbereitungen, welche in der Regel den Zeit bestimmenden Schritt eines solchen Verfahrens ausmachen. Darauf begründet lag der Hauptschwerpunkt dieser Arbeit in der Entwicklung eines immunologischen Isolations- bzw. Anreicherungsverfahrens auf Durchflussbasis. Diese Methode soll es ermöglichen, große Probenvolumina zu untersuchen (höhere Kapazität, als derzeit erhältliche ELISA-Verfahren), eine Zeitersparnis gegenüber üblichen kulturellen Verfahren zu erbringen und gleichzeitig über eine hohe Spezifität ggf. auch in Verbindung mit gentechnischen Methoden zu verfügen. Als Basis des

Analysensystems ist ein mit Antikörper kovalent beschichteter Kunststoffinter- oder Faserkörper in Abicap®-Säulen vorgesehen. Zur Herstellung der Antikörperbindung sollte ein vom Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Bonn neu entwickeltes Verfahren angewendet werden, welches eine kovalente Bindung der Antikörper auf Kunststoffen zulässt. Diese Form der Bindung soll eine Ausrichtung der Antikörper bewirken, was eine Kapazitätserhöhung und Kostenersparnis zur Folge hätte. Nach einer Etablierung der Methode für *Clostridium perfringens* war eine Übertragung des Verfahrens auf andere Bereiche, vor allem Trinkwasser, Getränke und Milch, und andere humanpathogene (Salmonellen, *Listeria monocytogenes*, Legionellen) und Verderbnis erregende (*Lactobacillus brevis*) Bakterien vorgesehen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Eingesetzte Bakterienstämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vergleichende Gruppenuntersuchungen von *Clostridium perfringens* durchgeführt. Darüber hinaus sollte für diese Spezies ein immunologisches Analyseverfahren auf Säulenbasis entwickelt werden. Die untersuchten Stämme (Tabelle 2.1) bestanden dabei zum einen aus Lebensmittelisolaten, welche unserem Labor vom Zentralen Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr in Kiel-Kronshagen (ZISanBw) und der INLAB GmbH -Institut für Lebensmittelmikrobiologie, Analytik, Betriebs- und Umwelthygiene- (IN-LAB) aus Dortmund zur Verfügung gestellt wurden. Zum anderen wurden auch Patienteniso-late herangezogen, welche uns das Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Universität Bonn (IMMI-Bn) und das Institut für Medizinische Mikrobiologie und Infekti-onsepidemiologie der Universität Leipzig (IMMI-L) zur Verfügung gestellt haben. Des Weiteren fanden Clostridien-Stämme der „Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultu-ren GmbH“ aus Braunschweig (DSMZ) als Vergleichsstandards Anwendung.

**Tabelle 2.1:** Stammbezeichnung/Herkunft der verwendeten Clostridien

Spezies	Stamm	Herkunft	Isoliert aus	am
<i>Clostridium perfringens</i> <sup>1,2</sup>	A 30	ZISanBw	Reisfleisch	04/98
	A112	ZISanBw	Kochmettwurst, Konserve	02/79
	A124	ZISanBw	Spargelcremesuppe	09/87
	A155	ZISanBw	Rinderbraten	09/87
	A 221	ZISanBw	Paprikapulver	10/96
<i>Clostridium perfringens</i> <sup>2</sup>	A 48	ZISanBw	Schweinefleisch	12/84
	A 113	ZISanBw	Wilstermarschkäse	08/87
	A 115	ZISanBw	Schmelzkäse	03/79
	A 118	ZISanBw	Sülze, Konserve	05/79
	A 120	ZISanBw	Schnittkäse	07/87
	A 121	ZISanBw	Schokoladenpudding	09/87
	A 141	ZISanBw	Sardellenpastete	09/84
	A 142	ZISanBw	Schnittkäse, Gouda	11/80
	A 147	ZISanBw	Sardellenpastete	09/84
	A 149	ZISanBw	Hackbraten	01/81

	A 152	ZISanBw	Spargelcremesuppe	09/87
	A 156	ZISanBw	Mortadella	05/81
	A 162	ZISanBw	Jagdwurst	08/81
	A 164	ZISanBw	Schnittkäse, Gouda	08/81
	A 177	ZISanBw	Bienenhonig	04/82
	A 178	ZISanBw	Bienenhonig	04/82
	A 184	ZISanBw	Hühnerfrikassee	11/82
	A 193	ZISanBw	Schnittkäse, Tilsiter	02/84
	I 2636	INLAB	Fruchtgrütze	02/03
	I 2905	INLAB	Endiviensalat	02/03
<i>Clostridium perfringens</i> <sup>3</sup>	B 6858 II	IMMI-Bn	Varia	08/03
	436	IMMI-L	Wundabstrich/Kinderklinik	09/00
	449	IMMI-L	Wundabstrich/Chirurgie	09/00
	534	IMMI-L	Wundabstrich/Gynäkologie	12/00
	541	IMMI-L	Wundabstrich/Chirurgie	12/00
	552	IMMI-L	Abstrich/Hautklinik	12/00
	623	IMMI-L	Abstrich/Hautklinik	02/01
	707	IMMI-L	Wundabstrich/Chirurgie	05/01
	710	IMMI-L	Abstrich Abdomen/Chirurgie	05/01
	721	IMMI-L	Wundabstrich/Chirurgie	05/01
	753	IMMI-L	Wundabstrich/Chirurgie	06/01
	760	IMMI-L	Abstrich Abdomen/Chirurgie	08/01
	779	IMMI-L	Intrabdominaler Abszeß/Chirurgie	10/01
	785	IMMI-L	Varia	10/01
	790	IMMI-L	Galle/Innere Medizin	01/02
	798	IMMI-L	Abstrich Abszesshöhle/Pathologie	01/02
	811	IMMI-L	Wundabstrich/Chirurgie	02/02
	840	IMMI-L	Wundabstrich Abdomen/Chirurgie	03/02
	842	IMMI-L	Abstrich/Chirurgie	03/02
	858	IMMI-L	Abstrich intrabdominal/Chirurgie	04/02
873	IMMI-L	Wundabstrich Unterschenkelamputation/Chirurgie	06/02	
1094	IMMI-L	Varia	07/03	
1099	IMMI-L	Varia	07/03	
1107	IMMI-L	Varia	08/03	

	B343	IMMI-L	Stuhl	09/80
	B344	IMMI-L	Stuhl	09/80
	B349	IMMI-L	Varia	09/80
	B360	IMMI-L	Stuhl	09/80
	B362	IMMI-L	Varia	11/79
	B364	IMMI-L	Varia	09/80
	B366	IMMI-L	Varia	12/80
	B369	IMMI-L	Varia	09/80
<i>Clostridium perfringens</i>	DSMZ 11784 <sup>1</sup>	DSMZ	Isoliert von A.H.W Hauschild	
	DSMZ 756 <sup>T</sup>	DSMZ	Typ-Stamm	
	Venusberg	IMMI-Bn	Stammsammlung, Lebensmittelmikrobiologie Universität Bonn	
<i>Clostridium butyricum</i>	DSMZ 10702 <sup>T</sup>	DSMZ	Typ-Stamm	
<i>Clostridium sporogenes</i>	Venusberg	IMMI-Bn	Stammsammlung, Lebensmittelmikrobiologie Universität Bonn	

1 = Enterotoxinbildner

2 = Lebensmittelisolate

3 = Patientenisolate

Das für *Clostridium perfringens* auf Säulenbasis zu entwickelnde immunologische Analysensystem sollte auch zum Nachweis von Legionellen genutzt werden. Die zur Entwicklung und Evaluierung verwendeten *Legionella*-Stämme sind in der Tabelle 2.2 aufgeführt. Diese Stämme wurden uns vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg (IMMH) zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 2.2:** Stammbezeichnung/Herkunft der verwendeten Legionellen

Spezies	Stammbezeichnung	Herkunft
<i>Legionella pneumophila</i>	Serogruppe 1	IMMH
	Serogruppe 1 Bellingham	IMMH
	Serogruppe 1 Philadelphia	IMMH
	Serogruppe 2	IMMH
	Serogruppe 3	IMMH
	Serogruppe 4	IMMH
	Serogruppe 5	IMMH

	Serogruppe 6	IMMH
	Serogruppe 7	IMMH
	Serogruppe 8	IMMH
	Serogruppe 9	IMMH
	Serogruppe 10	IMMH
	Serogruppe 11	IMMH
	Serogruppe 12	IMMH
	Serogruppe 13	IMMH
	Serogruppe 14	IMMH
<i>Legionella bozemanii</i>	Serogruppe 1	IMMH
<i>Legionella bozemanii</i>	Serogruppe 2	IMMH
<i>Legionella dumoffi</i>		IMMH
<i>Legionella gormanii</i>		IMMH
<i>Legionella jordanis</i>		IMMH
<i>Legionella longbeachae</i>	Serogruppe 1	IMMH
<i>Legionella longbeachae</i>	Serogruppe 2	IMMH
<i>Legionella micdadei</i>		IMMH

Bei der Entwicklung des immunologischen Verfahrens zum Nachweis von *Clostridium perfringens* wurden verschiedene Kunststoffmaterialien auf ihre Eignung als Trägermaterial für spezifische Antikörper getestet. Diesbezüglich erfolgte eine Untersuchung, die überprüft, in welchem Ausmaß verschiedene Trägermaterialien durch ihre Oberflächenbeschaffenheit humanpathogene Bakterien zurückhalten können. Dazu wurden die in der Tabelle 2.3 aufgeführten Bakterienstämme herangezogen, die signifikante Unterschiede in den Zellwandstrukturen aufweisen. Darüber hinaus wurden unter anderem auch zu Bestätigungsreaktionen weitere Bakterienstämme verwendet, die hier ebenfalls aufgeführt sind. Bei diesen Stämmen wurde jedoch auf die Beschreibung der Zellwandstruktur verzichtet.

**Tabelle 2.3:** Stammbezeichnung/Zellwandstruktur ausgewählter Bakterien

<b>Spezies</b>	<b>Stamm</b>	<b>Zellwandstruktur</b>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	DSMZ 30016	gramnegativ, A-Layer, bestehend aus saurem Protein- (oder Glykoprotein-) Multimer mit relativ hydrophoben Eigenschaften
<i>Bacillus subtilis</i>	NRS 624	grampositiv, Heteropolypeptid-Kapsel aus D- und L-Glutamat, peritrich begeißelt
<i>Escherichia coli</i> *	DSMZ 426	gramnegativ, Lipopolysaccharid assoziiert mit hydrophilen Polysacchariden (O-Antigenen), peritrich begeißelt, Fimbrien
<i>Klebsiella pneumoniae</i> *	DSMZ 30104	gramnegativ, Kapseln, bestehend aus sauren Polysacchariden
<i>Listeria monocytogenes</i>	NCTC 5348	grampositiv, Peptidoglykan mit Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren, peritrich begeißelt mit bis zu sechs Flagellen
<i>Proteus mirabilis</i>	DSMZ 50903	gramnegativ, Lipopolysaccharide mit hydrophilen Polysacchariden (O-Antigenen), peritrich begeißelt mit extrem vielen und langen Flagellen, Fimbrien
<i>Pseudomonas fluoreszens</i>	DSMZ 1694	gramnegativ, Lipopolysaccharide mit niedrigem Phosphatgehalt
<i>Salmonella Enteritidis</i> *	ATCC 29213	gramnegativ, Lipopolysaccharide mit spezifischen Oligosaccharidseitenketten (O-Antigenen), peritrich begeißelt
<i>Enterococcus faecium</i>	DSMZ 20477 <sup>T</sup>	grampositiv
<i>Lactobacillus brevis</i>	Hausstamm Fa. Genial (Bierisolat)	grampositiv
<i>Salmonella Poona</i> *		gramnegativ
<i>Streptococcus agalactiae</i>	PMBn	grampositiv

\* = Kultivierung bei 37 °C    PMBn = Pharmazeutische Mikrobiologie Bonn



## 2.2 Medien, Geräte, Chemikalien und sonstige Materialien

### 2.2.1 Nährmedien

Es wurden Fertig- und Trockennährmedien verwendet. Die unten aufgeführten Einwaagen für Trockennährmedien beziehen sich, insofern nicht anders beschrieben, immer auf ein Volumen von einem Liter destilliertem Wasser. Nach dem Lösen der einzelnen Bestandteile der Medien erfolgte eine Sterilisation im Autoklav.

**Tabelle 2.4:** Verwendete Nährmedien

Nährmedium	Hersteller/Zusammensetzung
Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar	OXOID, Basingstoke, England
Caseinpepton-Hefeextrakt-Glucose-Agar	OXOID, Basingstoke, England
Caseinpepton-Hefeextrakt-Glucose-Agar, modifiziert	Lebensmittelmikrobiologie, Weihenstephan <ul style="list-style-type: none"> <li>• 17,0 g Caseinpepton, 3,0 g Sojamehlpepton, 5,0 g Natriumchlorid, 2,5 g Kaliumhydrogenphosphat, 2,5 g Glucose, 6 g Hefeextrakt, 15,0 g Agar, pH 7,3 ± 0,2</li> </ul>
Columbia-Agar mit Schafblut	OXOID, Basingstoke, England
Differential Reinforced Clostidial Medium	OXOID, Basingstoke, England
Leber-Bouillon, Tabletten	OXOID, Basingstoke, England
Legionella-Anreicherungsbouillon	Lebensmittel-Mikrobiologie, Universität Bonn <ul style="list-style-type: none"> <li>• 17,0 g Caseinpepton, 3,0 g Sojamehlpepton, 5,0 g Natriumchlorid, 2,5 g Dinatriumhydrogenphosphat, 2,5 g Glucose, 10,0 g Hefeextrakt, 0,0485 g Eisen, 2,0 g Aktivkohle, 0,4 g L-Cystein</li> </ul>
Legionella BCYE Agar	Becton-Dickinson Microbiology, Frankreich
Listeria-Anreicherungsbouillon-Basis	OXOID, Basingstoke, England
MRS-Nährboden	OXOID, Basingstoke, England
Ringer-Lösung, Tabletten	OXOID, Basingstoke, England

### 2.2.2 Geräte

Die im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen verwendeten Geräte sind mit ihrer Bezeichnung und Herstellerfirma in der Tabelle 2.5 aufgeführt.

**Tabelle 2.5:** Verwendete Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Durchlichtphotometer	Abicap <sup>®</sup> -Reader	Biognosis Highspeed Diagnostics, Jülich
ELISA-Reader	SLT Easy Reader EAR 340 AT	SLT Labinstruments, Gördig, AU
FT-IR-Spektrometer	IFS 28B	Bruker, Karlsruhe
Durchlicht-Mikroskop	BH-2	Olympus, Hamburg
Photometer	Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech, Cambridge UK
Realtime-PCR-Cycler	Light-Cycler II	Roche Diagnostics, Mannheim
Raster- Elektronenmikroskop	XL30 ESEM	Fei Philips, Kassel
Thermocycler	Mastercycler gradient	Eppendorf-Nethler-Hinz GmbH, Hamburg
Workstation	Abicap <sup>®</sup> - Workstation	Biognosis Highspeed Diagnostics, Jülich
Zentrifuge	Centrifuge 5415 D	Eppendorf-Nethler-Hinz GmbH, Hamburg

### 2.2.3 Puffer und Lösungen

Die eingesetzten Puffer und Lösungen werden in der Tabelle 2.6 mit Bezeichnung und Zusammensetzung aufgeführt.

**Tabelle 2.6:** Verwendete Puffer und Lösungen

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung/Hersteller</b>
BCIP/NBT-Substrat, Tabletten	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Blockpuffer B1	Biognosis Highspeed Diagnostics, Jülich
BSA-Puffer, 20 %ig	20 %ige BSA-Lösung in PBS-Puffer
Casein-Stammlösung 5,5 %	Biognosis Highspeed Diagnostics, Jülich
CBB-Puffer	Natriumcarbonat-Bicarbonatpuffer, pH 9,5
Coating-Lösung B	Biognosis Highspeed Diagnostics, Jülich
Coating-Lösung D	Biognosis Highspeed Diagnostics, Jülich

Dextransulfat-Lösung 6,4 %ig	6,4 g Dextransulfat in 100 ml Na-Acetatcitrat-Puffer
Mix 100, PCR	400 µl dnTP-Mix, 250 µl Puffer (10x), 250 µl Magnesiumchlorid (25 mM), 1062 µl ddH <sub>2</sub> O
Na-Acetatcitrat-Puffer	8,2 g/l Natriumacetat, 19,21 g/l Citronensäure, pH-Wert: 4,8-4,9 (mit NaOH einstellen)
PBS-Puffer	20,5 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O; 3,97 g/l NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O; 3,5 g/l NaCl
Puffer (10x), PCR	Boehringer, Mannheim
PVA-Puffer	100 µg Polyvinylalkohol in 100 ml 0,1 %igen PBS-Puffer
Streptavidin (Poly HRP 40) mit Meerettichperoxidase	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Substrat	0,1 ml TMB-Stammlösung, 0,0625 ml Dextransulfatlösung (6,4 %ig), 2 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 %ig) ad 10 ml Na-Acetatcitrat-Puffer
TMB-Stammlösung	10 mg 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in 1 ml DMSO
TAE-Puffer (50x)	AppliChem, Darmstadt
TE-Puffer	10 ml Tris HCl, 2 ml 0,5 M EDTA ad 1000 ml ddH <sub>2</sub> O

## 2.2.4 Kits, Chemikalien, Reagenzien und sonstige Materialien

Tabelle 2.7 zeigt die verwendeten Kits, Chemikalien und sonstige Materialien, die bei der hier vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden.

**Tabelle 2.7:** Verwendete Kits, Chemikalien und sonstige Materialien

Kits/Chemikalien/Material	Hersteller
ABICAP <sup>®</sup> <i>Salmonella</i> RED Kit	Biognosis Highspeed Diagnostics, Jülich
All-tissue DNA-extraction kit	Genial, Troisdorf
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Desoxyribonukleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Boehringer, Mannheim
DNA-Größenstandard, 100 bp	Gibco-BRL, Eggenstein
Homidiumbromid	Serva, Heidelberg
Light-Cycler <sup>™</sup> Fast Start DNA Master SybrGreen I	Roche Diagnostics, Mannheim
Magnesiumchlorid (25 mM) (PCR)	Boehringer, Mannheim

RNase	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Seakem LE Agarose	Biozym, Rockland USA
Abicap <sup>®</sup> -Säule	Biognosis Highspeed Diagnostics, Jülich
Anaerocult <sup>®</sup> A und Anaerotest	Merck, Darmstadt
Light-Cycler <sup>™</sup> Capillaries	Roche Diagnostics, Mannheim
Micronaut-S MHK	Merlin, Bornheim-Hersel
Mikrotiterplatten	Greiner, Solingen
Polyester-Fritte Typ f-R-22536, Faser	Filtrona, Hamburg
Polyethylen-Fritte Typ 180 c, poröser Sinterkörper (Poren Ø 50 - 80 µm)	Porex, Singwitz/Bautzen
Polyethylen-Fritte Typ 180 c, poröser Sinterkörper, modifiziert („oxidiert“)	Porex, Singwitz/Bautzen, modifiziert im Institut für Pharmazeutische Biologie (IPB), Bonn
Polyethylen-Fritte Typ 180 c, poröser Sinterkörper, modifiziert („silanisiert“)	Porex, Singwitz/Bautzen, modifiziert im IPB, Bonn
Polyethylen-Fritte Typ 180 c, poröser Sinterkörper, modifiziert („carboxyliert“)	Porex, Singwitz/Bautzen, modifiziert im IPB, Bonn
Polyethylen-Fritte Typ 180 c, poröser Sinterkörper, modifiziert („geblockt“)	Porex, Singwitz/Bautzen, modifiziert im IPB, Bonn
Polyethylen-Fritte Typ 180 a (03082601-1), poröser Sinterkörper, modifiziert („APPG“) <sup>1</sup>	Porex, Singwitz/Bautzen, modifiziert im Fraunhofer-Institut für Angewandte Polymerforschung (FI-AngPolymF), Golm
Polyethylen-Fritte Typ 180 a (03082601-2), poröser Sinterkörper, modifiziert („PEI“) <sup>2</sup>	Porex, Singwitz/Bautzen, modifiziert im FI-AngPolymF, Golm
Polyethylen-Fritte Typ 180 a (03082601-3), poröser Sinterkörper, modifiziert („APTES“) <sup>3</sup>	Porex, Singwitz/Bautzen, modifiziert im FI-AngPolymF, Golm
Polyethylen-Fritte Typ Porex XM 1557, poröser Sinterkörper (Poren Ø 120 µm)	Porex, Singwitz/Bautzen,
Polyethylen Typ 180 a (03082601-3), Granulat, modifiziert („APTES“) <sup>3</sup>	Porex, Singwitz/Bautzen, modifiziert im FI-AngPolymF, Golm
Polypropylen-Fritte Typ f-R-21073, Faser	Filtrona, Hamburg
Polypropylen-Fritte Typ f-R 21073 (03082601-1), Faser, modifiziert („APPG“) <sup>1</sup>	Porex, Singwitz/Bautzen, modifiziert im FI-AngPolymF, Golm
Polypropylen-Fritte Typ f-R 21073 (03082601-2), Faser, modifiziert („PEI“) <sup>2</sup>	Porex, Singwitz/Bautzen, modifiziert im FI-AngPolymF, Golm
Polypropylen-Fritte Typ f-R 21073 (03082601-3), Faser, modifiziert („APTES“) <sup>3</sup>	Porex, Singwitz/Bautzen, modifiziert im FI-AngPolymF, Golm

<sup>1</sup>APPG = Bis(Aminopropoxy)-oligopropylenglykol<sup>2</sup>PEI = Polyethylenimin<sup>3</sup>APTES = Aminopropyl-triehtoxysilan

### 2.2.5 Oligonucleotide

Bei der Identifizierung und Differenzierung von *Clostridium perfringens* wurden die in der Tabelle 2.8 aufgeführten Oligonucleotide eingesetzt. Darüber hinaus wurden auch Primer zur Detektion von Mikroorganismen bei der Entwicklung eines Analysenverfahrens auf Säulenbasis verwendet.

**Tabelle 2.8:** Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Funktion/Produkt
PL 3	AAG TTA CCT TTG CTG CAT AAT CCC	Nachweis plc-Gen bei <i>Clostridium perfringens</i> , 283 bp
PL 7	ATA GAT ACT CCA TAT CAT CCT GCT	
PL 145	GAA AGA TCT GTA TCT ACA ACT GCT GGT CC	Nachweis cpe-Gen bei <i>Clostridium perfringens</i> , 426 bp
PL 146	GCT GGC TAA GAT TCT ATA TTT TTG TC	
Primer 139	GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA	Nachweis <i>Salmonella</i> spp.
Primer 141	TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C	
LM 1	GAA AAA GCA TTT GAA GCC AT	Nachweis <i>Listeria monocytogenes</i> , 149 bp
LM 2	GCA ACT TCC GGC TCA GC	
P1	(Primer-Mix)	Screening für obligate Bierschädlinge

### 2.2.6 Antikörper

Innerhalb dieser Arbeit wurden immunologische Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen entwickelt. Die dazu notwendigen Antikörper sind in der Tabelle 2.9 aufgeführt.

**Tabelle 2.9:** Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller
LP-F-003, <i>Legionella pneumophila</i> , monoklonal, Maus IgG	Dr. Streckert Diagnostica, Witten
LP-F-003, <i>Legionella pneumophila</i> , monoklonal, Maus IgG, biotinyliert	Dr. Streckert Diagnostica, Witten, biotinyliert im IPB, Bonn
Anti- <i>Salmonella</i> , polyklonaler Antikörper	Biognosis Highspeed Diagnostics, Jülich

Anti- <i>Salmonella</i> -Biotin, polyklonaler Antikörper, biotinyliert	Biognosis Highspeed Diagnostics, Jülich
Anti- <i>Clostridium perfringens</i> , polyklonaler Antikörper (Toxin A)	Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen
Anti- <i>Clostridium perfringens</i> , polyklonaler Antikörper (Toxin A), biotinyliert	Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen, biotinyliert im IPB, Bonn
Anti-Maus IgG Antikörper, biotinyliert	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Rabbit anti-mouse IgG Antikörper mit alkalischer Phosphatase	Dako, Hamburg

## 2.3 Mikrobiologische Methoden

### 2.3.1 Kultivierung/Stammhaltung

Die *Clostridium perfringens* Stammkulturen wurden in Flüssigkultur und Plattenhaltung kultiviert. Als Flüssigkultur diente ein mit 10 ml Leberbouillon befülltes Reagenzglas, welches mit dünnflüssigem Paraffin zum Zweck der Anaerobiose überschichtet war. Bebrütet wurde bei 37 °C für fünf bis acht Stunden, was ein durchschnittliches Wachstum von  $10^6$  bis  $10^8$  KbE/ml hervorbrachte. Da *Clostridium perfringens* Stämme in dieser Bouillon keine Sporen bilden, wurden die Flüssigkulturen alle acht Wochen passagiert. Die Plattenhaltung erfolgte auf TS-Agar-Platten im Anaerobentopf unter CO<sub>2</sub>-Atmosphäre (erzeugt durch Anaerocult® A der Firma Merck). Diese Platten wurden  $24 \pm 4$  Stunden bei 37 °C bebrütet und alle vier Wochen passagiert.

Die *Legionella*-Stämme wurden als Plattenkulturen angelegt. Als Medium diente BCYE-Agar mit Vancomycin und Cystein. Inkubiert wurde bei 37 °C in einem Topf mit integriertem Wasserbad, um ein feuchtwarmes Milieu zur Wachstumsförderung zu schaffen. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank, wobei die Platten mit einem Parafilmstreifen verschlossen waren, damit dieser über Luft übertragbare Keim nicht in die Umwelt gelangen konnte. Die Kulturen wurden alle vier Wochen passagiert. Bei den Untersuchungen zur Entwicklung eines Nachweises von Legionellen mittels ELISA-Verfahren wurden die Stämme in einer *Legionella*-Anreicherungsbouillon im feuchtwarmen Milieu bei 37 °C für 48 h angereichert.

Die Stammhaltung der sonstigen in Tabelle 2.3 aufgeführten Bakterien erfolgte im allgemeinen auf TS-Agar-Platten. Ausnahmen stellten *Enterococcus faecium* und *Listeria monocytogenes* dar, welche auf Listeria-Agar kultiviert vorlagen, da sie auf diesem Medium ein üppigeres Wachstum aufwiesen. Darüber hinaus wurde *Lactobacillus brevis* auf MRS-

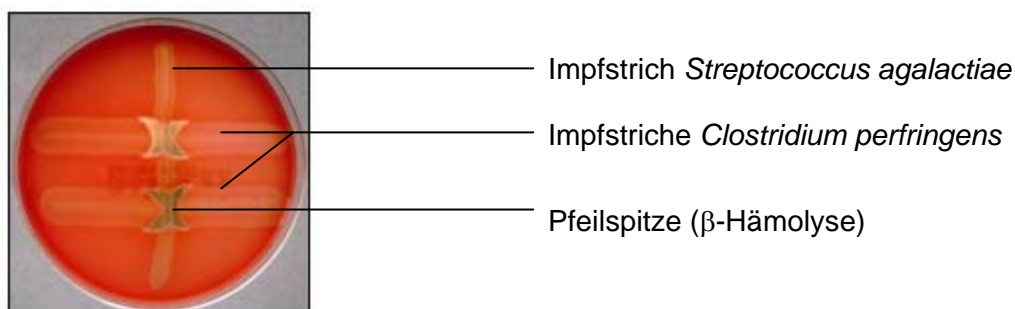
Agarplatten kultiviert. Die Stämme wurden bei 30 °C, bzw. die in der Tabelle 2.3 mit \* gekennzeichneten bei 37 °C, aerob bebrütet und alle vier Wochen passagiert.

### 2.3.2 Makroskopie und Mikroskopie von *Clostridium perfringens*

Um die zur Verfügung gestellten Clostridien-Stämme näher zu charakterisieren, wurden Unterschiede in der Kolonie- und Zellmorphologie festgehalten. Dazu sind die auf TS-Agar-Platten kultivierten Stämme bezüglich ihres Wachstums, der Konsistenz, des Geruchs, der Form (Umriss), Farbe, Erhebung über dem Nährboden und der Ausgestaltung der Kolonieränder beschrieben und darüber hinaus auch unter dem Mikroskop betrachtet und beurteilt worden.

### 2.3.3 Reverse-CAMP-Test zur Identifizierung von *Clostridium perfringens*

Zur Identifizierung der eingesetzten *Clostridium perfringens* Stämme wurde u.a. der Reverse-CAMP-Test eingesetzt. Dazu wurde ein *Streptococcus agalactiae* Stamm waagrecht und der zu identifizierende *Clostridium perfringens* Stamm rechtwinklig davon auf eine Columbia-Agar-Platte mit 5 % defibriniertem Schafblut aufgetragen. Es folgte eine anaerobe Bebrütung bei 37 °C für  $24 \pm 4$  Stunden. Das Auftreten einer pfeilspitzenförmigen Aufhellung ( $\beta$ -Hämolysen, siehe Abbildung 2.1) wird als positiver Nachweis gewertet (BAUMGART & BECKER 2004).



**Abbildung 2.1:**  $\beta$ -Hämolysen von *Clostridium perfringens* beim Reverse-CAMP-Test

### 2.3.4 Empfindlichkeit gegen Antibiotika

Diese Untersuchung diente der Erkennung unterschiedlicher Resistenzeigenschaften von *Clostridium perfringens*. Darüber hinaus sollte eine Datenbank erstellt werden, welche Infor-

mationen über den Wirkungsbereich, sowie die minimale Hemmkonzentration einer Auswahl an Antibiotika gegenüber *Clostridium perfringens* bieten soll. Die minimale Hemmkonzentration (mg/l) wird dabei als die niedrigste Konzentration verstanden, welche noch in der Lage ist, ein sichtbares Wachstum der Mikroorganismen zu verhindern. Um eine repräsentative Aussage über die Empfindlichkeit von *Clostridium perfringens* gegenüber Antibiotika zu erhalten, wurden in der Literatur beschriebene Verfahren miteinander verglichen, bewertet und, wo notwendig, modifiziert und angepasst.

#### 2.3.4.1 Agar-Diffusionsverfahren

Beim Agardiffusionsverfahren zur Bestimmung von Antibiotikaempfindlichkeit handelt es sich um eine kulturelle Methode, bei der das Wachstum des zu untersuchenden Mikroorganismus durch ein mit Antibiotika getränktes Blättchen gehemmt wird. Die Größe der dabei entstehenden Hemmzone ist von der Konzentration und der Art des Antibiotikums abhängig.

Der in dieser Arbeit beschriebene Agardiffusionstest wurde mit zwei in der Literatur mit am häufigsten für diesen Test beschriebenen Medien durchgeführt. Dabei handelte es sich zum einem um den Fertignährboden Columbia-Agar mit defibriniertem Schafblut und zum anderem um Müller-Hinton-Agar. Zu Beginn dieser Untersuchung wurde eine Kolonie des jeweiligen Stammes mittels Dreiösenausstrich auf eine TS-Agar-Platte gebracht und anaerob 24 Stunden bei 37 °C bebrütet. Von den üppig gewachsenen Kolonien wurde eine gehäufte Impföse ( $\varnothing$  Öse: 0,4 cm) in ein mit 1 ml Ringerlösung beschicktes Eppendorfröhrchen gegeben und mit dem Vortex homogenisiert. Diese Suspension wurde dann flächendeckend auf die jeweilige Agarplatte geimpft. Anschließend folgte das Belegen mit den insgesamt neun verschiedenen Antibiotika-Blättchen (siehe Tabelle 2.10). Die Auswahl und Konzentration wurde nach Maßgabe der in der Literatur als wirksam beschriebenen Antibiotika getroffen.

**Tabelle 2.10:** Antibiotikaauswahl für Agardiffusionstest

Antibiotika auf Blättchen	Konzentration	Hersteller
Ampicillin	10 µg	OXOID, Basingstoke, England
Cephalothin	30 µg	OXOID, Basingstoke, England
Chloramphenicol	30 µg	OXOID, Basingstoke, England
Erythromycin	15 µg	OXOID, Basingstoke, England
Gentamicin	10 µg	OXOID, Basingstoke, England
Penicillin G	10 units	OXOID, Basingstoke, England



Tetrazykline	30 µg	OXOID, Basingstoke, England
Trimethoprim/Sulfphametoxazole	25 µg	OXOID, Basingstoke, England
Vancomycin	30 µg	OXOID, Basingstoke, England

Nach einer  $24 \pm 4$ -stündigen, anaeroben Bebrütung bei  $37\text{ °C}$  wurden die Hemmhöfe, welche die einzelnen Antibiotika hervorgerufen hatten, ausgemessen und bewertet.

Der hier in der Methode beschriebene Agardiffusionstest mit Columbia-Agar wurde unter anderem zur näheren Charakterisierung und Unterscheidung von *Clostridium perfringens* Stämmen herangezogen. Um feststellen zu können, ob sich die ermittelten Hemmhöfe zweier Messreihen im Mittelwert signifikant voneinander unterscheiden, wurden die Messwerte mit dem so genannten Zweistich-Gauss-Test (siehe Formel) statistisch ausgewertet. Dabei gelten die bestimmten Mittelwerte zweier Messreihen als unterschiedlich wenn:

$$|\bar{x} - \bar{y}| > u_{100} \sqrt{\frac{\sigma_1^2}{m} + \frac{\sigma_2^2}{n}}$$

erfüllt ist, wobei  $\bar{x}$  Mittelwert der Messreihe 1 und  $\bar{y}$  den Mittelwert der Messreihe 2 darstellt,  $u_{100}$  die quantile Normalverteilung in Prozent,  $\sigma_1$  bzw.  $\sigma_2$  die Varianz der Messreihen und  $m$  bzw.  $n$  die Größen der Stichproben der jeweiligen Messreihe 1 bzw. 2 aufzeigt.

#### 2.3.4.2 Micronaut-Plattentest

Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration kam, in Anlehnung an die standardisierte Mikrodilution-Methode nach DIN 58940, der kommerziell erhältliche Micronaut-Plattentest der Firma MERLIN-Diagnostika in modifizierter Form zur Anwendung. Diese Platten wurden uns von der Abteilung Pharmazeutische Mikrobiologie der Universität Bonn zur Verfügung gestellt. Bei diesem Verfahren befinden sich die Antibiotika in dehydratisierter Form und geometrisch ansteigender Konzentration in den Kavitäten der Platte. Insgesamt waren zwölf verschiedene Antibiotika auf den Platten aufgebracht, wobei eine Kavität ohne Antibiotika als Wachstumskontrolle dienen sollte. Die zu untersuchenden *Clostridium perfringens* Stämme wurden nach einer siebenstündigen anaeroben Bebrütung bei  $37\text{ °C}$  in Leberbouillon zunächst 1:10 in einer membranfiltrierten Leberbouillon verdünnt und anschließend photometrisch auf eine  $OD_{620}$  von 0,025 bis 0,300 eingestellt. Dies entsprach in etwa einer Konzentration von  $10^5$  bis  $10^7$  KbE/ml. Nach einer weiteren 1:100 Verdünnung in membranfiltrierter

Leberbouillon folgte die Beimpfung der ELISA-Platten mit je 100  $\mu\text{l}$ . Die Platten wurden  $24 \pm 4$  Stunden anaerob bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert und anschließend mittels ELISA-Reader bei 620 nm die Trübung vermessen. Da auf diesen Platten nur eine Kavität als Wachstumskontrolle aber kein Nullstandard vorhanden ist, wird die Platte vor und nach dem anaeroben Inkubieren im ELISA-Reader vermessen und eine Differenz größer 0,100 als positiver Nachweis für Wachstum gewertet.

Beim Vergleich der Mittelwerte einzelner Messreihen wurde der Zwei-Stich-Gauss-Test als statistisches Mittel gewählt (siehe Kapitel 2.4.6.1). Aufgrund der Datenstruktur (geometrisch ansteigende Messpunkte) wurde hier eine quantitative Normalverteilung von  $u_{99}$  als signifikant angesehen (Irrtumswahrscheinlichkeit  $\pm 1\%$ ).

### 2.3.5 Nachweis und Sporulation von *Clostridium perfringens*

Diese Untersuchung erfolgt in Anlehnung an die in der DIN 38411 und der § 35 Methode des Lebensmittel und Bedarfsgegenstände Gesetzes (LMBG) „L59.00-4“ für den Nachweis von sulfitreduzierenden Clostridien empfohlene Methode. Dazu wird eine mit *Clostridium perfringens* beimpfte und frisch hergestellte Leberbouillon fünf Stunden anaerob bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  bebrütet. Aus dieser Anreicherung, welche ca.  $10^6$  bis  $10^8$  KbE/ml enthielt, wurde je 1 ml Probensuspension entnommen, in je ein Röhrchen mit 9 ml DRCM-Bouillon gegeben und zur Herstellung eines anaeroben Milieus mit Paraffin überschichtet. Nachdem eines der Röhrchen 10 min bei  $70\text{ }^\circ\text{C}$  pasteurisiert wurde, kamen beide Röhrchen (pasteurisiert und unpasteurisiert) für vier Wochen bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  in den Brutschrank. Während dieser Bebrütungszeit wurden die Medien der beiden Röhrchen regelmäßig alle zwölf Stunden kontrolliert. Eine Schwarzfärbung und Gasbildung beim pasteurisierten Röhrchen wurde als positiver Nachweis für das Sporulationsvermögen in diesem Medium gewertet. Dabei diente das unpasteurisierte Röhrchen als Kontrolle, ob der jeweils eingesetzte Stamm grundsätzlich in der Lage ist, in einer DRCM-Bouillon eine Sulfitreduktion zu erzeugen.

### 2.3.6 Nachweis von *Lactobacillus brevis*

Aus einer Keimsuspension von *Lactobacillus brevis* (ca.  $10^9$  KbE/ml) in MRS-Bouillon wurde eine dekadische Verdünnungsreihe in Ringerlösung hergestellt. Von den Verdünnungsstufen ( $10^{-2}$  und  $10^{-5}$ ) wurden 5,9 ml Probe entnommen und membranfiltriert (Membranfilter mit  $0,45\text{ }\mu\text{m}$  Poren). Die Filter wurden dann auf MRS-Agar aufgelegt und 72 Stunden bei  $30\text{ }^\circ\text{C}$  im  $\text{CO}_2$ -Schrank bebrütet und die Keimzahl bestimmt. Darüber hinaus wurde aus dem Filtrat wiederum eine dekadische Verdünnungsreihe angesetzt und mittels Oberflächenverfahren

auf MRS-Agar unter anlogenen Bebrütungsparametern die im Filtrat verbliebenen Lactobacillen bestimmt. Diese Methode sollte als Vergleichsstandard fungieren, um eine auf der Grundlage von Affinitätsmodulen neu entwickelte Methode zu beurteilen.

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR-Methode zur Identifizierung und Differenzierung humanpathogener und Verderbnis erregender Bakterien eingesetzt. Die unterschiedlichen Aufarbeitungs- und Analysenverfahren sind in den folgenden Unterkapiteln beschrieben.

### 2.4.1 Identifizierung und Differenzierung von *Clostridium perfringens* mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Der Nachweis von *Clostridium perfringens* (einschließlich Sporen) und die Differenzierung der jeweiligen Stämme, die genetisch in der Lage sind Enterotoxin zu bilden, wurde mit einer modifizierten Duplex-Polymerase-Kettenreaktion (Duplex-PCR) nach FACH & POPOFF (1997) durchgeführt. Unter Duplex-PCR versteht man eine Polymerase-Kettenreaktion, die bei der Amplifikation zwei Primerpaare gleichzeitig verwendet. Dazu wurden zwei Oligonucleotidpaare eingesetzt, die zum einen das *plc*-Gen (Phospholipase C) nachweisen, welches spezifisch für *Clostridium perfringens* ist, und zum anderen das *cpe*-Gen (Clostridium perfringens Enterotoxin), welches nur bei Enterotoxin bildenden Stämmen vorkommt. Die DNA-Isolierung aus den Bakterienstämmen erfolgte mit dem DNA *All*-Tissue-Kit der Firma Genial.

#### DNA-Isolierung von *Clostridium perfringens*

Ein Milliliter einer Übernacht-Reinkultur wurde fünf Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde abpipettiert, das Pellet mit 500 µl destilliertem Wasser gewaschen, anschließend mit 500 µl Lyse 1 Puffer, 50 µl Lyse 2 Puffer und 10 µl Enzym (Proteinase K) resuspendiert. Um die DNA freizusetzen, wurde diese Lösung bei 65 °C für 60 Minuten im Wärmeschrank inkubiert. Diese verhältnismäßig lange Zeit ist notwendig, um gegebenenfalls gebildete Sporen ebenfalls zu lysieren und dadurch DNA-Verluste zu vermeiden. Nach der Lyse erfolgte eine fünfminütige Erhitzung auf 95 °C zur Inaktivierung der Proteinase K und die Zugabe von 5 µl RNase, zur Beseitigung von RNA. Anschließend wurden 185 µl Lyse 3 Puffer hinzugegeben, 15 Sekunden gevortext und fünf Minuten bei -20 °C gekühlt. Es folgte eine zehnminütige Zentrifugation bei 13000 rpm, die Überführung des Überstandes in 1 ml 100 %igem Ethanol und eine zwanzigminütige Fällung bei -20 °C. Diese Zeit ist einzuhalten,

da längere Fällzeiten zu Verlusten an DNA-Material führen können. Anschließend erfolgte die Pelletierung der DNA durch eine zwanzigminütige Zentrifugation bei 13000 rpm. Der Überstand wurde vollständig abpipettiert, das Pellet mit 300 µl eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen und fünf Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand vollständig verworfen, das DNA-Pellet getrocknet und in TE-Puffer (1:10000 verdünnt) oder ddH<sub>2</sub>O gelöst. Dabei wurde nach einer photometrischen Messung der DNA-Gehalt durch Variation des TE-Puffer-Einsatzes (50 bis 100 µl) auf eine Konzentration von ca. 20 ng eingestellt.

### **Amplifikation**

Die Amplifikation der isolierten DNA erfolgte in einem Thermocycler. Der Reaktionsansatz betrug 25 µl. Er bestand aus 19,62 µl Mix 100 (siehe Tabelle 2.6), 0,8 µl ddH<sub>2</sub>O, 4 µl Proben-DNA, 0,18 µl Taq-Polymerase und aus zwei Primerpaaren je 0,1 µl pro Primer (Konzentration: 100 pMol). Bei den Primern handelte es sich um PL 3 und PL 7, welche ein Amplifikationsprodukt von 283 bp erzeugen (plc-Gen, spezifisch für *Clostridium perfringens*). Das zweite Primerpaar besteht aus den Primern PL 145 und PL 146, welche ein Produkt von 426 bp amplifizieren (cpe-Gen, Nachweis von genetischem Enterotoxinbildungsvermögen). Das PCR Temperaturprogramm wies eine Starttemperatur (Denaturierung des Templates) von 94 °C für 30 Sekunden auf. Die 30 Zyklen der Amplifikation erfolgten für 30 Sekunden bei 94 °C (erneute Denaturierung im Rahmen der Zyklen), für 30 Sekunden bei 55 °C (Annealing) und für 90 Sekunden bei 72 °C (Elongation). Nach dem letzten Zyklus erfolgte ein abschließender Extensionsschritt bei 72 °C für 180 Sekunden.

### **Detektion**

Zur Detektion wurde das PCR-Reaktionsprodukt (25 µl) mit 5 µl Markerfarbstoff versetzt. Von diesem Ansatz wurden dann 5 µl in ein 1 %iges Agarosegel in TAE-Puffer eingesetzt und in ca. 50 Minuten bei 70 V aufgetrennt. Als Standard wurde ein 100 bp Marker von Gibco-BRL verwendet. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung erfolgte eine fünfminütige Färbung des Gels unter Lichtausschluß mit Homidiumbromid (10 µg/ml), gefolgt von einer fünfminütigen Entfärbung mit Leitungswasser. Die Betrachtung des Gels erfolgte in einem Transluminator im UV-Licht bei 312 nm. Das Ergebnis wurde mit einer Video-Dokumentationsanlage unter zu Hilfenahme der Bio-Doc-Analyse-Software dokumentiert.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden immunologische und auf Affinitätsmodulen beruhende Methoden zur Anreicherung und Identifizierung von Bakterien entwickelt. Einige dieser Verfahren verwenden zum Nachweis der angereicherten bzw. zu identifizierenden Mikroorga-

nismen eine Realtime-PCR. Die Beschreibung dieser Detektierungsverfahren erfolgt in den Kapiteln 2.4.2 bis 2.4.5. Die dazu gehörenden neu entwickelten Aufarbeitungs- und Anreicherungsverfahren werden im Kapitel 3.8.3 ff. beschrieben.

## 2.4.2 Realtime-PCR von *Salmonella* Enteritidis

Die Amplifikation und Detektion von *Salmonella* Enteritidis erfolgte in einem Light-Cycler™ der Firma Merck (Realtime-PCR). Dazu wurde ein Reaktionsansatz von 2,0 µl SyberGreen, 1,2 µl Magnesiumchlorid, 11,6 µl ddH<sub>2</sub>O und je 0,1 µl Primer (Primer 139 und 141 a´ 100 pmol/µl) mit 10 µl Probe (3 ng/µl) verwendet. Dieses Gemisch wurde in Light-Cycler™ Capillaries pipettiert, kurz in einem Kühthalter zentrifugiert und in den Probenhalter des Light-Cyclers™ eingesetzt. Als Temperaturprogramm wurden die in der Tabelle 2.11 aufgeführten Parameter gewählt.

**Tabelle 2.11:** Temperaturprogramm der Realtime-PCR von *Salmonella* Enteritidis

### Denaturieren

Zykluszahl: 1

Typ: keinen

Fluoreszenzmodus: F1/1

Segmentanzahl	Zieltemperatur [ °C]	Haltezeit [sec.]	Neigung [ °C/sec.]	Annahmemodus
1	95	600	20	keinen

### Amplifizieren

Zykluszahl: 45

Typ: Quantifizierung

Fluoreszenzmodus: F1/1

Segmentanzahl	Zieltemperatur [ °C]	Haltezeit [sec.]	Neigung [ °C/sec.]	Annahmemodus
1	95	10	20	Keinen
2	55	15	20	Keinen
3	72	15	20	einfach

**Schmelzen**

Zykluszahl: 1				
Typ: Schmelzkurven		Fluoreszenzmodus: F1/1		
Segmentanzahl	Zieltemperatur [ °C]	Haltezeit [sec.]	Neigung [ °C/sec.]	Annahmemodus
1	95	0	20	keinen
2	50	10	20	keinen
3	95	0	0,1	ständig

**Kühlen**

Zykluszahl: 1				
Typ: keinen		Fluoreszenzmodus: F1/1		
Segmentanzahl	Zieltemperatur [ °C]	Haltezeit [sec.]	Neigung [ °C/sec.]	Annahmemodus
1	40	60	20	keinen

**2.4.3 Realtime-PCR von *Lactobacillus brevis***

Zum Nachweis von *Lactobacillus brevis* mittels Realtime-PCR wurde ein Reaktionsansatz von 2,0 µl Syber Green, 1,8 µl Magnesiumchlorid, 9,7 µl ddH<sub>2</sub>O und 1,5 µl Primer (P1-Primermix) mit 10 µl Probe (3 ng/µl) verwendet. Die Amplifikation erfolgte in Light-Cycler™ Capillaries in einem Light-Cycler der Firma Merck. Als Temperaturprogramm wurden die in der Tabelle 2.12 aufgeführten Einstellungen gewählt.

**Tabelle 2.12:** Temperaturprogramm Realtime-PCR von *Lactobacillus brevis***Denaturieren**

Zykluszahl: 1				
Typ: keinen		Fluoreszenzmodus: F1/1		
Segmentanzahl	Zieltemperatur [ °C]	Haltezeit [sec.]	Neigung [ °C/sec.]	Annahmemodus
1	95	600	20	keinen

**Amplifizieren**

Zyklenzahl: 40

Typ: Quantifizierung      Fluoreszenzmodus: F1/1

Segmentanzahl	Zieltemperatur [ °C]	Haltezeit [sec.]	Neigung [ °C/sec.]	Annahmemodus
1	95	0	20	keinen
2	63	8	5	keinen
3	72	25	20	keinen
4	77	2	20	einfach

**Schmelzen**

Zyklenzahl: 1

Typ: Schmelzkurven      Fluoreszenzmodus: F1/1

Segmentanzahl	Zieltemperatur [ °C]	Haltezeit [sec.]	Neigung [ °C/sec.]	Annahmemodus
1	95	0	20	keinen
2	76	15	20	keinen
2	95	0	0,1	ständig

**Kühlen**

Zyklenzahl: 1

Typ: keinen      Fluoreszenzmodus: F1/1

Segmentanzahl	Zieltemperatur [ °C]	Haltezeit [sec.]	Neigung [ °C/sec.]	Annahmemodus
1	40	60	20	keinen

**2.4.4 Auswertung der Realtime-PCR durch Schmelzkurvenanalysen**

Mit der Schmelzkurven-Analyse lassen sich Amplifikate einer Realtime-PCR spezifisch bestätigen. Dazu ist in der mitgelieferten Software des Light-Cyclers™ ein Programm integriert, mit dem die Schmelzkurven der PCR-Produkte automatisch angezeigt werden. Die Erkennung und Unterscheidung von einem spezifischen PCR-Produkt gegenüber unspezifischen PCR-Amplifikaten und Primer-Dimeren beruht darauf, dass jede doppelsträngige DNA ihren spezifischen Schmelzpunkt aufweist.

### **2.4.5 Auswertung der Realtime-PCR durch Gelelektrophorese**

Um die Schmelzkurvenanalyse durch ein zweites Verfahren zu bestätigen, wurde eine Gelelektrophorese angeschlossen. Dazu wurde der Inhalt der Light-Cycler™ Capillaren in Eppendorfröhrchen zentrifugiert, die Probe mit Blaumarker versetzt und in einem 1 %igem Agarosegel aufgetrennt. Nach Färbung mit Homidiumbromid und Betrachtung mit der Videodokumentationsanlage wurden die Amplifikationsprodukte ausgewertet.

## **2.5 Differenzierung von *Clostridium perfringens* mit FT-IR-Spektroskopie**

Die Methode der Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FT-IR-Spektroskopie) soll zur Differenzierung von *Clostridium perfringens* Stämmen herangezogen werden. Die dabei aufgenommenen Absorptionsspektren können als Grundlage einer Datenbank fungieren, welche dann für eine spätere Identifizierung dieser Spezies verwendet werden kann. Um analoge und auswertbare Messwerte zu erhalten, ist eine standardisierte Versuchsdurchführung Grundvoraussetzung (HELM, 1992).

### **2.5.1 Kultivierung von *Clostridium perfringens* für die FT-IR-Spektroskopie**

Um bei der FT-IR-Spektroskopie vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, ist es notwendig, ein Verfahren zu wählen, das die Voraussetzung erfüllt, dass sich die Bakterienstämme jeweils im selben Entwicklungsstadium befinden und uneingeschränkt durch die Anzuchtbedingungen wachstumsfähig sind. Um dieses zu gewährleisten, wurde folgender Kultivierungsansatz gewählt. Zunächst wurde eine Reinkolonie in einer mit Paraffin überschichteten Leberbouillon fünf Stunden bei 37 °C bebrütet. Aus dieser Bouillon wurden dann 100 µl Keimsuspension entnommen und per Oberflächenverfahren auf eine modifizierte TS-Agarplatte gegeben, welche im Anaerobtopf (mit Anaerokult® A der Firma Merck) zwischen 24 und 36 Stunden bei 37 °C bebrütet wurde. Von dieser Platte wurden dann wieder Einzelkolonien entnommen, mittels Dreiösenausstrich eine 2. Passage angelegt, welche wiederum zwischen 24 bis 36 Stunden anaerob bei 37 °C bebrütet wurde. Die so kultivierten Stämme konnten nun zur Präparation für die FT-IR-Spektroskopie eingesetzt werden.

### **2.5.2 Präparation von *Clostridium perfringens* für die FT-IR-Spektroskopie**

Für die Präparation der kultivierten Stämme wurde zunächst ein Bakterienrasen des jeweiligen Stammes angezüchtet. Dazu wurde eine ausreichende Menge (ca. 10 bis 20 Kolonien)



an Bakterienmasse von der 2. Passage der kultivierten Platten mit einer Platinöse entnommen, auf ein modifiziertes TS-Medium aufgebracht und mit einem Drigalski-Spatel gleichmäßig verteilt. Nach einer Bebrütung von genau  $24 \pm \frac{1}{2}$  Stunden wurde eine gehäufte Platinöse (Ösendurchmesser 0,4 cm) vom Bakterienrasen entnommen, in 100  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O suspendiert, gevortext und 35  $\mu\text{l}$  dieser Suspension auf ein Feld des Probenrades (Zink-Selen-Scheibe mit 15 Probenfeldern und einem Referenzfeld) aufgegeben. Es folgte eine Trocknung der Probenscheibe für 45 Minuten bei 30 °C, bis sich Probenfilme auf den jeweiligen Feldern gebildet hatten. Das so präparierte Probenrad konnte nun in die Messkammer des IR-Spektrometers eingesetzt und vermessen werden.

### 2.5.3 Messen der Infrarotspektren

Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte über ein computergesteuertes Programm. Vor der eigentlichen Messung mussten zunächst die Probandaten in eine Protokollmaske eingetragen werden. Auf Grundlage der eingegebenen Daten und eines Strichcodes auf dem jeweiligen Probenrad konnte die Software die einzelnen Probenfelder mit der jeweiligen Stammbezeichnung in Übereinstimmung bringen. Nach dem Einlegen des Probenrades in das Spektrometer konnte nach fünfminütiger Verweildauer, während dessen die Messkammer mit Luft gespült wurde, mit der Messung begonnen werden. Bei der folgenden Aufnahme der Absorptionsspektren wurde ein Wellenbereich von  $4000 \text{ cm}^{-1}$  bis  $500 \text{ cm}^{-1}$  gescannt. Gemäß den Vorgaben des Herstellers sollte der Absorptionsbereich zwischen 0,35 und 1,5 liegen. Bei Messwerten, die außerhalb dieses Bereiches lagen, wurden die Spektren nach Verdünnen der Probe und Aufgabe auf ein neues Probenfeld (wenn oberhalb des Bereiches) oder erneuter Aufgabe der Suspension auf den schon vorhandenen Probenfilm (wenn unterhalb des Bereiches) erneut vermessen. Um aussagekräftige und reproduzierbare Spektren zu erhalten, wurden die Messungen an die Bedingung geknüpft, dass die Verhältnisse zwischen Signal und Untergrundrauschen einerseits und der Wasserbande andererseits im angemessenen Verhältnis zueinander stehen. Lagen diese Verhältnisse außerhalb des Toleranzbereiches, wurde diese Messung wiederholt. Die mit der hier beschriebenen Methode erhaltenen Absorptionsspektren konnten nun nach den im Punkt 2.5.4 (Auswertung der Spektren) beschriebenen Parametern ausgewertet werden.

### 2.5.4 Auswertung der Spektren

Die Auswertung der Spektren erfolgt mittels Clusteranalyse. Dabei handelt es sich um ein Verfahren, welches Frequenz, Anzahl und Intensität der Peaks miteinander in Bezug setzt

und daraus ein so genanntes Dendrogramm berechnet. Ein Dendrogramm ist wie ein Stammbaum aufgebaut, wobei ähnliche Spektren nah aneinander liegen und voneinander verschiedene eine dementsprechende Distanz zueinander aufweisen. Schließen sich Spektren zu Gruppen zusammen, die sich von anderen Spektren oder Gruppen differenzieren, so werden diese als Cluster bezeichnet. Bei der Betrachtung von Spektren werden unterschiedliche Bereiche bewertet. Nach NAUMANN *et al.* (1990) werden Infrarotspektren, je nach ihren Funktionsbereichen, in die folgenden fünf spektralen Fenster eingeteilt (siehe Abbildung 2.2).

Fettsäurefenster (3000 bis 2800  $\text{cm}^{-1}$ ):

- Asymmetrische und symmetrische Streckschwingungen von CH-Bindungen der Methyl-, Methylen- und Methingruppen.

Amidfenster (1800 bis 1500  $\text{cm}^{-1}$ ):

- Amid I- und Amid II-Banden zellulärer Proteine und Peptide
- DNA- und RNA-Strukturen (nur geringfügig an Signalauswirkung beteiligt)

Mischfenster (1500 bis 1200  $\text{cm}^{-1}$ ):

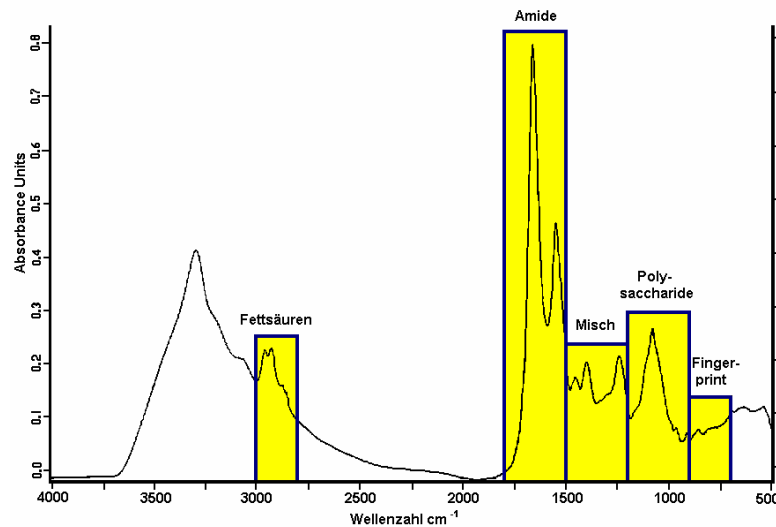
- Fettsäuren und Proteine
- Asymmetrische Streckschwingung der P=O Bindungen in Phosphodiestergruppen (Nukleotide, Phospholipide und phosphathaltige Polysaccharide)

Polysaccharidfenster (1200 bis 900  $\text{cm}^{-1}$ ):

- Ringschwingungen der Polysaccharide (lassen Rückschlüsse auf die Zellwand zu)

Fingerprintfenster (900 bis 700  $\text{cm}^{-1}$ ):

- signifikanter Bereich zur Identifizierung eines Stammes

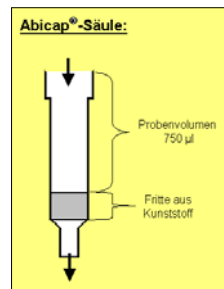


**Abbildung 2.2:** IR-Spektralfenster nach Naumann am Beispiel von *Clostridium perfringens* DSMZ 756 (entnommen aus: HERDING-SOTZECK, 1998, modifiziert)

Bei der hier durchgeführten Clusteranalyse wurde die erste Ableitung der Spektren verwendet. Die Auswertung basierte auf drei unterschiedlich gewichteten Spektral Fenstern. Es wurde der Fettsäurebereich mit 1, der Polysaccharidbereich mit 3 und der Fingerprintbereich mit 1 verwendet bzw. gewichtet. Die so ermittelten Messwerte sollten zur Differenzierung unterschiedlicher *Clostridium perfringens* Stämme herangezogen werden.

## 2.6 Entwicklung immunologischer Analysensysteme

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein immunologisches Analysenverfahren zur spezifischen Isolierung und Identifizierung von Mikroorganismen entwickelt. Um möglichst variable Proben volumina einsetzen zu können, fiel die Wahl auf ein Durchflusssystem. Als Grundträger diente eine Abicap<sup>®</sup>-Säule (siehe Abbildung 2.3), welche mit einem Kunststoffträger (zylinderförmige Fritte 5x5 mm) versehen war, auf dem die jeweiligen Antikörper aufgebracht wurden. Diese Antikörper sollten aus flüssigen oder aufgearbeiteten Proben spezifisch die zu untersuchenden Mikroorganismen herausfiltern. Die Detektion erfolgte dann mittels Sandwich-ELISA direkt auf der Säule oder, nach Lyse der Probe, außerhalb des Testsystems mit einer Polymerase-Kettenreaktion (Analysenprotokolle siehe Kapitel 3.7.3.2, 3.8 ff. und 9.3).



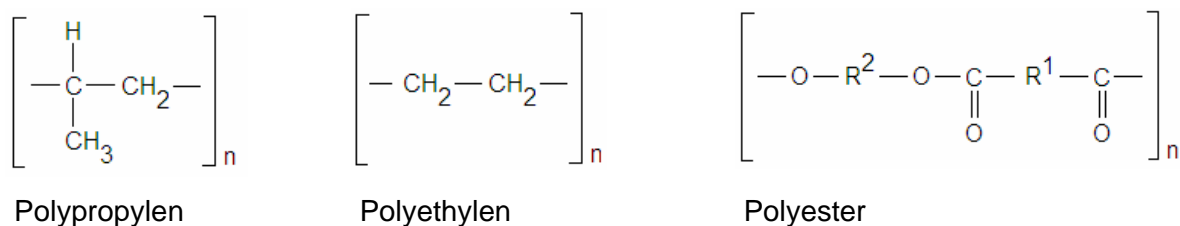
**Abbildung 2.3:** Abicap<sup>®</sup>-Säule mit Kunststoffträger für Antikörper

Die für die Entwicklung des Analysensystems notwendigen und durchgeführten Untersuchungen sind in den folgenden Kapiteln näher beschrieben. Die auf Grundlage der Ergebnisse entwickelten Anwendungen sind im Kapitel 3.7 ff. beschrieben.

## 2.6.1 Charakterisierung unterschiedlicher Trägermaterialien aus Kunststoff

### 2.6.1.1 Wechselwirkungen von Bakterien mit Kunststoffoberflächen

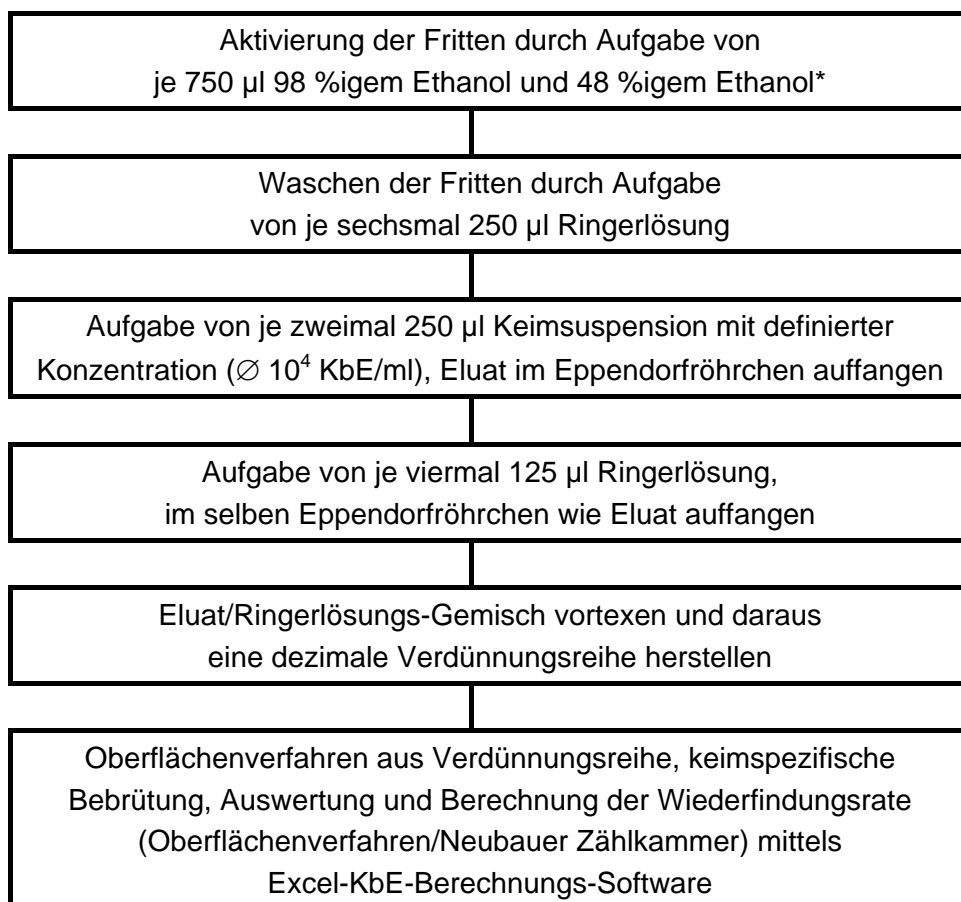
Bei der Entwicklung des immunologischen Verfahrens sollten Kunststoffe als Träger für spezifische Antikörper dienen. Um die Eignung der verschiedenen Trägermaterialien zu bestimmen, wurde untersucht, in welchem Ausmaß deren Oberflächen mit humanpathogenen Bakterien Wechselwirkungen eingehen bzw. diese zurückhalten. Die Bestimmung dieser Eigenschaften erfolgte mit der oben beschriebenen Abicap<sup>®</sup>-Säule, welche mit dem jeweils zu untersuchenden Kunststoffmaterial in Form einer Fritte bestückt wurde. Diese Fritten sind zylinderförmige, 5x5 mm große Faser- oder Sinterkörper. Als Frittenmaterial wurde Polypropylen (PP), Polyethylen Typ Porex (PE<sub>Porex</sub>), Polyethylen Typ 180 c (PE) und Polyester (PES) ausgewählt (siehe auch Abbildung 2.4).



**Abbildung 2.4:** Strukturformeln der verwendeten Kunststoffe

Bei der Auswahl der Bakterienstämme (siehe Tabelle 2.3) wurde darauf geachtet, dass diese signifikante Unterschiede in den Zellwandstrukturen aufweisen (nähere Beschreibung siehe unter Kapitel 2.1).

Zu Beginn der Untersuchung mussten die Kunststoff-Fritten aktiviert werden, damit dessen Oberfläche benetzt ist und die flüssigen Proben durch den Frittenkörper fließen können. Dazu wurden sie nacheinander mit je 750 µl 98 %igem Ethanol, 48 %igem Ethanol und je sechsmal mit je 250 µl Ringerlösung im Durchfluss gespült. Die Testdurchführung erfolgte durch Aufgabe von je zweimal 250 µl einer Keimsuspension definierter Konzentration ( $\varnothing 10^4$  KbE) auf die Säule, anschließender vierfacher Spülung der Säule mit je 125 µl Ringerlösung und Bestimmung der koloniebildenden Einheiten im Eluat (siehe Schema in Abbildung 2.5). Als Maß für die Interaktion zwischen Bakterium und dem jeweiligen Frittenmaterial wurde die Wiederfindungsrate im Eluat ermittelt (indirektes Nachweisverfahren).



\* bei modifizierten Fritten 2 x 500 µl Ethanol 48 %ig

**Abbildung 2.5:** Schematischer Ablauf der Bestimmung von Wechselwirkungen der Bakterien mit Kunststoffoberflächen

Um feststellen zu können, ob eine mögliche Wechselwirkung der Materialien mit den Bakterien durch Behandeln mit so genannten Blockpuffern beeinflusst werden kann (Belegung möglicher freier Bindungsstellen durch Pufferzusätze), wurde eine analoge Untersuchung auch mit Kunststoffkörpern durchgeführt, welche zuvor mit einer 0,1 %igen BSA-Pufferlösung behandelt wurden.

### **2.6.1.2 Durchflussgeschwindigkeit flüssiger Proben durch Kunststoff-Fritten**

Zur weiteren Charakterisierung der eingesetzten Materialien erfolgte eine Bestimmung der Durchflussgeschwindigkeit von flüssigen Bakteriensuspensionen durch die Kunststoff-Fritten. Dazu wurde die Zeit gemessen, welche 500 µl einer Keimsuspension in Ringerlösung (Konzentration  $\approx 10^4$  KbE/ml) benötigt, um die jeweilige Fritte zu passieren. Die Angabe des Ergebnisses erfolgte dann als Durchflussdauer in Sekunden pro ml Probensuspension. Untersucht wurden geblockte und ungeblockte Materialien, wobei die ungeblockten Fritten vor der Bestimmung der Fließgeschwindigkeiten mit 500 µl Ethanol gespült werden mussten. Dieses ist notwendig, um das unbehandelte Material zu benetzen, was die Grundvoraussetzung dafür ist, dass wässrige Probensuspension durch die Faser- bzw. Sinterkörper fließen können.

### **2.6.1.3 Charakterisierung von Kunststoffkörpern durch Elektronenmikroskopie**

Die in Kapitel 2.6.1.1 beschriebenen Sinter- und Faserkörper wurden mit einem Raster-Elektronenmikroskop (XL30 Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM)), Firma Fei Philips) untersucht. Dabei wurden die Kunststoff-Fritten ganzheitlich und als dünne, mit einem Skalpell geschnittene Plättchen betrachtet. Das Material wurde in der Begutachtungszelle justiert und ohne weitere Behandlung elektronenmikroskopisch abgerastert. Die Auswertung erfolgte mittels „Control Software Version 5.90“.

### **2.6.1.4 Überprüfung der Bakterien-Rückhaltekapazität von Kunststoff-Fritten**

Um die Kapazität des Rückhaltevermögens von Bakterien durch die eingesetzten Fritten zu ermitteln, erfolgte zunächst eine Wiederholung der unter 2.6.1.1 (Wechselwirkung von Bakterien mit Kunststoffoberflächen) beschriebenen Verfahrens, wobei die Konzentrationen der eingesetzten Keimsuspensionen in einem Bereich von  $10^1$  bis  $10^8$  KbE/ml variierten. Darüber hinaus wurde untersucht, wie sich hintereinander geschaltete Fritten verhalten. Dazu wurden zweimal je drei Abicap<sup>®</sup>-Säulen wie folgt präpariert (Ansatz A und B). Die erste Abicap<sup>®</sup>-

Säule wurde mit einer, die zweite mit zwei und die dritte Säule mit drei Fritten übereinander bestückt. Dabei wurden die Fritten beim Ansatz A so eingebracht, dass sie bei Säule I einen 5x5 mm, bei Säule II einen 5x10 mm und bei Säule III einen 5x15 mm großen Frittenkörper darstellten. Um feststellen zu können, ob lange Frittenkörper andere Eigenschaften als einzeln, mit Zwischenräumen hintereinander geschaltete Fritten aufweisen (z.B. durch Grenzflächeneffekte beim Ein- und Austritt der Probe aus der Fritte), wurde beim Ansatz B die Anordnung so gewählt, dass zwischen den einzelnen Fritten je ein Abstand von etwa 0,75 mm herrschte. Die beiden Ansätze wurden dann analog der oben beschriebenen Methode mit einer Konzentration von  $10^5$  KbE/ml beschickt und die Wiederfindungsrate im Eluat ermittelt. Als Testorganismus wurde *Listeria monocytogenes* herangezogen, da dieser bei den vorangegangenen Untersuchungen eine relativ geringe Wiederfindungsrate im Eluat aufwies, also starke Wechselwirkungen mit dem Material eingeht.

## **2.6.2 Oberflächenmodifikation von Kunststoff-Fritten**

Um Kunststoff-Fritten kovalent mit Antikörper zu belegen, müssen deren Oberflächen in mehreren aufeinander aufbauenden Stufen modifiziert werden (Oxidation, Silanisierung, Carboxylierung). Als Frittenmaterial wurde der PE 180c Sinterkörper herangezogen. Die Durchführung der Modifikationen erfolgte durch die Arbeitsgruppe Keusgen der Pharmazeutischen Biologie der Universität Bonn.

### **2.6.2.1 Funktionalisierung von Kunststoffoberflächen durch Oxidation**

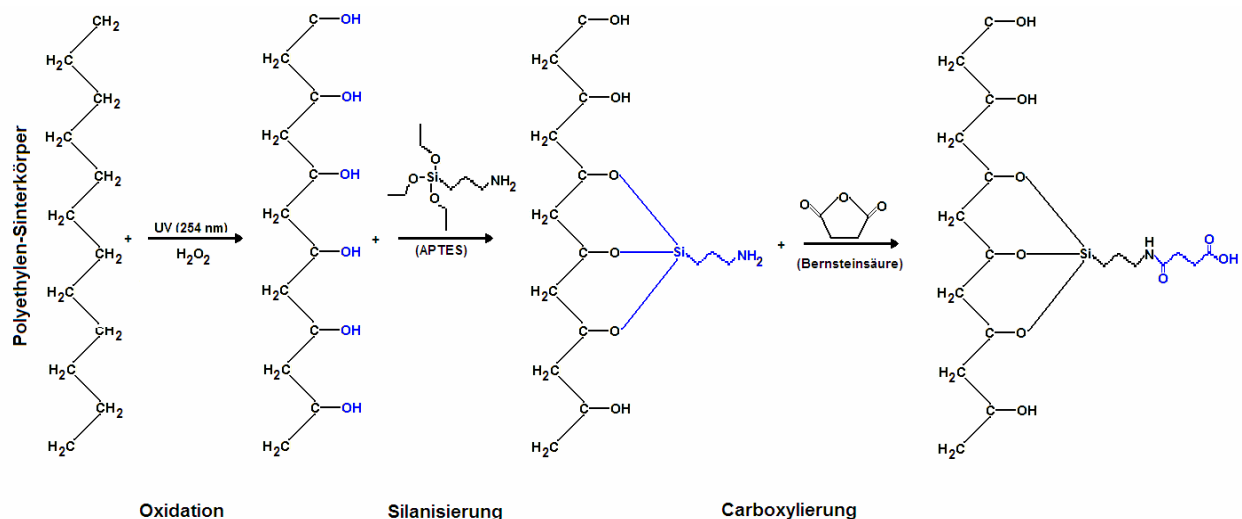
Zur Aktivierung der Kunststoff-Fritten wurden diese zunächst mit Aceton, anschließend mit einem Ethanol/Wasser-Gemisch (Verhältnis 50:50) und nachfolgend mit Wasser (mit NaOH auf pH 8 eingestellt) unter Vakuum im Exsikkator gereinigt und entgast. Die Funktionalisierung erfolgte dann durch eine sechsstündige Behandlung mit 38 %iger  $H_2O_2$ -Lösung (mit NaOH auf pH 8,5 eingestellt) unter Rühren auf einer Petrischale und gleichzeitiger Bestrahlung mit UV-Licht bei 254 nm (siehe Abbildung 2.6). Abschließend wurden die Sinterkörper unter Vakuum im Exsikkator dreimal mit Wasser gewaschen und vier Stunden bei 60 °C im Trockenschrank getrocknet (DEGENER, 2004).

### 2.6.2.2 Funktionalisierung oxidierter Kunststoffoberflächen durch Silanisierung

Zur Vorbereitung der Silanisierung wurde in den oxidierten und getrockneten PE-Sinterkörpern eine wasserdampfgesättigte Atmosphäre erzeugt (im Exsikkator mit Wasserbad durch anlegen eines Vakuums für 30 Minuten). Anschließend erfolgte eine fünfminütige Behandlung der PE-Fritten mit einer 0,5 %igen APTES-Lösung in Aceton (siehe Abbildung 2.6) unter Rühren im Vakuum (Exsikkator), gefolgt durch eine vierstündige Trocknung im Trockenschrank bei 60 °C (DEGENER, 2004).

### 2.6.2.3 Funktionalisierung silanisierter Kunststoffoberflächen durch Carboxylierung

Die Carboxylierung der silanierten PE-Fritten erfolgte durch eine Behandlung mit einer Bernsteinsäure-Lösung (siehe Abbildung 2.6). Dazu wurde 1 g Bernsteinsäureanhydrid mit 25 ml Phosphatpuffer versetzt und mit NaOH auf einen pH-Wert von 6 eingestellt. Diese Lösung wurde mit den silanierten Sinterkörpern in ein Becherglas gegeben und im Exsikkator, unter Anlegen eines Vakuums, für zwölf Stunden zur Reaktion gebracht (DEGENER, 2004). Die so behandelte und modifizierte Oberfläche der PE-Sinterkörper konnte nun zur Immobilisierung von kovalent gebundenen Antikörpern herangezogen werden (siehe Kapitel 2.6.3.3).



**Abbildung 2.6:** Modifikation von Polyethylen-Sinterkörpern des Typs 180c (Oxidation, Silanisierung und Carboxylierung) als Vorbereitung zur kovalenten Bindung von Antikörpern auf Kunststoffoberflächen

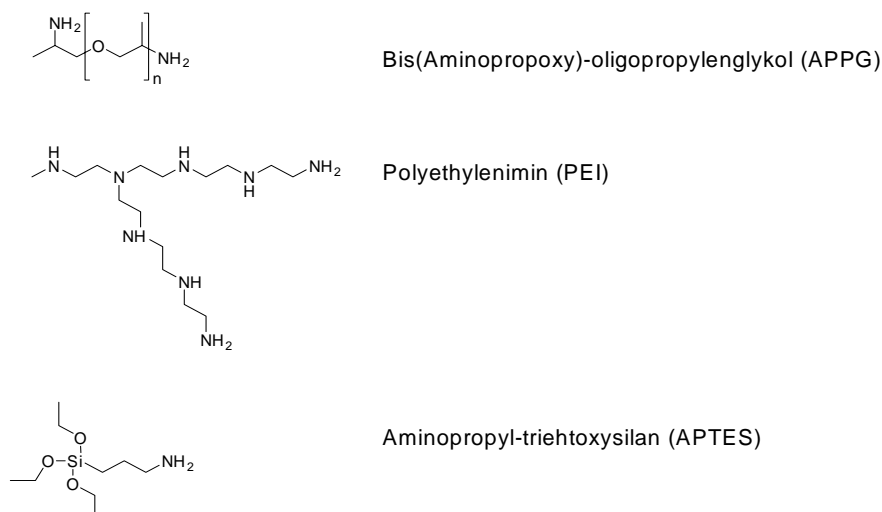


### 2.6.2.4 Wechselwirkungen von Bakterien mit modifizierten Kunststoffoberflächen

Die hier aufgeführte Untersuchung sollte ermitteln, ob die einzelnen Modifikationsstufen Wechselwirkungen mit Bakterien eingehen können. Dazu wurden die einzelnen Fritten aus jedem Modifikationsschritt (siehe Abbildung 2.6 und Abbildung 2.7) mit je zweimal 500 µl 48 %igem Ethanol und je sechsmal mit je 250 µl Ringerlösung im Durchfluss zum Zwecke der Aktivierung gespült. Die weitere Testdurchführung und die Auswahl der Bakterien entsprach der im Kapitel 2.6.1.1 (Wechselwirkungen von Bakterien mit Kunststoffoberflächen) beschriebenen Vorgehensweise.

### 2.6.2.5 Bindekapazität von Amino-Affinitätsmodulen gegenüber *Lactobacillus brevis*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden auch Systeme zur Anreicherung von Verderbnis erregenden Mikroorganismen in Lebensmitteln untersucht. Dazu wurde eine Auswahl von aminomodifizierten Sinter- und Faserkunststoffkörpern (siehe Abbildung 2.7), auf ihre Bindekapazität von Bakterien untersucht. Die Herstellung der modifizierten Fritten erfolgte durch Herrn Dr. Holländer vom Fraunhoferinstitut für Polymerforschung in Golm unter Anlehnung des im Kapitel 2.6.2 beschriebenen Verfahrens (HOLLÄNDER, persönliche Mitteilung 2003). Als Testkeim wurde *Lactobacillus brevis* ausgewählt, welcher insbesondere in der Getränkeindustrie als Verderbniserreger von Bedeutung ist. Um feststellen zu können, welche Aminomodifikation die höchste Bindekapazität gegenüber *Lactobacillus brevis* aufweist, wurde der in Abbildung 2.5 beschriebene Versuchsaufbau zur Untersuchung herangezogen.



**Abbildung 2.7:** Strukturformeln von Aminogruppen zur Modifikation von Kunststoffoberflächen

Neben dem in Abbildung 2.5 beschriebenen Verfahren, sollten die Amino-Affinitätsmodule auch ohne Abicap<sup>®</sup>-Säulen als einzelne Fritten oder Kunststoff-Granulat auf ihre Rückhaltefähigkeit gegenüber Lactobacillen untersucht werden. Dazu wurde aus einer *Lactobacillus brevis* Kultur (Konzentration ca.  $10^9$  KbE/ml) eine Verdünnungsreihe hergestellt, je Verdünnungsstufe 1 ml Probe entnommen und in je ein Eppendorfröhrchen gegeben. Es folgte die Zugabe von je zwei losen Fritten, die für eine Stunde unter Schütteln bei 30 °C im Inkubator in den Lösungen verblieben. Nach der Entnahme der Kunststoffkörper wurde aus den Eppendorfröhrchen 0,5 ml Lösung entnommen, eine dekadische Verdünnungsreihe in Ringerlösung hergestellt und die Keimzahl mit einem Oberflächenverfahren auf MRS-Agar bestimmt. Das modifizierte Kunststoff-Granulat wurde analog untersucht, wobei die Menge an Granulat immer dem jeweiligen Gewicht einer Fritte entsprach (je 49,9 mg/Fritte). Die Nutzung dieses Verfahrens im Rahmen eines Anreicherungssystems für Lactobacillen in flüssigen Lebensmitteln ist im Kapitel 3.8.2 ff. erläutert.

### **2.6.3 Bindung von Antikörpern auf Kunststoff-Fritten**

Herkömmliche Methoden bedienen sich der absorptiven Bindung, um Antikörper auf ein Kunststoffmaterial aufzubringen. In der hier vorliegenden Arbeit fanden zwei dieser Verfahren Anwendung, welche in den beiden folgenden Unterkapiteln beschrieben werden. Darüber hinaus wurde ein vom Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Bonn neu entwickeltes Verfahren eingesetzt, welche es ermöglicht, Antikörper kovalent zu binden.

#### **2.6.3.1 Absorptive Bindung von Antikörpern mittels Batchbeschichtung**

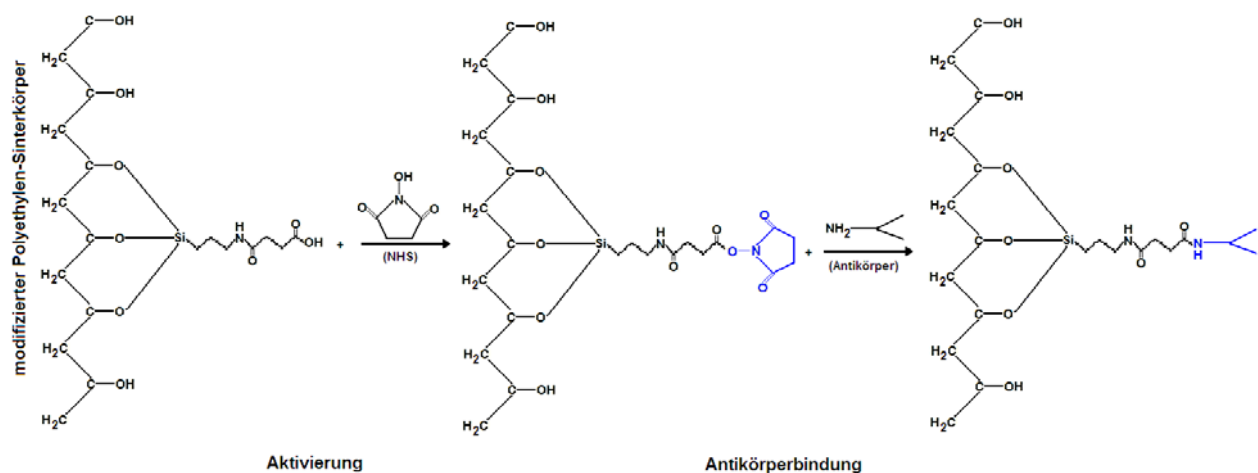
Der Batchbeschichtung muss eine Aktivierung der Kunststoff-Fritte vorgeschaltet werden. Dazu wurden die Fritten in ein Becherglas gegeben, mit 96 %igem Ethanol übergossen und 10 min unter Vakuum im Exsikkator gerührt. Nachfolgend wurde der Ansatz in 50 %igem Ethanol (10 min) bzw. in CBB-Puffer (3 x 10 min) wiederholt. Nun war die Fritte entgast/aktiviert und konnte für das Batch-Verfahren verwendet werden. Zum anschließenden Beschichten wurden die Fritten in ein Falcon-Röhrchen überführt, mit Coating-Lösung B gefüllt und 16 Stunden bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler inkubiert. Dabei lagern sich die Antikörper absorptiv an die Kunststoffoberfläche der Fritten an. Um mögliche freigebliebende Bindungsstellen zu belegen, wurden die Fritten abschließend zunächst zweimal 10 Minuten mit 10 %igem B1-Puffer im Überkopfschüttler gewaschen und dann mit konzentriertem B1-Puffer ebenfalls im Überkopfschüttler 60 Minuten lang geblockt. Die Lagerung der beschichteten Fritten erfolgte in B1-Puffer.

### 2.6.3.2 Absorptive Bindung von Antikörpern mittels Durchflussbeschichtung

Beim Durchflussbeschichten wurden die Kunststoff-Fritten direkt in die Abicap<sup>®</sup>-Säulen eingebracht, die Säulen dann mit Hilfe eines Costarahmens in eine Wanne mit 96 %igem Ethanol eingesetzt und 10 Minuten unter Vakuum im Exsikkator gelagert. Anschließend wurden nacheinander je 500 µl 50 %iges Ethanol, 3 mal 500 µl CBB-Puffer und 750 µl Coating-Lösung D (mit zwanzigminütiger Inkubation) im Durchfluss auf die Säule pipettiert. Um abschließend die noch freigebliebenen Bindungsstellen auf der Fritte zu belegen, wurde diese mit 750 µl Blockpuffer B1 versetzt. Die Lagerung der Fritten erfolgte in einer mit 500 µl B1-Puffer gefüllten und verschlossenen Abicap<sup>®</sup>-Säule bei 4 °C.

### 2.6.3.3 Kovalente Bindung von Antikörpern

Eine Weiterentwicklung der Bindungsverfahren auf Kunststoffmaterialien ist die kovalente Bindung von Antikörpern. Dieses Verfahren soll dafür sorgen, dass im Gegensatz zum absorptiven Verfahren die Antikörper ausgerichtet auf dem Kunststoffträger binden und so eine höhere Binfähigkeit/Kapazität erfolgen soll. Letztendlich ist hierdurch auch eine Ersparnis von Antikörpern zu erwarten. Das in dieser Arbeit verwendete Verfahren zur kovalenten Bindung an den Kunststoff-Fritten wurde von der Arbeitsgruppe Keusgen im Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Bonn entwickelt. Die zur kovalenten Bindung von Antikörpern auf Kunststoffen notwendige Oberflächenmodifikation ist in Kapitel 2.6.2 beschrieben. Die modifizierten Kunststoff-Fritten wurden mit Wasser, Methanol und Dioxan gespült und nachfolgend mit einer N-Hydroxysuccinimidin/Dicyclohexylcarbodiimid-Lösung (NHS/DCC-Lösung) in Dioxan für vier Stunden zur Reaktion gebracht (Aktivierung, siehe Abbildung 2.8). Anschließend wurden die Fritten je zweimal unter Vakuum im Exsikkator in Dioxan, in Methanol und in Wasser gespült und darauffolgend mit der zu immobilisierenden Antikörperlösung (in CBB-Puffer, pH 8,3) versetzt und 2,5 Stunden gerührt (Antikörperbindung, siehe Abbildung 2.8). Die so behandelten Fritten wurden dreimal mit CBB-Puffer (pH 8,3) gespült und abschließend zwölf Stunden mit BSA-Puffer geblockt (Absättigung noch freier Bindungsstellen) (DEGENER, 2004).



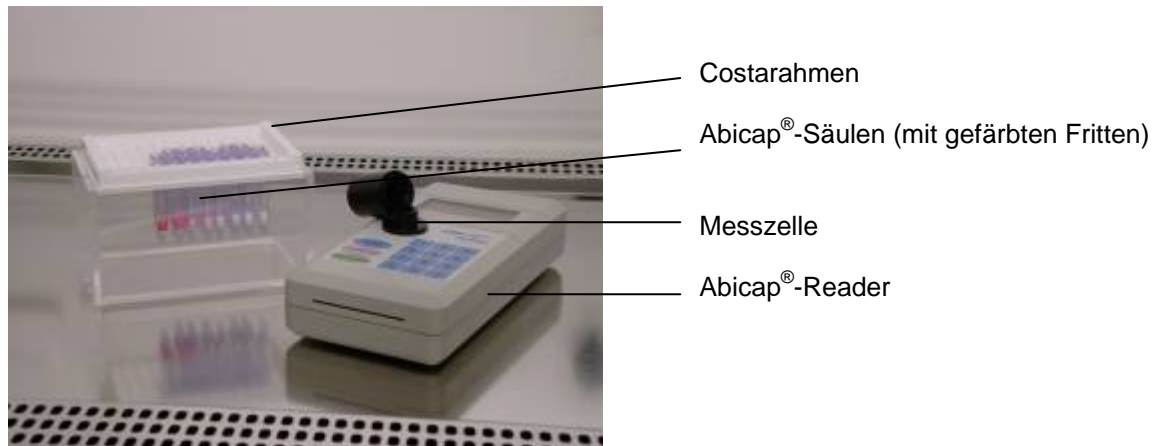
**Abbildung 2.8:** Aktivierung eines modifizierten PE-Sinterkörpers (oxidiert, silanisiert, carboxyliert) und kovalente Bindung von Antikörpern

## 2.7 Immunologische Methoden

### 2.7.1 Nachweis von *Salmonellen* mittels Abicap<sup>®</sup>-RED-Test

Um die Belegung mit *Salmonella*-Antikörpern auf Kunststoff-Fritten zu überprüfen, wurde der so genannte Abicap<sup>®</sup>-RED-Test als Funktionskontrolle eingesetzt. Im Bereich der hier durchgeführten Untersuchung soll überprüft werden, ob ein Nachweisverfahren von *Salmonellen* auf Basis des Abicap<sup>®</sup>-RED-Tests entwickelt werden kann. Die dazu notwendigen Reagenzien werden aus dem ABICAP<sup>®</sup> *Salmonella* RED Kit der Firma Biognosis Highspeed Diagnostics entnommen. Zur Testdurchführung wurden die Polyethylenfritten adsorptiv mit polyklonalen Antikörpern gegen *Salmonella* spp. beschichtet und in Abicap<sup>®</sup>-Säulen eingebracht. Als Untersuchungsgegenstand wurde eine *Salmonella* Enteritidis Suspension verwendet, welche 24 Stunden bei 37 °C in Peptonwasser vorangereichert und dessen Keimzahl, nach Herstellen einer Verdünnungsreihe in Ringerlösung, per Oberflächenverfahren bestimmt wurde. Die einzelnen Verdünnungsstufen wurden dann zur Untersuchung eingesetzt. Die eigentliche Testdurchführung erfolgte als Durchfluss-ELISA und begann mit dem Auftragen von 750 µl Universal-Puffer U3. Es folgte die Aufgabe von 750 µl Keimsuspension (je Verdünnungsstufe), gefolgt von 750 µl anti-*Salmonella*-Biotin-Arbeitssuspension, wobei nach jedem Schritt eine Inkubationszeit von sechs Minuten eingehalten wurde. Anschließend wurden die Fritten mit 500 µl Universal-Puffer U1 gewaschen und mit 500 µl ABICAP<sup>®</sup> RED-Arbeitssuspension versetzt. Nach weiterer sechsminütiger Inkubation wurde die Säule mit 750 µl destilliertem Wasser gespült und eine bei positiven Proben auftretende Rotfärbung, im

Abicap<sup>®</sup>-Reader (siehe Abbildung 2.9) als Optische Dichte (OD) innerhalb von 30 Minuten gemessen. Der genaue Reaktionsmechanismus des für die Rotfärbung verantwortlichen Abicap<sup>®</sup>-Red ist unbekannt bzw. markenrechtlich geschützt, jedoch benötigt es zum Anzeigen eines positiven Befundes keinerlei Enzym- oder Substratreaktion, wodurch eine erhebliche Zeitersparnis möglich ist (BIOGNOSIS, 2000).



**Abbildung 2.9:** Workstation mit Abicap<sup>®</sup>-Säulen und Abicap<sup>®</sup>-Reader

### 2.7.2 Agglutinationstest zum Nachweis einer Antikörper-Antigen-Reaktion

Die Agglutinationsmethode ist ein Schnelltest, welcher Antikörper-Antigen-Reaktionen nachweist. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Verfahren genutzt, um zu überprüfen, ob die für die Entwicklung eines immunologischen Analysenverfahrens verwendeten Antikörper funktionstüchtig sind. Dazu wurde ein Tropfen der zu untersuchenden Antikörperlösung auf einen Objektträger gegeben. Mit einer Impföse ein Teil einer Kolonie eines Bakterienstammes, mit dessen Antigenen der untersuchte Antikörper agieren soll, entnommen und mit dem Tropfen vermischt. Bei einer positiven Reaktion ist nach einigen Sekunden eine Agglutination „leichtes Ausflocken durch Wechselwirkung zwischen Antikörper und Antigen“ feststellbar.

### 3 ERGEBNISSE

Im Rahmen dieser Arbeit wurden gruppenspezifische Untersuchungen mit einer Auswahl von *Clostridium perfringens* Stämmen durchgeführt, dessen Ergebnisse in den Kapiteln 3.1 bis 3.5 dargestellt sind. Darüber hinaus sollte für *Clostridium perfringens* ein immunologisches Analysenverfahren entwickelt werden, welches auch auf andere humanpathogene Bakterien übertragen werden sollte. Die bei der Entwicklung und Charakterisierung dieses Verfahrens ermittelten Ergebnisse sind im Kapitel 3.6 folgende dargestellt.

#### 3.1 Charakterisierung und Identifizierung von *Clostridium perfringens*

Grundvoraussetzung für die Aussagekraft der Charakterisierung einer Spezies ist die sichere Identifizierung der zur Untersuchung herangezogenen Stämme (Tabelle 2.1). Dazu wurde der unter Kapitel 2.3.3 beschriebene Reverse-CAMP-Test und die im Kapitel 2.4.1 aufgeführte PCR als Bestätigungsanalysen herangezogen. Beide Verfahren konnten alle zur Verfügung gestellten Stämme als *Clostridium perfringens* identifizieren.

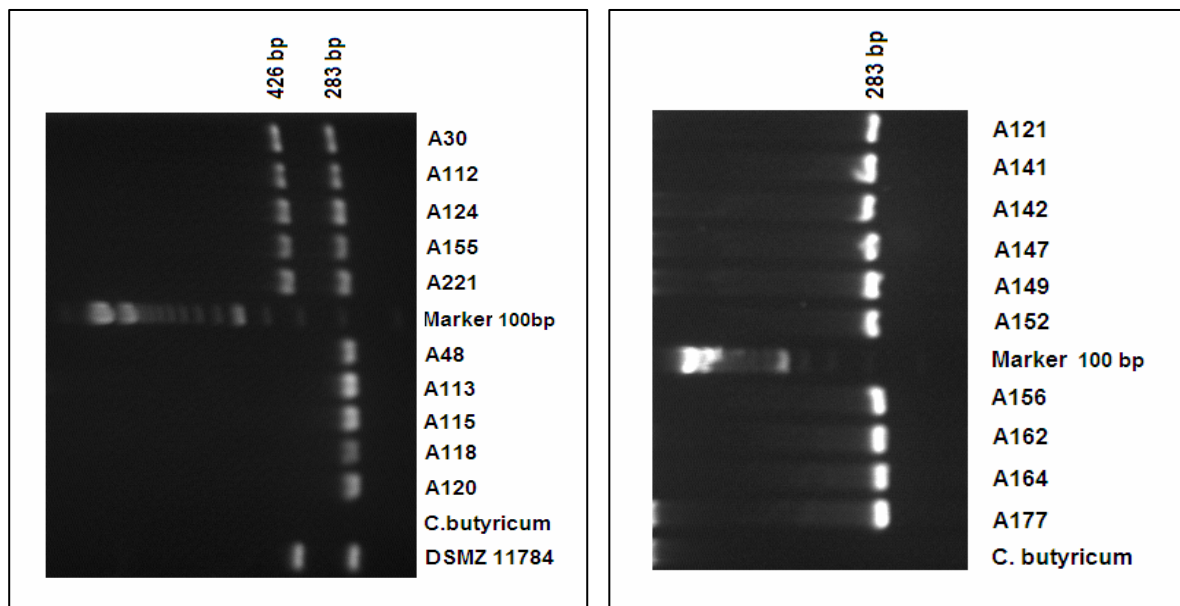
Zur allgemeinen Charakterisierung der herangezogenen *Clostridium perfringens* Stämme wurde dessen Morphologie beschrieben. Die Mikroskopie zeigte, dass es sich bei allen Stämmen um grampositive, plumpe Stäbchen mit einem Durchmesser von ca. 1,5 µm und Zelllänge zwischen 2 und 15 µm handelt. Die in der Literatur (BURGHARDT, 1992) beschriebene mögliche Kapselbildung konnte nur beim Stamm 785 nachgewiesen werden. Die makroskopische Betrachtung ergab, dass alle Stämme auf TS-Agar ein üppiges Wachstum mit viskoser Konsistenz und mild-edelsüßlichem Geruch aufzeigten. Eine Ausnahme stellte das Patientenisolat B6858II dar, welches einen „Pferdestall“-Geruch aufwies. Die gebildeten Kolonien hatten einen Ø von 0,2 bis 1,3 cm mit in der Regel filamentöser bis wurzelförmiger teilweiser aber auch glatter Form mit transparenter, im Zentrum beigefarbener Färbung. Der überwiegende Teil der Kolonien wies eine flach bis knopfförmige Gestalt auf.

#### 3.2 Differenzierung Enterotoxin bildender *Clostridium perfringens* Stämme gegenüber nicht Enterotoxin bildenden Stämmen

Aus Sicht der Lebensmittelmikrobiologie sind die *Clostridium perfringens* Stämme mit Enterotoxinbildungsvermögen von großem Interesse. Die folgenden Kapitel (3.2.1 bis 3.2.4) sollen Untersuchungsergebnisse zur Charakterisierung, Differenzierung und Identifizierung von *Clostridium perfringens* Stämmen mit und ohne Enterotoxinbildungsvermögen darstellen.

### 3.2.1 Molekularbiologische Differenzierung mittels Duplex-PCR

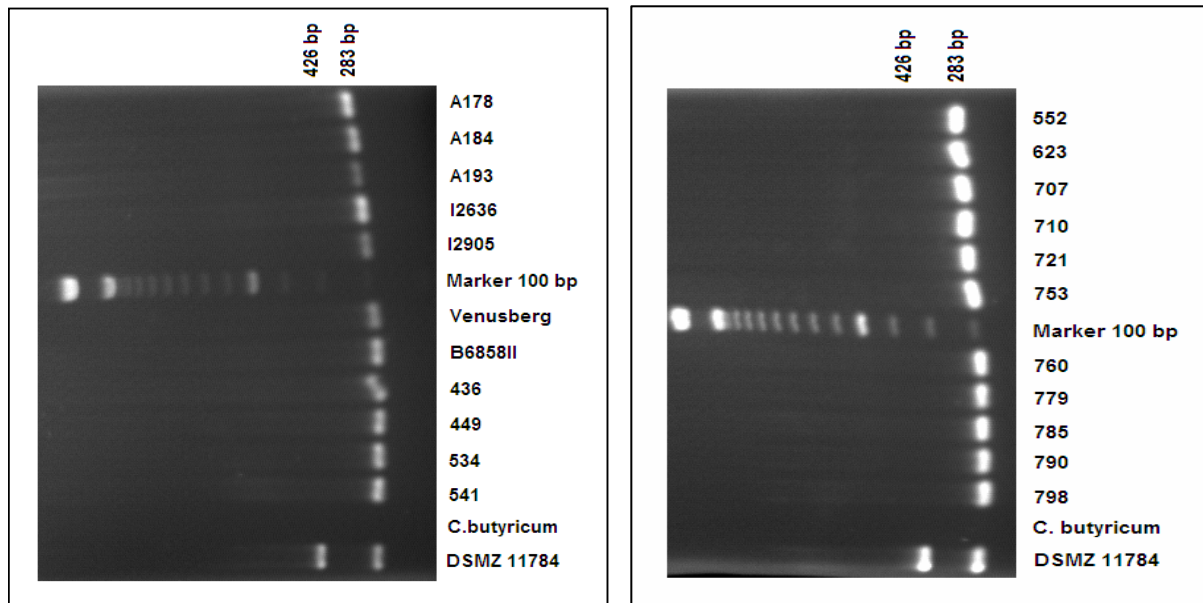
Ein molekularbiologisch, charakteristisches Merkmal von *Clostridium perfringens* ist das Vorhandensein des „Phosphatase Gens“ (plc-Gen). Darüber hinaus besitzen Stämme, die das Enterotoxin bilden können, das sogenannte „*Clostridium perfringens* Enterotoxin Gen“, kurz cpe-Gen (siehe Kapitel 1.1.3 und 1.2.3). In den Abbildungen 3.1 bis 3.3 sind die Ergebnisse dargestellt, die nach einer DNA-Extraktion, einer Duplex-PCR nach FACH und POPOFF (1997) und anschließender gelelektrophoresischer Auftrennung erzielt wurden (Methode siehe Kapitel 2.5.2).



**Abbildung 3.1:** PCR-Produkte von *Clostridium perfringens* Isolatens aus Lebensmitteln (A30 bis A177), (283 bp, plc-Gen, spezifisch für *Clostridium perfringens*) und (426 bp, cpe-Gen, spezifisch für Enterotoxinbildner)

Die in der Abbildung 3.1 dargestellte gelelektrophoresische Auftrennung zeigt die Untersuchung von insgesamt 20 *Clostridium perfringens* Stämmen (A30 bis A177), die aus Lebensmitteln isoliert wurden. Als positiver Vergleichsstandard diente der *Clostridium perfringens* DSMZ 11784 Stamm, welcher das plc- und das cpe-Gen besitzt. Als negativer Standard wurde *Clostridium butyricum* DSMZ 10702 ausgewählt, welcher der gleichen Gattung, nicht aber der Spezies *Clostridium perfringens* angehört. Bei allen hier dargestellten Lebensmittelisolatens konnte das plc-Gen (PCR-Produkt von 283 bp) amplifiziert werden. Unter Betrachtung der positiven und negativen Vergleichsproben konnte hier der Nachweis erbracht werden, dass es sich bei den Isolatens um *Clostridium perfringens* Stämme handelt. Darüber

hinaus konnte bei den Stämmen A30, A112, A124, A155 und A221 das *cpe*-Gen (PCR-Produkt von 426 bp) nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass diese Stämme genetisch in der Lage sind, Enterotoxin zu bilden.

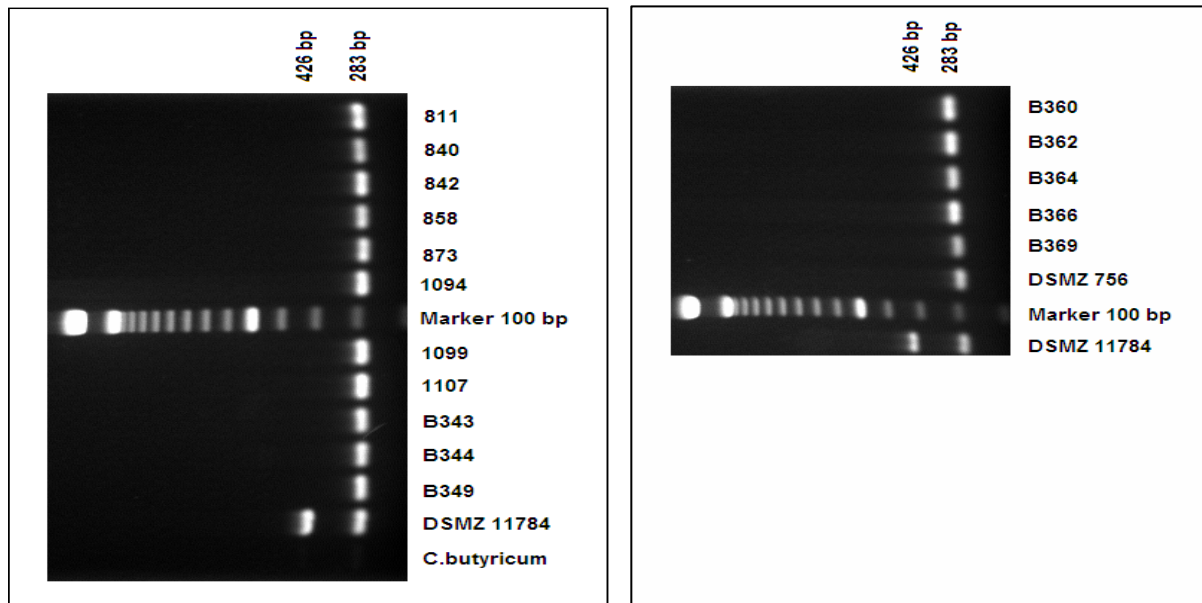


**Abbildung 3.2:** PCR-Produkte von *Clostridium perfringens* Isolaten aus Lebensmitteln (A178 bis I2905) und Patienten (B6858II bis 798) mit dem spezifischen *plc*-Gen (283 bp)

In Abbildung 3.2 sind *Clostridium perfringens* Isolate aus Lebensmitteln (A178 bis I2905) und Patienten (B6858II bis 798) dargestellt. Bei allen Stämmen konnte der Nachweis des *plc*-Gens (Amplifikat von 283 bp) erfolgen, also die Identität, dass es sich um *Clostridium perfringens* Stämme handelt. Keiner dieser Stämme enthielt das *cpe*-Gen, so dass hier bei keinem die genetische Fähigkeit der Enterotoxinbildung vorliegt.

Bei den in der folgenden Abbildung 3.3 aufgeführten PCR-Produkten konnte bei allen dargestellten *Clostridium perfringens* Patientenisolaten (811 bis B369) das *plc*-Gen, nicht jedoch das *cpe*-Gen nachgewiesen werden. Damit konnten diese Stämme als *Clostridium perfringens* ohne genetische Fähigkeit der Enterotoxinbildung identifiziert werden.





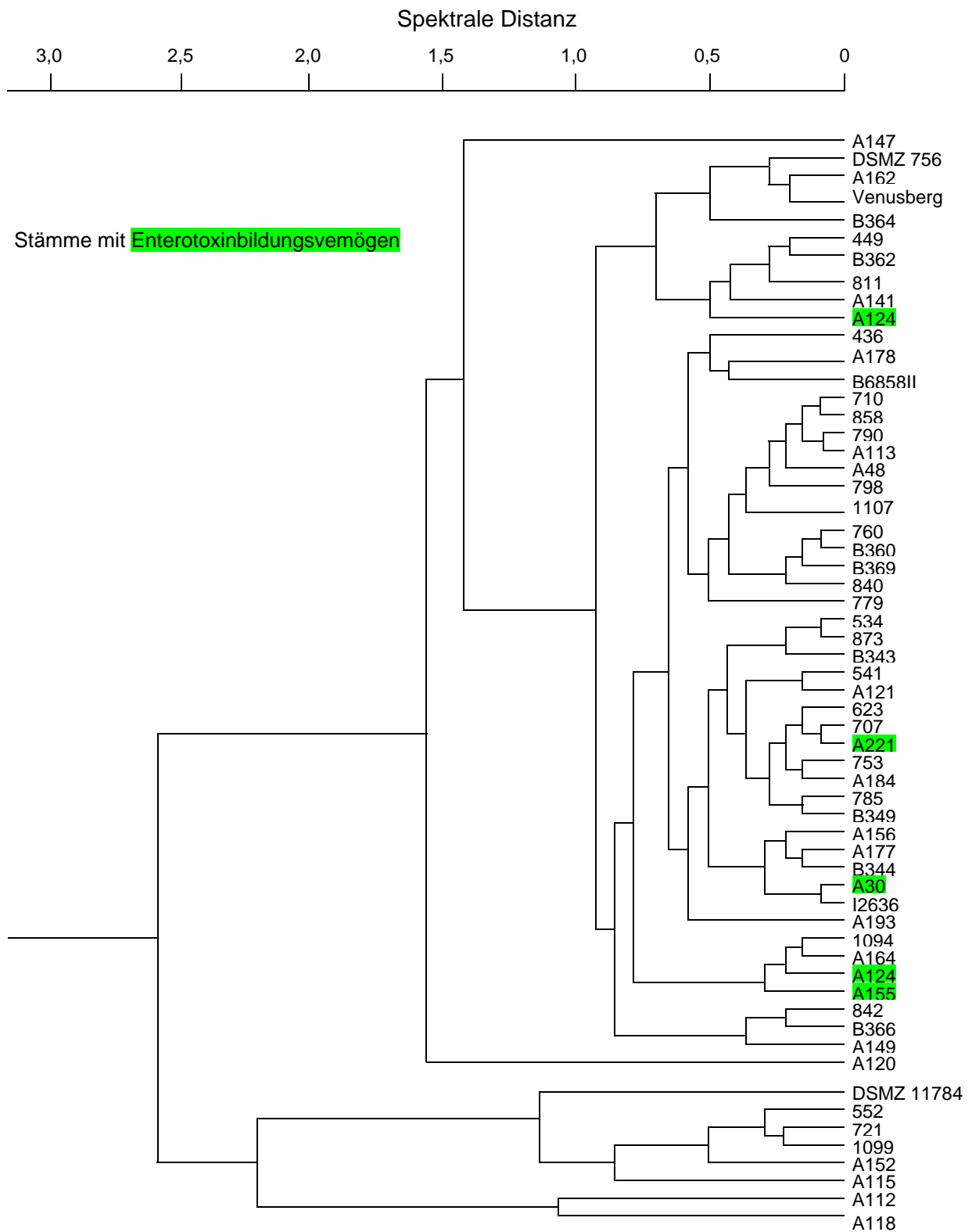
**Abbildung 3.3:** PCR-Produkte von *Clostridium perfringens* Isolaten von Patienten (811 bis B369) mit dem spezifischen plc-Gen (283 bp)

Bei einer Gesamtbetrachtung der hier untersuchten 57 *Clostridium perfringens* Stämme, die aus 25 verschiedenen Lebensmitteln, bzw. 32 Patienten isoliert wurden, konnten bei fünf Stämmen das cpe-Gen nachgewiesen werden. Damit besitzen insgesamt etwa 10 % der hier betrachteten Stämme die genetische Voraussetzung, um das Enterotoxin zu erzeugen. Dabei ist festzuhalten, dass diese fünf Stämme (A30, A112, A124, A155 und A221) ausschließlich aus Lebensmitteln isoliert wurden.

### 3.2.2 Clusteranalyse von FT-IR-Dendrogrammen

Nach der in Kapitel 2.6 beschriebenen Methode wurden FT-IR-Spektren aller zur Verfügung stehenden *Clostridium perfringens* Stämme aufgenommen und diese unter dem Gesichtspunkt möglicher Clusterbildung der Enterotoxin bildenden Stämme betrachtet.

Das in der Abbildung 3.4 dargestellte Dendrogramm zeigt zwei Hauptcluster (Cluster A mit insgesamt 51 Stämmen, Cluster B mit insgesamt 8 Stämmen). Die spektrale Distanz der untersuchten *Clostridium perfringens* Stämme ist mit einem Maximalwert von 2,5 sehr gering. Die Enterotoxin bildenden Stämme sind auf beide Cluster verteilt und zeigten zueinander keine nähere Ähnlichkeit, als zu den anderen Stämmen.



**Abbildung 3.4:** FT-IR-Dendrogramm einer Clusteranalyse von *Clostridium perfringens* unter Herausstellung von Stämmen mit Enterotoxinbildungsvermögen

### 3.2.3 Vergleich der Antibiotikasensitivität Enterotoxin bildender *Clostridium perfringens* Stämme zu nicht Enterotoxin bildenden Stämmen

Um feststellen zu können, ob Enterotoxin bildende Stämme eine andere Widerstandsfähigkeit gegenüber Antibiotika aufweisen als nicht Enterotoxin bildende Stämme, wurden die Minimalen-Hemm-Konzentrationen (MHK) bestimmt. Dazu wurden zwölf verschiedene Antibiotika ausgewählt, von denen unter zu Hilfenahme des Mikronaut-Plattentests (siehe Kapitel 2.4.5.2) die MHK-Werte ermittelt wurden. In den Tabellen 3.1 bis 3.3 werden die zur Hemmung der Enterotoxin bildenden Stämme und den nicht Enterotoxin bildenden Stämmen notwendigen Konzentrationen von Antibiotika aufgeführt und die am häufigsten auftretenden wirksamen Konzentrationen durch Farbhinterlegungen (grün bei Enterotoxinbildnern, schwarz umrandet bei Nicht-Enterotoxinbildnern) herausgestellt. Dabei ist zu beachten, dass die jeweils höchste eingesetzte Konzentration eines Antibiotikums als  $\geq$  und die jeweils niedrigste eingesetzte Konzentration als  $\leq$  angesehen werden muss.

**Tabelle 3.1:** Vergleich der Antibiotikasensitivität (MHK-Werte) von Enterotoxin bildenden *Clostridium perfringens* Stämmen mit nicht Enterotoxin bildenden Stämmen (Zellwandsynthese-Inhibitoren).

Konz. µg/ml	Antibiotika									
	Amoxicillin/ Clavulansäure		Ampicillin		Imipenem		Teicoplanin		Vancomycin	
	Ent.	n.Ent.	Ent.	n.Ent.	Ent.	n.Ent.	Ent.	n.Ent.	Ent.	n.Ent.
≤0,25	5	48	5	49	3	7	5	40	0	0
0,5	0	2	0	1	2	10	0	10	0	0
1	0	0	0	0	0	6	0	1	1	0
2	0	0	0	0	0	18	0	0	4	38
4	0	0	0	0	0	5	0	0	0	12
8	0	0	0	1	0	4	0	0	0	1
16	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1
32/>32	0/0	0/1	0/0	0/1	0/0	0/2	0/0	0/0	0/0	0/2

Ent. = Enterotoxin bildender

n.Ent. = nicht Enterotoxinbildendner

1 = Konzentration konstant 2 µg/ml

Die Penicilline Amoxicillin/Clavulansäure und Ampicillin zeigten gegenüber den untersuchten *Clostridium perfringens* Stämmen vergleichbare MHK-Werte. So konnten alle fünf Enterotoxin bildenden Stämme und 48, bzw. bei Ampicillin 49 der 52 Isolate, ohne Enterotoxinbildungsvermögen bereits bei einer Konzentration von 0,25 µg/ml in ihrem Wachstum gehemmt werden. Die Glykopeptide Teicoplanin und Vancomycin zeigten unterschiedliche Wir-

kungsbereiche. Teicoplanin wirkte bei Enterotoxinbildnern sowie Nicht-Enterotoxinbildnern, ähnlich wie Penicilline, bereits in einem Bereich von 0,25 bis 0,5 µg/ml. Bei Vancomycin hingegen mussten zur Hemmung Konzentrationen zwischen 2 und 4 µg/ml eingesetzt werden. Gegenüber Imipenem zeigten die MHK-Werte von 0,25 bis 32 µg/ml, insbesondere bei den nicht Enterotoxin bildenden Stämmen, eine große Schwankungsbreite auf (siehe Diskussion auf Seite 106/107). Insgesamt betrachtet liegen die MHK-Werte der Enterotoxin bildenden Stämme (mit Ausnahme von Imipenem) im gleichen Bereich wie die der nicht Enterotoxin bildenden Stämme. Die Enterotoxinbildner sind im Vergleich zu den restlichen Isolaten im unteren Bereich der Wirkungsspektren der einzelnen Antibiotika anzusiedeln.

**Tabelle 3.2:** Vergleich der Antibiotikasensitivität (MHK-Werte) von Enterotoxin bildenden *Clostridium perfringens* Stämmen mit nicht Enterotoxin bildenden Stämmen (Proteinsynthese-Inhibitoren).

Konz. µg/ml	Antibiotika							
	Gentamicin		Erythromycin		Doxycyclin		Quinupristin/ Dalfopristin	
	Ent.	n.Ent.	Ent.	n.Ent.	Ent.	n.Ent.	Ent.	n.Ent.
≤0,25	0	0	1	0	5	15	0	0
0,5	0	0	0	0	0	15	0	1
1	0	0	0	0	0	9	3	5
2	0	0	0	3	0	0	2	42
4	0	0	0	1	0	2	0	3
8	0	1	4	35	0	4	0	1
16/>16*	2/3	33/18	0	13	0	1	0	0
32/>32	-	-	0/0	0/0	0/0	5/1	0/0	0/0

Ent. = Enterotoxin bildender      n.Ent. = nicht Enterotoxinbildender      \* = > für Gentamicin

Das Aminoglycosid Gentamicin zeigte mit Ausnahme eines Stammes, der bereits bei 8 µg/ml gehemmt wurde, erst ab Konzentrationen  $\geq 16$  µg/ml hemmende Wirkungen. Erythromycin war im Durchschnitt bei 8 bis 16 µg/ml und Quinupristin/Dalfopristin im Durchschnitt bei 1 bis 2 µg/ml wirksam. Doxycyclin zeigte mit einem Spektrum von 0,25 bis  $\geq 32$  µg/ml, insbesondere bei den Nicht-Enterotoxinbildnern, einen großen Schwankungsbereich auf. Die MHK-Werte der Enterotoxin bildenden Stämme lagen bei einer Gesamtbetrachtung auch hier wieder im unteren Bereich der übrigen Stämme.

**Tabelle 3.3:** Vergleich der Antibiotikasensitivität (MHK-Werte) von Enterotoxin bildenden *Clostridium perfringens* Stämmen mit nicht Enterotoxin bildenden Stämmen (Nukleinsäuresynthese-Inhibitoren).

Konz. µg/ml	Antibiotika					
	Ciprofloxacin		Ofloxacin		Cotrimoxazol	
	Ent.	n.Ent.	Ent.	n.Ent.	Ent.	n.Ent.
≤0,0625	0	0	-	-	-	-
0,125 <sup>#</sup>	0	0	0	0	-	-
0,25	1	1	0	0	-	-
0,5	1	12	0	0	-	-
1 <sup>x</sup>	2	16	2	11	1	0
2	0	15	1	18	0	0
4	0	5	2	17	0	0
8/>8*	1/0	2/1	0/0	5/1	0	0
16	-	-	-	-	0	1
32	-	-	-	-	1	1
64	-	-	-	-	0	0
128/>128	-	-	-	-	1/2	1/49

Ent. = Enterotoxin bildender

n.Ent. = nicht Enterotoxin bildender

# = ≤ bei Ofloxacin

x = ≤ bei Cotrimoxazol

\* = &gt; bei Ciprofloxacin und Ofloxacin

Die ausgewählten Inhibitoren der Nukleinsäuresynthese zeigten bezüglich ihrer Wirksamkeit eine relativ große Schwankungsbreite. Die beiden Chinolone, Ciprofloxacin und Ofloxacin, waren mit einer Ausnahme eines nicht Enterotoxin bildenden Stammes (753) bei allen untersuchten *Clostridium perfringens* Stämmen wirksam. Cotrimoxazol war in den eingesetzten Konzentrationen überwiegend unwirksam gegenüber den untersuchten *Clostridium perfringens* Stämmen, wobei drei der fünf Enterotoxinbildner (60 %) gehemmt wurden und bei den übrigen 52 Stämmen lediglich drei weitere Stämme (6 %) beim eingesetzten Konzentrationsbereich eine Wirkung zeigten.

### 3.2.4 Sporulationsverhalten

Die hier vorliegenden Ergebnisse (siehe Tabelle 3.4) wurden mit der in Kapitel 2.4.6 beschriebenen und nach DIN 38411 und LMBG „L59.00-4“ Vorschrift zum Nachweis für sulfit-reduzierende Clostridien empfohlenen Methode durchgeführt. Bei diesen Untersuchungsvorschriften wird zur Beseitigung störender Begleitorganismen eine Pasteurisation durchgeführt, welche die Clostridien als Sporen überstehen sollen. Die hier durchgeführte Untersuchung

soll klären, ob das unter relativ schwierigen Bedingungen zur Sporulation befähigte *Clostridium perfringens* grundsätzlich nach einer Pasteurisation nachweisbar ist. Dabei sollen insbesondere die Enterotoxin bildenden Stämme betrachtet werden, da sich deren Stoffwechselfvorgänge durch die Produktion des Enterotoxins während der Sporulation von den übrigen Stämmen unterscheiden.

**Tabelle 3.4:** Vergleich des Sporulationsverhaltens von *Clostridium perfringens* Stämmen mit und ohne Enterotoxinbildungsvermögen in DRCM-Bouillon

Anzahl positiv/negativ	Enterotoxinbildner		keine Enterotoxinbildner	
	nicht pasteurisiert	pasteurisiert	nicht pasteurisiert	pasteurisiert
alle positiv	5	5	51	17
1 von 6 negativ	-	-	-	2
2 von 6 negativ	-	-	-	1
3 von 6 negativ	-	-	-	7
4 von 6 negativ	-	-	-	7
5 von 6 negativ	-	-	-	4
6 von 6 negativ	-	-	-	13

Der Nachweis, dass die untersuchten *Clostridium perfringens* Stämme befähigt sind, in DRCM-Bouillon zu sporulieren, angezeigt durch Schwarzfärbung und Gasbildung des pasteurisierten Röhrchens, erfolgte als Dreifachbestimmung. Proben, die bei diesem Ansatz ein oder mehrere negativ bewertete Röhrchen aufzeigten (fehlende Schwarzfärbung und Gasbildung eines Röhrchens), wurden erneut einer Dreifachbestimmung unterzogen. Die Tabelle 3.4 zeigt, dass alle Stämme mit Enterotoxinbildungsvermögen sowohl bei den Pasteurisierten als auch bei den nicht Pasteurisierten jeweils positive Ergebnisse (alle Röhrchen Schwarzfärbung und Gasbildung) aufwiesen. Bei den übrigen 51 untersuchten *Clostridium perfringens* Stämmen konnte durch die Schwarzfärbung der nicht pasteurisierten Röhrchen gezeigt werden, dass alle zu den sulfitreduzierenden Clostridien zählen. Nach der Pasteurisation wiesen jedoch nur noch 17 Stämme (33 %) bei allen Röhrchen einen positiven Nachweis auf. Bei 13 Stämmen (25 %) konnte wegen fehlender Schwarzfärbung aller pasteurisierten Röhrchen kein Sporulationsvermögen nachgewiesen werden. Die restlichen 21 Stämme (40 %) zeigten jeweils zumindest bei einem Röhrchen einen positiven Nachweis. Demnach zeigen die nicht Enterotoxin bildenden Stämme im Durchschnitt eine deutlich geringere Sporulationshäufigkeit bei einer Pasteurisation als Enterotoxin bildende Stämme auf (Interpretation siehe S. 105).

### 3.3 Unterscheidungsmerkmale zwischen *Clostridium perfringens* Stämmen aus Lebensmittel- und Patientenisolaten

Aus klinischer Sicht sind *Clostridium perfringens* Stämme einerseits als Gasbranderreger und andererseits als Lebensmittelvergifter von Interesse. Die in den folgenden Kapiteln aufgeführten Ergebnisse sollen feststellen, ob *Clostridium perfringens* Stämme aus Patientenisolaten gegenüber denen, die aus Lebensmitteln isoliert wurden, signifikante Unterschiede aufweisen.

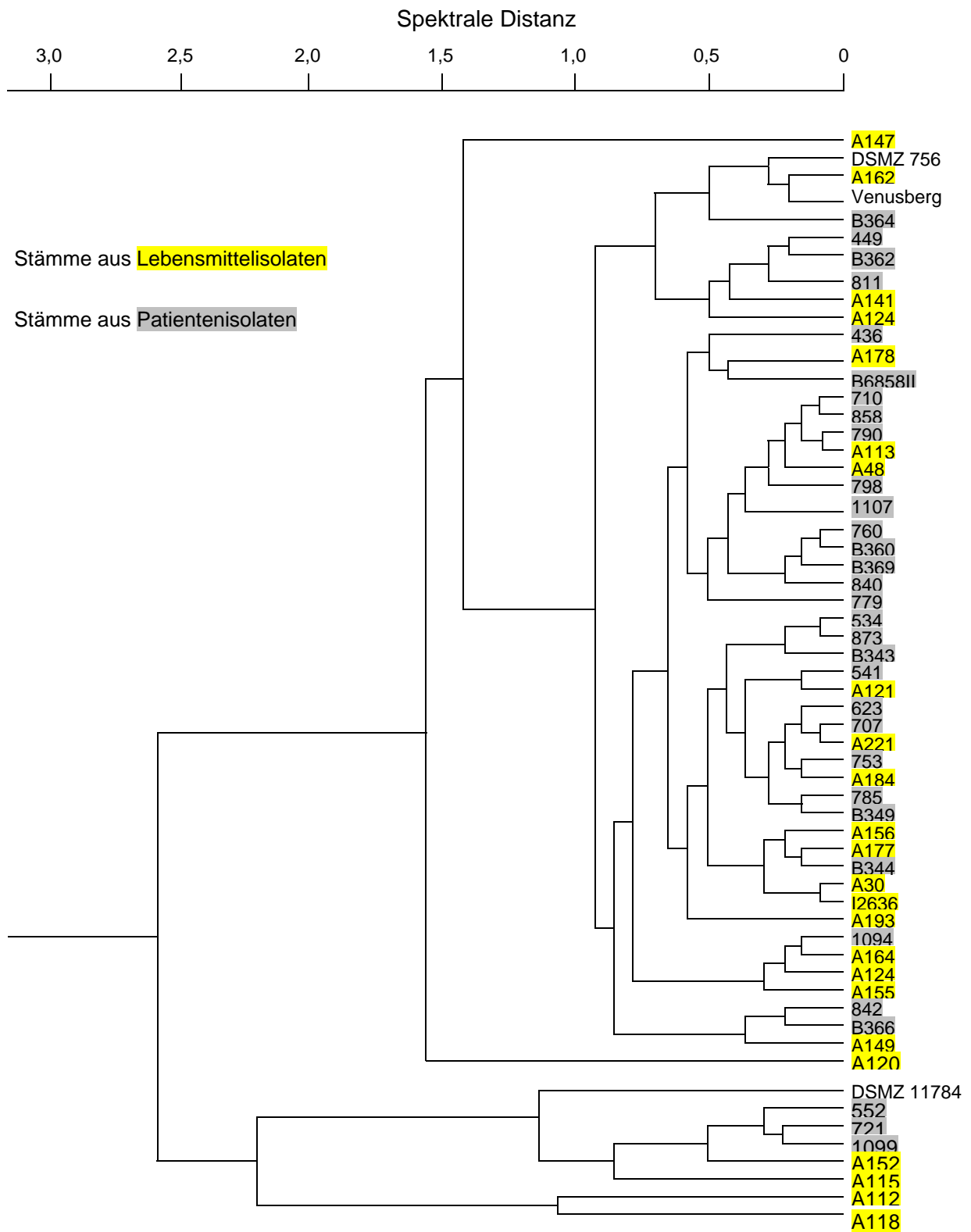
#### 3.3.1 Molekularbiologische Differenzierung mittels Duplex-PCR

Von den insgesamt 57 untersuchten *Clostridium perfringens* Stämmen konnte bei fünf (ca. 10 %) das *cpe*-Gen und somit die genetische Fähigkeit der Enterotoxinbildung nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.1). Diese fünf Stämme wurden alle aus Lebensmitteln isoliert (Bestandteil der in den letzten 25 Jahren isolierten *Clostridium perfringens* Stämme des Zentralen Instituts des Sanitätsdienstes der Bundeswehr in Kiel-Kronshagen). Bei den insgesamt 32 Patientenisolaten konnte bei keinem Stamm das *cpe*-Gen nachgewiesen werden.

#### 3.3.2 Clusteranalyse eines FT-IR-Dendrogramms

Auf Grundlage einer Clusteranalyse von FT-IR-Spektren aller zur Verfügung stehenden *Clostridium perfringens* Stämme sollen Unterschiede zwischen Lebensmittel- und Patientenisolaten herausgearbeitet werden. Dabei sind sich Stämme um so ähnlicher, je geringer die spektrale Distanz ist, bzw. je näher ihre Spektren zueinander liegen. Um mögliche Unterschiede im Dendrogramm zu visualisieren, wurden die aus Lebensmitteln isolierten Stämme gelb und Patientenisolate grau markiert, so dass eine mögliche Clusterbildung direkt erfassbar ist.

Das in Abbildung 3.5 aufgeführte Dendrogramm zeigt auf, dass Lebensmittelisolate gegenüber Patientenisolaten keine signifikanten Unterschiede aufzeigten. Die einzelnen Stämme sind jeweils über das gesamte Haupt- sowie Nebencluster verteilt.



**Abbildung 3.5:** FT-IR-Dendrogramm einer Clusteranalyse von *Clostridium perfringens* unter Gegenüberstellung von Lebensmittel- und Patientenisolaten



### 3.3.3 Antibiotikasensitivität von *Clostridium perfringens* Stämmen aus Lebensmittel- und Patientenisolaten

Die Gegenüberstellung der MHK-Werte soll ermitteln, ob sich der Isolationsort bzw. das Umgebungsmilieu der einzelnen Stämme auf die Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika auswirken. Dazu wurde das im Kapitel 2.4.5.2 beschriebene Verfahren angewendet. In den Tabellen 3.5 bis 3.7 werden die MHK-Werte von Lebensmittelisolaten mit denen von Patientenisolaten verglichen und die am häufigsten auftretenden wirksamen Konzentrationen durch Farbhinterlegungen (gelb bei Lebensmittelisolaten, grau bei Patientenisolaten) herausgestellt.

**Tabelle 3.5:** Vergleich der Antibiotikasensitivität (MHK-Werte) von *Clostridium perfringens* Isolaten aus Lebensmitteln mit Isolaten aus Patienten (Zellwandsynthese-Inhibitoren).

Konz. µg/ml	Antibiotika									
	Amoxicillin/ Clavulansäure		Ampicillin		Imipenem		Teicoplanin		Vancomycin	
	LM	Pat.	LM	Pat.	LM	Pat.	LM	Pat.	LM	Pat.
≤0,25	24	29	24	30	9	1	20	25	0	0
0,5	0	2	0	1	9	3	3	7	0	0
1	0	0	0	0	3	3	1	0	1	0
2	0	0	0	0	3	15	0	0	20	22
4	0	0	0	0	0	5	0	0	3	9
8	0	0	1	0	1	3	0	0	0	1
16	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0
32/>32	0/0	0/1	0/0	0/1	0/0	0/2	0/0	0/0	0/0	0/0

LM = Lebensmittelisolate                      Pat. = Patientenisolate                      1 = Konzentration konstant 2 µg/ml

Die Penicilline, Amoxicillin/Clavulansäure und Ampicillin, sowie das Glykopeptid Teicoplanin waren bei Lebensmittelisolaten sowie auch bei Patientenisolaten überwiegend bereits bei Konzentrationen von 0,25 bis 0,5 µg/ml wirksam, wobei ein Stamm (779) im eingesetzten Konzentrationsbereich nicht durch die Penicilline gehemmt werden konnte. Beim zweiten eingesetzten Glykopeptid Vancomycin waren bei Stämmen aus beiden Isolationsorten durchschnittlich 2 bis 4 µg/ml zur Hemmung notwendig. Unterschiede zeigten sich beim Einsatz von Imipenem. Bei beiden Isolationsgruppen waren große Schwankungsbreiten bezüglich der Wirksamkeit feststellbar. Tendenziell werden Lebensmittelisolate, bei denen Imipenem überwiegend bei 0,25 bis 0,5 µg/ml wirksam war, bei niedrigerer Konzentration als die

Patientenisolate gehemmt, die hauptsächlich im Bereich von 2 bis 4 µg/ml Wirkung zeigten. Darüber hinaus reichte bei zwei Patientenisolaten (552 und 779) der eingesetzte Konzentrationsbereich von Imipenem (bis 32 µg/ml) nicht zur Hemmung des Wachstums aus (siehe Diskussion S. 106/107).

**Tabelle 3.6:** Vergleich der Antibiotikasensitivität (MHK-Werte) von *Clostridium perfringens* Isolaten aus Lebensmitteln mit Isolaten aus Patienten (Proteinsynthese-Inhibitoren).

Konz. µg/ml	Antibiotika							
	Gentamicin		Erythromycin		Doxycyclin		Quinupristin/ Dalfopristin	
	LM	Pat.	LM	Pat.	LM	Pat.	LM	Pat.
≤0,25	0	0	1	0	10	10	0	0
0,5	0	0	0	0	12	3	1	0
1	0	0	0	0	0	9	6	2
2	0	0	2	1	0	0	14	30
4	0	0	0	1	2	0	3	0
8	1	0	15	24	0	4	1	0
16/>16*	8/16	27/5	7	6	1	0	0	0
32/>32	-	-	0	0	0	5/1	0	0

LM = Lebensmittelisolate      Pat. = Patientenisolate      \* = > bei Gentamicin

Bei beiden Isolationsgruppen zeigte Erythromycin bei Konzentrationen zwischen 8 und 16 µg/ml und Quinupristin/Dalfopristin im Bereich von 1 bis 2 µg/ml Wirksamkeit. Beim Gentamicin konnten bei den Lebensmittelisolaten bei 9 Stämmen MHK-Werte von 8 bzw. 16 µg/ml ermittelt werden, 16 Stämme (64 %) hingegen konnten im eingesetzten Konzentrationsbereich (bis 16 µg/ml) nicht gehemmt werden. Bei den untersuchten Patientenisolaten wiesen 27 Stämme (84 %) bei einer Konzentration von 16 µg/ml kein Wachstum mehr auf, wobei 5 Stämme (16 %) Hemmkonzentrationen von >16 µg/ml aufzeigten. Unterschiede ergaben sich auch beim Einsatz von Doxycyclin. Hierbei war festzustellen, dass die Lebensmittelisolate in einem relativ geringen Schwankungsbereich lagen, von 25 Stämmen werden 22 Stämme bei Konzentrationen von 0,25 bis 0,5 µg/ml gehemmt. Patientenisolate wurden ebenfalls überwiegend bei Konzentrationen von 0,25 bis 1 µg/ml (22 von 32 Stämmen) gehemmt, hatten aber auch fünf Isolate (15 %), die erst bei 32 µg/ml Doxycyclin Wirkung zeigten und sogar einem Stamm (760), bei dem die eingesetzten Konzentrationen nicht zur Hemmung ausreichten.

Die in der Tabelle 3.7 dargestellten Chinolone, Ciprofloxacin und Ofloxacin, hemmten bei beiden Isolationsgruppen im gleichen Konzentrationsbereich, wobei insgesamt eine große Schwankungsbreite in der Wirksamkeit (zwischen 0,5 bis 8 µg/ml) auftrat. Bei einem Patientenisolat (753) reichte die eingesetzte Höchstkonzentration von 8 µg/ml weder beim Ciprofloxacin, noch bei Ofloxacin zur Hemmung des Stammes aus. Cotrimoxazol zeigte sich, mit Ausnahme von fünf Lebensmittelstämmen und einem Patientenisolat, bei Konzentrationen bis 128 µg/ml als unwirksam.

**Tabelle 3.7:** Vergleich der Antibiotikasensitivität (MHK-Werte) von *Clostridium perfringens* Isolaten aus Lebensmitteln mit Isolaten aus Patienten (Nukleinsäuresynthese-Inhibitoren).

Konz. µg/ml	Antibiotika					
	Ciprofloxacin		Ofloxacin		Cotrimoxazol	
	LM	Pat.	LM	Pat.	LM	Pat.
≤0,0625	0	0	-	-	-	-
0,125 <sup>#</sup>	0	0	0	0	-	-
0,25	2	0	0	0	-	-
0,5	8	5	0	0	-	-
1 <sup>x</sup>	4	14	11	2	1	0
2	5	10	4	15	0	0
4	3	2	6	13	0	0
8/>8*	3/0	0/1	4/0	1/1	0	0
16	-	-	-	-	1	0
32	-	-	-	-	2	0
64	-	-	-	-	0	0
128/>128	-	-	-	-	1/20	1/31

LM = Lebensmittelisolate

Pat. = Patientenisolate

# = ≤ bei Ofloxacin

x = ≤ bei Cotrimoxazol

\* = > bei Ciprofloxacin und Ofloxacin

### 3.3.4 Sporulationsverhalten

Bei den hier dargestellten Ergebnissen soll geklärt werden, ob sich das Sporulationsverhalten von *Clostridium perfringens* Stämmen aus Lebensmitteln gegenüber Patientenisolaten unterscheidet. Dazu wurde die in Kapitel 2.4.6 beschriebenen Methoden herangezogen und die Ergebnisse der Patienten- mit denen der Lebensmittelisolate verglichen (Tabelle 3.8).

Bei den Lebensmittelisolaten konnten dabei 9 von 25 Stämmen (36 %) bei allen pasteurisierten Röhrrchen einen positiven Nachweis aufzeigen. Bei drei Proben (12 %) konnte hingegen keine Sporulation in DRCM-Bouillon nachgewiesen werden (alle pasteurisierten Röhrrchen

negativ). Die restlichen 13 untersuchten Lebensmittelisolate (52 %) hatten zwei bis fünf von sechs pasteurisierten Röhrcchen als negativ bewertet. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei den Patientenisolaten. Hier konnten zwölf Stämme (38 %) bei allen pasteurisierten Röhrcchen einen positiven Nachweis erbringen. Die Anzahl der nach der Pasteurisation nicht mehr nachweisbaren Stämme ist hier jedoch mit zehn Stämmen (31 %) nahezu dreimal höher als bei den Lebensmittelisolaten. Die übrigen zehn Patientenproben (31 %) zeigten bei eins bis fünf von sechs pasteurisierten Röhrcchen einen negativen Befund (siehe auch S. 107/108).

**Tabelle 3.8:** Vergleich des Sporulationsverhaltens von *Clostridium perfringens* Isolaten aus Lebensmitteln gegenüber Patientenisolaten in DRCM-Bouillon

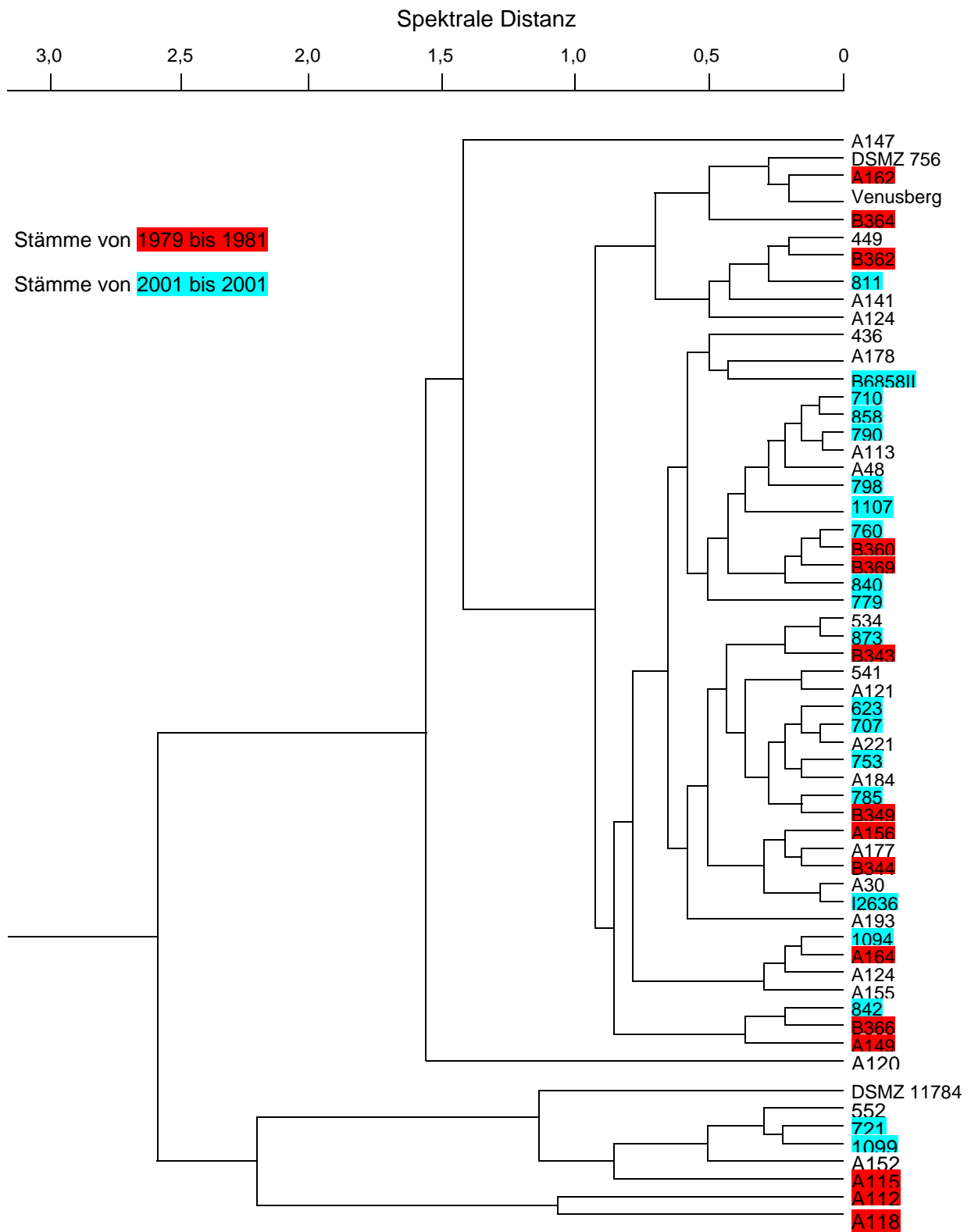
Anzahl positiv/negativ	Lebensmittelisolate		Patientenisolate	
	nicht pasteurisiert	pasteurisiert	nicht pasteurisiert	pasteurisiert
alle positiv	25	9	32	12
1 von 6 negativ	-	-	-	2
2 von 6 negativ	-	1	-	1
3 von 6 negativ	-	6	-	1
4 von 6 negativ	-	4	-	3
5 von 6 negativ	-	2	-	3
6 von 6 negativ	-	3	-	10

### 3.4 Charakterisierung von *Clostridium perfringens* Stämmen verschiedenen Ursprungs

In den folgenden Unterkapiteln werden Ergebnisse von *Clostridium perfringens* Stämmen betrachtet, die in den letzten 25 Jahren isoliert wurden. Dazu erfolgte ein Vergleich der Eigenschaften von Stämmen die zwischen 1979 bis 1981 (16 Stämme) und solchen die ab 2001 bis 2003 (21 Stämme) isoliert wurden.

#### 3.4.1 Clusteranalyse in einem FT-IR-Dendrogramm

In diesem Kapitel wurden die bereits unter den Punkten 3.2.2 und 3.3.2 verwendeten und mit dem in Kapitel 2.6 beschriebenen Verfahren ermittelten Ergebnisse herangezogen und unter dem Gesichtspunkt des Isolationszeitraumes miteinander verglichen. Dazu wurden bei dem in Abbildung 3.6 dargestellten Dendrogramm die *Clostridium perfringens* Isolate zwischen 1979 bis 1981 mit roter Farbe hinterlegt und Stämme ab dem Isolationsjahr 2001 bis 2003 mit blau markiert.



**Abbildung 3.6:** FT-IR-Dendrogramm einer Clusteranalyse von *Clostridium perfringens* unter Herausstellung von Isolaten bis 1981 und ab 2001

Bei der Clusteranalyse konnte festgestellt werden, dass keine Zusammenlagerungen von *Clostridium perfringens* Isolaten bis 1981 gegenüber denen ab 2001 feststellbar waren. Beide Messreihen verteilten sich auf die beiden Cluster bzw. über das gesamte Dendrogramm.

### 3.4.2 Antibiotikasensitivität bei einer Auswahl von *Clostridium perfringens* Isolaten verschiedenen Ursprungs

Die Unterscheidung der MHK-Werte von Stämmen, die bis 1981 isoliert wurden, gegenüber Stämmen, die ab 2001 isoliert wurden, soll feststellen, ob der in den letzten 25 Jahren der gestiegene Einsatz von Antibiotika eine Auswirkung auf das Resistenzverhalten der Spezies *Clostridium perfringens* zur Folge hatte. Zur Bestimmung der MHK-Werte wird die standardisierte Mikrodilution-Methode gemäß Kapitel 2.4.5.2 herangezogen. Die am häufigsten auftretenden wirksamen Konzentrationen wurden bei Stämmen, die bis 1981 isoliert wurden, rot und bei Stämmen ab 2001 blau hinterlegt.

**Tabelle 3.9:** Vergleich der Antibiotikasensitivität (MHK-Werte) von *Clostridium perfringens* Stämmen unterschiedlicher Isolationszeiträume (1979-1981 mit 2001-2003), (Zellwandsynthese-Inhibitoren).

Konz. µg/ml	Antibiotika									
	Amoxicillin/ Clavulansäure		Ampicillin		Imipenem		Teicoplanin		Vancomycin	
	79-81	01-03	79-81	01-03	79-81	01-03	79-81	01-03	79-81	01-03
≤0,25	15	18	15	19	4	2	13	15	0	0
0,5	0	2	0	1	2	1	2	6	0	0
1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0
2	0	0	0	0	9	7	0	0	11	14
4	0	0	0	0	0	4	0	0	4	6
8	0	0	1	0	1	3	0	0	0	1
16	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0
32/>32	0/0	0/1	0/0	0/1	0/0	0/1	0/0	0/0	0/0	0/0

79-81 = Isolate von 1979-1981      01-03 = Isolate von 2001-2003      1 = Konzentration konstant 2 µg/ml

Beim überwiegenden Anteil an Stämmen zeigten Amoxicillin/Clavulansäure, Ampicillin und Teicoplanin bereits bei Konzentrationen von 0,25 bis 0,5 µg/ml Wirkung. Bei Vancomycin und Imipenem lag der Hauptwirkungsbereich bei 2 bis 4 µg/ml. Die ab 2001 isolierten *Clostridium perfringens* Stämme zeigten bei den Zellwandsynthese-Inhibitoren keine signifi-

kanten Unterschiede gegenüber den Stämmen, die bis 1981 isoliert wurden. Lediglich Imipenem wies bei den jüngeren Stämmen eine etwas breitere Streuung auf, als bei Stämmen, die bis 1981 isoliert wurden (siehe auch S. 106/107).

**Tabelle 3.10:** Vergleich der Antibiotikasensitivität (MHK-Werte) von *Clostridium perfringens* Stämmen unterschiedlicher Isolationszeiträume (1979-1981 mit 2001-2003), (Proteinsynthese-Inhibitoren).

Konz. µg/ml	Antibiotika							
	Gentamicin		Erythromycin		Doxycyclin		Quinupristin/ Dalfopristin	
	79-81	01-03	79-81	01-03	79-81	01-03	79-81	01-03
≤0,25	0	0	0	0	7	5	0	0
0,5	0	0	0	0	3	5	0	0
1	0	0	0	0	1	5	5	0
2	0	0	2	1	0	0	10	20
4	0	0	0	1	2	0	0	1
8	0	1	12	13	0	3	1	0
16/>16*	9/7	17/3	2	6	0	0	0	0
32	-	-	0/0	0/0	3/0	2/1	0/0	0/0

79-81 = Isolate von 1979-1981

01-03 = Isolate von 2001-2003

\* = > bei Gentamicin

Die Hemmkonzentrationen bei den Proteinsynthese-Inhibitoren lagen bei allen hier im Vergleich stehenden Isolaten im gleichen Bereich. Vereinzelt waren beim Einsatz von Quinopristin/Dalfopristin und auch bei Erythromycin für Stämme mit Isolationszeitraum 2001 bis 2003 im Mittel höhere Konzentrationen zur Hemmung notwendig, jedoch nicht in einem signifikant zu manifestierbaren Bereich.

Die Hemmkonzentrationen der Nukleinsäuresynthese-Inhibitoren (siehe Tabelle 3.11) lagen bei Ciprofloxacin mit durchschnittlich 0,5 bis 2 µg/ml gegenüber 1 bis 2 µg/ml, bei Ofloxacin mit überwiegend 1 bis 4 µg/ml bzw. 2 bis 4 µg/ml und bei Cotrimoxazol  $\geq 128$  µg/ml, bei denen zum Vergleich herangezogenen Stämmen im gleichen Bereich. Analog des Einsatzes der Proteinsynthese-Inhibitoren waren im Mittel die notwendigen Antibiotikakonzentrationen beim Einsatz der Chinolone (Ciprofloxacin und Ofloxacin) bei Isolaten ab 2001 geringfügig höher, jedoch wiederum nicht in einem signifikant zu unterscheidenden Ausmaß.

**Tabelle 3.11:** Vergleich der Antibiotikasensitivität (MHK-Werte) von *Clostridium perfringens* Stämmen unterschiedlicher Isolationszeiträume (1979-1981 mit 2001-2003), (Nukleinsäuresynthese-Inhibitoren).

Konz.	Antibiotika					
	Ciprofloxacin		Ofloxacin		Cotrimoxazol	
	79-81	01-03	79-81	01-03	79-81	01-03
µg/ml						
≤0,0625	0	0	-	-	-	-
0,125 <sup>#</sup>	0	0	0	0	-	-
0,25	1	0	0	0	-	-
0,5	6	3	0	0	-	-
1 <sup>x</sup>	4	7	8	0	0	0
2	4	7	3	9	0	0
4	1	3	5	10	0	0
8/>8*	0/0	0/1	0/0	1/1	0	0
16	-	-	-	-	0	1
32	-	-	-	-	1	0
64	-	-	-	-	0	0
128/>128	-	-	-	-	0/14	0/20

79-81 = Isolate von 1979-1981

01-03 = Isolate von 2001-2003

# = ≤ bei Ofloxacin

x = ≤ bei Cotrimoxazol

\* = &gt; bei Ciprofloxacin und Ofloxacin

### 3.4.3 Sporulationsverhalten

Um zu untersuchen, ob sich das Sporulationsverhalten in DRCM-Bouillon, der in den letzten 25 Jahren isolierten *Clostridium perfringens* Stämme verändert hat, wurde analog der in Kapitel 3.2.6 beschriebenen Vorgehensweise verfahren. Dazu wurden die Daten, die mit der in Kapitel 2.4.6 beschriebenen Methode für alle zur Verfügung stehenden *Clostridium perfringens* Stämmen bestimmt wurden, in der Tabelle 3.12 unter dem Gesichtspunkt der in Kapitel 3.4 beschriebenen Populationsauswahl (Isolate zwischen 1979 und 1981 bzw. 2001 bis 2003) miteinander verglichen.

Bei den insgesamt 16 Stämmen, die zwischen 1979 und 1981 isoliert wurden, konnte bei acht Stämmen (50 %) bei allen eingesetzten pasteurisierten Röhrcchen ein positiver Nachweis (Schwarzfärbung und Gasbildung) erfolgen. Bei zwei Isolaten konnte keine Sporulation in DRCM-Bouillon (alle pasteurisierten Röhrcchen negativ) nachgewiesen werden und bei den übrigen sechs Stämmen konnte zumindest bei einem pasteurisierten Röhrcchen ein positiver Nachweis erbracht werden. Bei der Population von 2001 bis 2003 wurden insgesamt 21 Isolate untersucht, wobei sieben dieser Stämme (30 %) bei allen pasteurisierten Röhrcchen ei-



nen positiven Nachweis anzeigten. Genauso viele Stämme (30 %) konnten jedoch nicht in DRCM-Bouillon sporulieren. Die restlichen Stämme (60 %) zeigten analog der Population zwischen 1979 und 1981 bei mindestens einem pasteurisierten Röhrchen eine Schwarzfärbung und Gasbildung (siehe auch S. 107/108).

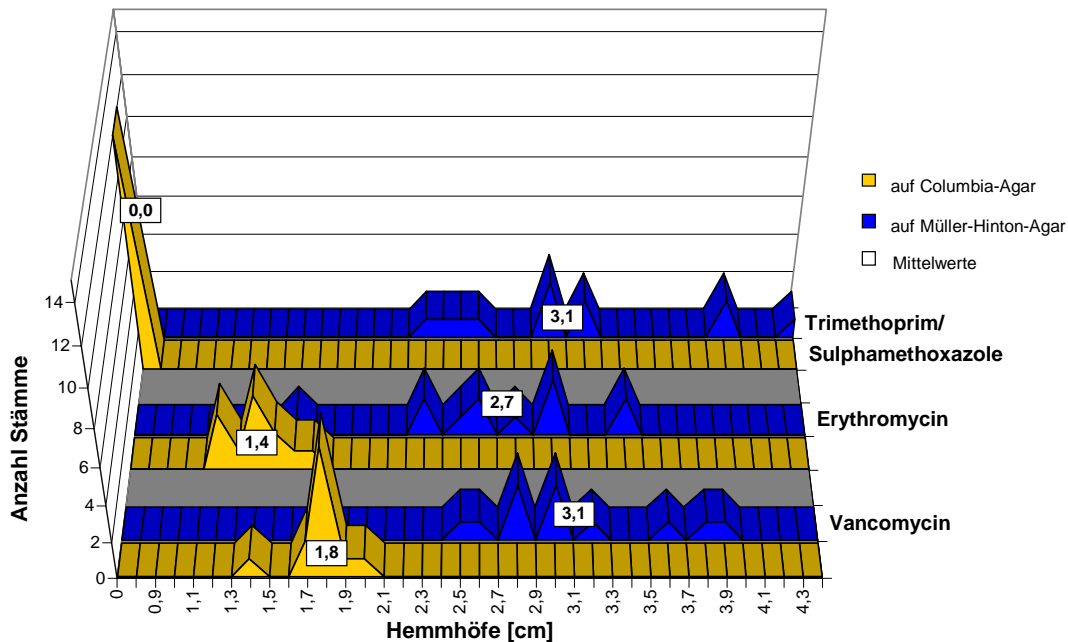
**Tabelle 3.12:** Vergleich des Sporulationsverhaltens und des Nachweises von *Clostridium perfringens* Isolaten bis 1981 gegenüber Isolaten ab 2001 in DRCM-Bouillon

Anzahl positiv/negativ	Isolate von 1979 bis 1981		Isolate von 2001 bis 2003	
	nicht pasteurisiert	pasteurisiert	nicht pasteurisiert	pasteurisiert
alle positiv	16	8	21	7
1 von 6 negativ	-	1	-	1
2 von 6 negativ	-	1	-	1
3 von 6 negativ	-	2	-	1
4 von 6 negativ	-	1	-	3
5 von 6 negativ	-	1	-	1
6 von 6 negativ	-	2	-	7

### 3.5 Einfluss verschiedener Nährmedien auf den Antibiotika-Sensitivitätstest (Agardiffusionstest)

In der Literatur werden für den Agardiffusionstest unterschiedliche Nährmedien verwendet. In diesem Kapitel sollen die am häufigsten empfohlenen Medien, der Müller-Hinton-Agar und der Columbia-Agar, miteinander verglichen werden. Ziel ist es, festzustellen, in wieweit die unterschiedlichen Nährmedien Einfluss auf die Ausbildung der Hemmhöfe haben. Dazu wurde die in Kapitel 2.3.4.1 beschriebene Methode herangezogen und die entstandenen Hemmhöfe miteinander verglichen. In der Abbildung 3.7 sind die ermittelten Hemmhöfe auf Müller-Hinton- bzw. Columbia-Agar einer Auswahl von zwölf *Clostridium perfringens* Stämmen durch drei verschiedene Antibiotikablättchen gegenübergestellt. Bei den eingesetzten Antibiotika handelt es sich je um einen Inhibitoren der Zellwandsynthese (Vancomycin), der Proteinsynthese (Erythromycin) und der Nukleinsäuresynthese (Trimethoprim/Sulphamethoxazol).

### Vergleich der Hemmhöfe auf Müller-Hinton- und Columbia-Agar



**Abbildung 3.7:** Gegenüberstellung der Ausbildung von Hemmhöfen einer Auswahl von *Clostridium perfringens* Stämmen bei der Verwendung unterschiedlicher Anzuchtmedien (Müller-Hinton-Agar/Columbia-Agar)

Beim Einsatz von Vancomycin und Erythromycin waren die Mittelwerte bei Verwendung von Müller-Hinton-Agar durchschnittlich um 1,3 cm größer. Darüber hinaus erschien die Streubreite gegenüber den auf Columbia-Agar entstandenen Hemmhöfen höher. Beim Einsatz der Nukleinsäuresynthese-Inhibitoren Trimethoprim/Sulphamethoxazole zeigte sich, dass das Wachstum von *Clostridium perfringens* bei Anzucht auf Müller-Hinton-Medium gehemmt werden konnte. Im Gegensatz dazu konnten auf Columbia-Agar keine Hemmhöfe festgestellt werden. Insgesamt zeigt die in Abbildung 3.7 aufgeführte Auswahl, dass *Clostridium perfringens* Stämme auf Müller-Hinton-Agar stärker gehemmt wurden als auf Columbia-Agar, wobei bei einer Einzelbetrachtung der jeweiligen Stämme dies nicht ausschließlich zutraf (teilweise waren Hemmhöfe bei einzelnen Stämmen auf Müller-Hinton-Agar kleiner als auf Columbia-Agar).

### **3.6 Charakterisierung unterschiedlicher Trägermaterialien bei der Entwicklung von immunologischen Analysensystemen**

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde ein immunologisches Analysesystem zur Anreicherung und Identifizierung von *Clostridium perfringens* und anderen humanpathogenen Bakterien entwickelt. Dazu wurden Kunststoffkörper als Trägermaterialien für Antikörper verwendet. Zur Überprüfung der Eignung dieser Materialien wurden die in den Kapiteln 2.7.1 und 2.7.2 beschriebenen Untersuchungen durchgeführt, dessen Ergebnisse in den folgenden Kapiteln (3.6.1 bis 3.6.3) dargestellt sind.

#### **3.6.1 Eigenschaften von Trägermaterialien aus Kunststoff**

Zu Beginn der Entwicklung des immunologischen Testsystems wurden die unter 3.6 beschriebenen Kunststoffkörper auf ihre grundlegenden Eigenschaften hin untersucht. Dazu wurde die Wechselwirkung verschiedener Kunststoffe, in unbehandelter und mit Blockpuffern behandelte Form, mit Bakterien überprüft, die Flieseigenschaften flüssiger Proben durch die Faser- und Sinterkörper charakterisiert, der Aufbau der Kunststoffkörper durch elektronenmikroskopische Aufnahmen beschrieben und die absolute Rückhaltefähigkeit der Fritten gegenüber Bakteriensuspensionen bestimmt (siehe Kapitel 3.6.1.1 bis 3.6.1.5).

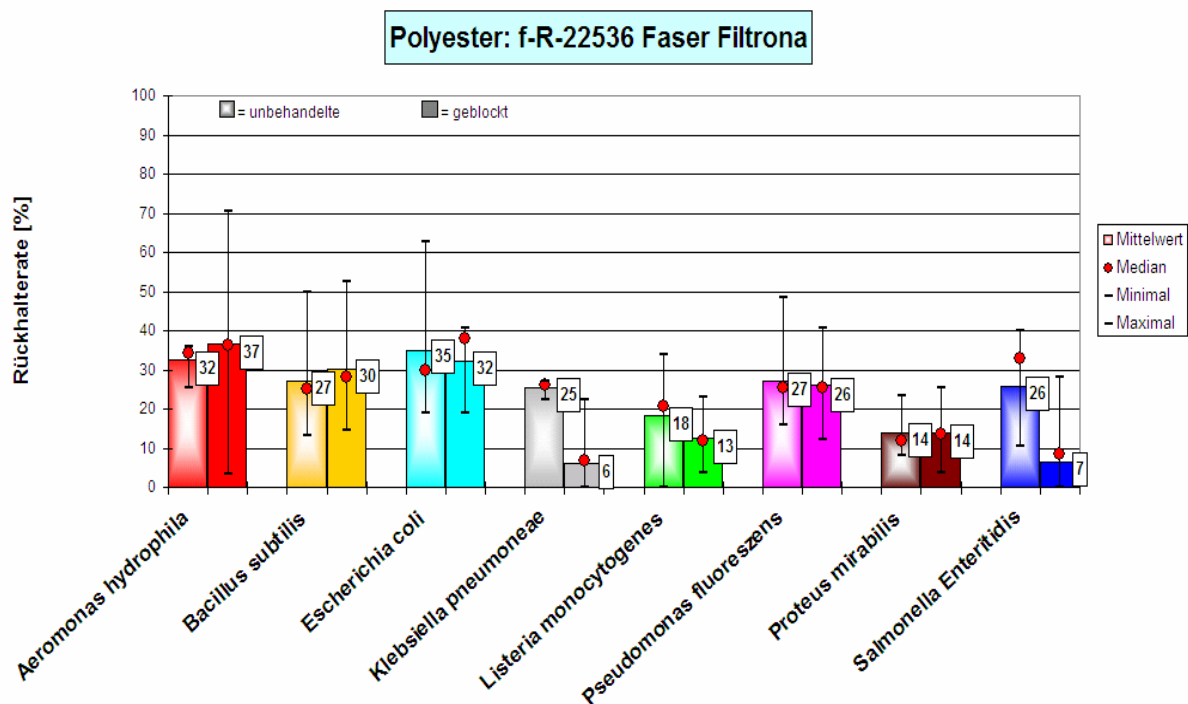
##### **3.6.1.1 Wechselwirkungen von Bakterien mit Kunststoffoberflächen**

Um die Wechselwirkungen von Bakterien mit Kunststoffoberflächen zu ermitteln, wurde das unter 2.6.1.1 beschriebene Verfahren angewendet. Die einzelnen Kunststoffe, welche sich als Sinter- oder Faserkörper in den Abicap<sup>®</sup>-Säulen befanden, wurden dabei mit einer definierten Keimkonzentration ( $\varnothing 10^4$  KbE/g) im Durchfluss beschickt und dessen Wiederfindungsrate im Eluat bestimmt. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden dann Rückschlüsse auf das Rückhaltevermögen bzw. des Verbleibs der eingesetzten Bakterien auf den Kunststoff-Fritten gezogen.

Die Untersuchung ergab, dass Polyester- und die Polyethylenfritten des Typs Porex durch ihre Oberflächenbeschaffenheit ca. 15 bis 35 % der eingesetzten Bakterienstämme zurückhalten. Bei Polyethylen des Typs 180c und bei Polypropylen wiesen die Rückhalteraten mit 41 bis 98 % bzw. 17 bis 83 % eine relativ weite Streuung auf. Eine graphische Darstellung der Ergebnisse ist in den Abbildungen 3.8 bis 3.10 und 3.13 aufgeführt bzw. integriert.

### 3.6.1.2 Einfluss von Blockpuffer auf die Wechselwirkungen zwischen Bakterien und Kunststoffoberflächen

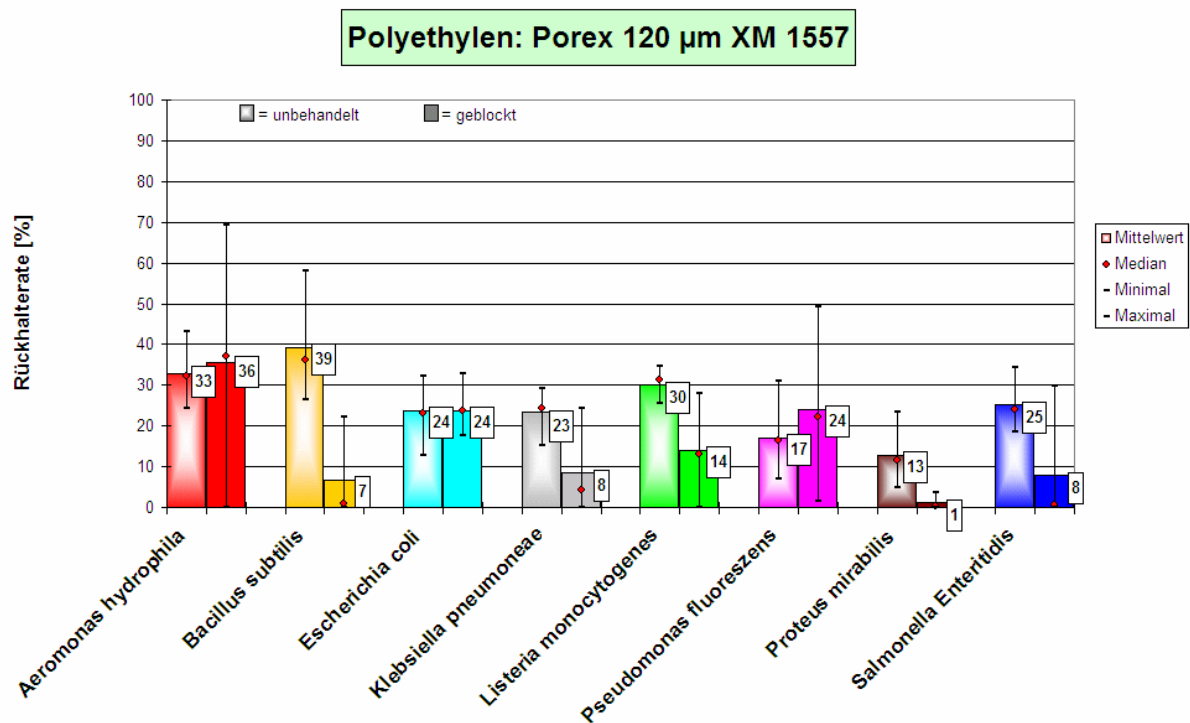
Bei einem spezifischen immunologischen Analysenverfahren sind unspezifische Wechselwirkungen mit den Trägermaterialien unerwünscht. Eine Behandlung der Kunststoff-Fritten mit Blockpuffern (unspezifische Belegung von freien Bindungsstellen durch Pufferzusätze) lässt eine Herabsetzung der Interaktion zwischen den Bakterien und Kunststoffoberflächen erwarten. Um den Einfluss von geblockten Kunststoffkörpern auf die Wechselwirkungen der Bakterien mit dessen Oberflächen zu untersuchen, wurde das unter 2.7.1.1 beschriebene Verfahren mit BSA-Puffer geblockten Sinter- bzw. Faserkörpern wiederholt und mit den Ergebnissen aus 3.7.1.1 in Bezug gesetzt. Als Untersuchungsgegenstand wurde Polyester, Polyethylen Typ Porex und Polypropylen herangezogen.



**Abbildung 3.8:** Vergleich der Rückhalteraten von ausgewählten humanpathogenen Bakterien gegenüber unbehandelten und geblockten Polyesterfritten nach Aufgabe auf eine Abicap®-Säule

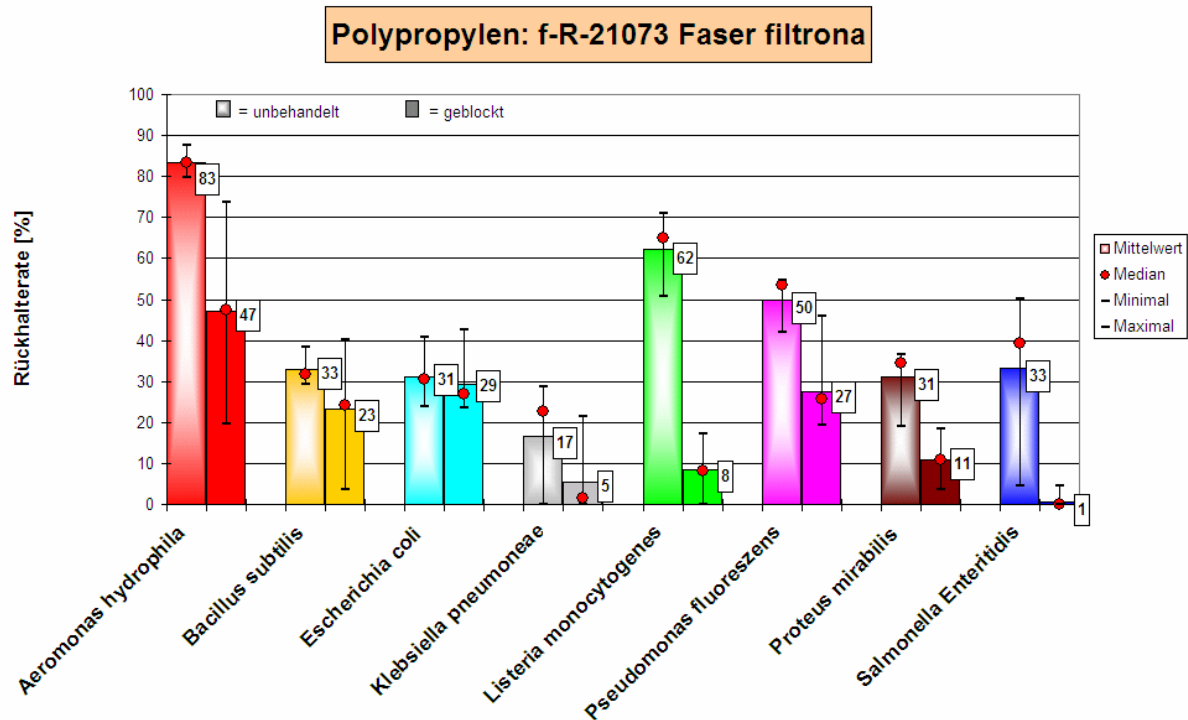
Bei unbehandelten Polyesterfritten wurden Rückhalteraten von ca. 15 bis 35 % festgestellt. Bei geblockten, mit Ausnahme von *Klebsiella pneumoniae* und *Salmonella Enteritidis*, bei denen sich die Wiederfindungsraten im Eluat signifikant um ca. 20 % erhöhten (bestätigt durch Zweistich-Gauss-Test) und die Rückhalteraten nunmehr bei unter 10 % lagen, konnten keine Veränderungen der Wechselwirkungen zwischen dem Polyestermaterial und den ein-

gesetzten Bakterien festgestellt werden. Für die Stämme *Klebsiella pneumoniae* und *Salmonella* Enteritidis bedeutet dies eine deutliche Herabsetzung der Wechselwirkung mit den Polyesterfritten. Es ist jedoch festzuhalten, dass sich die Schwankungsbreite der Rückhalteraten auf das gesamte Keimspektrum insgesamt von ursprünglich 20 % auf nunmehr 30 % erhöht hat.



**Abbildung 3.9:** Vergleich der Rückhalteraten von ausgewählten humanpathogenen Bakterien gegenüber unbehandelten und geblockten Polyethylefritten Typ Porex nach Aufgabe auf eine Abicap®-Säule

Bei dem Polyethylen Typ Porex konnte bei unbehandelten Fritten Rückhalteraten von ca. 15 bis 35 % ermittelt werden. Blocken der Polyethylefritten, Typ Porex, vermindert die Rückhalterate bei fünf der acht getesteten Bakterienstämme um ca. 10 bis 20 %. Dadurch traten bei vier Stämmen Rückhalteraten von unter 10 % auf, wobei bei *Proteus mirabilis* mit 1 % Rückhalterate praktisch keine Wechselwirkungen mehr feststellbar waren. Die Schwankungsbreite der Rückhalteraten wurde in Bezug auf das gesamte eingesetzte Keimspektrum von ursprünglich 20 % auf 35 % in ähnlicher Weise wie bei den Polyesterfritten deutlich erhöht.



**Abbildung 3.10:** Vergleich der Rückhalteraten von ausgewählten humanpathogenen Bakterien gegenüber unbehandelten und geblockten Polypropylenfritten nach Aufgabe auf eine Abicap®-Säule

Die unbehandelten Polypropylenfritten wiesen mit Rückhalteraten zwischen 17 und 83 % eine relativ breite Streuung auf. Das Blocken der Fritten hat das Rückhalteverhalten signifikant geändert. Bei geblockten Polypropylenfritten wurde bei allen eingesetzten Bakterienstämmen, mit Ausnahme von *Escherichia coli* (unverändert), ein Herabsetzen der Rückhalterate von ca. 10 bis 55 % erreicht. Durch das Blocken wurde die starke Streuung der Rückhalteraten deutlich herabgesetzt. Ausgenommen von *Aeromonas hydrophila*, bei dem die Rückhalterate auf ca. 45 % gesenkt wurde, weist dieses Material ähnliche Schwankungsbreiten (0 bis 30 % Rückhalterate) auf wie die anderen Materialien.

### 3.6.1.3 Fließeigenschaften flüssiger Proben durch Kunststoff-Fritten

Bei einem Analyseverfahren auf Durchflussbasis sind die Fließeigenschaften und Durchflussgeschwindigkeiten der Probe von großer Bedeutung. Zum einen geben diese darüber Auskunft, in welchem Zeitraum die zu analysierenden Stoffe (hier Bakterien) mit den Oberflächen der Trägermaterialien Wechselwirkungen eingehen können und darüber hinaus sind gewisse Fließeigenschaften Voraussetzung für eine praktikable Anwendung des Systems. Die Bestimmung der Durchflussgeschwindigkeit erfolgte nach der in Kapitel 2.7.1.2 be-

schriebenen Weise. Die Ergebnisse dieser Untersuchung (siehe Tabelle 3.13), in Verbindung mit den Werten der individuellen Rückhaltevermögen der Materialien (siehe Kapitel 3.6.1.1 und 3.6.1.2), dienen als Grundlage zur Beurteilung der Verwendbarkeit des jeweiligen Frittentyps als Trägermaterial für ein immunologisches Analysenverfahren.

**Tabelle 3.13:** Durchflussgeschwindigkeit flüssiger Proben durch Kunststoff-Fritten

Kunststoff	Behandlung	Durchflussgeschwindigkeit/ml
Polyester: f-R-22536 Faser Filtrona	unbehandelt	Ø 10 sec.
	geblockt	Ø 5 sec.
Polyethylen: Typ Porex 120 µm XM1557	unbehandelt	Ø 60 sec.
	geblockt	90 bis 170 sec.
Polyethylen: Typ 180c	unbehandelt	Ø 320 sec.
	geblockt	Ø 70 sec.
Polypropylen: f-R-21073 Faser Filtrona	unbehandelt	Ø 70 sec.
	geblockt	Ø 70 sec.

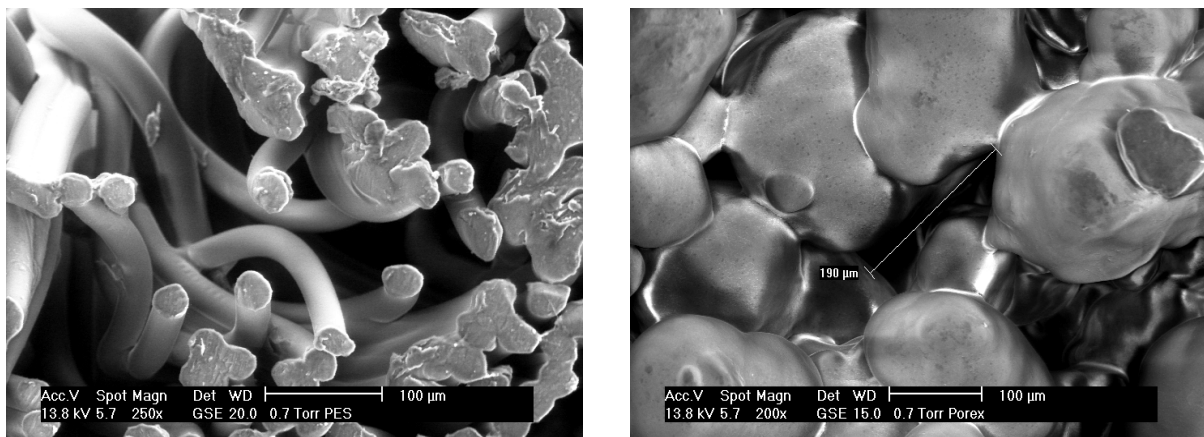
Die höchste Durchflussgeschwindigkeit war mit geblockten Kunststoff-Fritten aus Polyester (5 sec./ml) zu erreichen. Das Blocken dieses Materials bewirkte eine Halbierung der Durchlaufzeit. Bei der Polyethylen Typ Porex Fritte wurde bei unbehandelten Oberflächen Durchlaufzeiten von ca. 60 Sekunden ermittelt, wobei das Blocken dieses Materials zu einer deutlichen Herabsetzung der Durchflussgeschwindigkeit (von ursprünglich 1 Minute bis auf nahezu 3 Minuten) führte. Darüber hinaus hat sich bei diesen Kunststoffen durch die Behandlung mit einem Blockpuffer auch eine relativ hohe Schwankungsbreite der Durchflusszeiten eingestellt. Die geringste Durchflussrate weist das unbehandelte Polyethylen Typ 180c auf, bei der 1 ml Probensuspension über 5 Minuten für das passieren der Fritte benötigte. Der Faserkörper aus Polypropylen hat eine Durchflussrate von etwas über 1 Minute, wobei das behandeln mit Blockpuffern bei diesem Material keinen Einfluss auf die Durchflussgeschwindigkeit erkennen lässt.

Bei der Betrachtung der Flieseigenschaften ist auch die Handhabbarkeit (Verstopfung, Probleme bei Aufgabe der Probe, Entstehung von Lufteinschlüssen bei Aufgabe der Probe u. dgl.) der Materialien zu beachten. Insbesondere das Entstehen von Lufteinschlüssen bei der Aufgabe der Probe in die mit den Fritten bestückten Abicap<sup>®</sup>-Säulen ist von entscheidender

Bedeutung, da diese dazu führen, dass eine solche Fritte, auch nach Beseitigung der Luftblase, nicht mehr ohne Hilfsmittel durchflussfähig und demnach unbrauchbar ist. Bei den Polyester- und den Polyethylen Typ 180c Fritte entstehen, im Gegensatz zu den beiden anderen Frittentypen, wesentlich seltener Lufteinschlüsse, so dass diese zur weiteren Betrachtung bei der Entwicklung des immunologischen Analysensystems ausgewählt wurden (siehe auch Kapitel 3.6.2).

### 3.6.1.4 Charakterisierung der Kunststoffkörper durch Elektronenmikroskopie

Um auszuschließen, dass Bakterien aufgrund der Porengröße der einzelnen Kunststoff-Fritten zurückgehalten werden, erfolgte eine Begutachtung der Materialien gemäß der in Kapitel 2.7.1.3 beschriebenen Methode. In der folgenden Abbildung 3.11 sind die Aufnahmen eines Raster-Elektronenmikroskops von einem Fasermaterial (Polyester: f-R-22536 Faser) und einem Sinterkörper (Polyethylen: Typ Porex 120 µm XM1557) dargestellt.



**Abbildung 3.11:** Raster-Elektronenmikroskopaufnahme einer Polyesterfritte (links) und einer Polyethylenfritte Typ Porex (rechts)

Die im unteren Bereich der Abbildungen dargestellten Skalen stellen 100 µm dar. Der Größte der acht zur Charakterisierung der Kunststoffkörper eingesetzten humanpathogenen Bakterien ist *Bacillus subtilis*, welcher ca. einen Durchmesser von 1 µm und eine Länge von 8 µm aufweist. *Aeromonas hydrophila* und *Salmonella* Enteritidis zeigen Längen von ca. 2 bis 5 µm und die restlichen Stämme Längen von 1 bis 1,5 µm auf. Auf der Grundlage der elektronenmikroskopischen Aufnahmen kann davon ausgegangen werden, dass die Porengröße keinen entscheidenden Einfluss auf die Rückhaltefähigkeit von Bakterien durch die getesteten Kunststoffkörper darstellt.



### 3.6.1.5 Überprüfung der Bakterien-Rückhaltekapazität von Kunststoff-Fritten

Die Überprüfung der Rückhaltekapazität der Kunststoff-Fritten gegenüber Bakterien wurde mit der nach Kapitel 2.7.1.4 beschriebenen Methode durchgeführt. Dabei wurden Module mit einer Fritte durch Aufgabe verschiedener Keimkonzentrationen direkt auf ihre Kapazitätsgrenze hin untersucht (siehe Tabelle 3.14).

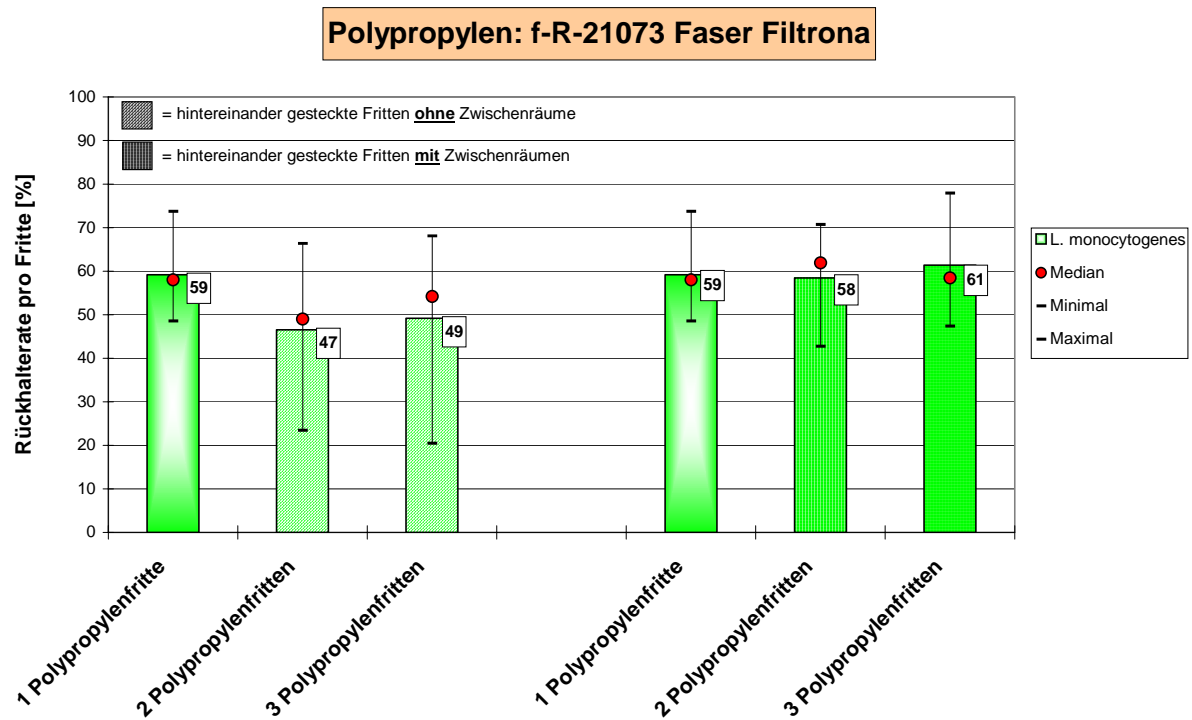
**Tabelle 3.14:** Rückhaltekapazität von Polypropylenfritten gegenüber *Listeria monocytogenes* Suspensionen unterschiedlicher Konzentrationen

<sup>1</sup> Eingesetzte Konzentration [KbE/g]	Ø <sup>2</sup> Wiederfindungsrate		Ø <sup>3</sup> Rückhalterate	
	[KbE/g]	[%]	[KbE/g]	[%]
$1,6 \times 10^8$	$9,2 \times 10^7$	<b>59</b>	$6,3 \times 10^7$	<b>41</b>
$1,6 \times 10^7$	$5,5 \times 10^6$	<b>36</b>	$1,0 \times 10^7$	<b>64</b>
$1,6 \times 10^6$	$6,6 \times 10^5$	<b>43</b>	$8,9 \times 10^5$	<b>57</b>
$1,6 \times 10^5$	$6,1 \times 10^4$	<b>39</b>	$9,4 \times 10^4$	<b>61</b>
$1,6 \times 10^4$	$6,3 \times 10^3$	<b>41</b>	$9,2 \times 10^3$	<b>59</b>
$1,6 \times 10^3$	$5,3 \times 10^2$	<b>34</b>	$1,0 \times 10^3$	<b>66</b>

1 = *Listeria monocytogenes*    2 = im Eluat    3 = auf Polypropylenfritte

Betrachtet man die in der Tabelle 3.14 aufgeführten Ergebnisse, so ist festzustellen, dass bis zu einer eingesetzten Konzentration von ca.  $10^7$  KbE/g die prozentualen Rückhalteraten (57 bis 66 %) der Polypropylenfritte gegenüber der Bakteriensuspension von *Listeria monocytogenes* in etwa gleich bleiben. Davon abweichend konnte beim Einsatz einer Keimkonzentration von  $1,6 \times 10^8$  KbE/g nur noch 41 % der eingesetzten Keimkonzentration zurückgehalten werden. In Verbindung mit der oben beschriebenen prozentualen Rückhaltefähigkeit der Fritten kann daraus geschlossen werden, dass die Kapazitätsgrenze der eingesetzten Polypropylenfritte gegenüber dem Bakterium *Listeria monocytogenes* bei einer Konzentration von etwa  $10^7$  KbE/g liegt.

Um die prozentuale Rückhaltefähigkeit der Kunststoffkörper näher zu charakterisieren, wurde in weiterführenden Untersuchungen Module mit hintereinander geschalteten Fritten getestet. Die Präparation der Fritten und die Durchführung dieser Untersuchung ist im Kapitel 2.7.1.4 beschrieben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.1 dargestellt.

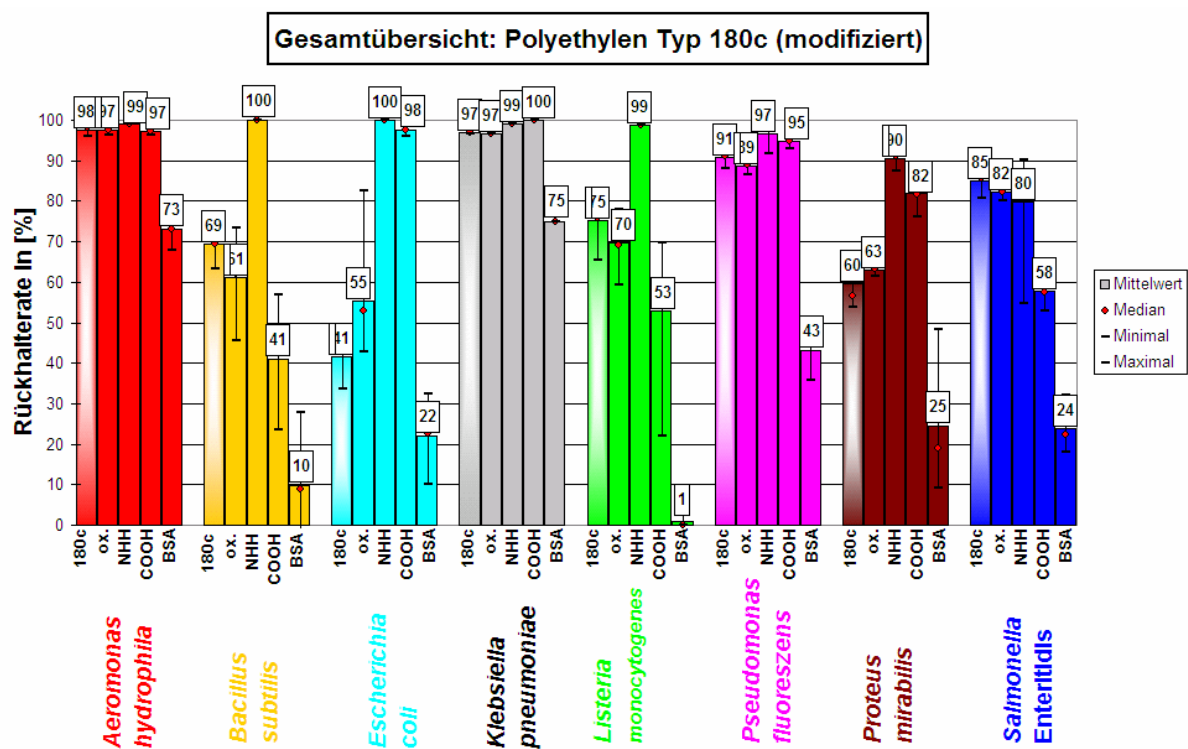


**Abbildung 3.12:** Rückhalterate von *Listeria monocytogenes* pro Fritte nach Aufgabe auf eine Abicap®-Säule mit unbehandelten, hintereinander (mit und ohne Zwischenräume) geschalteten Polypropylenfritten

Bei dieser Untersuchung wurden zwei bzw. drei hintereinander geschaltete Kunststoffkörper bezüglich ihrer Rückhaltefähigkeit getestet. Bei der Testreihe 1 (gestreifte Balken), wurden die Fritten direkt, ohne Zwischenräume in eine Abicap®-Säule gesteckt und untersucht. Die ermittelten Wiederfindungsraten der eingesetzten Bakteriensuspension im Eluat wurden pro eingesetzte Fritte umgerechnet (siehe Abbildung 3.12), so dass dessen Ergebnisse direkt mit Säulen, die nur mit einer Fritte bestückt sind, vergleichbar sind. In der zweiten Testreihe (karierte Balken) wurden die Kunststoff-Fritten ebenfalls hintereinander geschaltet, wobei jedoch zwischen den Körpern ein Zwischenraum verblieb. Bezüglich der Darstellung der Ergebnisse wurde analog der Testreihe 1 verfahren. Die ermittelten Rückhalteraten pro Fritte (ca. 60 %) der hintereinander geschalteten Kunststoffkörper mit Zwischenräumen (karierte Balken) befinden sich im gleichen Bereich wie Module, die nur mit einer Fritte bestückt sind. Bei den hintereinander geschalteten Fritten ohne Zwischenräume (gestreifte Balken) wurden Ergebnisse im gleichen Bereich ermittelt. Die insgesamt bis zu 10 % niedrigeren Mittelwerte lassen sich aufgrund von Grenzflächeneigenschaften beim Ein- und Austritt der Proben aus den Fritten erklären (siehe auch S. 109/110).

### 3.6.2 Wechselwirkungen von Bakterien mit modifiziertem Kunststoffmaterial

Die in Punkt 3.6.1.1 durchgeführte Untersuchung hat ergeben, dass verschiedene Kunststoffe unterschiedlich hohe Wechselwirkungen mit den Oberflächen von Bakterien eingehen können. Dadurch ist zu erwarten, dass auch die verschiedenen Stufen einer Modifikation, welche zur Herstellung einer kovalenten Bindung von Antikörpern auf der Fritte notwendig sind, jeweils Wechselwirkungen mit den Bakterien eingehen können. Um diese Einflüsse zu untersuchen, wurde jede einzelne Stufe der Modifikation, Oxidation (ox.), Silanisierung (NHH), Carboxylierung (COOH) und Blocken (BSA) auf ihr Rückhaltevermögen von Mikroorganismen hin untersucht. Dazu wurde das in Kapitel 2.6.1.1 beschriebene Analysenprotokoll herangezogen. Als Grundträger diente die Polyethylen Typ 180c Fritte. Diese wurde aufgrund der Fließeigenschaften (siehe Kapitel 3.6.1.3) und der strukturellen Eignung zur Modifikation (DEGENER, 2004) ausgewählt (siehe Diskussion S. 110/111).



**Abbildung 3.13:** Rückhalterate von humanpathogenen Bakterien durch modifizierte Polyethylenfritte Typ 180c nach Aufgabe auf eine Abicap®-Säule

Die Abbildung 3.13 zeigt, dass die Oxidation der Polyethylen Typ 180c Materials nur geringe Auswirkung auf die Rückhaltefähigkeit der Fritten gegenüber den ausgewählten Bakterienstämmen hatte. Mit Ausnahme von *Escherichia coli*, bei dem das Rückhaltevermögen der

Fritte um etwa 15 % auf nunmehr 55 % gesteigert wurde, konnten keine wesentlichen Veränderungen gegenüber dem unbehandelten Material festgestellt werden.

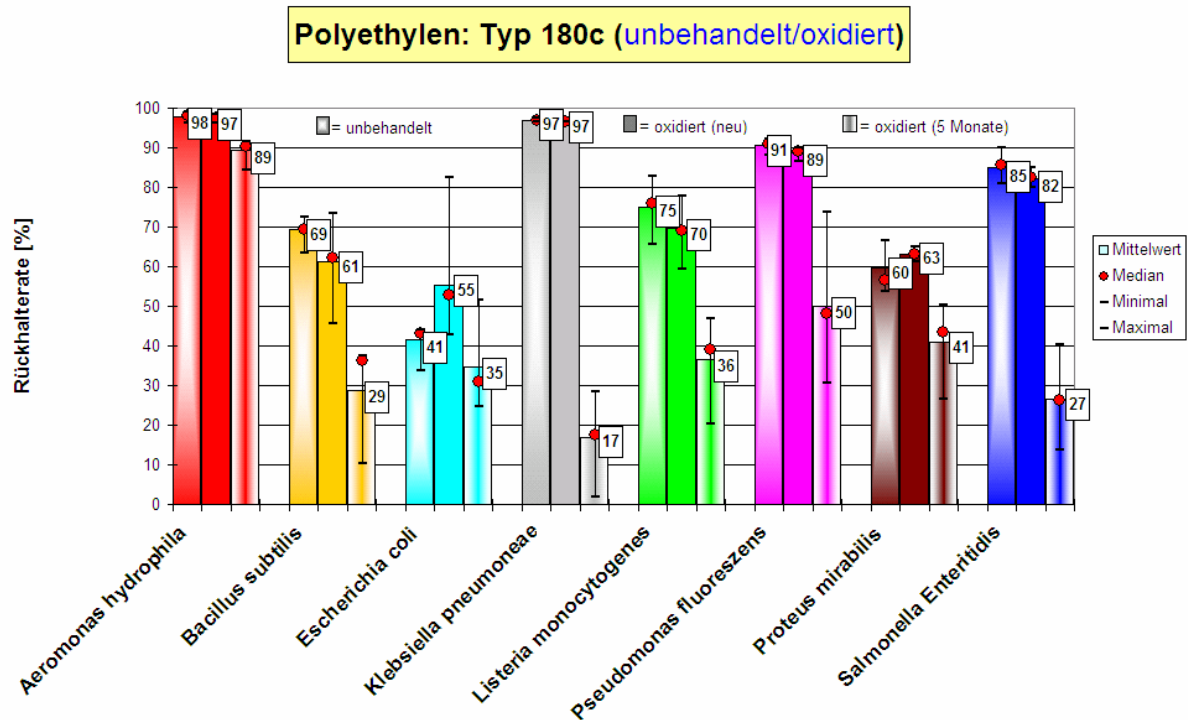
Die Modifikationsstufe der Silanisierung hatte großen Einfluss auf die Rückhaltefähigkeit der Polyethylen Typ 180c Fritte. Bei sechs der acht untersuchten Bakterienstämme geht die Rückhalterate gegen 100 %, also verbleiben die Bakterien nahezu komplett auf diesem modifizierten Material. Eine Ausnahme stellte *Salmonella* Enteritidis dar, bei der sich die Rückhalterate im Rahmen der Schwankungsbreite nicht verändert hat.

Durch die Carboxylierung der Polyethylen Typ 180c Fritte wurde die Rückhalterate bei *Proteus mirabilis* und *Salmonella* Enteritidis gegenüber der vorangegangenen Modifikationsstufe in etwa um 10 bzw. 20 % reduziert. Bei den beiden im Test eingesetzten grampositiven Stämmen, *Bacillus subtilis* und *Listeria monocytogenes*, wurde die Rückhaltefähigkeit der Fritte von vorher nahezu 100 % auf nunmehr etwa 40 bzw. 50 % stark herabgesetzt. Auf die Rückhalteraten der Fritten gegenüber den restlichen zur Untersuchung eingesetzten Bakterienstämmen (alle gramnegativ) hatte diese Modifikationsstufe keinen nennenswerten Einfluss.

Das Blocken des modifizierten Polyethylen Typs 180c Materials mit PBS-Puffer reduziert die Wechselwirkungen zwischen den Fritten und den untersuchten Bakterienstämmen. Die Rückhalteraten der mit BSA-Puffer belegten modifizierten Polyethylen-Sinterkörper sind bei allen Stämmen geringer als bei dem unbehandelten Grundmaterial und allen eingeführten Modifikationsstufen. Im Vergleich zur letzten Modifikationsstufe (Carboxylierung) sind die Rückhalteraten um etwa 25 % (von etwa 100 % auf 75 % bei *Aeromonas hydrophila* und *Klebsiella pneumoniae*) bis zu 78 % (von etwa 100 % auf 22 % bei *Escherichia coli*) herabgesetzt worden. Die geringste Wechselwirkung haben die geblockten modifizierten Fritten gegenüber den beiden untersuchten grampositiven Stämmen *Bacillus subtilis* und *Listeria monocytogenes*, die nur noch zu 10 bzw. 0 % zurückgehalten werden.

### **3.6.3 Einfluss der Lagerung von modifiziertem Kunststoffmaterial auf die Wechselwirkung mit humanpathogenen Bakterien**

Um festzustellen, ob die Lagerung einzelner modifizierter Module einen Einfluss auf die Wechselwirkung mit humanpathogenen Mikroorganismen hat, wurden die Rückhalteraten von oxidierten Polyethylenfritten nach einer fünfmonatigen Lagerung mit frisch hergestellten Fritten verglichen. Dazu wurde wiederum das im Kapitel 2.7.1.1 beschriebene Verfahren herangezogen. In der folgenden Abbildung 3.14 werden die Wiederfindungsraten der gelagerten oxidierten Fritten mit der frisch hergestellten und unbehandelten Fritten verglichen.



**Abbildung 3.14:** Vergleich der Rückhalterate ausgewählter Bakterien nach Aufgabe auf eine Abicap®-Säule mit einer unbehandelten, einer frisch und einer fünf Monate gelagerten oxidierten Polyethylen Typ 180c Fritte

Das in Abbildung 3.14 dargestellte Diagramm zeigt, wie schon im Kapitel 3.7.2 beschrieben, dass frisch oxidierte Polyethylen Typ 180c Fritten im Vergleich zu unbehandelten Materialien keine entscheidenden Unterschiede bezüglich der Wechselwirkungen mit den untersuchten Bakterienstämmen aufweisen. Bei oxidierten Kunststoffkörpern, die fünf Monate gelagert wurden, ist hingegen eine starke Abnahme der Rückhaltefähigkeit von Bakterien gegenüber dem unbehandelten und frisch oxidierten Material zu erkennen.

### 3.7 Immunologische Verfahren zum Nachweis von humanpathogenen Mikroorganismen

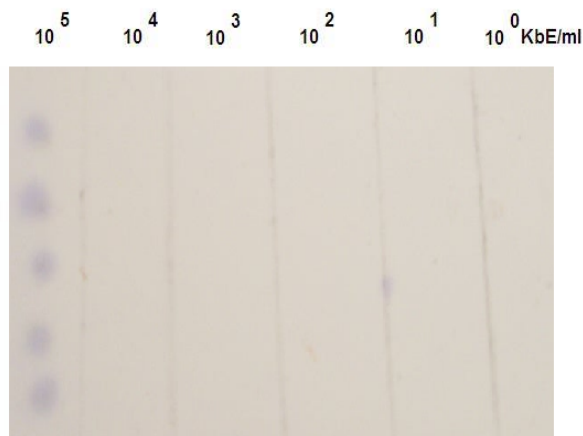
Die in diesem Kapitel beschriebenen immunologischen Testsysteme wurden im Rahmen dieser Arbeit entwickelt oder auf Funktionalität zum Einsatz als Nachweissystem für pathogene Mikroorganismen überprüft. Als Grundträger diente die so genannte Abicap®-Säule (siehe Abbildung 2.3), welche mit einem Polyethylensinterkörper des Typs 180c (zylinderförmige Fritte 5x5 mm), auf dem die spezifischen Antikörper gebunden wurden, bestückt waren. In den folgenden Kapiteln werden Validierungsergebnisse und Verfahren zum Nachweis von *Clostridium perfringens*, *Legionella pneumophila* und Salmonellen vorgestellt.

### 3.7.1 Immunologische Verfahren zum Nachweis von *Clostridium perfringens*

Als Teststamm wurde *Clostridium perfringens* DSMZ 756 der „Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“ aus Braunschweig ausgewählt. Die für die immunologische Methode vorgesehenen Kunststoffträger wurden gemäß des im Kapitel 2.7.1.1 beschriebenen Verfahrens auf Wechselwirkung mit dem Teststamm untersucht und als geeignet eingestuft. Um die Nachweisgrenze und Bindekapazität des ELISA-Verfahrens zu bestimmen, musste eine Keimsuspension mit bekannter Konzentration hergestellt werden. Dazu wurde der Teststamm *Clostridium perfringens* DSMZ 756 in einer Leberbouillon fünf Stunden bei 37 °C angereichert, eine Verdünnungsreihe in Ringerlösung angesetzt und die Keimkonzentration mittels Oberflächenverfahren auf TS-Agar bestimmt. Die einzelnen Verdünnungsstufen (Konzentration von 2 bis  $2,3 \times 10^6$  KbE/g) wurden dann zur Untersuchung herangezogen.

#### 3.7.1.1 Nachweis von *Clostridium perfringens* mittels Dot-Blot-ELISA

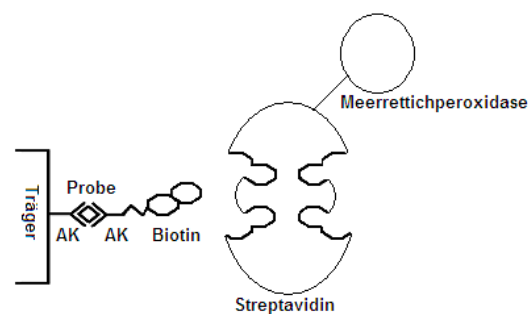
Um eine Charakterisierung und Überprüfung der Antikörper-Antigen Wechselwirkung ohne Einflüsse der Frittematrix durchzuführen, wurde zunächst das im folgenden beschriebene Dot-Blot-ELISA-Verfahren auf planaren Trägern entwickelt. Dazu werden aus Bakteriensuspensionen unterschiedlicher Konzentration (siehe in Punkt 3.8.1 beschriebene Verdünnungsreihe einer *Clostridium perfringens* Suspension) je 2 µl pro Dot entnommen und auf eine Nitrocellulosefolie aufgebracht. Nachdem die Dot's in die Folie eingezogen sind, wird diese in einer PVU-Pufferlösung geblockt, mit 0,1 %igem PBS-Puffer gewaschen, in eine Antikörperlösung (biotinierter, polyklonaler Antikörper gegen das  $\alpha$ -Toxin von *Clostridium perfringens*) gegeben und abgedeckt unter Schwenken eine Stunde inkubiert. Es folgen ein Waschgang und eine Inkubation in einem Streptavidin/Meerrettichperoxidase-Reagenz. Nach erneutem Waschen wird das Stoppreagenz (TMB-Substrat) hinzugegeben, bei beginnender Blaufärbung wieder abgegossen und die Reaktion durch Spülen mit Leitungswasser beendet. Nach Trocknung der Folie sind die bei positiven Proben violett gefärbten Dot's (siehe Abbildung 3.15) visuell auswertbar. Ein Analysenprotokoll zu dieser Methode befindet sich im Anhang 7.3. Der Vergleich der positiv auswertbaren Dot's mit der oben beschriebenen Bestimmung der eingesetzten Keimkonzentrationen mittels kulturellen Verfahrens ermöglicht es, die Nachweisgrenze des hier entwickelten Dot-Blot-ELISA-Verfahrens zu ermitteln. Die Nitrocellulosefolie des Dot-Blot-ELISA's zeigt lediglich bei der  $10^{-1}$  Verdünnung eine positive Reaktion. Die Konzentration bei dieser Verdünnungsstufe betrug  $2,3 \times 10^5$  KbE/g, welche gleichzeitig die Nachweisgrenze dieses Systems darstellt.



**Abbildung 3.15:** Dot-Blot-ELISA von *Clostridium perfringens* (NWG:  $10^5$  KbE/ml)

### 3.7.1.2 Nachweis von *Clostridium perfringens* mittels Durchfluss-ELISA

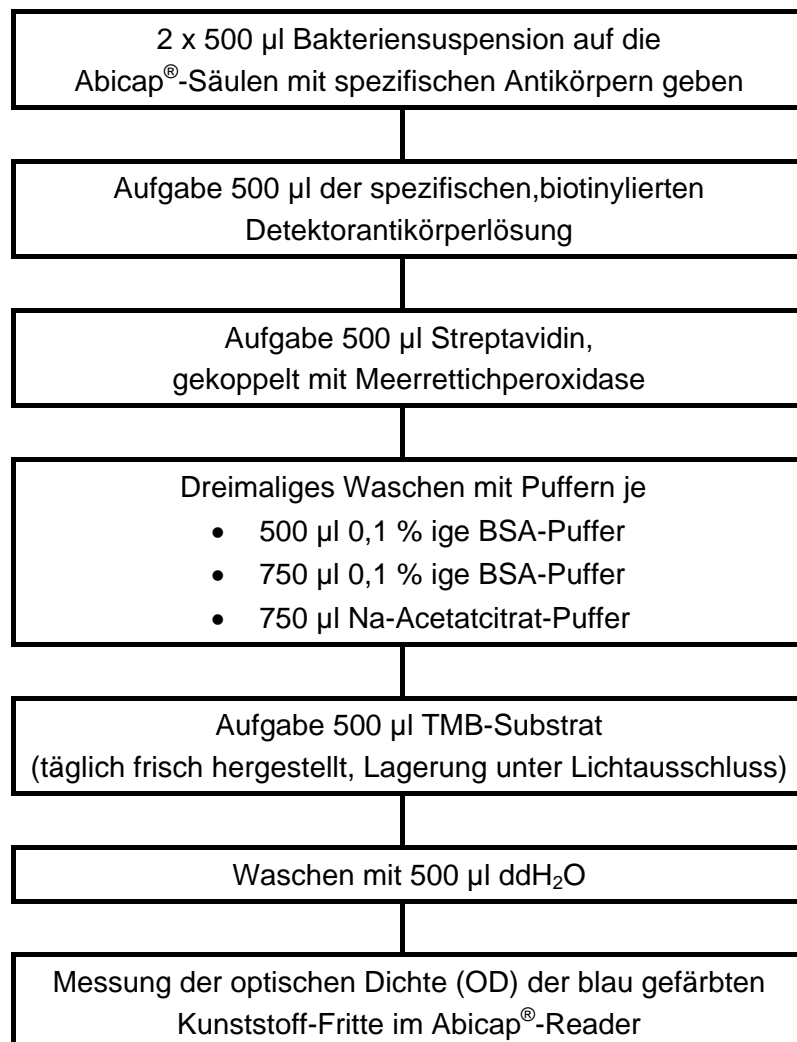
Nach der Charakterisierung der Materialeigenschaften der als Grundträger für Antikörper dienenden Kunststoff-Fritten und Auswertung des Dot-Blot-ELISA-Verfahrens wurde das unter Abbildung 3.16 dargestellte Durchfluss-ELISA-Testsystem für *Clostridium perfringens* entwickelt.



**Abbildung 3.16:** Schematische Darstellung eines ELISA-Verfahrens auf Basis von Kunststoffträgern zum Nachweis von *Clostridium perfringens* (vereinfacht)

Die Durchführung erfolgt mit Polyethylenfritten bestückten Abicap<sup>®</sup>-Säulen. Die Fritten wurden zuvor von der Arbeitsgruppe Keusgen der Pharmazeutischen Biologie der Universität Bonn mit kovalent gebundenen Antikörpern gegen das  $\alpha$ -Toxin von *Clostridium perfringens*

beschichtet. Die Module werden in einen Costarahmen auf einer Workstation mit Auffangwanne gesteckt (siehe Abbildung 2.8) und sind nach dem Spülen mit 750 µl BSA-Puffer für das immunologische Testverfahren einsetzbar. Das eigentliche ELISA-Verfahren erfolgt als Durchflusssystem in acht Schritten, wobei die Probe (mit bekannter Konzentration bis  $10^5$  KbE/g) und die Reagenzien nacheinander auf die Säule gegeben werden, über die Kunststoff-Fritte fließen und in einer Wanne aufgefangen und letztendlich verworfen werden. Die Detektion erfolgt mittels Durchlichtphotometer (Abicap<sup>®</sup>-Reader) der Firma Biognosis Highspeed Diagnostics (siehe Abbildung 2.8). Dabei wird die Optische Dichte (OD) einer Blaufärbung (entsteht bei positiven Proben) direkt auf der Fritte gemessen. Die einzelnen Schritte dieses Testsystems sind in dem Fließschema der Abbildung 3.17 dargestellt.



**Abbildung 3.17:** Ablaufschema eines Durchfluss-ELISA-Verfahrens zum Nachweis human-pathogener Bakterien



Bei der Entwicklung dieses Verfahrens wurden Keimsuspensionen von *Clostridium perfringens* DSMZ 756 bis zu einer Konzentration von  $10^5$  KbE/g (bestimmt durch kulturelle Referenzmethode, Oberflächenverfahren auf TS-Agar) eingesetzt. Trotz dieser hohen Keimzahl war es nicht möglich mit dem oben angegebenen Durchfluss-ELISA-Verfahren einen positiven Nachweis zu erhalten (siehe auch Kapitel 4.2).

### 3.7.1.3 Überprüfung der Antikörperqualität durch einen Agglutinationstest

Um ergänzend die Qualität des polyklonalen Antikörpers zu überprüfen, wurde ein Agglutinationstest gemäß des in Kapitel 2.8.2 beschriebenen Verfahrens durchgeführt. Diese Untersuchung zeigte keine eindeutig erkennbare Agglutination („Ausflockung“) durch eine Antikörper-Antigen-Reaktion zwischen den untersuchten *Clostridium perfringens* DSMZ 756 Stamm und der eingesetzten polyklonalen Antikörperlösung.

## 3.7.2 Immunologische Verfahren zum Nachweis von *Legionella pneumophila*

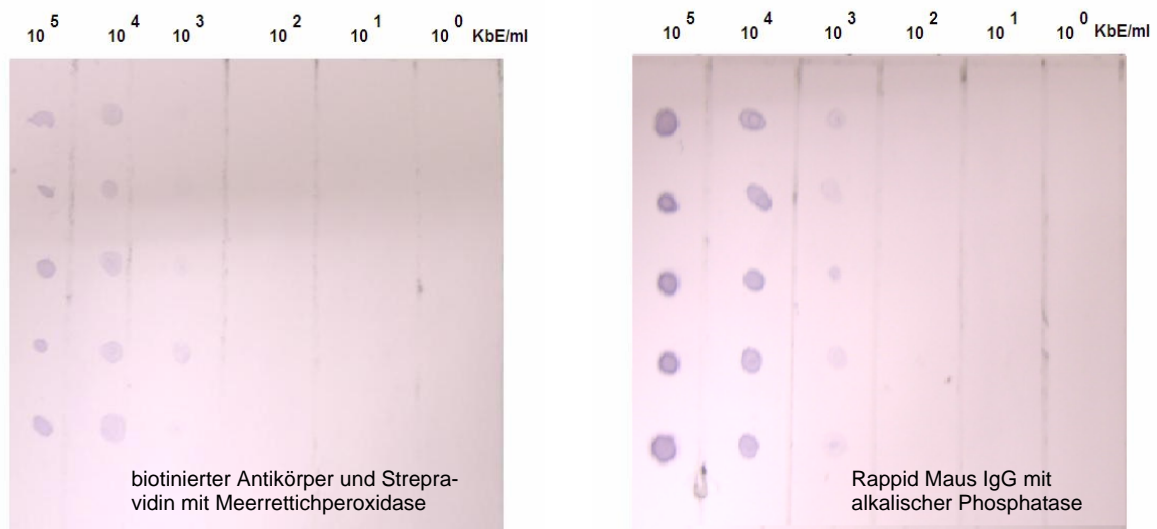
Gemäß der Entwicklung des Analysensystems zum Nachweis von *Clostridium perfringens* wurde ein ELISA-Verfahren zur Detektierung von Legionellen entwickelt. Die zur Entwicklung des Verfahrens notwendigen und vorgenommenen Arbeitsschritte werden in den folgenden Abschnitten erläutert. Als Teststamm wurde *Legionella pneumophila* der Serogruppe 1 ausgewählt, da dieser bis zu 90 % der auftretenden Legionellakontaminationen in Trink- und Brauchwasser ausmacht. In weiterführenden Untersuchungen wurden dann auch andere Serovaren von *Legionella pneumophila* sowie weitere Legionellastämme (siehe Tabelle 2.2) zur Validierung des Verfahrens herangezogen. Die für das ELISA-Verfahren als Grundträger dienende Abicap<sup>®</sup>-Säule mit Kunststoff-Fritte wurde analog des im Rahmen des Materialtestes untersuchten „Wechselwirkung von Bakterien mit Kunststoffoberflächen“ (siehe 2.7.1.1) mit Legionellen getestet und für geeignet befunden. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze und Bindekapazität des ELISA-Verfahrens erfolgte die Herstellung einer Keimsuspension mit bekannter Konzentration. Dazu wurde der Teststamm *Legionella pneumophila* in Legionella-Yeast-Bouillon bei 37 °C 72 Stunden angereichert, eine Verdünnungsreihe in Ringerlösung angesetzt und die Keimkonzentration mittels Oberflächenverfahren auf BCYE-Agar bestimmt. Die einzelnen Verdünnungsstufen wurden dann zum Test eingesetzt.

### 3.7.2.1 Nachweis von Legionellen mittels Dot-Blot-ELISA

Um einen Vergleichsstandard zu etablieren und die Qualität der Antikörper zu überprüfen, wurden zwei Dot-Blot-ELISA-Verfahren entwickelt und angewendet. Folgende Ansätze wurden gewählt: Bei dem ersten Verfahren erfolgt die Aufgabe von ca. 1 µl Probe auf eine Nitrocellulosefolie. Nach Trocknung der Dot's wird die Folie zur Belegung hydrophober Bereiche in einer PVU-Pufferlösung geblockt. Nach Abgießen des Puffers wird zunächst eine Legionella-Antikörperlösung aufgegeben, welche nach einer Einwirkzeit von einer Stunde durch eine zweite Antikörperlösung (Anti-Maus-IgG, biotiniert) ersetzt wird, in welcher die Folie ebenfalls eine Stunde verweilt. Nach Abgießen dieser Lösung erfolgt die Aufgabe von Streptavidin mit Meerrettichperoxidase, das Waschen mit 0,1 %igem PBS-Puffer bzw. mit Na-Acetatcitrat-Puffer und abschließend die Zugabe eines Stoppreagens (Substrat). Bei beginnender Blaufärbung wird das Substrat abgegossen, mit Leitungswasser gespült und die blau-violetten Dot's ausgewertet.

Beim zweiten Ansatz wird mit Ausnahme folgender Punkte analog Verfahren. Zum einem erfolgt die Zugabe eines Rabbit Anti-Maus IgG Antikörpers mit alkalischer Phosphatase anstatt eines biotinylierten Antikörpers. Zum anderen findet ein anderes Stoppreagenz (BCIP/NBT-Substrat) Anwendung, welches spezifisch für die alkalische Phosphatase ist und direkt nach der Behandlung mit dem Rabbit Anti-Maus IgG eingesetzt wird.

Bei der Validierung der beiden Dot-Blot-ELISA-Verfahren zum Nachweis von Legionellen wurden Keimkonzentrationen von *Legionella pneumophila* der Serogruppe 1 von 1 bis zu  $1,7 \times 10^5$  KbE/g (bestimmt durch kulturelle Referenzmethode, Oberflächenverfahren auf BCYE-Agar) eingesetzt. Bei beiden Verfahren konnten Konzentrationen (untere Nachweisgrenze) von  $10^3$  KbE/g durch anzeigen von blau-violetten Spots nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.18). Dabei waren die Spots des Verfahrens, welches sich einem biotinylierten Antikörper mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase Detektierung bediente, unmittelbar nach der Anfärbung bis zur oben angegebenen Konzentration von  $10^3$  KbE/g sichtbar, wo hingegen das Rappid Maus Ig mit alkalischer Phosphatase System zunächst nur eine Konzentration von  $10^4$  KbE/g nachweisen konnte und erst nach zwölfstündiger Lagerung der Folie, dann jedoch deutlich, Spots bei der Konzentration von  $10^3$  KbE/g anzeigen konnte. Dem entgegen ist bei dem zweit genannten Verfahren (System mit alkalischer Phosphatase), im Gegensatz zum Streptavidin Verfahren, eine eindeutige Abstufung der Intensität der Spots der einzelnen Verdünnungsstufen erkennbar (siehe Abbildung 3.18).



**Abbildung 3.18:** Dot-Blot-ELISA von *Legionella pneumophila* Serogr. 1 (NWG:  $10^3$  KbE/ml)

### 3.7.2.2 Nachweis von Legionellen mittels Durchfluss-ELISA

Auf Grundlage der im Dot-Blot-ELISA ermittelten Ergebnisse wurde nun ein Modul zur Bestimmung von Legionellen auf Durchflussbasis installiert. Dazu wurde der monoklonale Antikörper (LP-F-003) kovalent auf Polyethylenfritten gebunden und in eine Abicap<sup>®</sup>-Säule eingebracht. Das Testsystem beruht dabei auf dem in der Abbildung 3.16 chematisch dargestellten Prinzip. Die Entwicklung des Analysenverfahrens erfolgte mit *Legionella pneumophila* der Serogruppe 1 in Anlehnung an das in Abbildung 3.17 dargestellte Fließschema. Als Detektorantikörper wird ein biotinylierter monoklonaler Antikörper (LP-F-003) herangezogen. Zur Validierung des Systems und zur Überprüfung von Kreuzreaktionen, wurde dieses Verfahren mit denen in Tabelle 2.2 aufgeführten Legionella-Stämmen durchgeführt.

**Tabelle 3.15:** Validierungsergebnisse, Kreuzreaktionen und Nachweisgrenzen von Legionellen beim Nachweis mittels Durchfluss-ELISA mit Abicap®-Säulen

Spezies	Stamm- bezeichnung	Nachweisgrenze [KbE/ml]	Eingesetzte Konzentration* [KbE/ml]
<i>Legionella pneumophila</i>	Serogruppe 1	4	4 bis $3,7 \times 10^5$
	Serogruppe 1 Bellingham	$3,0 \times 10^2$	3 bis $3,4 \times 10^5$
	Serogruppe 1 Philadelphia	$3,0 \times 10^1$	6 bis $6,0 \times 10^4$
	Serogruppe 2	n.n.	1 bis $1,0 \times 10^3$
	Serogruppe 3	n.n.	3 bis $3,0 \times 10^3$
	Serogruppe 4	n.n.	9 bis $8,7 \times 10^4$
	Serogruppe 5	n.n.	3 bis $2,8 \times 10^4$
	Serogruppe 6	n.n.	2 bis $1,5 \times 10^3$
	Serogruppe 7	n.n.	1 bis $1,1 \times 10^5$
	Serogruppe 8	n.n.	2 bis $1,6 \times 10^5$
	Serogruppe 9	n.n.	3 bis $3,2 \times 10^3$
	Serogruppe 10	n.n.	3 bis $2,7 \times 10^5$
	Serogruppe 11	n.n.	2 bis $1,5 \times 10^5$
	Serogruppe 12	n.n.	2 bis $1,5 \times 10^4$
Serogruppe 13	n.n.	2 bis $2,3 \times 10^4$	
Serogruppe 14	n.n.	3 bis $3,3 \times 10^3$	
<i>Legionella bozemanii</i>	Serogruppe 1	n.n.	7 bis $7,4 \times 10^5$
<i>Legionella bozemanii</i>	Serogruppe 2	n.n.	1 bis $1,0 \times 10^5$
<i>Legionella dumoffi</i>		n.n.	8 bis $7,7 \times 10^4$
<i>Legionella gormanii</i>		n.n.	2 bis $2,4 \times 10^6$
<i>Legionella jordanis</i>		n.n.	2 bis $2,2 \times 10^6$
<i>Legionella longbeachae</i>	Serogruppe 1	n.n.	4 bis $3,6 \times 10^5$
<i>Legionella longbeachae</i>	Serogruppe 2	n.n.	4 bis $3,6 \times 10^5$
<i>Legionella micdadei</i>		n.n.	1 bis $1,4 \times 10^6$

\* = bestimmt durch Referenzmethode, Oberflächenverfahren auf BCYE-Agar

n.n. = nicht nachweisbar im eingesetzten Konzentrationsbereich

Die Validierung des entwickelten Durchfluss-ELISA-Verfahrens hat für *Legionella pneumophila* der Serogruppe 1 im Durchschnitt eine Nachweisgrenze von 4 KbE/ml (bestimmt durch kulturelle Referenzmethode, Oberflächenverfahren auf BCYE-Agar) ergeben. Die beiden anderen im Test eingesetzten Legionella Stämme der Serogruppe 1, *Legionella* Bellingham und *Legionella* Philadelphia, konnten mit dem eingesetzten Antikörpersystem ebenfalls nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze für den Bellingham Stamm lag dabei mit 300 KbE/ml um zwei Zehnerpotenzen höher als die bei *Legionella pneumophila*, und um eine Zehnerpotenz höher als die des Philadelphia Stammes (30 KbE/ml). Die anderen im Test eingesetzten Legionella Stämme konnten in den eingesetzten Konzentrationsbereichen mit dem hier verwendeten Antikörpersystem nicht nachgewiesen werden.

### **3.7.3 Immunologische Verfahren zum Nachweis von Salmonellen**

Die in Kapiteln 2.7 beschriebene Abicap<sup>®</sup>-Säule mit Kunststoff-Fritte sollte als Grundlage für Nachweisverfahren von Salmonellen dienen. Im Kapitel 3.7.3.1 werden Ergebnisse einer Verwendbarkeitsprüfung eines Salmonella-Kits der Firma Biognosis dargestellt. Dieser Testkit ist ursprünglich als Funktionskontrolltest für die Belegung von Fritten mit Antikörpern entwickelt worden. Im Kapitel 3.7.3.2 wird ein neu entwickeltes Verfahren beschrieben. Dieses beruht auf der Anreicherung von Salmonellen auf einer mit polyklonalen Antikörper belegten Fritte mit anschließender PCR-Detektierung.

#### **3.7.3.1 Nachweis von Salmonellen mittels Abicap<sup>®</sup>-RED-Test**

Zur Überprüfung, ob der in Kapitel 2.8.1 aufgeführte Abicap<sup>®</sup>-RED-Test als Analysenverfahren zum Nachweis von Salmonellen geeignet ist, wurde ein Funktionstest durchgeführt. Dazu wurden zwei Verdünnungen ( $1 \times 10^8$  und  $2 \times 10^7$  *Salmonella* Ag Zellzahl/ml) des mitgelieferten Kontrollantigens hergestellt und in einem zwölffachen Ansatz untersucht. Zusätzlich wurde der Pufferleerwert in Dreifachbestimmung mitgeführt. Als Testmaterial wurden Abicap<sup>®</sup>-Säulen mit PE-Fritten des Typs 180c verwendet. Eine Testreihe erfolgte mit Kunststoff-Fritten ohne Antikörper (nur geblockt) eine zweite Testreihe mit *Salmonella*-spezifischen Antikörpern bestückten Fritten. Die Auswertung wurde mit einem Abicap<sup>®</sup>-Reader der Firma Biognosis durchgeführt.

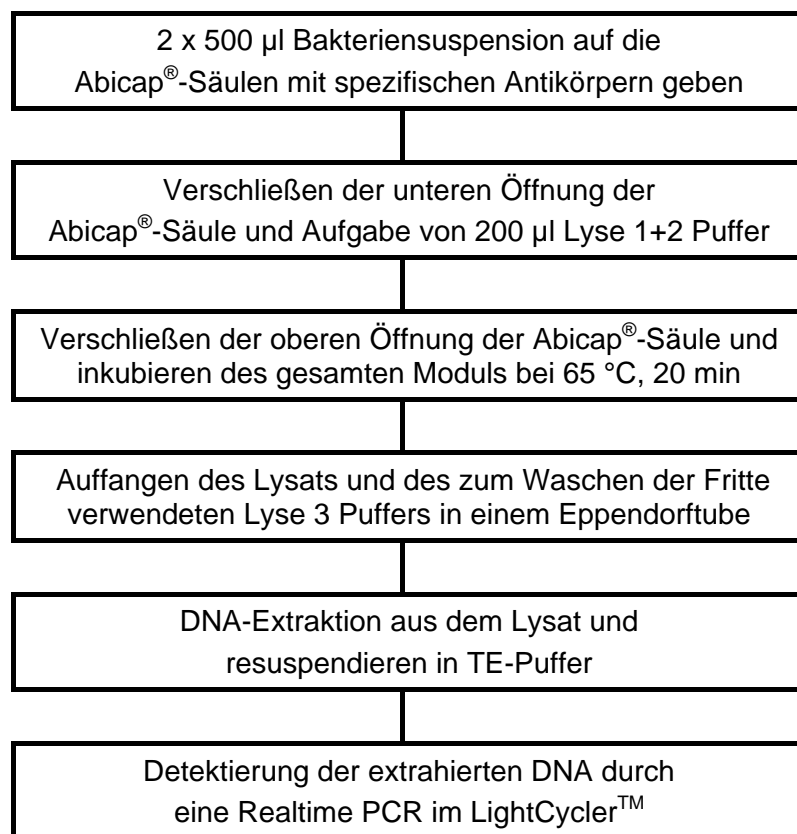
**Tabelle 3.16:** Ergebnisse (optische Dichten) einer Messreihe von Salmonellen auf eine Abicap<sup>®</sup>-Säule nach Durchführung des Abicap<sup>®</sup>-RED-Test

Eingesetzte Konzentration [Zellzahl/ml]	Ø Optische Dichte Fritten (geblockt)	Ø Optische Dichte Fritten mit Antikörper
1,0 x 10 <sup>8</sup>	0,151	1,299
2,0 x 10 <sup>7</sup>	0,044	0,661
Leerwert	0	0

Bei der Funktionskontrolle des Abicap<sup>®</sup>-RED-Tests konnte festgestellt werden, dass es, bei Aufgabe des Zelllysats und nachfolgender Behandlung mit Abicap<sup>®</sup>-RED, zu einer rot Färbung kam (siehe optische Dichte geblockte Fritten in Tabelle 3.16). Dies lässt darauf schließen, dass das Zelllysate im geringen Umfang von den geblockten Fritten zurückgehalten wurde, so dass das Abicap<sup>®</sup>-RED eine Reaktion mit den in der Säule verbliebenen Zelllysate eingehen konnte. Die deutlich höher gemessenen Optischen Dichten (intensivere Rotfärbung) bei Fritten mit Antikörper zeigen, dass die verwendeten Antikörper grundsätzlich in der Lage sind Salmonellen auf der Fritte zu binden. Um die Methode auf Eignung für lebende Salmonellen zu testen, wurde das unter Kapitel 2.8.1 beschriebene Verfahren angewendet. Dabei konnte festgestellt werden, dass das Verhältnis zwischen Konzentration und Optischer Dichte bei Zelllysate mit denen bei lebenden Zellen vergleichbar ist. Bei der Untersuchung nach 2.8.1 mit lebenden Salmonellen konnte eine Nachweisgrenze des Verfahrens von ca. 10<sup>6</sup> KbE/ml (bestimmt durch kulturelle Referenzmethode, Oberflächenverfahren auf TS-Agar) ermittelt werden.

### 3.7.3.2 Nachweis von Salmonellen mittels immunologischer Anreicherung mit anschließender PCR-Detektierung

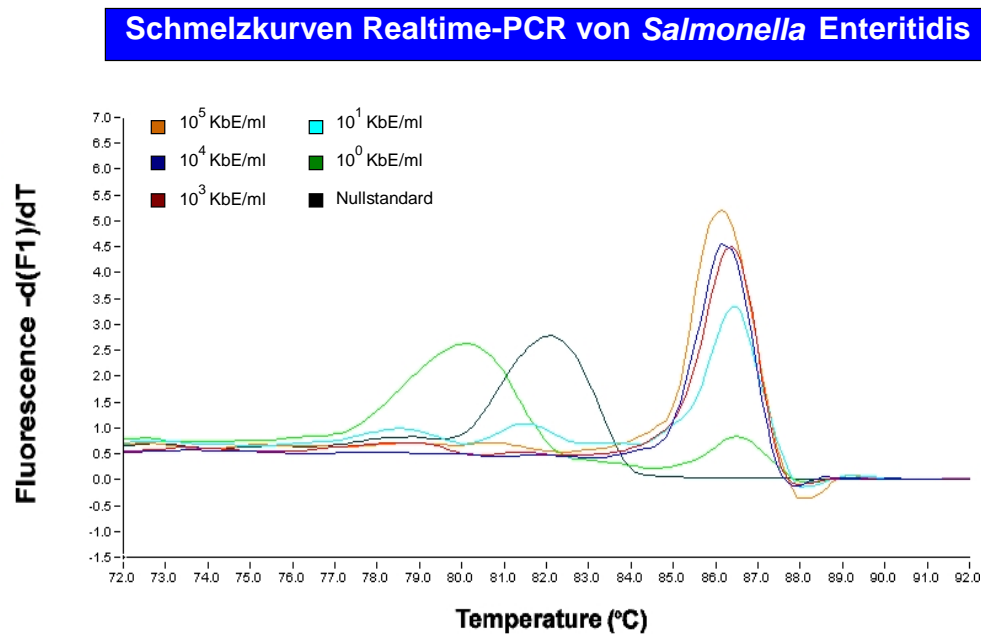
Auf Basis von mit *Salmonella*-Antikörpern beschichteten Fritten (siehe 2.8.1) wurde ein Verfahren zur Anreicherung und Nachweis von Salmonellen entwickelt. Dabei dienen die Antikörper zur immunologischen Anreicherung der Salmonellen auf der Fritte die nach einer DNA-Extraktion, mittels darauffolgender Polymerase-Kettenreaktion detektiert werden können. In Abbildung 3.19 wird das Ablaufschema dieser Methode beschreiben.



**Abbildung 3.19:** Ablaufschema eines Testsystems zur immunologischen Anreicherung von *Salmonellen* mit anschließender PCR-Detektierung

Um das in Abbildung 3.19 dargestellte Analysenverfahren zu validieren, wurde die Nachweisgrenze dieser Methode ermittelt. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe von *Salmonella* Enteritidis mit bekannter Konzentration hergestellt und gemäß der in Kapitel 3.7.3 beschriebenen Methode immunologisch angereichert und mit einer Realtime-PCR bestimmt.

Das Diagramm in Abbildung 3.20 stellt eine Schmelzkurvenanalyse einer Realtime-PCR von *Salmonella* Enteritidis dar. Eingesetzt wurden Konzentrationen zwischen 3 und  $10^5$  KbE/ml (bestimmt durch kulturelle Referenzmethode, Oberflächenverfahren auf TS-Agar) und ein Nullstandard. Bei allen eingesetzten Konzentrationen konnten PCR-Amplifikate (Schmelzpunkt bei ca. 86 °C) nachgewiesen werden. Demnach liegt die Nachweisgrenze dieses Verfahrens gemäß Referenzmethode bei  $\geq 3$  KbE/ml Salmonellensuspension. Die beim Nullstandard und die zusätzlich bei der am geringsten eingesetzten Keimkonzentration entstandenen Amplifikate sind wegen ihrer Schmelzpunkte als unspezifisch zu bezeichnen.



**Abbildung 3.20:** Nachweisgrenze von *Salmonella* Enteritidis nach immunologischer Anreicherung auf Kunststoff-Fritten und anschließender PCR-Detektierung

### 3.8 Methoden zur Anreicherung von Mikroorganismen aus flüssigen Lebensmitteln durch Affinitätsmodule

Die Ergebnisse nach Punkt 3.6.2 haben ergeben, dass durch eine Modifikation der Kunststoffmaterialien mit Aminogruppen ein Modul erzeugt wird, welches ein großes Potential an Rückhaltefähigkeit für Bakterien beinhaltet. Diese Eigenschaft sollte zur Entwicklung einer Voranreicherungsmethode für Mikroorganismen genutzt werden. Als erster Testorganismus wurde das in der Milchindustrie als interessant und bei Vorversuchen als besonders wechselwirkungsfreudig agierende *Listeria monocytogenes* ausgewählt. Das Analysenprotokoll dieser neu entwickelten Methode ist im Kapitel 3.8.1 erläutert. Eine weitere Anwendung auf Grundlage der modifizierten Kunststoffmaterialien wurde in enger Zusammenarbeit mit der Firma Genial aus Troisdorf im Bereich der Getränkeanalytik installiert, dessen Daten (Kapitel 3.8.2.2) uns hier zur Verfügung gestellt wurden. Dazu erhielten wir vom Fraunhofer Institut für Polymerforschung sechs neu entwickelte Module mit optimierten Aminogruppenoberflächen (siehe Abbildung 2.6). Als Untersuchungsgegenstand dienten Lactobacillen, die in einer Reihe von Getränken als unerwünschte Verderbniserreger vorkommen. Die Ergebnisse der Entwicklungsschritte und die Durchführung dieses Verfahrens sind in den Unterkapiteln 3.8.2 aufgeführt.

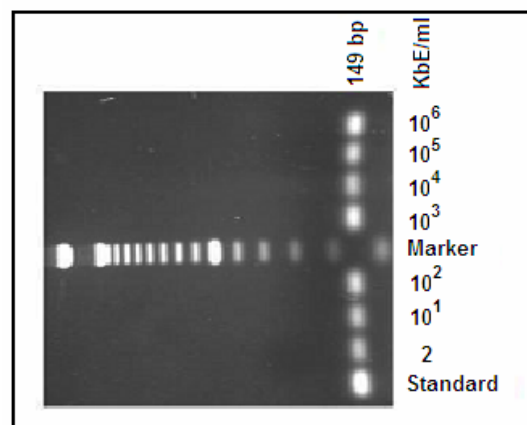


### 3.8.1 Anreicherung von *Listeria monocytogenes* aus Milch mit Affinitätsmodulen

Bei diesem Verfahren werden aminomodifizierte Affinitätsmodule der Arbeitsgruppe Keusgen (Pharmazeutischen Biologie der Universität Bonn) verwendet. Nach einsetzen der Abicap®-Säulen, welche mit silanisierten Kunststoff-Fritten bestückt sind, [in einen Costarahmen und einem Aktivierungsschritt durch Spülen der Fritten mit Ethanol und Ringerlösung (siehe Kapitel 2.7.1)] kann mit der Testdurchführung begonnen werden.

Nach Aufgabe von 1 ml der zu untersuchenden flüssigen Probe und viermaligem Waschen mit je 250 µl Ringerlösung wird die Säule unten verschlossen, mit 500 µl Lyse 1 Puffer, 50 µl Lyse 2 Puffer und 10 µl Proteinase K befüllt und 30 Minuten bei 65 °C inkubiert. Das dabei entstehende Lysat wird in einem Eppendorftube aufgefangen und die extrahierte DNA gemäß der in Kapitel 2.4.1 beschriebenen Methode isoliert, amplifiziert, gelelektrophoresisch aufgetrennt und dokumentiert. Ein vollständiges Analysenprotokoll dieser Methode ist im Anhang 7.3 aufgeführt.

Bei der Validierung der Methode wurden eine 3,5 % H-Milch mit Keimkonzentrationen zwischen 2 und  $2 \times 10^3$  KbE/g eingesetzt. Um die Nachweisgrenze dieses Verfahrens zu bestimmen, wurden die bei der Gelelektrophorese noch detektierbaren Amplifikate (149 bp) mit der eingesetzten Konzentration, welche zuvor durch ein Oberflächenverfahren auf Listeria-Agar bestimmt wurden, verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass bei der am geringsten eingesetzten Konzentration (2 KbE/g) die gelelektrophoretische Auftrennung noch eine deutliche Bande bei 149 bp anzeigt. Die hier entwickelte Methode ist in der Lage aus einer 3,5 %igen Milchprobe eine Kontamination von 2 KbE/g von *Listeria monocytogenes* nachzuweisen.



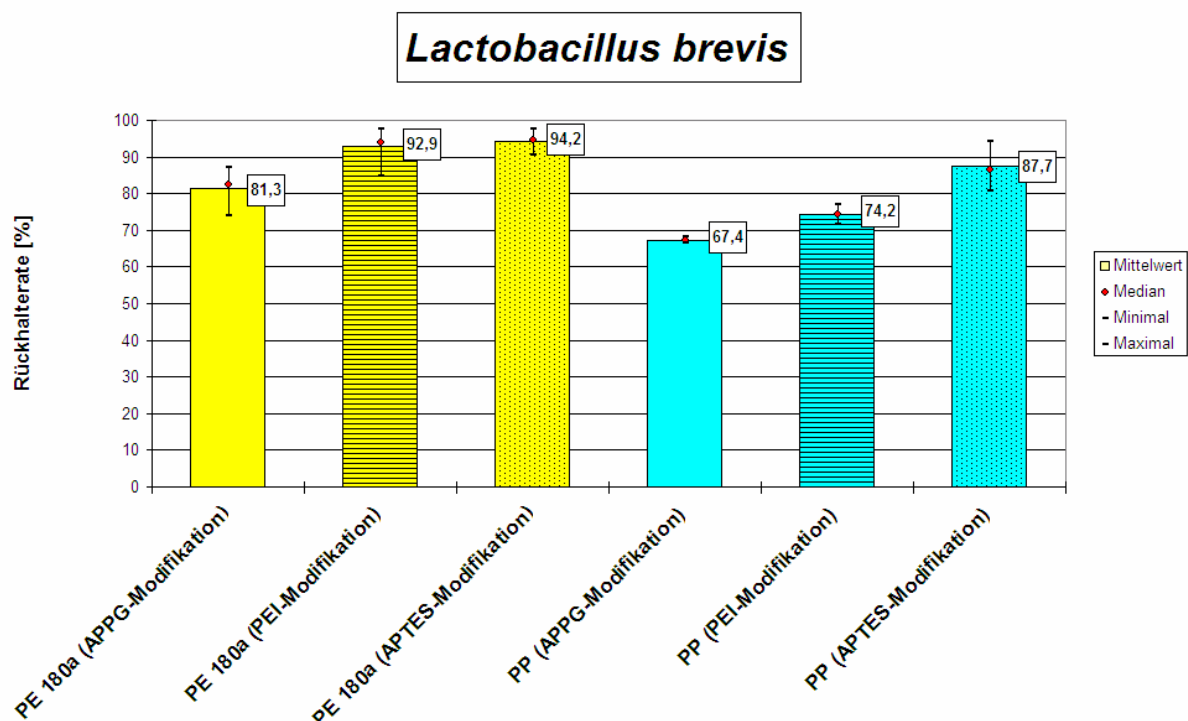
**Abbildung 3.21:** Gelelektrophorese eines 149 bp Amplifikats einer *Listeria monocytogenes* Probe aus Milch nach einer Polymerase-Kettenreaktion im Thermocycler

### 3.8.2 Anreicherung von Lactobacillen mit aminomodifizierten Kunststoffen

Bei der Anreicherung von Mikroorganismen aus flüssigen Lebensmitteln besteht oft die Notwendigkeit große Probenvolumina zu untersuchen. Um dieses zu ermöglichen, wurde ein auf der Affinität von aminomodifizierten Kunststoffen beruhendes Verfahren entwickelt. In den Kapiteln 3.8.2.1 und 3.8.2.2 sind die Ergebnisse der Bestimmung des Materials mit der höchsten Rückhaltekapazität sowie das daraus entstandene Analysenverfahren zur Anreicherung von Lactobacillen beschrieben.

#### 3.8.2.1 Bestimmung der Aminomodifikation mit der höchsten Rückhaltekapazität

Die vom Fraunhofer Institut für Polymerforschung bereitgestellten optimierten Aminoaffinitäts-Fritten (siehe Abbildung 2.6) wurden mit der unter 2.7.1.1 dargestellten Methode auf ihre Rückhaltefähigkeit gegenüber Bakterien getestet. Als Modellkeim wurde *Lactobacillus brevis* in einer Konzentration von ca.  $10^4$  KbE/g (bestimmt durch Oberflächenverfahren auf MRS-Agar im CO<sub>2</sub>-Brutschrank bei 30 °C) herangezogen. Die Rückhalteraten der einzelnen Module, welche durch die Wiederfindungsrate der eingesetzten Lactobacillen im Eluat ermittelt wurden (mindestens 6-fach Bestimmung), sind im Diagramm der Abbildung 3.22 dargestellt.

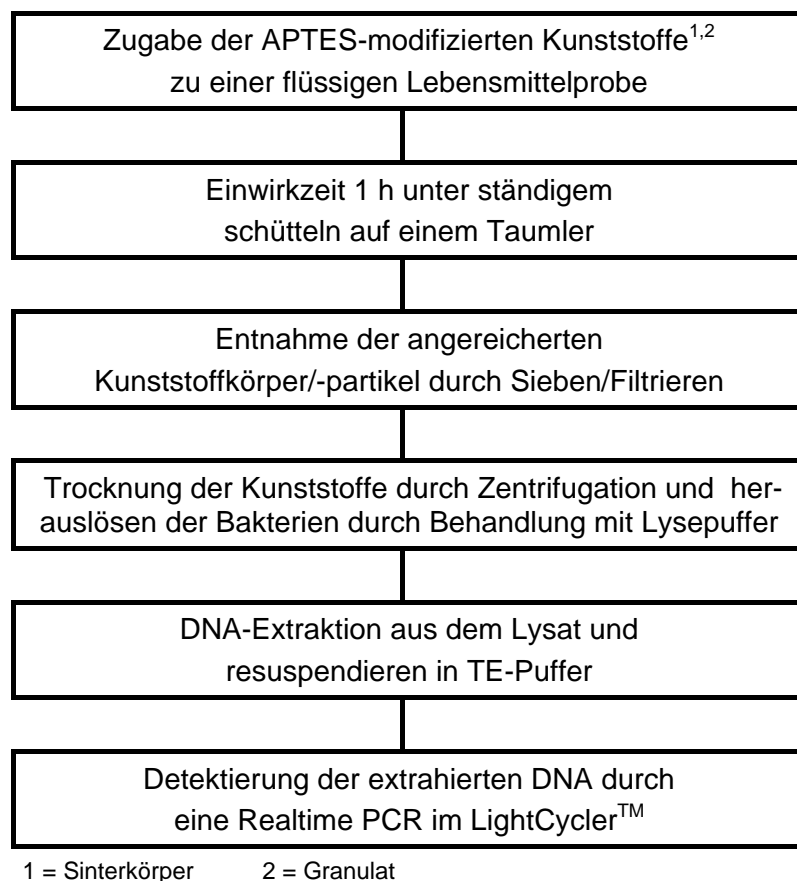


**Abbildung 3.22:** Rückhalteraten von *Lactobacillus brevis* nach Aufgabe auf eine Abicap<sup>®</sup>-Säule mit unterschiedlichen aminomodifizierten Kunststoff-Fritten

Die Rückhalteraten der eingesetzten aminomodifizierten Kunststoffkörper gegenüber *Lactobacillus brevis* lagen zwischen 67 und 94 %. Die Polyethylen Typ 180a modifizierten Fritten (gelbe Balken) zeigten im direkten Vergleich zu den analog modifizierten Polypropylen Fritten des Typs f-R 21073 (blaue Balken) deutlich höhere Rückhalteraten. Bei den Bis(Aminopropoxy)-oligopropylenglykol (APPG) modifizierten Fritten betrug der Unterschied 14 %, bei den Polyethylenimin (PEI) modifizierten Kunststoffen 19 % und bei den Aminopropylen-triehtoxysilan (APTES) modifizierten Material 6 %. Um diese kulturell ermittelten Ergebnisse zu manifestieren, wurden die Wiederfindungsraten auch mittels einer Polymerase-Kettenreaktion aus dem Eluat überprüft. Diese Methode konnte die zuvor ermittelten Ergebnisse bestätigen. Für die weitere Entwicklung eines Anreicherungs-systems für *Lactobacillus* wurde der Polyethylen Typ 180a mit der APTES-Modifikation ausgewählt, da dieses gegenüber dem eingesetzten Teststamm die höchste Rückhaltefähigkeit aufwies.

### **3.8.2.2 Verfahren zur Anreicherung von *Lactobacillus brevis* durch aminomodifizierte Kunststoffe mit nachfolgender PCR-Detektierung**

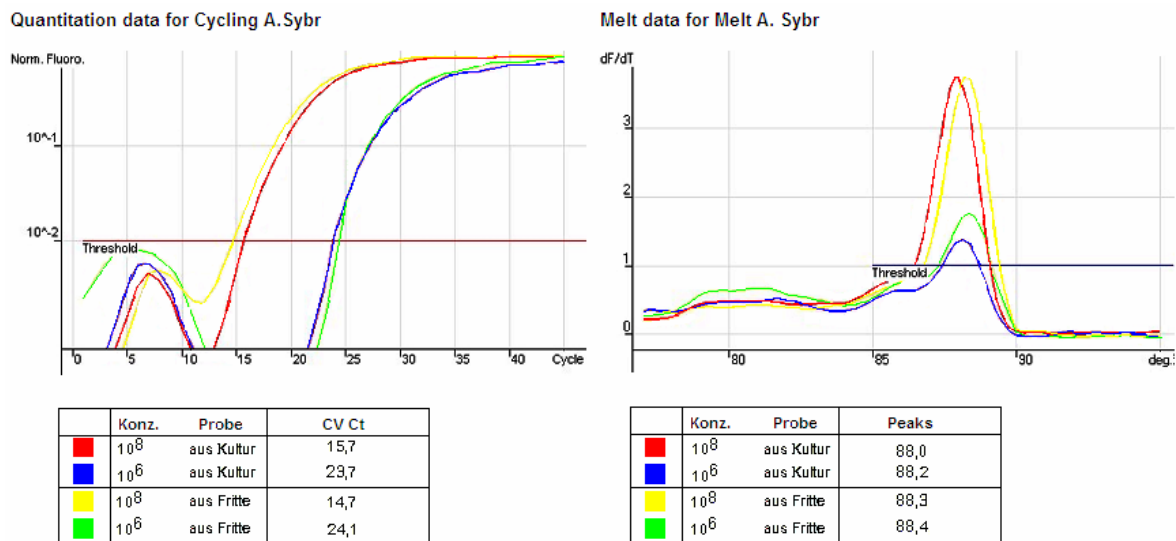
Auf Grundlage der unter 3.8.2.1 beschriebenen Ergebnisse wurde ein Verfahren auf Basis von APTES-Fritten entwickelt. Dabei werden in die zu untersuchende flüssige Probe die modifizierten Fritten in loser Form (ohne Abicap® -Säule) direkt eingebracht. Nach einer ein-stündigen Einwirkzeit (unter schütteln auf einem Taumler), werden die Kunststoffkörper wieder entnommen (abschöpfen oder absieben) und zur weiteren Analyse herangezogen. Eine Übersicht über das gesamte Verfahren mit PCR-Detektierung ist in dem folgenden Fließschema (Abbildung 3.23) dargestellt.



**Abbildung 3.23:** Ablaufschema eines Testsystems zur Anreicherung von *Lactobacillus brevis* durch Aminoaffinitätsmodule mit anschließender PCR-Detektierung

### 3.8.2.3 Aufnahmekapazität von Aminoaffinitäts-Sinterkörpern (lose Form) gegenüber *Lactobacillus brevis*

Um die Effizienz des im Kapitel 3.8.2.2 beschriebenen Verfahrens zu ermitteln, wurde die Aufnahmekapazität der in loser Form eingesetzten modifizierten Fritten gegenüber *Lactobacillus brevis* mit einem molekularbiologischen Verfahren ermittelt. Dazu wurde je ein Milliliter einer Verdünnungsreihe von *Lactobacillus brevis* in Eppendorfröhrchen pipettiert, je eine Fritte dazugegeben und nach einer Einwirkzeit von einer Stunde die Wiederfindungsrate von *Lactobacillus brevis* in den Kunststoffkörpern (PCR-Verfahren wie unter Punkt 2.5.4.2 beschrieben) bestimmt. Diese Ergebnisse wurden direkt mit denen aus den einzelnen Verdünnungsstufen bestimmten Keimkonzentrationen in Bezug gesetzt. Die in der Abbildung 3.24 dargestellten Ergebnisse wurden mit einem Rotor-Gene Realtime-PCR Analysengerät aufgenommen.



**Abbildung 3.24:** Quantifikation und Spezifikation von *Lactobacillus brevis* nach einer DNA-Extraktion direkt aus einer Flüssigkultur im Vergleich zu Proben nach einer Anreicherung in aminomodifizierten Kunststoff-Fritten

Die hier durchgeführte Untersuchung ergab, dass die Kapazität einer Fritte bei einer Konzentration von  $10^8$  KbE bei dem eingesetzten *Lactobacillus brevis* Stamm liegt. Die Abbildung 3.24 stellt dar, dass die direkt aus der Kultur bestimmten Ergebnisse (bei einem Gehalt bis  $10^8$  KbE) analoge Konzentrationen wie die aus den Kunststoffkörpern gewonnenen aufwiesen (linkes Diagramm). Die im rechten Diagramm dargestellten Schmelzkurven bestätigen, dass die Amplifikationsprodukte spezifisch als *Lactobacillus brevis* identifiziert werden konnten. Weiterführende Untersuchungen zeigten darüber hinaus, dass bei geringeren Keimkonzentrationen (geringer als  $10^5$  KbE/ml) der Einsatz von einer größeren Anzahl von Fritten die Nachweisgrenze dieses Verfahrens herabsetzt. Des Weiteren wurden erste Untersuchungen mit modifiziertem Kunststoffgranulat durchgeführt, welches im Verhältnis (pro mg Material) eine um zwei bis drei Zehnerpotenzen höhere Effizienz erwarten lässt (siehe auch Diskussion S. 120).

### 3.8.3 Nachweis von *Lactobacillus brevis* durch Membranfiltration

Um einen Vergleichsstandard zur Isolierung und zum Nachweis von Lactobacillen aus Lebensmitteln zur Verfügung zu haben, wurde das unter Kapitel 2.4.8 dargestellte Verfahren angewendet. Dazu wurden verschiedene Stufen einer Verdünnungsreihe von *Lactobacillus brevis* (Konzentration  $10^4$  bis  $10^7$  KbE/g) membranfiltriert und das Eluat auf Rückstände von *Lactobacillus brevis* hin untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass der verwendete Membranfilter ( $\varnothing$  0,45  $\mu\text{m}$ ) alle Bakterien zurückgehalten hat, also kein *Lactobacillus brevis* im Eluat nachgewiesen werden konnte.

## 4 DISKUSSION

Ungeachtet wissenschaftlicher Erkenntnisse, der verbesserten hygienischen Standards und der Optimierung der Lebensmitteltechnologie ist in den letzten Jahrzehnten eine Zunahme an bakteriologischen Erkrankungen durch Lebensmittel zu verzeichnen (SCHMITZ, 2000; KRÄMER, 2002; HELLENBRAND, 2003; ZORN, 2004). Insbesondere bei Kontaminationen im Bereich der Gemeinschaftsverpflegung und bei der Freigabe von Produkten in der Lebensmittelindustrie sind schnelle Analyseverfahren zur Identifizierung krankheitserregender Mikroorganismen von hohem Interesse (SCHMITZ, 2000; KEUSGEN *et al.* 2000; FERNER *et al.* 2001). Eines der bei Lebensmittelvergiftungen am häufigsten in Erscheinung tretenden Bakterien stellt *Clostridium perfringens* dar (SCHAU, 1986; MCCLANE, 1997; ALLEN *et al.*, 1999; MCCLANE *et al.* 2000). Die herkömmliche mikrobiologische Diagnostik dieses Mikroorganismus ist sehr zeit- und materialaufwendig. Neuere, immunologische und molekularbiologische Methoden, bewirken eine deutliche Zeitersparnis (KLEIN & BARTELT, 2003), haben jedoch oftmals, aufgrund des hohen instrumentellen Aufwands, nur beschränkt Anwendung in der Praxis gefunden (HECKÖTTER *et al.* 1997; LEHMACHER *et al.* 1998; FENGLER & ZÖLLER, 1999; KEUSGEN, 2003). Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer spezifischen und hoch sensitiven immunologischen Schnellmethode auf Durchflussbasis zum Nachweis von *Clostridium perfringens* in Lebensmitteln. Dabei sollte die Abicap<sup>®</sup>-Technologie, welche auf Grundlage günstiger Kunststoffpolymere basiert und bereits in der medizinischen Mikrobiologie zum Nachweis von *Clostridium tetani* verwendet wird (CAVUSLU *et al.* 2003), herangezogen werden. Die Etablierung dieser Methode für *Clostridium perfringens* sollte darüber hinaus als Grundlage für weitere Anwendungen in der lebensmittelmikrobiologischen Diagnostik dienen.

Die hohe Anzahl der durch *Clostridium perfringens* bedingten Lebensmittelvergiftungen wird durch ein Enterotoxin erzeugt, welches von nur fünf Prozent der Spezies gebildet werden kann (KOKAI-KUN *et al.*, 1994; SONGER & MEER, 1996; DAUBE *et al.*, 1996; WEN *et al.* 2003). Die Identifizierung und Charakterisierung von Enterotoxin bildenden Stämmen ist demnach von besonderer Bedeutung (EISGRUBER, 2003). Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Stämme andere Eigenschaften (Stoffwechsel, Hitzeresistenz, CPE-Regelmechanismen) aufweisen als nicht Enterotoxin bildende Stämme (WERDELING, 1989; CZECZULIN *et al.* 1996; SARKER *et al.*, 2000). Auf dieser Basis wurden gruppenspezifische Untersuchungen zur Feststellung phänotypischer Unterscheidungsmerkmale zwischen Enterotoxin- und nicht Enterotoxinbildenden *Clostridium perfringens* Stämmen als weiteres Ziel dieser Arbeit definiert. Die dabei ermittelten Ergebnisse wurden auch unter dem Gesichtspunkt der Herkunft und der Isolationszeiträume der Stämme miteinander verglichen.

### **Identifizierung von *Clostridium perfringens***

In der vorliegenden Arbeit wurden 57 *Clostridium perfringens* Stämme, die aus Lebensmittel und Patienten (siehe Tabelle 2.1) isoliert wurden, untersucht. Die eindeutige Identifizierung der herangezogenen Isolate ist die grundlegende Voraussetzung für die Aussagekraft einer Charakterisierung der Eigenschaften von *Clostridium perfringens*. Diesbezüglich wurden eine Duplex-PCR nach FACH und POPOFF (1997) und der Reverse Campstest ( $\beta$ -Hämolyse) zur Überprüfung der Identität genutzt (SCHALCH, 1996; RHODEHAMEL & HARMON, 1998). Beiden Verfahren haben nachgewiesen, dass es sich bei den hier herangezogenen Isolaten um *Clostridium perfringens* handelt. Darüber hinaus konnten mit dem verwendeten PCR-Verfahren fünf Stämme als Träger des *cpe*-Gens (BAJTAY & LANGFELDT, 2003) identifiziert bzw. bestätigt werden.

### **Zellaufbau/-zusammensetzung Enterotoxin bildender *Clostridium perfringens* Stämme**

Enterotoxin bildende *Clostridium perfringens* Stämme haben andere Eigenschaften (Stoffwechsel, Hitzeresistenz) als nicht Enterotoxin bildende Stämme (WERDELING, 1989; SARKER *et al.*, 2000). Um feststellen zu können, ob diese Unterschiede sich in der Zusammensetzung der Bakterienzelle widerspiegeln, wurden die hier zur Verfügung stehenden Stämme mit einer FT-IR-Spektroskopie, die Mikroorganismen auf Grundlage ihrer Stoffwechselprodukte und Zellbestandteile differenziert (HERING-SOTZECK, 1998; SCHERER, 2001; KIRSCHNER, 2004), untersucht. Die Ergebnisse dieses Verfahrens werden im Rahmen einer Clusteranalyse dargestellt (NAUMANN, 1997). Die eigenen Untersuchungen (siehe Kapitel 3.2.2) ergaben, dass sich bei den geprüften Stämmen zwei Hauptcluster (Cluster A mit insgesamt 51 Stämmen, Cluster B mit acht Stämmen) mit einer geringen spektralen Distanz (maximal 2,5), welche auf eine hohe Ähnlichkeit/Verwandtschaft schließen lässt (WENNING, 2003), identifizieren lassen. Die insgesamt sechs eingesetzten Enterotoxinbildner verteilten sich dabei gleichmäßig auf beide Cluster, so dass sie untereinander keine höhere Ähnlichkeit aufwiesen, als zu den anderen untersuchten *Clostridium perfringens* Stämmen. Auch eine unterschiedliche Gewichtung (NAUMANN *et al.*, 1990b; HERDING-SOTZECK, 1998, WENNING, 2003) der einzelnen Funktionsbereiche (z.B. höhere Gewichtung des Amidfensters, bei welchem auch DNA- und RNA-Strukturen Einfluss auf die Signalwirkung haben) konnte diesen Befund nicht beeinflussen.

### **Antibiotikaempfindlichkeit Enterotoxin bildender *Clostridium perfringens* Stämme**

Eine weitere Untersuchung sollte zeigen, ob die Enterotoxinbildenden gegenüber den nicht Enterotoxin bildenden Stämmen eine unterschiedliche Antibiotikasensitivität haben. Dazu wurden ein Agardiffusionstest und die Bouillon-Mikrodilutionsmethode herangezogen. Die



Hemmhöfe bzw. MHK-Werte der zu untersuchenden Stämme wurden bestimmt und miteinander verglichen (ROCHE LEXIKON MEDIZIN, 1999; TAREK, 2001). Es wurden Antibiotika eingesetzt, die die Zellwand-, die Protein-, bzw. die Nukleinsäuresynthese hemmen.

Inhibitoren der Zellwandsynthese wirken hauptsächlich durch die Unterbindung der Mureinsynthese (Hof *et al.* 2002). Eine bedeutende Gruppe stellen die  $\beta$ -Laktam-Antibiotika dar, welche schwer hydrolysierbar an Penicillinbindepoteine (PBP) binden. Diese sind in der Zytoplasmamembran lokalisiert, besitzen eine Transpeptidase-Transglykolyase- oder Carboxypeptidaseaktivität und sind für die Peptidoglykansynthese essentiell (WAXMANN *et al.* 1983). Die Bindung der Antibiotika an die PBP stört die Zellwandbiosynthese, was letztendlich zu einem Sekundärtod der Zelle führt (YAO & MOELLERING, 1995; HUMANN, 2000). In der vorliegenden Studie wurden diesbezüglich die Penicilline Amoxicillin/Clavulansäure und Ampicillin, sowie das Carbapenem Imipenem eingesetzt. Eine weitere Gruppe der Zellwandsyntheseinhibitoren stellen die Glykopeptide dar, die durch eine Komplexierung des entstandigen D-Alanyl-D-Alanin-Abschnitts die Elongation und Quervernetzung der Peptidoglykanketten verhindern (NAGARAJAN, 1991; ARTHUR & COURVALIN, 1993; MUTSCHLER, 1996; HUMANN, 2000). Aus der Gruppe der Glykopeptide wurden Teicoplanin und Vancomycin verwendet.

Die Untersuchungen haben gezeigt (siehe Kapitel 3.2.3), dass Zellwandsyntheseinhibitoren grundsätzlich dazu geeignet sind, *Clostridium perfringens* abzutöten. Die Penicilline zeigten bei Konzentrationen  $\leq 0,25 \mu\text{g/ml}$  bzw. bei Teicoplanin zwischen  $\leq 0,25$  und  $0,50 \mu\text{g/ml}$  eine Hemmwirkung. Höhere Werte waren bei Verwendung von Vancomycin (ca. 2 bis  $4 \mu\text{g/ml}$ ) und Imipenem feststellbar, wobei letzts genanntes bei sehr unterschiedlichen Konzentrationen eine Hemmwirkung verursachte ( $\leq 0,25$  bis  $> 32 \mu\text{g/ml}$ ). Dies trat vor allem bei den nicht Enterotoxin bildenden Stämmen auf. Die Mittelwerte der Hemmhöfe (siehe Anhang 2) und der MHK-Werte der Glykopeptide sowie des Carbapenem (siehe auch S. 101/102) weisen darauf hin, dass Enterotoxinbildner geringfügig empfindlicher gegen diese Zellwandinhibitoren sind als die übrigen Stämme. Diese Aussage wird bei der Betrachtung der Hemmhöfe durch den Zweistich-Gauss-Test unterstützt, der mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von  $\pm 0,1 \%$  bei Teicoplanin bzw.  $\pm 2,2 \%$  bei Vancomycin einen signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten aufzeigt. Da die Untersuchung lediglich an fünf Stämmen mit Enterotoxinbildungsvormögen durchgeführt wurde (entspricht 10 % des Gesamtanteils), sind die hier ermittelten Ergebnisse trotz der hohen statistischen Signifikanz nur als Trend zu bewerten.

Als Inhibitoren der Proteinsynthese wurden Aminoglycoside, Tetrazykline, Makrolide und Streptogramine eingesetzt. Das verwendete Aminoglycosid Gentamicin verhindert durch irreversibles Blockieren der Ribosomen (30S-Untereinheiten) die fehlerfreie Translation der mRNA. Dadurch entstehen sogenannte „Nonsense-Proteine“ (fehlerhafte Enzym- und Struk-

turproteine), die nicht funktionsfähig sind und irreversible Membranschäden hervorrufen (DAVIES, 1983; RUSTIGE-WIEDEMANN & WIEDEMANN 1996). Von insgesamt 57 zur Verfügung stehenden *Clostridium perfringens* Stämmen konnten 36 Stämme (63 %) durch den Einsatz von bis zu 16 µg/ml Gentamicin gehemmt werden. Bei drei Enterotoxinbildnern und 18 nicht Enterotoxin bildenden Stämmen waren die eingesetzten Konzentrationen unwirksam. Ein statistisch abgesicherter Unterschied zwischen den Stämmen mit und ohne Enterotoxinbildungsvermögen war nicht feststellbar.

Das eingesetzte Tetrazyklin Doxycyclin unterbindet durch eine reversible Bindung an die Ribosomen (30S-Untereinheiten) die Anlagerung der Aminoacyl-tRNA an den mRNA-Ribosom-Komplex, und somit die Verlängerung der Polypeptidkette (GOLDMANN *et al.* 1983; CHOPRA *et al.* 1992). Hier zeigte sich im Mittel ein deutlicher Unterschied zwischen Enterotoxinbildnern und Nicht-Enterotoxinbildnern. So konnten alle Stämme mit Enterotoxinbildungsvermögen bereits bei Einsatz von  $\leq 0,25$  µg Doxycyclin gehemmt werden. Von den nicht Enterotoxin bildenden Stämmen konnten lediglich 15 Stämme (29 %) bei dieser Konzentration am Wachstum gehindert werden. Bei den übrigen Stämmen benötigte man 0,5 bis 32 µg/ml, bei einem Stamm reichte auch die höchste eingesetzte Konzentration nicht zur Hemmung aus.

Das Makrolid Erythromycin blockiert die Proteinsynthese in der Elongationsphase durch eine reversible Bindung an die 50S-Untereinheiten der Ribosomen. Dabei verhindert es den Austritt von Polypeptiden (bestehend aus wenigen Aminosäuren) aus dem Ribosom, wodurch eine weitere Verlängerung der Peptide unterbunden wird (BAUERNFEIND, 1993; CHITTUM & CHAMPNEY, 1995). Dieser Wirkungsmechanismus hatte auf das Wachstum der untersuchten Stämme keinen entscheidenden Einfluss. In beiden Fällen reichten durchschnittliche Konzentrationen von 8 und 16 µg/ml zur Hemmung aus.

Die Wirksamkeit von Quinupristin/Dalfopristin (Streptogramine) beruht auf einem Synergieeffekt (als Einzelsubstanzen sind sie unwirksam). Dabei bewirkt Dalfopristin durch Bindung an die 50S-Untereinheiten der ribosomalen Proteine L 10 und L 11 eine Konformationsänderung, welche dem Quinupristin den Zugang zum Protein L 24 ermöglicht. Dadurch entsteht ein stabiler Komplex, welcher die Extrusion neu synthetisierter Polypeptide verhindert, wodurch die Ribosomen funktionsunfähig werden (TRAUTMANN *et al.* 1997). Diese, in Kombination eingesetzten Streptogramine, sind geeignet *Clostridium perfringens* zu hemmen ( $\varnothing$  2 µg/ml), wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den MHK-Werten Enterotoxin bildender gegenüber nicht Enterotoxin bildenden Stämmen feststellbar war.

Als weitere Gruppe von Antibiotika, die hier zur Charakterisierung von Enterotoxin bildenden *Clostridium perfringens* Stämmen diente, wurden die Chinolone (Ciprofloxacin und Ofloxacin) eingesetzt. Diese Inhibitoren der Nukleinsäuresynthese wirken durch Ausbildung eines stabili-

len Topoisomerase-DNA-Antibiotika-Komplexes, welcher die Beendigung der chromosomalen DNA-Replikation zur Folge hat (LIU *et al.*, 1980; WOLFSON & HOOPER, 1985; MUTSCHLER, 1996, HEISIG, 1997). Beide Chinolone waren in der Lage, das Wachstum der untersuchten *Clostridium perfringens* Stämme zu unterbinden. Als einzige Ausnahme kann der Stamm 753, ein nicht Enterotoxin bildendes Patientenisolat, angesehen werden. Bei diesem Stamm reichte bei beiden Antibiotika der Einsatz einer Konzentration von bis zu 8 µg/ml nicht zur Hemmung aus. Mögliche Ursachen dafür sind die Ausbildung einer Resistenz in Form einer Mutation der Zielstruktur oder ein Herabsetzen der Antibiotikakonzentration am Wirkort durch Effluxmechanismen (HEISIG & WIEDEMANN, 2001). Abgesehen von diesem Stamm, wiesen die übrigen Stämme eine ähnliche Empfindlichkeit gegenüber den Chinolonen auf.

Ein weiteres, hier verwendetes Antibiotika, stellt Cotrimoxazol, eine Gemisch aus Sulfamethoxazol (Sulfonamid) und Trimethoprim (Diaminopyridin), dar. Diese Hemmstoffe greifen in unterschiedliche Stadien des Folsäuremetabolismus ein, wodurch die Bildung von Tetrahydrofolsäure (THF) gehemmt wird. THF wird bei zahlreichen Synthesevorgängen des Bakteriums als Donator von C<sub>1</sub>-Einheiten benötigt, so dass die Hemmung letztendlich auch die Nukleinsäuresynthese unterbindet (HITCHINGS, 1973; RICE & BONOMO, 1996). Cotrimoxazol erwies sich bei den untersuchten *Clostridium perfringens* Stämmen als überwiegend unwirksam. So konnten bei dem hier angewendeten Bouillon-Mikrodilutionstest lediglich sechs Stämme (11 %, drei Enterotoxinbildner und drei Nicht-Enterotoxinbildner) durch den Eingriff in den Folsäuremetabolismus in ihrem Wachstum Es wird beschrieben, dass die Zusammensetzung des Kultur-Mediums für die Wirksamkeit des Cotrimoxazols von entscheidender Bedeutung ist. So beschrieben bereits FERONE *et al.* 1975, und FERGUSON & WEISSFELD (1984) das Schwankungen im Thymin- und Thymidin-Gehalt im Nährboden beim Einsatz von Sulfonamiden und Trimethoprim einen bedeutenden Einfluss auf die Bestimmung der MHK-Werte haben. Eigene Untersuchungen haben gezeigt, dass ein Medium nicht nur das Wirksamkeitsspektrum bzw. die Minimale-Hemm-Konzentration als absoluten Wert verschieben kann, sondern das bestimmte Medien sogar dazu führen können, dass sich ein Antibiotikum insgesamt als unwirksam darstellt. So konnte auch in der vorliegenden Arbeit dargestellt werden, dass bei einem Agardiffusionstests mit Cotrimoxazol auf Columbia-Agar (Blutplatten) keine Hemmung, bei der Verwendung von Müller-Hinton-Agar aber deutliche Hemmhöfe erkennbar waren. Begründbar ist diese Beobachtung durch die vorhandenen Nährstoffe in den eingesetzten Medien. Leberbouillon (eingesetzt bei Bouillon-Mikrodilutionstest) und Blut (eingesetzt beim Agardiffusionstest) können Anteile von Tetrahydrofolsäure enthalten, so dass die Hemmung des Folsäuremetabolismus durch Cotrimoxazole in Folge bis zu einem gewissen Grad unwirksam bleibt. Fehlen solche Inhaltsstoffe,

wie dieses beim Müller-Hinton-Agar der Fall ist, so muss das untersuchte Bakterium die Tetrahydropholsäure selbst synthetisieren, wodurch ein Eingriff in den Folsäuremetabolismus auch zur Hemmung des Organismus führen kann. Wie zu erwarten war, konnte in der vorliegenden Studie in mehreren Fällen bestätigt werden (siehe Kapitel 3.5 und Anhang 3), dass für die Aussagekraft einer Antibiotikaresistenz die Wahl des Mediums von entscheidender Bedeutung ist und Messwerte, die auf verschiedenen Nährböden ermittelt wurden, nicht unmittelbar vergleichbar sind. Dem entsprechend sollte bei der Auswahl der Medien darauf geachtet werden, dass für den zu untersuchenden Bakterienstamm die Bedingungen und der Nährstoffgehalt optimiert sind oder diese zumindest ein vergleichbares Milieu aufweisen, wie es der zu untersuchende Mikroorganismus in seiner natürlichen Umgebung auffindet.

### **Sporulationsverhalten Enterotoxin bildender *Clostridium perfringens* Stämme**

Durch *Clostridium perfringens* implizierte Lebensmittelvergiftungen werden durch ein Enterotoxin erzeugt, das sich während der Sporulation im Dünndarm bildet und nach Lysis der Zelle freigesetzt wird (KATSARAS, 1980; WERDELING, 1989). Die Enterotoxinsynthese ist ein sporulationspezifischer Prozess (WERDELING, 1989; KRÄMER, 2002; BAJTAY & LANGFELDT, 2003). In vitro Untersuchungen von BAJTAY & LANGFELDT (2003) haben gezeigt, dass es keine quantitative Übereinstimmung zwischen der Sporulationsintensität und dem Enterotoxinbildungsvermögen gibt. In der hier vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob Enterotoxin bildende *Clostridium perfringens* Stämme grundsätzlich eher dazu befähigt sind Sporen auszubilden, als nicht Enterotoxin bildende Stämme. Dazu wurde das Sporulationsverhalten, von Enterotoxin bildenden und nicht Enterotoxin bildenden Stämmen, nach einer Pasteurisation in DRCM-Bouillon untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass alle Enterotoxinbildner dazu in der Lage waren, während der Pasteurisation zu sporulieren. Dagegen konnte bei den 51 nicht Enterotoxin bildenden Stämmen lediglich bei 17 Stämmen (33 %) bei allen parallel durchgeführten Untersuchungen eine Sporulation nachgewiesen werden. 13 Stämme (25 %) wiesen unter diesen Bedingungen kein Sporulationsvermögen auf. Um in vitro eine Sporulation von *Clostridium perfringens* zu induzieren, wurde eine Vielzahl verschiedener Medien entwickelt (DUNCAN & STRONG, 1969 ; PHILLIPS , 1986 ; MEYER & THOLOZAN , 1999). BAJTAY und LANGFELDT (2003) haben die in der hier vorliegenden Arbeit untersuchten Enterotoxin bildenden *Clostridium perfringens* Stämme auf ihr Sporulationsverhalten auf dem Sporulationsmedium nach Phillips untersucht. Dabei konnte bei allen Enterotoxinbildnern eine Sporulation nachgewiesen werden. Die hier beschriebenen Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass Enterotoxin bildende Stämme eher zur Sporulation befähigt sind als nicht Enterotoxin bildende Stämme. Aufgrund der insgesamt geringen Anzahl an untersuchten Enterotoxinbildnern (5 Stämme) kann diesbezüg-

lich jedoch keine abschließende Aussage getroffen werden. Die hier durchgeführten Untersuchungen haben darüber hinaus gezeigt, dass DRCM-Bouillon nur bedingt zum Nachweis von *Clostridium perfringens* geeignet ist. Der Nachweis einer Sulfitreduktion ist prinzipiell ein signifikantes Merkmal um Clostridien, inklusive *Clostridium perfringens*, nachzuweisen (KAWABATA, 1979). In der Routineanalytik ist es jedoch notwendig, andere sulfitreduzierende Bakterien, die zu einem falsch positiven Ergebnis führen könnten, zu beseitigen. Dazu wird in der Praxis eine Pasteurisation des beimpften Nährbouillon durchgeführt (GERTEN, 1993). Eigene Untersuchungen haben gezeigt, dass unter diesen Bedingungen nicht alle *Clostridium perfringens* Stämme zu einer Sporulation in DRCM-Bouillon befähigt sind. Demnach hätten bei der hier vorliegenden Studie 13 (23 %) der insgesamt 57 Stämme nach einer Pasteurisation nicht nachgewiesen werden können.

#### **Unterscheidungsmerkmale zwischen *Clostridium perfringens* Stämmen aus Lebensmittel- und Patientenisolaten und unterschiedlichen Isolationszeiträumen**

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollte auch untersucht werden, ob aufgrund des Umgebungsmilieus und der Isolationszeiträume phänotypische Unterschiede zwischen den einzelnen *Clostridium perfringens* Isolaten feststellbar sind. Dazu wurden insgesamt 25 Lebensmittelisolate mit 32 Patientenisolaten und Stämmen, die zwischen 1979 und 1981 bzw. 2001 und 2003 isoliert wurden (LEUSCH, 2003; BAJTAY & LANGFELD, 2003; ACKERMANN, 2003), miteinander verglichen. Die zur Untersuchung herangezogene FT-IR-Spektroskopie konnte weder zwischen Lebensmittel- und Patientenisolaten, noch bei den in den unterschiedlichen Zeiträumen isolierten Stämmen eine Clusterbildung im Dendrogramm feststellen. Demnach kann mit der hier angewendeten Methode keine grundsätzliche Veränderung des Stoffwechsels, der Struktur und des Aufbaus der untersuchten Stämme durch das Umgebungsmilieu oder durch die Isolationszeiträume festgestellt werden.

Ein Vergleich der Sensitivität der einzelnen Isolationsgruppen gegenüber verschiedenen Antibiotikazeigte, dass die Isolationszeit bzw. der Isolationsort keinen Einfluss auf die Empfindlichkeit der einzelnen *Clostridium perfringens* Stämme hat. Eine Ausnahme stellt der Zellwandinhibitor Imipenem dar. Die ermittelten MHK-Werte weisen eine breite Streuung auf. Trotz dieser uneinheitlichen Empfindlichkeit gegenüber Imipenem ist beim Vergleich der Lebensmittel- mit den Patientenisolaten ein tendenzieller Unterschied im notwendigen Konzentrationsbereich feststellbar (Lebensmittelisolate im Bereich von  $\varnothing$  0,25 bis 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ; Patientenisolate im Bereich von  $\varnothing$  2 bis 4  $\mu\text{g/ml}$  und zwei Wundisolate mit  $> 32 \mu\text{g/ml}$ ). Der große Schwankungsbereich dieses  $\beta$ -Laktam-Antibiotikums könnte darauf hinweisen, dass einzelne *Clostridium perfringens* Stämme in diesem Konzentrationsbereich Resistenzmechanismen entwickeln und dass der Isolationsort der Stämme einen Einfluss darauf hat. Einen mögli-

chen Mechanismus stellt die Ausbildung einer Mutation, welche die Permeabilität der Zellmembran vermindert, dar (CHARREL *et al.*, 1996). Bei der Betrachtung dieser Ergebnisse ist zu beachten, dass Imipenem sehr empfindlich (instabil) und nur begrenzt lagerfähig ist. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass beim Einsatz von Mikronaut-Platten der Firma Merlin, bei der Bestimmung der durch Imipenem erzeugten MHK-Werte, nicht reproduzierbare Ergebnisse zustande kommen können (HUPPERTZ & WIEDEMANN, 2002), so dass die mit diesem Antibiotikum ermittelten Ergebnisse hier nicht weiter als Grundlage der Differenzierung der einzelnen *Clostridium perfringens* Stämme herangezogen wurden.

Zwischen 1972 und 1986 wurden mehrere Untersuchungen zur Überprüfung der Ausbildung von Resistenzen von *Clostridium perfringens* gegenüber einer Auswahl an Antibiotika durchgeführt. Trotz Anwendung unterschiedlichster Methoden waren die Ergebnisse in der Regel vergleichbar (JOBST, 2001). Unterschiede ergaben sich lediglich bei der Beurteilung der Resistenzen gegenüber Tetrazyklinen und Penicillinen. So stellten MARTIN *et al.* (1972) fest, dass Tetrazykline gegenüber 85 % der untersuchten Stämme wirksam waren, wohingegen BROWN & WAATTI (1980) nur noch 25 % der Stämme als empfindlich darstellten. Ähnliches wurde von MARRIE *et al.* (1981) im Bezug auf Penicilline beschrieben. Sie konnten im Gegensatz zu BRAZIER *et al.* (1985) einen Anstieg der Resistenz gegenüber dieser Antibiotikagruppe feststellen. Eigene Untersuchungen konnten bei der Gegenüberstellung von Stämmen, die im Zeitraum zwischen 1979-1981 bzw. 2001-2003 isoliert wurden, keine signifikanten Unterschiede in der Antibiotikaresistenz feststellen. Die Betrachtung der MHK-Werte der Penicilline (Amoxicillin/Clavulansäure und Ampicillin) zeigt, dass bei 90 % der Stämme der Einsatz von  $\leq 0,25 \mu\text{g/ml}$  zur Wachstumshemmung ausreichte. Ein vergleichbares Ergebnis wurde auch beim Einsatz von Doxycyclin (Tetracyclin) beobachtet, bei dem 70 % der untersuchten Stämme bei einer Konzentration von  $1 \mu\text{g/ml}$  und über 97 % der Stämme bei der Verwendung von bis zu  $32 \mu\text{g/ml}$  nicht mehr wachstumsfähig waren. Bei der Bewertung der Ergebnisse ist jedoch zu beachten, dass der überwiegende Anteil der hier zur Verfügung stehenden Stämme gefriergetrocknet gelagert wurde. Von den insgesamt 21 Stämmen, die im Zeitraum 2001 bis 2003 isoliert wurden lediglich drei (14 %) keinem Gefriertrocknungsprozess unterzogen. Ein Vergleich der MHK-Werte mit den übrigen 18 Stämmen dieses Isolationszeitraumes zeigte keinen maßgebenden Unterschied, so dass die Lagerung im gefriergetrockneten Zustand möglicherweise keinen entscheidenden Einfluss auf die Antibiotikaresistenz der einzelnen Stämme ausübt. Letztendlich ist jedoch eine Auswirkung durch den Prozess und die Lagerung im gefriergetrockneten Zustand nicht auszuschließen.

Vergleicht man das Sporulationsverhalten von Isolaten aus unterschiedlichen Umgebungsmedien und Zeiträumen, so sind nur vereinzelt Unterschiede feststellbar. So zeigten jeweils ca. 35 % der Lebensmittel- und Patientenisolate und der zwischen 2001 bis 2003 isolierten

Stämme ein positives Sporulationsverhalten. Lediglich Stämme, die zwischen 1979 und 1981 isoliert wurden, wiesen mit ca. 50 % ein etwas höheres Sporulationsvermögen auf. Etwas differenzierter stellten sich die Anteile der unter diesen Bedingungen nicht zur Sporulation befähigten Stämme dar. Hier zeigten ca. 12 % der Lebensmittelisolate und der zwischen 1979 und 1981 isolierten Stämme und ca. 30 % der Patientenisolate und der im Zeitraum zwischen 2001 und 2003 isolierten Stämmen keine Sporulation. Trotz dieser Unterschiede kann kein genereller Zusammenhang zwischen Isolationszeit und -ort und dem Sporulationsverhalten festgestellt werden.

### **Entwicklung eines immunologischen Analysensystems auf Basis der Abicap<sup>®</sup>-Technologie zum Nachweis von *Clostridium perfringens* in Lebensmitteln**

Herkömmliche, kulturelle Nachweisverfahren (ISO, § 35 Methoden) benötigen zum Nachweis und Identifizierung von *Clostridium perfringens* in Lebensmitteln mehrere Tage (BAUMGART & BECKER, 2004). Eine deutliche Zeitersparnis können immunologische Analysensysteme, die auf spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktionen beruhen, und in der Medizin bereits weit verbreitet sind, erbringen. Zahlreiche methodische Verbesserungen, insbesondere der Einsatz von enzymmarkierten Reagenzien (ELISA) haben dazu geführt, dass diese Verfahren in der Lebensmittelanalytik immer mehr Verwendung finden (NEWSOME, 1986; LÜTHY & WINDEMANN, 1987; FUKAL & KAS, 1989; MÄRTLBAUER *et al.*, 1991; BECKER *et al.*, 1992). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein immunologisches Schnellverfahren zum Nachweis von *Clostridium perfringens* zu entwickeln. Diese Methode sollte eine hohe Selektivität, eine Zeitersparnis, geringe Kosten, sowie den Einsatz von hohen Probenvolumina, insbesondere auch unter dem Gesichtspunkt der Übertragung eines solchen Systems zum Nachweis anderer pathogener Mikroorganismen in Lebensmitteln, ermöglichen (SCHMITZ & KRÄMER, 2000). Als Basis sollte die auf synthetischen Polymeren (Kunststoffkörpern) beruhende Abicap<sup>®</sup>-Technologie dienen, die bereits in der medizinischen Mikrobiologie zum Nachweis von *Clostridium tetani* genutzt wird (BIOGNOSIS, 2000). Erste Versuche, dieses Verfahren in der Lebensmittelmikrobiologie einzusetzen, scheiterten an einer zu hohen Nachweisgrenze und fehlenden Reproduzierbarkeit (TIGGES, 1998). Zur Beseitigung dieser Problematik wurden umfangreiche Untersuchungen zur Auswahl und Charakterisierung eines geeigneten Materials, welches als Trägersystem für die spezifischen Antikörper dienen soll, durchgeführt (FERNER *et al.* 2001). Um eine optimierte und ausgerichtete Antikörperbeschichtung zu erreichen, wurde das bisher zur Kopplung von Antikörpern eingesetzte absorptive Verfahren durch ein neues kovalentes Bindevverfahren (KEUSGEN *et al.* 2000) ersetzt. Dadurch ist eine erhöhte Effizienz und Empfindlichkeit des Systems zu erwarten.

### **Charakterisierung der Wechselwirkung von Kunststoff-Fritten mit Bakterien**

Zur Untersuchung von Interaktionen zwischen Kunststoffoberflächen und Mikroorganismen wurden vier unterschiedliche Sinter- bzw. Faserfritten auf ihre Rückhaltekapazität gegenüber einer Auswahl von humanpathogenen Bakterien mit signifikant unterschiedlichen Zellwandstrukturen getestet (FERNER *et al.* 2001). Die Untersuchungen zeigten, dass die eingesetzten Kunststoffe unterschiedliche Wechselwirkungen mit dem ausgewählten Keimspektrum eingehen. Fritten aus Polyester und Polyethylen des Typs Porex hielten 15 bis 35 % der eingesetzten Keimsuspensionen zurück, Fritten aus Polyethylen des Typs 180c und Polypropylen 41 bis 98 % bzw. 17 bis 83 %. Der Einsatz von Blockpuffern (unspezifische Belegung von freien Bindungsstellen durch Pufferzusätze) sollte Wechselwirkungen zwischen Bakterienzellwänden und Kunststoffoberflächen herabsetzen (FERNER *et al.* 2001). Dies trat nicht in jedem Fall ein. So minderten sich beim Polyester die Rückhalteraten nur bei zwei, beim Polyethylen Typ Porex bei fünf und beim Polypropylen bei sieben der jeweils acht eingesetzten Bakterienstämme. Insgesamt hat der Einsatz von Blockpuffern dazu geführt, dass die Schwankungsbreite der Rückhalteraten auf durchschnittlich 5 bis 35 % herabgesetzt wurde. Dabei war jedoch festzustellen, dass das Blocken nicht dazu ausreicht hat die Wechselwirkungen der Materialien so anzugleichen, dass je ein Stamm bei allen Kunststoffmaterialien die gleiche Rückhalterate aufweist.

Die Rückhaltekapazität von Kunststoff-Fritten gegenüber Mikroorganismen kann durch Filtrationseffekte oder Wechselwirkungen der Bakterienzellwände mit den Kunststoffoberfläche hervorgerufen werden. Um feststellen zu können, ob die Rückhalteraten durch die Porendurchmesser zustande kommt, wurden die eingesetzten Bakterien der Größe nach in Gruppen eingeteilt und verglichen, ob die Rückhalteigenschaften gruppenspezifisch korrelieren. Darüber hinaus wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen des Kunststoffmaterials angefertigt. Dabei konnte dargestellt werden, dass die Poren der Faser- und Sinterkörper um das 10 bis 100-fache größer sind als die eingesetzten Bakterien und kein gruppenspezifischer Zusammenhang zwischen Größe und Rückhalterate besteht. Auch die Betrachtung grundsätzlicher Zellwandunterschiede (grampositiv gegenüber gramnegativ) der hier verwendeten Mikroorganismen zeigten keine Übereinstimmung mit den unterschiedlichen Rückhaltekapazitäten (siehe auch Wechselwirkungen mit modifizierten Kunststoffmaterial, Seite 105).

Um die Eigenschaften und die Kapazität der eingesetzten Kunststoffkörper näher zu charakterisieren, wurden mehrere Frittenkörper hintereinander geschaltet, dem oben beschriebenen Verfahren unterworfen (siehe Kapitel 2.7.1.4) und die daraus resultierenden Rückhalteraten bewertet. Dabei konnte festgestellt werden, dass die eingesetzten Kunststoffkörper pro Einheit in etwa den gleichen prozentualen Anteil an Mikroorganismen zurückhalten und demnach ähnlich wie theoretische Böden fungieren (FALBE & REGITZ, 1995). Dieser Effekt



konnte bei beiden Versuchsaufbauten bestätigt werden, wobei die einzeln hintereinander geschalteten Fritten etwas besser korrelierten, als der durchgehende Frittenkörper. Dies ist dadurch begründbar, dass die jeweils auftretenden Grenzflächeneigenschaften beim Ein- und Austritt der Probe bei einzeln positionierten Fritten, im Gegensatz zu einem langen Frittenkörper, jeweils gleich sind. Im Rahmen der unter 2.7.1.4 beschriebenen Untersuchung wurde auch die Kapazitätsgrenze (getestet mit Polypropylenfritten und *Listeria monocytogenes*) bestimmt, die bei dieser Kombination bei etwa  $10^7$  KbE/ml Keimsuspension liegt.

Abschließend betrachtet, hat die Untersuchung der für Antikörper als mögliche Träger zur Verfügung stehenden Faser- und Sinterkörper ergeben, dass Bakterien mit den geprüften Kunststoffen Wechselwirkungen eingehen. Diese sind je nach Material und eingesetztem Mikroorganismus individuell unterschiedlich. Dies bedeutet, dass die verschiedenen Trägermaterialien nicht universell gegeneinander austauschbar sind. Darauf begründet, müssen sie für jede Aufgabenstellung individuell getestet und abgestimmt werden.

### **Fließeigenschaften flüssiger Proben durch Kunststoff-Fritten in Abicap<sup>®</sup>-Säulen**

Neben den Wechselwirkungen der Frittenmaterialien mit den zu untersuchenden Keimen ist bei einem Analysensystem auf Durchflussbasis die Fließgeschwindigkeit von flüssigen Proben von entscheidender Bedeutung. So ist diese unter anderem für die Zeitspanne verantwortlich, die für eine Antigen-Antikörper-Reaktion zur Verfügung steht. Die Bestimmung der Durchflussgeschwindigkeiten hat ergeben, dass ein Milliliter Ringerlösung zwischen fünf (geblockte Polyesterfritte) und 320 Sekunden (unbehandelte Polyethylen Typ 180c Fritte) zum passieren der Abicap<sup>®</sup>-Säule mit Kunststoff-Fritte (Größe 5 x 5 mm) benötigt. Das Blocken der Fritten kann zum Herabsetzen, Erhöhen oder auch einer gleichbleibenden Fließgeschwindigkeit führen.

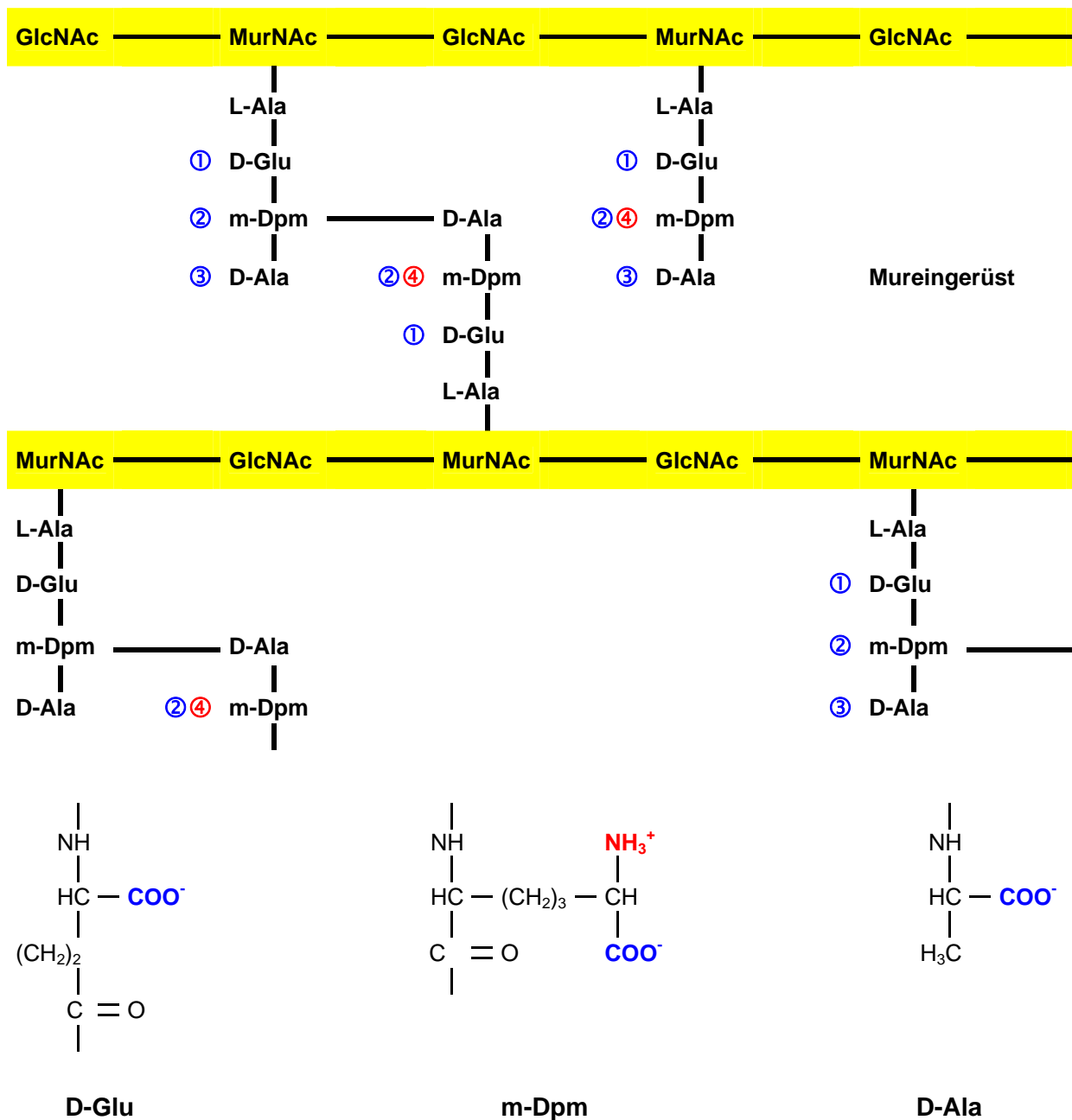
### **Wechselwirkungen modifizierter Fritten gegenüber pathogenen Mikroorganismen**

Das hier zu entwickelnde Verfahren auf Basis einer Säulenteknologie, sollte mit Fritten bestückt werden, die mit kovalent gebundenen Antikörpern beschichtet sind. Für diese Beschichtung muss der Kunststoff auf seiner Oberfläche in mehreren Stufen modifiziert werden (Oxidation, Silanisierung, Carboxylierung, Antikörperbeschichtung, Blocken). Bei der Auswahl des Materials ist insbesondere die Porengröße der Faser- und Sinterkörper von entscheidender Bedeutung. Je kleiner die Poren, desto größer ist die Oberfläche, an der Koppelungsreaktionen erfolgen können (WEETALL, 1993). Als Frittenmaterial wurde der Polyethylen-Sinterkörper des Typs 180 c ausgewählt. Dieser war zum einen am besten dazu geeignet bei einer Behandlung mit APTES ein weitreichendes Silannetzwerk aufzubauen, welches

zur weiteren Immobilisierung notwendig ist (DEGENER, 2004). Zum anderen zeigte dieses Material auch gute Fließeigenschaften, die sich durch eine Fließgeschwindigkeit auszeichnen, die dem Analyten ausreichende Zeit für eine Wechselwirkung bietet, ohne durch Luft einschüsse bei der Probenaufgabe unbrauchbar zu werden.

Um festzustellen, inwieweit die einzelnen Modifikationsstufen Einfluss auf die Wechselwirkung mit humanpathogenen Mikroorganismen haben, wurde jede Modifikationsstufe dem unter Kapitel 2.7.1.1 beschriebenen Materialtest unterzogen und mit der Struktur der Zellwandoberflächen der untersuchten Spezies verglichen. Dabei war feststellbar, dass die Verläufe der Rückhalteraten, der im Test eingesetzten grampositiven Bakterien, bei den einzelnen Modifikationsstufen jeweils vergleichbar waren. Dieses Ergebnis konnte durch Untersuchungen mit Bazillen und Clostridien als charakteristisch für grampositive Bakterien manifestiert werden. Demnach ist hier ein Zusammenhang zwischen der Eigenschaft der Bakterienzellwand und den Rückhalteraten der einzelnen, modifizierten Kunststoffe anzunehmen.

Die Fähigkeit von Kunststoffen Bakterien zurückzuhalten kann durch hydrophobe Wechselwirkungen, kovalente oder Ionen-Bindungen mit den funktionellen Gruppen der Zellwandoberflächen hervorgerufen werden (KÜPPER, 2001). Bei der Betrachtung der Struktur von Polyethylen ( $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  Ketten) ist davon auszugehen, dass die Rückhaltefähigkeit der eingesetzten unbehandelten PE 180c Fritten hauptsächlich auf Grundlage von Wasserstoffbrückenbindungen mit den Zellwandoberflächen hervorgerufen wird (KRÄMER & FERNER, 2003). Die Ergebnisse zeigen, dass eine Oxidation des Polyethylens nur einen geringen Einfluss auf diese Wechselwirkung ausübt. Dem entgegen bewirkt die Silanisierung der Kunststoffoberfläche eine hohe Affinität gegenüber Bakterien. Bei grampositiven Bakterien bestehen die Zellwände hauptsächlich aus einem mehrschichtigen Mureinnetz, dessen alternierenden N-Acetylglucosamin- (GlcNAc) und N-Acetylmuraminsäure- (MurNAc) Ketten durch Tetrapeptidseitenketten der Muraminsäure peptidisch miteinander verknüpft sind. Darüber hinaus ist das Vorhandensein von Teichonsäure charakteristisch (DUCKWORTH, 1979; SCHLEGEL & ZABOROSCH, 1992). Aufgrund dieses Aufbaus kann postuliert werden, dass die Rückhaltefähigkeit der silanisierten Kunststoff-Fritten gegenüber grampositiven Bakterien auf Bindungen mit Carboxygruppen der freien Tetrapeptidseitenketten (siehe Abbildung 4.1) und amidartigen Bindungen über das Phosphat der Teichonsäure (DUCKWORTH, 1979) zurückzuführen ist. Dabei ist zu berücksichtigen, dass diese Bindungen vom pH-Wert des eingesetzten Mediums abhängig sind (HOLLÄNDER, 2004). Demnach ist davon auszugehen, dass es sich in dem vorliegenden Fall, bei dem Ringerlösung mit einem annähernd neutralen pH-Wert eingesetzt wurde, um ionische Bindungen ( $\text{COO}^-$  und  $\text{NH}_3^+$  etc.) handelt.



**Abbildung 4.1:** Schematische Darstellung der möglichen Bindestellen der Tetrapeptidseitenketten der Mureinsäure für die silanisierten ①, ②, ③ und carboxylierten ④ Kunststoffoberflächen

Auch die Rückhaltefähigkeit der folgenden Carboxylierungsstufe lässt sich durch Bindungen mit den Tetrapeptidseitenketten der Mureinsäure erklären. In diesem Fall sind jedoch die freien Aminogruppen der Diaminopimelinsäure als Reaktionspartner anzusehen. Insgesamt ist bei dieser Modifikationsstufe eine Herabsetzung der Rückhaltekapazität feststellbar. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Tetrapeptidseitenketten der Mureinsäure mehr freie Car-

boxygruppen (D-Glu ①, Dpm ②, D-Ala ③) für die Bindung mit einer silanisierten Kunststoffoberfläche, als freie Aminogruppen (Dpm ④) für die carboxylierte Modifikation aufweisen. Bei der Betrachtung der Rückhalteraten der einzelnen Modifikationsstufen ist zu beachten, dass die Belegung der Kunststoffoberflächen nicht quantitativ verläuft, so dass nach jeder Modifikation ein Anteil an funktionellen Gruppen der vorherigen Modifikationsstufe für die Bakterien zugänglich bleibt. Demnach ist die ermittelte Rückhalterate der Carboxylierungsstufe ein Produkt aus Wechselwirkungen der Bakterien mit den Carboxygruppen und einem Restanteil an Aminogruppen. Bei der anschließenden Behandlung der Fritten mit BSA-Puffer werden die verbliebenen freien Aminogruppen und ein Grossteil der Carboxygruppen geblockt, wodurch die Rückhalterate grampositiver Bakterien durch peptidische verknüpfte Verbindungen stark herabgesetzt wird, was sich auch in den dargestellten Ergebnissen der Abbildung 3.13 widerspiegelt. Bei gramnegativen Bakterien sind die Zellwandstrukturen sehr uneinheitlich (SCHLEGEL & ZABOROSCH, 1992; FERNER *et al.*, 2001). So haben sich bei dem hier durchgeführten Test zwar auch Gruppen mit ähnlichen Rückhalteverläufen bei den jeweiligen Stufen gebildet, die Betrachtung der Zellwandoberflächen konnte aber keine Zuordnung bzgl. bestimmter Strukturen als Grund der Rückhalteeigenschaft ermitteln. Demnach sind bei gramnegativen Bakterien durch die Vielzahl an unterschiedlichen funktionellen Gruppen im Zellwandaufbau keine direkten Rückschlüsse auf einen möglichen Verlauf der Rückhalteraten bei dem eingesetzten modifizierten Material vorhersehbar.

### **Lagerfähigkeitsuntersuchung von modifizierten PE-Fritten**

Um die Lagerfähigkeit modifizierter PE-Fritten zu untersuchen, wurden oxidierte PE 180c Fritten fünf Monate bei +4 °C gelagert, deren Wechselwirkung gemäß der in Kapitel 2.7.1.1 dargestellten Untersuchung mit dem in Tabelle 2.3 aufgeführten Keimspektrum ermittelt und mit den in Kapitel 3.6.2 dargestellten Ergebnissen frisch oxidierter Fritten verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, dass nach einer derartigen Lagerung stets eine Herabsetzung der Rückhalterate (zwischen ca. 10 bis 80 %) stattfand. Dabei entspricht dessen Wechselwirkungsbereich mit 15 - 35 % weder den unbehandelten, noch den Ergebnissen der modifizierten PE 180c Fritten. Vielmehr nähern sich dessen Rückhalteraten den untersuchten unbehandelten Polyester- und Polypropylenfritten an. Eine genau Spezifikation der Veränderungen der Oberflächen durch eine Lagerung stellt sich als komplex dar (HOLLÄNDER, 2002) und wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

### **Immunologisches Analysenverfahren zum Nachweis von *Clostridium perfringens***

Eine Kernaufgabe der hier vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines immunologischen Analysenverfahrens zur Isolierung und Identifizierung von *Clostridium perfringens* in Lebensmitteln. Dazu sollte die Abicap<sup>®</sup>-Technologie in Form eines Sandwich-ELISA's mit einem polyklonalen Antikörper genutzt werden. Als Testorganismus wurde der DSMZ Stamm 756 eingesetzt. Der Versuchsaufbau erfolgte gemäß dem in Abbildung 3.17 aufgeführten Schema. Mit der eingesetzten Konzentration von bis zu  $10^5$  KbE/ml konnte mit diesem System kein *Clostridium perfringens* nachgewiesen werden. Um unabhängig von der Abicap<sup>®</sup>-Technologie zu überprüfen, ob mit dem gewählten Reaktionsansatz grundsätzlich *Clostridium perfringens* nachgewiesen werden kann, wurde der gesamte Ansatz auf ein Dot-Blot-ELISA-Verfahren (siehe Kapitel 3.7.1.1) übertragen und darüber hinaus ein Agglutinationstest (siehe Kapitel 3.7.1.3) zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Antikörpers durchgeführt. Mit dem Dot-Blot-ELISA konnte *Clostridium perfringens* mit einer Nachweisgrenze von  $2,3 \times 10^5$  KbE/ml detektiert werden. Beim Agglutinationstest hingegen war keine Agglutination („Ausflockung“) erkennbar. Demnach ist davon auszugehen, dass der verwendete Antikörper grundsätzlich in der Lage ist, *Clostridium perfringens* zu detektieren, dass dessen Qualität (bzw. Spezifität) aber nicht ausreichend ist, um ein Sandwich-ELISA-Verfahren auf der Abicap<sup>®</sup>-Säule zu etablieren. Das Dot-Blot-ELISA-System ist prinzipiell in der Lage, *Clostridium perfringens* nachzuweisen, jedoch ist die Empfindlichkeit mit  $\geq 10^5$  KbE/ml relativ gering, so dass dessen Einsatz bei einer Realanalytik im Einzelfall abgewogen werden muss.

### **Immunologische Analysenverfahren zum Nachweis von Legionellen**

Parallel zur Entwicklung des Nachweissystems für *Clostridium perfringens* auf Basis der Abicap<sup>®</sup>-Technologie wurde ein analoges Verfahren für Legionellen entwickelt, wobei hier monoklonale Antikörper (siehe Tabelle 2.9) eingesetzt wurden. Als Testkeim wurde *Legionella pneumophila* der Serogruppe 1 herangezogen. Um die Funktionalität des Antikörper-Antigen-Systems zu untersuchen, wurde zunächst ein Dot-Blot-ELISA-Verfahren mit einem analogen und einem zweiten, davon abweichenden Detektionsreagenziensystem (siehe Kapitel 3.7.2.1) durchgeführt. Mit beiden Systemen konnte *Legionella pneumophila* mit einer Nachweisgrenze von  $\geq 10^3$  KbE/ml nachgewiesen werden. Bei der Betrachtung der Dot's ist festzustellen, dass das Reagenziensystem (biotinierter Antikörper mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase), welches auch bei der Abicap<sup>®</sup>-Technologie eingesetzt werden soll, im Bereich der Nachweisgrenze direkt nach Entwicklung der Folie Ergebnisse lieferte. Das als Referenz eingesetzte Reagenziensystem (Rappid Maus Ig mit alkalischer Phosphatase) zeigte nach der Entwicklung lediglich Dot's im Bereich einer Nachweisgrenze von  $10^4$

KbE/ml und erst nach einer zwölfstündigen Lagerung der Folie deutliche Dot's im Bereich von  $10^3$  KbE/ml. Im Gegensatz zum Meerrettichperoxidase-System ist beim zweitgenannten Verfahren eine deutlichere Abstufung der Intensität der Dot's bei den jeweiligen Verdünnungsstufen erkennbar. Auf Grundlage der im Dot-Blot-Verfahren erzielten Ergebnisse wurde nun ein auf der Abicap<sup>®</sup>-Technologie beruhendes Verfahren als Sandwich-ELISA (mitbiotinylierten Antikörper und Streptavidin-Meerrettichperoxidase) installiert. Bei diesem Verfahren (siehe Kapitel 3.7.2.2) konnten die eingesetzten *Legionella pneumophila* mit einer Nachweisgrenze  $\geq 4$  KbE/ml nachgewiesen werden. Zur Überprüfung der Spezifität und möglicher Kreuzreaktionen, wurde das Verfahren mit einer Auswahl unterschiedlicher Legionellaspezies (siehe Tabelle 2.2) wiederholt. Dabei konnte festgestellt werden, dass lediglich zwei der insgesamt 24 zum Test eingesetzten Stämme (siehe Tabelle 3.16), mit diesem Analysensystem nachgewiesen werden konnten. Dabei handelte es sich um *Legionella pneumophila* der Serogruppe 1, Subspezies Bellingham und Subspezies Philadelphia, die mit Nachweisgrenzen von  $\geq 3,0 \times 10^2$  bzw.  $\geq 3,0 \times 10^1$  KbE/ml bestimmt wurden. Herkömmliche ELISA-Verfahren weisen Nachweisgrenzen im Bereich von  $\geq 10^3$  bis  $\geq 10^5$  KbE/ml auf (SOBITIES *et al.* 1996; BAUMGART & BECKER, 2004). Der hier entwickelte Abicap<sup>®</sup>-ELISA ist demnach bis zu zwei Zehnerpotenzen empfindlicher als die derzeit kommerziell angebotenen ELISA-Kits. Die hohe Empfindlichkeit lässt sich aus der Kombination der hohen Spezifität der als Fänger und Detektor eingesetzten monoklonalen Antikörper, dem Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase Multikomplex (Streptavidin-PolyHRP 40) und der optimierten kovalenten Bindung der Antikörper auf den Kunststoffoberflächen (höhere Belegungsdichte, ausgerichtete Antikörper) begründen.

### **Analysenverfahren auf Säulenbasis zum Nachweis von Salmonellen**

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der Abicap<sup>®</sup>-Technologie sollte der Nachweis von Salmonellen darstellen. Dazu sollte ein Verfahren der Firma Biognosis Higspeed Diagnostics aus Jülich herangezogen werden, welches verwendet wird um die Belegung von Antikörpern auf der Frittenoberfläche zu überprüfen. Das Testverfahren arbeitet mit einem Testkit, welcher eine sogenannte Abicap<sup>®</sup>-Red-Arbeitssuspension als Detektions-Reagenz enthält (Verfahrensbeschreibung siehe Kapitel 2.7.1). Die Testdurchführung erfolgt auf Polyethylen Typ 180c Fritten, die absorptiv mit für Salmonellen spezifischen polyklonalen Antikörpern beschichtet waren. Als Testkeim wurde *Salmonella* Enteritidis verwendet. Mit diesem Analysenverfahren konnte der ausgewählte *Salmonella* Stamm mit einer Nachweisgrenze  $\geq 10^6$  KbE/ml nachgewiesen werden (TIGGES, 1998). Um ein Verfahren zu entwickeln, welches eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Salmonellen aufweist, wurde ein Methodenansatz

gewählt, der die Abicap<sup>®</sup>-Säule mit Antikörpern beschichteter Kunststoff-Fritte als Anreicherungssystem verwendet und die Sandwich-ELISA-Detektierung durch einen PCR-Nachweis ersetzt. Bei diesem, in Abbildung 3.19 beschriebenen Verfahren, konnte der eingesetzte *Salmonella* Stamm mit einer Nachweisgrenze von weniger als < 10 KbE/ml bestimmt werden. Eine Überprüfung mit *Salmonella* Poona kam zum gleichen Resultat (siehe Anwendungsbereiche, Seite 118).

### **Vor- und Nachteile der Abicap<sup>®</sup>-Technologie auf Durchflussbasis**

Kommerziell erhältliche ELISA-Systeme, die in Form von Testkits angeboten werden, verwenden in der Regel Mikrotiterplatten, Glasträger oder Festphasen (z.B. Nitrocellulosefolien) als Träger für ihre Antikörper-Antigen-Reaktion (WOLLENBERGER *et al.* 2003; BAUMGART & BECKER, 2004). Die hier verwendete Abicap<sup>®</sup>-Technologie (Durchflussverfahren) hat gegenüber diesen stationären Systemen folgende Vorteile:

- Höhere Probenvolumina (herkömmliche ELISA i.d.R. nur 100 µl; bei Durchflussverfahren stellen je nach Probenmatrix das 10 bis 50 fache des Volumens kein Problem dar)
- Schnellerer Versuchsablauf (bei der Abicap<sup>®</sup>-Technologie wirken die Antikörper beim Durchfließen der Probe wie ein „Netz“, so dass keine langen Wartezeiten zur Antikörper-Antigen-Reaktion notwendig sind)
- Anwendung einfacher, als bei stationären Modulen (nur pipettieren und messen)
- Einzeltests sind möglich (Säulen können im Gegensatz zu herkömmlichen ELISA-Kits praktikabel in kleinen Stückzahlen (sogar nur ein Test ist möglich) durchgeführt werden).
- Test ist nicht stationär an Laboreinrichtungen gebunden (es wird lediglich der Kit, eine Pipette und ein taschenformatgroßer Reader benötigt)
- Im Gegensatz zu stationären ELISA-Verfahren können gebundene Bakterien ohne große Anstrengung wieder von der Säule gelöst, aufgefangen und weiterverarbeitet werden (siehe Testansatz mit PCR-Detektierung)

Als hauptsächlicher Schwachpunkt dieser Methode ist die Anwendbarkeit auf verschiedene Probenmatrizen anzusehen. So ist dieses System darauf angewiesen, dass die eingesetzte Probe gewisse Fließeigenschaften aufweist. Demnach können halbflüssige oder gar feste Proben nur nach einer gewissen Aufarbeitung und ggf. Beseitigung von Schwebstoffen (z.B. Stomacherbeutel mit Filtereinsatz) eingesetzt werden. Diese Aufarbeitungen, in der Regel eine Verdünnung bzw. Aufnahme in ein flüssiges Medium, bewirken im Allgemeinen eine Herabsetzung der Empfindlichkeit.

### **Einsatzgebiet und Anwendbarkeit des für *Clostridium perfringens* entwickelten immunologischen Analyseverfahrens**

*Clostridium perfringens* ist beim Menschen als Darm- und Gasbranderreger sowie als Lebensmittelvergifter von Interesse (SCHALLEHN, 1988; HATHEWAY, 1990; ROOD & COLE, 1991; KRÄMER, 2002). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit standen vor allem Stämme im Vordergrund, welche durch Bildung eines Enterotoxins in der Lage sind Lebensmittelvergiftungen hervorzurufen. Um Krankheitssymptome beim Menschen auftreten zu lassen, sind in der Regel Keimkonzentrationen  $\geq 10^6$  KbE/g Lebensmittel notwendig (SHANDERA *et al.*, 1983; WENDELING, 1989; KRÄMER, 2002). Demnach hat das neu entwickelte Dot-Blot-ELISA-Verfahren eine ausreichende Empfindlichkeit (Nachweisgrenze  $\geq 10^5$  KbE/g), um Keimkonzentrationen nachweisen zu können, die zu Krankheitserscheinungen führen können. In der Praxis ist jedoch zu bedenken, dass unterschiedliche Probenmatrices die Nachweisgrenze nach oben verschieben können (BRIGMON *et al.*, 1995). Darüber hinaus hängt das Auftreten von Lebensmittelvergiftungen in hohem Maße vom Immunzustand des betroffenen Konsumenten ab (D'AOUST, 1994).

### **Einsatzgebiet des für Legionellen entwickelten immunologischen Analyseverfahrens**

In der Lebensmittelmikrobiologie ist die Untersuchung von Legionellen im Bereich der Trinkwasser- und Badebeckenwasseruntersuchung von Interesse. Das empfohlene Verfahren des Umweltbundesamtes (BUNDESGESUNDHEITSBLATT 2000-43:915; Nachweis von Legionellen in Trinkwasser und Badebeckenwasser) benötigt zur Identifikation von Legionellen in Wasser bis zu 14 Tage. Das neu entwickelte, auf der Abicap<sup>®</sup>-Technologie basierende ELISA-Verfahren, ist dazu geeignet, als Schnellmethode (z.B. für ein Screening, Hygienekontrollen oder um einen Erstverdacht zu erhalten) eingesetzt zu werden. Dabei kann dieses Verfahren in die herkömmliche kulturelle Legionellendiagnostik integriert werden (siehe Anhang A). Dazu wird nach einer Membranfiltration der zu untersuchenden Wasserprobe der Membranfilter entnommen, in eine Trypticase-Bouillon gegeben, gut geschüttelt, das Sediment der so gewonnenen Suspension auf die Abicap<sup>®</sup>-Säule gegeben und der oben beschriebene ELISA durchgeführt. Eine nach diesem Schema erfolgte Analyse ist in der Lage bereits nach etwa 3 h ein Ergebnis darzustellen. Da der entwickelte Abicap<sup>®</sup>-ELISA lediglich in der Lage ist *Legionella pneumophila* der Serogruppe 1 zu detektieren, ist dieses System in der Trink- und Badewasseranalytik nur als ergänzende Methode anwendbar und nicht dazu geeignet als selbständiges Verfahren herangezogen zu werden.



### **Einsatzgebiet und Anwendbarkeit der für Salmonellen entwickelten Analyseverfahren**

In der Lebensmittelgesetzgebung fordern eine Reihe von Hygiene- und Produktverordnungen eine Nulltoleranz für Salmonellen in 25 bzw. 10 g Lebensmittel (HACKFLEISCH VERORDNUNG, 1997; FLEISCHHYGIENE VERORDNUNG, 1999). In den letzten 20 Jahren sind eine ganze Anzahl an neu entwickelten Methoden zum Nachweis von Salmonellen entstanden. Keines dieser Verfahren kann aufgrund der geforderten Sensitivität und der komplizierten Probenmatrix „Lebensmittel“ auf eine Voranreicherung verzichten (BUCHANAN & DEROEVER, 1993). Bei kulturellen Nachweisverfahren (z.B. § 35 LMBG oder DIN-Verfahren) folgt der Voranreicherung eine Selektivanreicherung (L00.00.20, 1998; DIN EN 12824, 1998). Die Anreicherungsverfahren dienen dazu, Salmonellen, die durch technologische Prozesse subletal geschädigt wurden, zu regenerieren und anschließend von der Begleitflora zu selektieren (KRÄMER, 2002). Eine Voranreicherung benötigt in der Regel 16 bis 20 Stunden eine Selektivanreicherung bis zu 48 Stunden. Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, ein Analysensystem zum Nachweis von Salmonellen zu entwickeln, welches eine hohe Spezifität und Sensivität aufweist und darüber hinaus eine Zeitersparnis ermöglicht. Der hier untersuchte Abicap<sup>®</sup>-Red-Test ist in der Lage Salmonellen nachzuweisen (TIGGES, 1998), jedoch ist er mit einer Nachweisgrenze von  $\geq 10^6$  KbE/ml zu unempfindlich, um in einer Lebensmittelanalytik sinnvoll eingesetzt zu werden. Die immunologische Anreicherung durch mit Antikörper beschichtete Kunststoffkörper in Abicap<sup>®</sup>-Säulen mit anschließender PCR-Detektierung ist dem entgegen für den Nachweis von Salmonellen in Lebensmitteln geeignet. Auch wenn die Frage, ob dieses Verfahren eine Nachweisgrenze von 0 KbE in 10 bzw. 25 g Lebensmittel in jedem Fall erreicht hier nicht abschließend beantwortet werden kann, so ist die Empfindlichkeit (Nachweisgrenze  $< 10$  KbE/ml) und die Selektivität (spezifische Antikörper als Fänger und spezifische Primer als Detektierungsgrundlage) ausreichend, um den üblichen Zeitraum der Voranreicherung zu verkürzen und auf die Selektivanreicherung komplett zu verzichten.

Wie nahezu jedes PCR-Verfahren hat diese Methode gegenüber kulturellen Methoden den Nachteil, dass kein direkter Lebendnachweis der Salmonellen erfolgen kann. Diese Problematik lässt sich durch einen Zwei-Stufen-Plan umgehen. Dazu wird die zu untersuchende Probe zunächst mit der Abicap<sup>®</sup>-Realtime-PCR-Kombination identifiziert und quantifiziert. Parallel dazu wird ein Teil der Probe einer Voranreicherung in Peptonwasser unterzogen. Nach einem definierten Zeitraum wird die Voranreicherung ebenfalls dem Abicap<sup>®</sup>-Realtime-PCR-Verfahren unterzogen und die Ergebnisse miteinander verglichen. Dabei würde ein Anstieg der Salmonella-DNA-Konzentration im PCR-Produkt der in Peptonwasser angereicherten Probe gegenüber dem Direktansatz nach Probeneingang ein Wachstum der Salmonellen aufzeigen und somit den Lebendnachweis erbringen.

### **Affinitätsmodule zur Anreicherung von *Listeria monocytogenes* aus Milch**

Bei der Entwicklung des immunologischen Analysensystems auf Säulenbasis wurde festgestellt, dass eine Modifikation der Frittenoberfläche mit Aminogruppen ein Modul erzeugt, welches eine hohe Affinität gegenüber Mikroorganismen aufweist. Diese Eigenschaft wurde dazu genutzt, ein Modul zur unspezifischen Voranreicherung von pathogenen Mikroorganismen zu entwickeln. Solche Verfahren sind bereits bei Dot-Blot-ELISA z.B. auf Nitrocellulosefolien bekannt (HOLTZHAUER, 1995; GANGOLF SCHRIMPF, 2003; WOLLENBERGER *et al.* 2003), wobei das hier herangezogene Abicap<sup>®</sup>-Säulensystem, im Gegensatz zu den Methoden auf planaren Trägern, die Vorteile eines Durchflussverfahrens aufweist (siehe Seite 116). Auf Grundlage dieser Methodik wurde ein Analysensystem zum Nachweis von *Listeria monocytogenes* in Milch (siehe Kapitel 3.8.1) etabliert. Die nach der § 35 Methode des LMBG (L 00.00.32 und L 00.00.22) aufgeführten kulturellen Analysengänge zum Nachweis von *Listeria monocytogenes* nehmen bis zur entgeltigen Identifizierung eine Analysenzeit von 3 bis 6 Tagen in Anspruch. Das auf der Säulenteknologie beruhende Verfahren erbringt dem gegenüber eine deutliche Zeitersparnis (Brutto-Analysenzeit ca. drei bis sechs Stunden je nach Detektionsverfahren). Die zur Identifizierung notwendige Spezifität wird hierbei durch eine PCR-Detektierung (spezifische Primer) sichergestellt.

Die auf der Abicap<sup>®</sup>-Säulenteknologie basierende Methode konnte in 3,5 %igen H-Milch eine Kontamination von  $\geq 2$  KbE/ml nachweisen. Nach der BGVV (2000a) gelten bei verzehrfertiger, nicht wärmebehandelter Vorzugsmilch sowie für Milchmischgetränke Gehalte von bis zu  $10^2$  KbE/ml Probe an *Listeria monocytogenes* als tolerierbar, so dass die hier entwickelte Methode eine ausreichende Empfindlichkeit aufweist, um bei diesen Erzeugnissen Anwendung zu finden. Für sonstige wärmebehandelte flüssige Erzeugnisse auf Milchbasis fordert die MILCHVERORDNUNG (Anlage 6 Nr. 3.3; 2000) eine Nulltoleranz von *Listeria monocytogenes* in 1 g Lebensmittel. Bei der hier durchgeführten Abicap<sup>®</sup>-Methode wurde 1 ml Milch als Probe eingesetzt. Eigene Untersuchungen sowie die von TIGGES (1998) lassen den Schluss zu, dass die Aufgabe der Probenmatrix Milch auf Abicap<sup>®</sup>-Säulen bis zu einem Volumen von etwa 5 ml problemlos ist. Diese Feststellung und die Betrachtung der Intensität des Amplifikatspots nach der Gelelektrophorese, welcher durch 2 KbE/ml Probe erzielt wurde, lässt erwarten, dass eine Erhöhung des Probenvolumens dazu führt, dass das hier entwickelte Verfahren auch empfindlich genug ist, um den von der Milchverordnung geforderten Grenzwert für sonstige flüssige Erzeugnisse auf Milchbasis zu detektieren. Die hier beschriebenen Ergebnisse wurden mit einer herkömmlichen PCR (Thermocycler) erzielt. Um eine gesicherte quantitative Aussage treffen zu können ist die Implementierung einer Realtime-PCR sinnvoll.

### **Affinitätsmodule zur Anreicherung von Mikroorganismen aus flüssigen Lebensmitteln**

In der Lebensmittelanalytik besteht oft die Notwendigkeit große Probenvolumina zum Nachweis von Mikroorganismen zu untersuchen. Eine besonders problematische Matrix stellen dabei auch flüssige Lebensmittel dar, welche aufgrund ihrer Bestandteile (z.B. Fruchtfleisch) oder physikalischen Eigenschaften (schäumend) nicht oder nur eingeschränkt mit herkömmlichen Methoden (z.B. Filtration) zur weiteren Untersuchung präpariert werden können (SCHÖNLING, 2003). Auch das bisher dargestellte Verfahren mit Abicap<sup>®</sup>-Säulen benötigt eher unproblematische Fließeigenschaften, so dass es für einen solchen Einsatz ebenfalls ungeeignet wäre.

Um den Einfluss der Probenmatrix zu minimieren und relativ unabhängig von Fließeigenschaften zu sein, wurde in enger Zusammenarbeit mit der Firma Genial in Troisdorf ein Verfahren entwickelt (siehe Kapitel 3.8.2.2), welches die Kunststoff-Fritten direkt (ohne Abicap<sup>®</sup>-Säule) in die zu untersuchenden flüssigen Proben einsetzt. Dabei dient die Affinität einer optimierten Aminomodifikation auf der Frittenoberfläche als Grundlage für die universelle Anreicherung von Mikroorganismen. In der hier vorliegenden Arbeit wurde *Lactobacillus brevis*, ein Keim der unter anderem als Verderbniserreger bei Bier und Wein bekannt ist (DORNHAUSER, 1993; SCHEER, 1994; GAFFNER, 2003), als Testorganismus eingesetzt. Als Detektionsverfahren wurde eine Realtime-PCR verwendet. Die Untersuchungen (siehe Kapitel 3.8.2.3) haben ergeben, dass die Kapazitätsgrenze von derart eingesetzten aminomodifizierten Kunststoffkörpern bei etwa  $10^8$  KbE/ml liegt (SCHÖNLING & FERNER, 2003) und das eine Einwirkzeit von ca. 1 h ausreichend ist, um eine in der Probenmatrix schwimmende Fritte mit Mikroorganismen zu sättigen (SCHÖNLING, 2003). Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass bei Proben mit einer Keimkonzentrationen von  $\leq 10^5$  KbE/ml der Einsatz einer größeren Anzahl an Fritten erforderlich ist, um die Empfindlichkeit des Verfahrens zu erhöhen. Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass der Einsatz von Kunststoffgranulat gegenüber den herkömmlichen Fritten durch die Oberflächenvergrößerung im Verhältnis (pro mg Material) eine Effizienzsteigerung vom 10 bis 100 fachen erwarten lässt (SCHÖNLING, 2003).

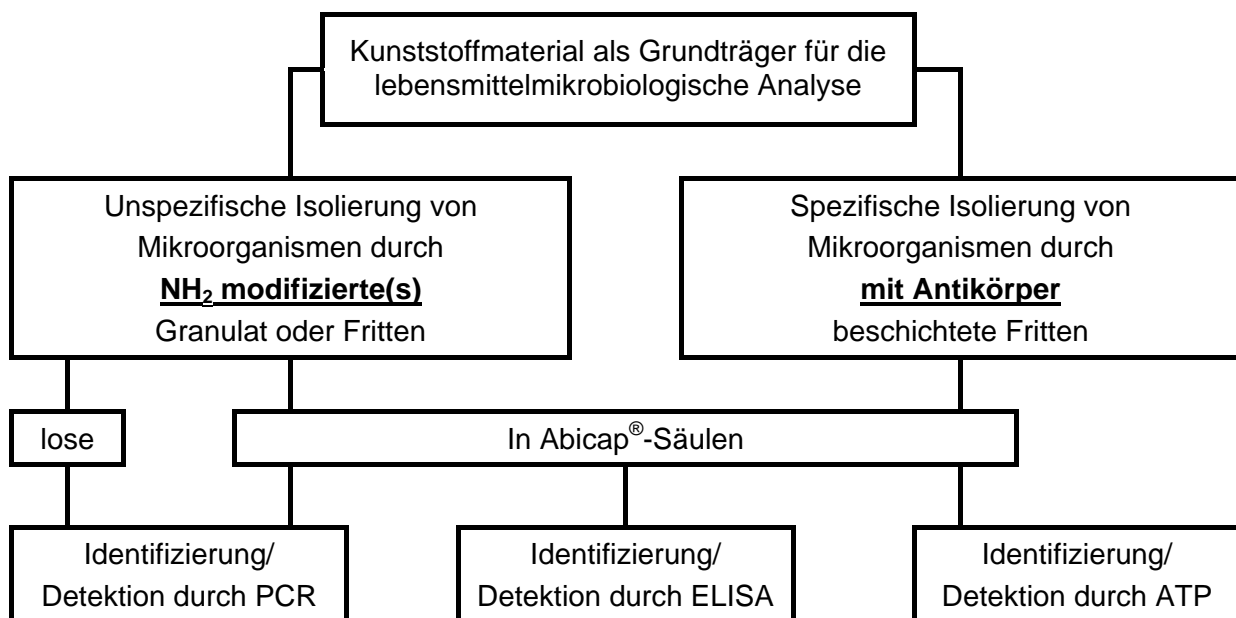
Das hier beschriebene Verfahren ist grundsätzlich dazu in der Lage aus hohen Probenvolumina flüssiger Lebensmittel Mikroorganismen zu isolieren. Ein Einsatz bei Fruchtsäften (mit Fruchtfleisch), stark schäumenden und dickflüssigen Getränken sowie bei Wein und Bier ist denkbar (ERXLEBE & SCHÖNLING, 2003). Eine Optimierung der Größenverhältnisse der eingesetzten Kunststoffe (Granulat anstatt Fritten) lässt eine ausreichende Effizienz erwarten. Die Anordnung des Versuchsablaufs ermöglicht einen schnellen Nachweis der zu identifizierenden Mikroorganismen. Darüber hinaus ist dieses System voraussichtlich ohne größere Entwicklungsarbeit auf andere Keimspektren übertragbar. Dieses Verfahren kann nach

einer Validierung als Alternative zur herkömmlichen Membranfiltration herangezogen werden, insbesondere auch bei Proben, dessen Matrices eine Verstopfung von Filtern verursachen würden (ERXLEBE & SCHÖNLING, 2003; FERNER & KRÄMER, 2003).

### **Ausblick und Beurteilung der Anwendbarkeit der auf Basis von Kunststoffpolymeren entwickelten immunologischen und auf Affinitätsmodulen beruhenden Verfahren**

Die im Rahmen dieser Arbeit auf Grundlage von Kunststoffträgern entwickelten immunologischen und auf Aminoaffinitätsmodulen beruhenden Verfahren stellen eine vielseitige und kostengünstige Methodik zur Isolierung von Bakterien aus Lebensmitteln dar. Die Charakterisierung der Kunststoffmaterialien hat gezeigt, dass Bakterien mit Polymeren Wechselwirkungen eingehen können. Diese sind je nach Material und eingesetzten Mikroorganismus individuell unterschiedlich. Demnach sind verschiedene Trägermaterialien nicht universell gegeneinander austauschbar und müssen für jede Aufgabenstellung (Keimspektrum) individuell abgestimmt und getestet werden.

Die Kunststoffpolymere sind zur unspezifischen (aminomodifizierte Module) und zur spezifischen Isolierung (mit Antikörper beschichtetes Material) von Mikroorganismen einsetzbar. Zur Identifizierung kann ein ELISA, eine Adenosintriphosphat-Messung (ATP-Messung) oder die PCR herangezogen werden (siehe Abbildung 4.2).



**Abbildung 4.2:** Übersicht über die mögliche Einbindung von Kunststoffträgern in die mikrobiologische Analytik zum Nachweis von humanpathogenen und Verderbnis erregenden Mikroorganismen in Lebensmitteln

Der Einsatz eines ELISA-Tests als Detektionsverfahren ist insbesondere als kostengünstige Schnellmethode sinnvoll (siehe Nachweisverfahren für *Legionella pneumophila* S. 88). Die Isolierung der zu untersuchenden Bakterien ist mit Antikörper beschichtetem oder aminomodifiziertem Material möglich. Bei der Verwendung von Aminoaffinitätsmodulen ist zu beachten, dass sich bei der Untersuchung von Lebensmitteln mit einem großen Keimspektrum der zu isolierende Keim in Konkurrenz um die freien Bindungsstellen befindet, wodurch die Empfindlichkeit der Methode deutlich herabgesetzt werden kann.

Die Detektion mittels ATP-Messung ist ebenfalls als Schnellmethode einsetzbar. Vorteil eines solchen Nachweissystems ist die Möglichkeit des Lebendnachweises der isolierten Mikroorganismen. Da diese Methode das gesamte lebende, in der Fritte befindliche Keimspektrum detektiert, benötigt es einen spezifischen Isolationsschritt, so dass bei diesem Verfahren nur mit Antikörpern beschichtete Kunststoffe verwendbar sind. Darüber hinaus sind beim Einsatz dieser Detektionsmethode ausschließlich ATP-freie Materialien zu verwenden, wodurch sich dieses Verfahren kostenintensiver als ein ELISA darstellt. Umfangreiche Untersuchungen zu dieser Methode wurden von der Firma ConCell durchgeführt (KEUCHEL, 2003).

Als spezifische und universell einsetzbare Detektionsmethode ist die PCR einzustufen. Neben den oben beschriebenen Isolationsverfahren mit Aminoaffinitätsmodulen und mit Antikörpern beschichtete Fritten in Abicap<sup>®</sup>-Säulen (siehe Nachweisverfahren von *Listeria monocytogenes* S. 94 und Salmonellen S. 91) können diese auch zur Identifizierung von Mikroorganismen, die mit modifizierten losen Fritten oder Granulat isoliert wurden (siehe Verfahren zum Nachweis von *Lactobacillus brevis* S. 96), herangezogen werden. Die PCR ist vielseitiger aber auch kosten- und zeitaufwendiger als die zuvor genannten Verfahren, weshalb je nach Aufgabenstellung auch der ELISA- und der ATP-Nachweis eine Alternative zu dieser Detektion darstellen kann.

Zukünftige Entwicklungen können die hier auf Basis von immunologischen und auf Affinitätsmodulen beruhenden Isolations- und Identifizierungsverfahren auf andere Keimspektren übertragen. Dabei sind insbesondere ELISA-Verfahren als kostengünstige Schnellmethoden und PCR-Detektionen durch ihre vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten von Interesse. Insbesondere die Anreicherung von Mikroorganismen aus großen Probenvolumina in Kombination mit einer PCR-Detektion weist ein hohes Entwicklungspotential auf. Ein weiterer Schritt dieser Methodik könnte die Kombination mit einem Biochip darstellen, so dass auch in Lebensmitteln, die in großen Probenvolumina untersucht werden müssen, ein Screening auf mikrobielle Kontaminanten möglich ist. Derartige Verfahren sind vor allem bei der Identifizierung Verderbnis erregender Mikroorganismen in der Produktionskontrolle sinnvoll, da hier, im Gegensatz zu einer ganzen Anzahl an humanpathogenen Bakterien, keine Nulltoleranz gefordert wird bzw. notwendig ist.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden Analysensysteme auf Basis synthetischer Polymere entwickelt. Diese Systeme basieren auf der Abicap<sup>®</sup>-Technologie, bei der sich der Kunststoffträger in Form einer Fritte (5 x 5 mm) in einem Abicap<sup>®</sup>-Röhrchen (Kunststoffsäule mit 750 µl Fassungsvermögen) befindet. Durch eine umfangreiche Charakterisierung der Eigenschaften und Wechselwirkungen von Kunststoffkörpern mit humanpathogenen und Verderbnis erregenden Mikroorganismen konnte die Grundlage geschaffen werden, leistungsfähige Methoden zum Nachweis von *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes* und Salmonellen sowie zur Anreicherung von Mikroorganismen aus großen Probenvolumina zu entwickeln.

- Der für *Legionella pneumophila* entwickelte Durchfluss-Sandwich-ELISA weist eine Nachweisgrenze von < 10 KbE/ml auf und ist als Schnellmethode in die Routineanalytik integrierbar. Aufgrund der auf die Serogruppe 1 begrenzten Spezifität kann diese Methode die amtlichen Analyseverfahren sinnvoll ergänzen aber nicht vollständig ersetzen.
- Die entwickelte Methode zum Nachweis von Salmonellen beruht auf der Kombination der Abicap<sup>®</sup>-Technologie als Anreicherungsschritt und einer Detektion mittels Realtime-PCR (Nachweisgrenze < 10 KbE/ml). Dieses System ist in der Lage, neben den amtlich vorgeschriebenen, kulturellen Methoden eingesetzt zu werden. Dabei ist eine deutliche Zeiterparnis, insbesondere durch Verkürzung der Voranreicherung und Verzicht der Selektiv-anreicherung, möglich.
- Der Nachweis von *Listeria monocytogenes* besteht aus einer Anreicherung mittels Affinitätsmodul (Kunststoff-Fritte mit modifizierter Aminooberfläche) und anschließender PCR-Detektion. Dieser Ansatz stellt eine neue, kostengünstige und effektive Alternative zur Isolierung von Mikroorganismen aus Lebensmitteln dar (Nachweisgrenze < 10 KbE/ml).
- Die Abicap<sup>®</sup>-Technologie wurde auch zur Entwicklung eines Verfahrens zum Nachweis von *Clostridium perfringens* herangezogen. Die Etablierung eines Abicap<sup>®</sup>-Sandwich-ELISA´s konnte nicht erbracht werden. Dies ist vermutlich auf eine zu geringe Spezifität der Fänger- und Detektorantikörper zurückzuführen.

Die hohe Anzahl der durch *Clostridium perfringens* bedingten Lebensmittelvergiftungen wird durch ein Enterotoxin erzeugt, welches nur fünf Prozent der Spezies bilden können. Die Identifizierung und Charakterisierung von Enterotoxin bildenden Stämmen ist demnach von besonderer Bedeutung, weshalb in der vorliegenden Arbeit neben der Entwicklung von mikrobiologischen Analyseverfahren gruppenspezifische Untersuchungen mit *Clostridium*

*perfringens* Isolaten erfolgten. Dazu wurden die Zellbestandteile/Stoffwechselprodukte (FT-IR-Spektroskopie), die Antibiotikaempfindlichkeit und das Sporulationsverhalten der Stämme untersucht.

- Die FT-IR-Spektroskopie zeigte zwei Hauptcluster mit einer geringen spektralen Distanz (maximal 2,5), was auf eine hohe Ähnlichkeit/Verwandtschaft der untersuchten Stämme hinweist. Die insgesamt sechs eingesetzten Enterotoxinbildner waren gleichmäßig über beide Cluster verteilt und wiesen keine unterscheidbaren Merkmale gegenüber den nicht Enterotoxin bildenden Stämmen auf.
- Die untersuchten enterotoxinbildenden *Clostridium perfringens* Stämme zeigten gegenüber den eingesetzten Antibiotika vergleichbare Empfindlichkeiten. Signifikante Unterschiede konnten beim Einsatz von Doxycyclin festgestellt werden. Enterotoxinbildner wurden hier bereits bei der Verwendung von  $\leq 0,25 \mu\text{g/ml}$  gehemmt, wohingegen diese Konzentration bei 70 % der nicht Enterotoxin bildenden Stämme keine Wirkung zeigte. Ein Stamm stellte sich bei einer Doxycyclinkonzentration von bis zu  $32 \mu\text{g/ml}$  als unempfindlich heraus.
- Die untersuchten Enterotoxin bildenden *Clostridium perfringens* Stämme waren nach einer Pasteurisation in DRCM-Bouillon zur Sporulation fähig. Bei den nicht Enterotoxin bildenden Stämme zeigten nur 1/3 der untersuchten Stämme bei allen durchgeführten Paralleluntersuchungen eine Sporulation. Ein Viertel der Nicht-Enterotoxinbildner konnte unter diesen Bedingungen keine Sporen ausbilden.

## 6 LITERATUR

- Ackermann G. (2003)** Liste *Clostridium perfringens* Stämme (aus Stammsammlung Leipzig) mit Isolationsort und Zeit.
- Ackermann W. u. B. Kleine (1978)** Über das Vorkommen und den routinemäßigen Nachweis von *Clostridium perfringens* beim Pferd. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., **91**, 141-144.
- Allen, S. D. (1985)** *Clostridium*. In Manual of clinical microbiology (ed W. J. H. u. H. J. S. H. A. Balows), pp. S. 434-444.
- Allen, S. D. Emery C. L. Siders J. R. (1999)** *Clostridium*. In: Murray, P. R., Baron, E. J., Tenover, F. C., Tenover, F. C., Tenover, R. H. Manual of Clinical Microbiology, ASM Press, Washington, D. C..
- Angelotti R., Hall H. Foter M. Lewis K (1962)** Appl. Microbiol., **10**, 193-199.
- Arthur M., Courvalin P. (1993)** Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in *Enterococci*. Antimicrob. Agents Chemother. , **37**, 1563-1571.
- Bajtay Z., Langfeldt N. (2003)** Determination of the Enterotoxin Production Capacity of *Clostridium perfringens* Isolated From Food in Correlation to Sporulation. Archiv für Lebensmittelhygiene, **54**, 4-7.
- Bangsberg J.M., Uldum S. Jensen J. S. Bruun B. G. (1995)** Nosocomial Legionellosis in three heart-lung transplant patients: case reports and enviromental obsarvations. Eur J Microbiol Infect Dis, **14**, 99-104.
- Barker J., Brown M. R. W. Collier P. J. et al. (1992)** Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. Appl. Environ Microbiol, 2420-2425.
- Barnes E. A., Ingram M. (1956)** *Clostridium perfringens*. Journal Appl. Bateriol., **19**, 117-128.
- Barnes Ella M., Despaul J. E. Ingram M. (1963)** Journal Appl. Bateriol., **26**, 415-427.
- Bauernfeind A. (1993)** Resistenz gegenüber Makroliden. Chemoter. J. **Suppl. 2**, 23-28.
- Baumgart Jürgen und Becker Barbara (1994)** Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. Behr's Verlag, Losebl.-Ausgabe, **22. Aktualisierung 2003**.
- Becker H., Schaller G. Terplan G. (1992)** Konventionelle und alternative Verfahren zum Nachweis verschiedener pathogener Mikroorganismen in Milch und Milchprodukten. DMZ Lebensmittelind. Milchwirtsch., **113**, 956-968.
- Becker H. und Märtebauer E. (2003)** Immunologischer Nachweis von Mikroorganismen und Toxinen. In: Baumgart Jürgen und Becker Barbara (1994) Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. Behr's Verlag, Losebl.-Ausgabe, 22. Aktualisierung 2003.
- Belitz H.-D., Grosch W. (1992)** Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Bell J.C., Jorm L. R. Williamson M. et al. (1996)** Legionellosis linked with a hotel car park-how many were infected? Epidemiol Infect, **116**, 185-192.
- Benson R. F., Fields B. S. (1998)** Classification of the Genus *Legionella*. Seminars in Respiratory Infections, 90-99.



- Beumer R. R., Brinkmann E. Rombouts F. M. (1991)** Enzyme-linked immunoassays for the detection of *Salmonella* spp.: a comparison with other methods. *Int. Journal of Food Microbiol.*, **12**.
- BGBI. (2000)** Nachweis von Legionellen in Trinkwasser und Badebeckenwasser - Empfehlung des Umweltbundesamtes nach Anhörung der Trink- und Badewasserkommission des Umweltbundesamtes. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz*, Springer Verlag, **43**, 911-915.
- BGVV: Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin** Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG, Beuth Verlag GmbH, Berlin, Köln.
- Biognosis (2000)** Abicap<sup>®</sup> manual, the new system for immunological analysis. Biognosis Highspeed Diagnostics GmbH, Jülich.
- Bisping W., Amtsberg G. (1988)** Colour atlas for the diagnosis of bacterial pathogens in animals. Parey, Berlin, Hambrug.
- Borriello S. P., Barclay E. Welch A. R. (1984)** Colonization resistance of the gastrointestinal tract a potential in vitro method for the determination of susceptibility to infection with *Clostridium difficile*. In: *Models of Anaerobic Infection*, Steening Comitee of the Anaerobe Discussion Group, Martinus Nijhoff-Verlag Dordrecht, Boston, Lancaster, 241-242.
- Borriello S. P., Barclay E. Welch A. R. Stringer M. F. Watson N. Williams K. T. Seal D. V. Sullens K. (1985)** Epidemiology of Diarrhoe caused by enterotoxigenic *Clostridium perfringens*. *Journal med. Microbiol.*, **20**, 363-372.
- Brazier J. S., Levett P. N. Stannard A. J. Phillips K. D. Willis A. T. (1985)** Antibioticsusceptibility of clinical isolates of clostridia. *Journal Antimicrobial Chemoth.*, **15**, 181-185.
- Brigmon R., Zam S. Wilson H. (1995)** Detection of *Salmonella enteritidis* in eggs and chicken with Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Poultry Science*, **74 (7)**, 1232-1236.
- Brown W. J., Waatti P. E. (1980)** Susceptibility testing of clinically isolated anaerobic bacteria by an agar dilution technique. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **17**, 629-635.
- Buchanan R. L., Deroever C. M. (1993)** Limits in assessing microbiological food safety. *Journal of Food Protec.*, **56 (8)**, 725-729.
- Bundesamt für Gesundheit (1991)** Importierter Fall von Legionärskrankheit. *Bulletin BAG*, **38**, 613-614.
- Bundesamt für Gesundheit (1997)** Nosokomiale Legionellose. *Bulletin BAG*, **16**, 15.
- Burkhardt F. (1992)** Mikrobiologische Diagnostik, Hrsg.: Burkhardt F., Bearb. Bauernfeind A., Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Bush K., Jacoby G. A. Medeiros A. A. (1995)** A functional classification schema for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structures. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 1211-1233.
- Carman R. J. (1997)** *Clostridium perfringens* in spontaneous and antibiotic-associated Diarrhoea of man and other animals. *Rev. Med. Microbiol.*, **8 (Suppl. 1)**, 43-45.
- Cato E. P., George W. L. Finegold S. (1986)** Genus *Clostridium*. In: Sneath P. H. A., Mair N. S., Sharpe M. E., Holt J. G., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Verlag Williams and Wilkins, Baltimore, London, **Band 2**, 1141-1200.
- Cavuslu S., Oncul O. Altunay H. Ozsoy M. F. Kocak N. (2003)** Seroprevalence of Tetanus Antibodz in Turkish Population and Effectivness of Single Dose Tetanus Toxoid. *Europ. Journal of Clin. Microbiol. & Infectious Diseases*, Springer Verlag.

- CDC (1997)** Sustained transmission of nosocomial Legionnaires' disease-Arizona and Ohio. *MMWR*, **46**, 416-421.
- Charrel R. N., Pages J. M. De Micco P. Mallea M. (1996)** Prevalence of outer membrane protein alteration in  $\beta$ -lactam antibiotic-resistant *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 2854-2858.
- Chittum H. S., Champney W. S. (1995)** Erythromycin inhibits the assembly of the large ribosomal subunit in growing *Escherichia coli* cells. *Curr. Microbiol.*, **30**, 273-279.
- Chopra I. Hawkey P. M., Hinton M. (1992)** Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *J. Antimicrob. Chemother.*, **29**, 245-277.
- Cowell N., Selvey L. (1995)** Heated spa associated with *Legionella pneumophila* deaths. *Communicable Diseases Intelligence*, **19**, 116-117.
- Czczulin, J. R., Collie, R. E., and McClane, B. A. (1996)** Regulated Expression of *Clostridium perfringens* Enterotoxin in Naturally Cpe-Negative Type a, B, and C Isolates of C-Perfringens. *Infection and Immunity*, **64**, 3301-3309.
- D'Aoust J.-Y. (1994)** *Salmonella* and the international food trade. *International Journal of Food Microbiology*, **24**, 11-31.
- Daube G., Simon P. Limbourg B. Manteca C. Mainil J. Kaeckenbeeck A. (1996)** Hybridization fo 2,659 *Clostridium perfringens* isolates with gene probes for seven toxins and for sialidase. *Am. Journal Vet. Res.*, **57**, 496-502.
- Davies J. E. (1983)** Resistance to aminoglycosides: mechanisms and frequency. *Rev. Infect. Dis* **5** (Suppl 2), 361-367.
- De Jong, A. E. I., Eijhusen, G. P., Brouwer-Post, E. J. F., et al (2003)** Comparison of Media for Enumeration of *Clostridium perfringens* From Foods. *Journal of Microbiological Methods*, **54**, 359-366.
- Debevere J. M. (1979)** A simple method for the isolation and determination of *Clostridium perfringens*. *European Journal Appl. Microbiol.*, **6**, 409-414.
- Degener I. (2004)** Entwicklung von Methoden zur Immobilisierung an Polymersinterkörpern – Immunoassays für die pharmazeutische und lebensmittelchemische Qualitätskontrolle- Promotion: Pharmazeutische Biologie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Duncan C. L., Strong D. H. (1969)** Ileal loop fluid accumulation and production of Diarrhöe in rabbits by cell free products of *Clostridium perfringens*. *Journal Bacteriol.*, **100**, 86-94.
- Duncan C. L., Somers E. B. (1972)** Quantitation of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin by electroimmunodiffusion. *Appl. Microbiol.*, **24**, 801-804.
- DVGW W 551/552 (2002)** Trinkwassererwärmungs- und leitungsanlagen; Technische Maßnahmen zur Verminderung des Legionellenwachstums. Technische Regel Arbeitsblatt W 551/W 552.
- Edelstein P.H. (1993)** Legionnaires' disease-State-of-the-art clinical article. *CID*, **16**, 741-749.
- Eisgruber H. (2003)** Typisierung von *Clostridium perfringens* unter epidemiologischen Gesichtspunkten. Tagung Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin. 12
- Erxlebe, Schönling J. (2003)** Erste Erfahrungen mit aminofunktionalisierten Sinterkörper zur Isolierung von Bakterien aus Flüssigkeiten. Vortragsreihe Schloss Meeting Bonn-Poppelsdorf, Genial GmbH.

- Fach P. und Popoff M. R. (1997)** Detection of Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in Food and Fecal Samples with a Duplex PCR and the Slide Latex Agglutination Test. Applied and Environmental Microbiology, **63**, 4232-4236.
- Falbe, Regitz (1995)** CD Roempp Chemie Lexikon - Version 1.0, Stuttgart/New York, Georg Thieme Verlag .
- Fallon R. J., Goldberg D. J. Wrench J. G. et al. (1993)** Pontiac fever in children. In Barbaree J. M., Breiman R. F., Dufow A. P. eds. *Legionella: current status and emerging perspectives*. Washington D.C. ASM, 50-51.
- Famiglietti R.F., Bakerman P. R. Saubolle M. A. Rudinsky M. (1997)** Legionellosis in two immunocompetent infants. Pediatrics, **99**, 899-903.
- Feingold S. (1980)** In: B. Kagen Antimicrobial therapy. W. B. Saunders, Philadelphia, 248-255.
- Fensterseib M. D., Miller M. Diggins C. et al. (1990)** Outbreak of Pontiac fever due to *Legionella anisa*. Lancet, **336**, 35-37.
- Ferguson R. W., Weissfeld A. S. (1984)** Journal Clinical Microbiology, **19**, 85-86.
- Ferner A., Birzele B. Krämer J. (2001)** Interaktion von humanpathogenen Bakterien mit Kunststoffmaterial unterschiedlicher Hydrophobizität. Abstract, DGHM-Tagung Karlsruhe .
- Ferner A., Krämer J. (2003)** Entwicklung und Anwendung eines Durchflussanreicherungs- und Analyseverfahrens auf Basis von Affinitätsmodulen aus Kunststoff zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen. Vortragsreihe Schloss Meeting Bonn-Poppelsdorf
- Ferone R. (1975)** Antimicrob. Chemotherap., **7**, 91-98.
- Fields BS. (1993)** *Legionella* and *Protozoa*: Interaction of a pathogen and its natural host. In Barbaree JM, Breiman RF, Dufow AP eds. *Legionella: current status and emerging perspectives*. Washington D.C.: ASM, 129-136.
- Fleischhygiene-Verordnung-FIHV (1999)** Verordnung über die hygienischen Anforderungen und amtlichen Untersuchungen beim Verkehr mit Fleisch.
- Frame B., Fritzpatrick B. W. F. (1972)** In: Shapton D. A., Board R. G., Isolation of anaerobes, Academic Press London, 48-55.
- Fraser D. W., TSAI T. R. Orenstein W. et al. (1977)** Legionnaires disease: description of an epidemic of pneumonia. N Engl J Med, 1189-1197.
- Fukal L., Kas J. (1989)** The advantages of immunoassay in food analysis. Trends Anal. Chem., **8**, 112-116.
- Gafner J. (2003)** Mikroorganismen beim biologischen Säureabbau und Weinausbau. Schweiz. Z. Obst-Weinbau, 6-8.
- Gaia V., Poloni C. Peduzzi R. (1994)** Epidemiological typing of *Legionella pneumophila* with ribotyping. Report of two clinical cases. Eur J Epidemiol, **10**, 303-306.
- Gangolf Schrimpf (2003)** Dot Blot. Gentechnische Methoden, Spektrum Verlag, Heidelberg, Berlin, 223 ff., 351 ff.
- Germani Y., Popoff M. R. Begaud E. Guesdon J. L. (1990)** Competitive erythroimmunoassay for detecting *Clostridium perfringens* Typ A enterotoxin in stool specimens. Res. Microbiol., **141**, 563-571.

- Gerten B. (1993)** DRCM Bouillon (Differential Reinforced Clostridial Medium): Zum Nachweis sulfid-reduzierender, sporenbildender Anaerobier (Clostridien) nach DIN 38411 (DEV) und § 35 LMBG sowie zur Koloniezahlbestimmung nach der MPN-Methode. Oxoid Handbuch, **5** aktualisierte deutsche Ausgabe, 136.
- Gibbs B. M. (1973)** Journal Appl. Bacteriol., **36**, 23-33.
- Giercke-Sygyusch S. (1987)** Untersuchungen zur Erstellung eines Atlas anaerober Bakterien. Dissertation, FB Agrarwissenschaften, Universität Göttingen, Göttinger Beiträge zur Land- und Forstwirtschaft in den Tropen und Subtropen.
- Giesbrecht P., Naumann D. Labischinski H. Barnickel G. (1985)** A new method for the rapid identification and differentiation of pathogenic microorganisms using Fourier Transform infrared spectroscopy. In: Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology ed. Habermehl K.-O. Springer Verlag, Berlin, 198-206.
- Glick T. H., Gregg M. B. Berman B et al. (1978)** Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department. J Epidemiol, 149-160.
- Goldberg D. J., Collier P. W. Fallon R. J. et al. (1989)** Lochgoilhead fever: outbreak of non-pneumonic legionellosis due to *Legionella micdadei*. Lancet, 316-318.
- Goldmann R. A., Hasan T. Hall C. C. Straycharz W. A. Coopermann B. S. (1983)** Photoincorporation of tetracycline into *Escherichia coli* ribosomes. Identification of the major proteins photolabeled by native tetracycline and tetracycline photoproducts and implications for the inhibitory action of tetracycline on protein synthesis. Biochem., **22**, 359-368.
- Gottschalk G. (1986)** Bacterial metabolism. Springer New York.
- Granum P. E., Skjelkvale (1981)** Appl. Environ Microbiol., **42**, 596-598.
- Granum P. W., Stewart G. S. A. B. (1993)** Molecular biology of *Clostridium perfringens* enterotoxin. In: Sebald M. ed. Genetics and Molecular Biology of Anaerobic Bacteria, Springer-Verlag New York, 235-247.
- Hackfleisch-Verordnung-HFIV (1997)** Verordnung über Hackfleisch, Schabefleisch und anderes zerkleinertes rohes Fleisch.
- Hahn G. (2002)** Erreger bakterieller Intoxikationen durch im Lebensmittel präformierte Toxine. In: Heeschen, Meyer, Zschacher: Handbuch Lebensmittelhygiene. Behr's Verlag, Hamburg.
- Hammer P. Hahn G., Heeschen W. (1988)** Deut. Mock-Zeit, **50**, 1700-1706.
- Harmon S. M., Kautter D. A. (1986)** Evaluation of a reversed passive latex agglutination test kit for *Clostridium perfringens* enterotoxin. Journal Food Prot., **49**, 523-525.
- Hatheway C. L. (1990)** Toxigenic clostridia. Clinical Microbiol. Review, **3**, 66-98.
- Hauschild A., Hilsheimer R. Martin W. (1973)** Can. Journal Microbiol., **19**, 1379-1382.
- Heisig P. (1997)** Mechanismen bakterieller Resistenz gegenüber Antibiotika. Arzneimittelther., **12 (7)**, 218-230.
- Heisig P., Wiedemann B. (2001)** Actio und Reactio: Wirkungs- und Resistenzmechanismen der Chinolone. Pharmazie in unserer Zeit, **Jahrgang 30, Nr. 5**, 382-392.

- Heitefuß S. (1991)** Untersuchung zur Identifizierung von aeroben, anaeroben und fakultativ anaeroben Bakterien mit gaschromatographischen Methoden. Göttinger Beiträge zur Land- und Forstwirtschaft in den Tropen und Subtropen, Heft **57**.
- Hellenbrand W. (2003)** Neu und vermehrt auftretende Infektionskrankheiten. Pressemitteilung des Robert Koch Institutes, GBE Heft, **18**.
- Helm D. (1992)** Anleitung zur Charakterisierung von Mikroorganismen mit IFS 25/B und OPUS (OPUS 1.4). Arbeitsgruppe FT-IR-Spektroskopie Robert Koch-Institut, Bundesgesundheitsblatt, Berlin.
- Helm D., Labischinski H. Schallehn G. Naumann D. (1991)** Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. Journal of General Microbiol., **137**, 66-79.
- Herdig Sotzeck B. (1998)** Identifizierung von *Clostridium* Spezies mittels der Fourier Transform Infrarotspektroskopie. Berichte aus der Medizin, Dissertation, Shaker Verlag, Aachen.
- Hichings G. H. (1973)** Mechanism of action of trimethoprim-sulfamethoxazol. J. Infect., **Dis. 128 (Suppl.)**, 433-436.
- Hirsch A., Grinstead E. (1954)** Journal Dairy Res., **21**, 101-110.
- Hirsch A., Grinstead E. (1954)** Journal DAiry Res., **21**, 101-110.
- Hobbs P. (1979)** In: Riemann H. and F. Bryan, Food borne infections and intoxications. Academic Press, New York, 131-171.
- Hof H., Mertgen C. P. Witte K. (2002)** Antibiotika in der Geriatrie; Hemmstoffe der bakteriellen Wandsynthese. Socio-medico Verlag GmbH, Wessobrunn, 72, 82.
- Hoffmann D. (1984)** Differenzierung von Clostridien mit Hilfe der Dampfraum-Gaschromatographie und der statistischen Auswertung ihrer Fettsäuremuster. Dissertation, FB Agrarwissenschaften, Universität Göttingen, Göttinger Beiträge zur Land- und Forstwirtschaft in den Tropen und Subtropen.
- Holdemann L. V., Cato E. P. Moore E. C. (1977)** Anaerobe Laboratory Manual. Virginia Polytechnique Institute and State University, Blacksburg, Virginia.
- Holländer A. (2002)** Modifikation von Kunststoffkörpern. Statusseminar InnoNet (innovative Netzwerke) in Gollm.
- Holländer A. (2003)** Oberflächenchemie an Kunststoffen für die Bindung biologisch aktiver Moleküle und chemische Analyse von funktionalisierten Oberflächen. Vortragsreihe Schloss Meeting Bonn-Poppelsdorf, Genial GmbH.
- Horiguchi Y., Uemura T. Kozaki S. Sakaguchi G. (1985)** FEMS Microbiol. Lett., **28**, 131-135.
- Humann D. (2000)** Die natürliche Antibiotikaempfindlichkeit nichtfermentierender gram-negativer Bakterien. Dissertation, Pharmazeutische Mikrobiologie der Universität Bonn, 16-17.
- Huppertz K., Wiedemann B. GENERAS Projektgruppe (2002)** GENARS Resistenzstatistik. Chemother. Journal, **11**, 174-177.
- Jarmund T., Telle W. (1982)** Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect., **90**, 377-381.
- Jarvis B. (1984)** A philosophical approach to rapid methods for industrial food control. Rapid methods and Automation in Microbiology and Immunology, 593.

- Jobst D. (2001)** Verbreitung von *Clostridium difficile* in einer Pferdeklinik unter Berücksichtigung des Vorkommens von *Clostridium difficile* und *Clostridium perfringens* im Kot von Pferden mit Kolik-symptomatik und Typhlocolitis. Dissertation an der Tierärztlichen Hochschule Hannover.
- Joseph C. A., Harrison T. G. Ilijic-Car D. Bartlett C. L. R. (1997)** Legionnaires' disease in residents of England and Wales: 1996. CDR Review, **7**, 153-159.
- Joseph C.A., Morgen D. Birtles R. et al. (1996)** An international investigation of an outbreak of Legionnaires' disease among UK and French tourists. Eur J Epidemiol, **12**, 215-219.
- Joseph C. A., Watson J. M. Harrison T. G. Bartlett C. R. L. (1994)** Nosocomial Legionnaires' disease in England and Wales 1980-1992. Epidemiol Infect, **112**, 329-345.
- Kappler C., Führer M. Nicolai t. et al. (1997)** Protrahierte Legionellenpneumonie bei akuter lymphoblastischer Leukämie. Pädiatr Prax, **52**, 439-447.
- Katasaras K. (1980)** *Clostridium perfringens*-Toxine. Archiv für Lebensmittelhygiene, **31**, 117-125.
- Kawabata N. (1980)** Studies on the Sulfite Reduction Test for Clostridia. Microbiol. Immunol., **24 (4)**, 271-179.
- Keuchel H. (2003)** Detektion von Salmonellen – Forschungsaktivitäten der Firma ConCell im Rahmen des InnoNet-Projektes 2000-2003, Vortragsreihe Schloss Meeting Bonn-Poppelsdorf
- Keusgen M. (2003)** Polymere in der Bioanalytik - Die Materialien von Morgen. Schloss Meeting der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Keusgen M., Kraemer J. Hollaender A. (2000)** Antrag Ausschreibung InnoNet (innovative Netzwerke) an BMWi.
- Kirschner C. (2004)** Charakterisierung und Differenzierung von humanpathogenen Mikroorganismen mittels schwingungsspektroskopischer Techniken. Dissertation, Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie, Freie Universität Berlin.
- Klein G., Bartelt E. (2003)** Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, 1.
- Kokai-Kun J. F., Songer J. G. Czczulin J. R. Chen F. McClane B. A. ( 1994)** Comparison of Western immunoblots and gene detection assays for identification of potentially enterotoxigenic isolates of *Clostridium perfringens*. Journal Clin. Microbiol., **32**, 2533-2539.
- Kramer M., Beer G. Nechwatal R. et al. (1992)** Kasuistik einer Legionellen-Epidemie in einer Rehabilitationsklinik. Zentralblatt Hygiene, 262-271.
- Krämer, Johannes (2002)** *Clostridium perfringens* In: Krämer J., Lebensmittel-Mikrobiologie. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.
- Küpper (2001)** Beschreibung der Zellwandbeschaffenheit pathogener Mikroorganismen. InnoNet-Meeting (Merlin Diagnostik, Pharmazeutische Biologie, Landwirtschaftliche und Lebensmittel-Mikrobiologie), Bonn.
- Kwaik Y. A., Gao L. Y. Stone B. J. et al. (1998)** Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. Appl Environ Microbiol, 3127-3133.
- Labbe R. (1989)** *Clostridium perfringens*. In: Foodborne bacterial pathogens, edited by Michael P. Doyle, Marcel Dekker, Inc., New York, 191 ff.
- Langmann J., Schröder H. J., Gruber K., Hönn W., Roberts E., Römer M., Schreckenbach T. (1999)** Singlepath® *E. coli* O157:H7 im Mikrobiologie Handbuch, Merck KGaA, Darmstadt, 376a

- Leusch H.-G. (2003)** Beschreibung, Isolationszeit, und -ort *Clostridium perfringens* Stämme.
- Liu L. F., Liu C. C. Alsberts B. M. (1980)** Typ II topoisomerasen: Enzyme, die ein topologisch knotted DNA-Molekül über einen reversiblen Doppelstrangbruch auflösen. *Cell*, **19**, 697-707.
- Livemore D. M. (1995)**  $\beta$ -Lactamase in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Review*, 557-584.
- Livermore D. M. (1997)** Acquired carbapenemases. *Journal Antimicrob. Chemother.*, **39**, 673-676.
- Lovett J., Francis D. W. Hunt J. M. (1987)** *Journal Food Prot.*, **50**, 188-192.
- Lukinmaa S., Takkunen E. Siitonen A. (2002)** Molecular Epidemiology of *Clostridium perfringens* Related to Food-Borne Outbreaks of Disease in Finland from 1984 to 1999. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 3744-3749.
- Lüthy J., Windemann H. (1987)** Immunochemische Methoden in der Lebensmittelanalytik. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, **78**, 147-167.
- Lüttichau H. R., Vinther C. Uldum S. A. et al. (1998)** An outbreak of Pontiac fever among children following use of a whirlpool. *CID*, **26**, 1374-1378.
- Marrie T. J., Haldane E. V. Swantee C. A. Kerr E. A. (1981)** Susceptibility of anaerobic bacteria to nine antimicrobial agents and demonstration of decreased susceptibility of *Clostridium perfringens* to penicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **19**, 51-55.
- Martin W. J., Gardner M. Washington J. A. (1972)** In vitro antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria isolated from clinical specimens. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1**, 148-158.
- McClane B. A. (1997)** *Clostridium perfringens*. In: *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers* ed-by Doyle M. P., Beuchart L. R., Montville T. J., ASM Press Washington D.C., 305-326.
- McClane B. A. (2001)** *Clostridium perfringens*. In: Doyle P., Beuchart R., Montville J.: *Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington D.C., **2nd ed.**
- McClane, B. A. (1996)** An Overview of *Clostridium perfringens* Enterotoxin. *Toxicon*, **34**, 1335-1343.
- McClane B. A., Lyerly D. M. Moncrief J. S. Wilkins T. D. (2000)** Enterotoxigenic clostridia: *Clostridium perfringens* type A and *Clostridium difficile*. In: Fischetti V. A., Novick R. P., Ferretti J. J., Portnoy D. A., Rood J. I., ed. *Gram-positive pathogens*. ASM Press, Washington D. C., 551-562.
- McClane B. A., Snyder J. T. (1987)** Development and preliminary evaluation of a slide latex agglutination assay for detection of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Journal Immunol. Methods*, **100**, 131-136.
- McDade J. E., Shepard C. C. Fraser D. W. et al. (1977)** Legionnaires disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med*, 1197-1203.
- McDonel J. (1980)** *Biochemistry*, **21**, 4801-4807.
- McDonel J., Duncan C. (1977)** *Journal Infect. Dis.*, **136**, 661-666.
- Moore W., Cato E. Holdeman L. (1966)** Fermentation patterns of some *Clostridium* species. *Int. Journal Syst. Bacteriol.*, **16**, 383-415.
- Moss W., Lewis V. (1967)** Characterization of *Clostridia* by gas chromatography. I. Differentiation of species by cellular fatty acids. *Appl. Microbiol.*, **15**, 390-397.

- Mutschler E. (1996)** Arzneimittelwirkungen . Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.
- Märtelbauer E., Dietrich R. Terplan G. (1991)** Erfahrungen bei der Anwendung von Immunoassays zum Nachweis von Mykotoxinen in Lebensmitteln. Archiv Lebensmittelhygiene, **42**, 3-6.
- Müllenberg W. (1993)** Tödliche reiseassoziierte Legionellainfektion durch Duschaerosole in einem deutschen Hotel. Gesundh Wes , **55**, 653-656.
- Müller G. (1986)** Bakterielle Lebensmittelvergiftungen In: Grundlagen der Lebensmittelmikrobiologie: eine Einf. von Gunther Müller. Dr. Dietrich Steinkopff Verlag Darmstadt.
- Nagrajan R. (1991)** Antibacterial activities and modes of action of vancomycin and related glycopeptides. Antimicrob. Agents Chemother., **35**, 605-609.
- Naik H. S., Ducan C. L. (1977)** Rapid detection and quantitation of *Clostridium perfringens* enterotoxin by counterimmunoelectrophoresis. Appl. Environ. Microbiol., **34**.
- Nauman (1997)** Biomedizinischen Diagnostik mittels FT-IR Spektroskopie. Bioanalytischer Workshop, Protokoll Salzer R., 2.
- Naumann D. (1985)** The ultra rapid differentiation and identification of pathogenic bacteria using FT-IR techniques. In: SPIE, Fourier and Computerized Infrared Spectroscopy ed. Grasselli J. G., Cameron D. G., International Society for Optical Engineering, Bellingham, **553**, 268-269.
- Naumann D., Helm D. Schultz C. (1994)** Characterization and identification of micro-organisms by FT-IR spectroscopy and FT-IR microscopy. In: Bacterial Diversity and Systematic ed. Priest F. G., Ramos-Cormenzana A., Tindall B. J., Plenum Press, New York, 67-85.
- Naumann P., Krech T. (1992)** Gattung *Listeria*. Mikrobiologische Diagnostik, Hrsg.: Burkhardt F., Bearb. Bauernfeind A., Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 248-249.
- Nechwatal R., Ehret W. Klatte O. J. et al. (1993)** Nosocomial outbreak of legionellosis in a rehabilitation center. Demonstration of potable water as a source. Infection, 235-240.
- Neut C. H., Pathak J. Romond C. H. Beerens H. (1985)** Rapid detection of *Clostridium perfringens*: Comparison of Laktose sulfite broth with tryptose-sulfite-cycloserine agar. Journal Assoc. Off. Anal. Chem., **68**, 881-883.
- Newsome W. H. (1986)** Potential and advantages of immunochemical methods for analysis of foods. Journal Assoc. Off. Anal. Chem., **69**, 919-922.
- Niilo L. (1980)** *Clostridium perfringens* in animal disease: A review of current knowledge. Can. vet. Journal, **21**, 141-148.
- O'Brien S. J., Bhopal R. S. (1993)** Legionnaires' disease: the infective dose paradox. Lancet, 5-6.
- OMS and EWGLI. (1998)** Legionnaires' disease in Europe, Weekly Epidemiological Record. 257-261.
- Pai P., Kumar S. Bell G. M. Ahmad R. (1996)** Rapidly progressive crescentic glomerulonephritis and Legionnaires' disease. Clin Nephrol, **45**, 209-210.
- Parry W. (1963)** Br. Med. Journal, **2**, 1616-1618.
- Pedro-Botet M. L., Sabria-Leal M. Sopena N. et al. (1998)** Role of immunosuppression in the evolution of Legionnaires'disease. CID., 14-19.



- Phillips K. D. (1986)** A sporulation medium for *Clostridium perfringens*. Letters in Applied Microbiology, **3**, 77-79.
- Pichardt Klaus (1998)** *Clostridium perfringens* In: Lebensmittelmikrobiologie: Grundlagen für die Praxis/Klaus Pichardt. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Pichon, N., Francois, B., Pichon-Lefievre, F., et al (2003)** Hepatic Abscess From *Clostridium perfringens* Septicemia. Gastroenterologie Clinique Et Biologique, **27**, 237-238.
- Pietzsch O. (1981)** *Salmonella*. In: Blobel H., Schliesser T. Hrsg.: Handbuch der bakteriellen Infektionen der Tiere, Verlag Fischer, Jena, **Band 3**, 344-452.
- Plaschke M., Ströhle A. Then Bergh F. et al. (1997)** Neurologische und psychiatrische Symptomatik bei der Legionellainfektion; Fallbericht und Übersicht über das klinische Spektrum. Der Nervenarzt, **68**, 342-345.
- Prodinge W.M., Bonatti H. Allerberger F. et al. (1994)** *Legionella pneumonia* in transplant recipients: a cluster of cases of eight years duration. J Hosp Infect, **26**, 191-202.
- Rambach A. (1990)** New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. and other enteric bacteria. Appl. Environ. Microbiol., **56**, 301-303.
- Rhodehamel E. J., Harmon S. M. (1998)** *Clostridium perfringens*. In: Bacteriological Analytical Manual, Food and Drug Administration, ed. AOAC International, Gaithersburg, USA, **8th**.
- Rice L. B., Bonomo R. A. (1996)** Genetics and biochemical mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. In: Lorain V. Hrsg. Antibiotics in laboratory medicine, Baltimore, Maryland, 453-501.
- Richardson M., Granum P. (1985)** FEBS Lett., **182**, 479-484.
- Rieke K. (1981)** Differenzierung von Clostridia mit Hilfe der gaschromatographischen Analyse metabolisch gebildeter Fettsäuren. Dissertation, FB Agrarwissenschaften, Universität Göttingen.
- Robert Koch Institut (RKI) (2001)** Ratgeber Infektionskrankheiten - 10. Folge Legionellose. Epidemiologischen Bulletin 49/1999, aktualisiert.
- Rocha G., Verissimo A. Bowker R. et al. (1995)** Relationship between *Legionella* spp. and antibody titres at a therapeutic thermal spa in Portugal. Epidemiol Infect, **115**.
- Rodloff A. C. (1999)** Obligat anaerobe sporenbildende Stäbchen (Clostridien). In: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie Hrsg.: Han H., Falke D., Kaufmann H. E., Ullmann U., Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 357 ff.
- Rood J. I., Cole S. T. (1991)** Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. Microbiol. Rev., **55**, 621-648.
- Rowbotham T. J. (1980)** Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. J Clin Pathol, 1179-1183.
- Ruckdeschel G. (1992)** Gattung *Clostridium*, *Clostridium perfringens* und andere histotoxische sowie sonstige, gewöhnlich apathogene Klostridienarten. Mikrobiologische Diagnostik, Hrsg. von Burkhardt F., bearbeitet von Bauernfeind A., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 223 ff., 228 ff.
- Rustige-Wiedemann C., Wiedemann B. (1996)** Wirkungsweise von Aminoglykosid-Antibiotika. Chemother., **J 5**, 50-53.

**Sarker, M. R., Singh, U., and McClane, B. A. (2000)** An Update on *Clostridium perfringens* Enterotoxin. *Journal of Natural Toxins*, **9**, 251-266.

**Sarker M. R., Carman R. J. McClane B. A. (1999)** Inactivation of the gene (*cpe*) encoding *Clostridium perfringens* enterotoxin eliminates the ability of two *cpe*-positive *C. perfringens* type A human gastrointestinal disease isolates to affect rabbit ileal loops. *Mol. Microbiol.*, **33**, 946-958.

**Sarker M. R., Shivers R. P. Sparks S. Juneja V. K. McClane B. A. (2000)** Comparative experiments to examine the effects of heating on Vegetative cells and spores of *Clostridium perfringens* isolates carrying plasmid versus chromosomal enterotoxin genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 3234-3240.

**Schalch B., Eisgruber H. Geppert P. Stolle A. (1996)** Comparison of four routine procedures for the confirmation of *Clostridium perfringens* from food. *Arch. Lebensmittelhyg.*, **47**, 27-30.

**Schallehn G. (1988)** Die Sporenbildner. Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie Hrsg. Brandis H., Pulverer G., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 436 ff.

**Scheer (1994)** Modellversuche zur Entstehung des Mäuselins. Jahresbericht 1994 - Fachgebiet Mikrobiologie und Biochemie, FH-Wiesbaden.

**Scherer S. (2001)** Das gläserne Bakterium FT-IR-Spektroskopie zur Bakterienidentifizierung und mikrobiellen Qualitätskontrolle. F&E-Projekte, Hamburg, 1.

**Schlegel H. G., Zaborosch C. (1992)** Die Zelle und ihre Struktur - Zellwand. Allgemeine Mikrobiologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 50-54.

**Schmitz R. (2000)** Begründung der Zielsetzung gegenüber dem technischen und wissenschaftlichen Stand. InnoNet (innovative Netzwerke) Antragsbegründung.

**Schmitz R., Krämer J. (2000)** Antrag InnoNet (innovative Netzwerke) an das BMWi.

**Schoenling J. (2003)** Einsatz von Kunststoffkörpern zur Anreicherung von Verderbniserregern in Getränken. Niederschrift Besprechung Genial GmbH, Fraunhofer Institut, Landwirtschaftliche und Lebensmittel Mikrobiologie.

**Seeliger H. P. R., Welshimer H. J. (1986)** Genus *Listeria*. In: Sneath H. A., Mair N. S., Sharpe M. E. Holt J. B.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. II, Williams und Wilkins, Baltimore.

**Seifert H. S. H. (1995)** Clostridiosen bei Mensch und Tieren. In: Blobel H., Schließer T., *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, **Band 2, Teil 4**.

**Selbitz H. J. (1991)** Die Virulenz der Salmonellen - Faktoren und Mechanismen. *Prakt. Tierarzt*, **72**, 589-592.

**Selbitz H. J. (1992)** Lehrbuch der veterinärmedizinischen Bakteriologie, Verlag Fischer, Jena.

**Shandera W. X., Tacket C. O. Blake P. A. (1983)** Food poisoning due to *Clostridium perfringens* in the United States. *Journal Infect. Dis.*, **147**, 167-170.

**Sire S., Staub T. Christmann D. (1994)** Manifestations extrapulmonaires des legionelloses. *Med Mal Infect*, **24**.

**Skjelkvale R., Tolleshaug H. Jarmund T. (1980)** *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect.*, **88**, 95-102.

**Sobities C. L., Bennett A. R. Betts R. P. Greenwood D. J. Banks J. G. (1996)** Evaluation of Bax for Screening/*Salmonella*. A rapid PCR-based method for the analysis of foods and food-borne *Salmonella*. *International Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians*, Seattle WA, **7**, 10, 17.

- Songer J. G., Meer R. M. (1996)** Genotyping of *Clostridium perfringens* by polymerase chain reaction is a useful adjunct to diagnosis of clostridial enteric disease in animals. *Anaerobe*, **2**, 197-203.
- Stark R. L., Duncan C. L. (1972)** Purification and biochemical properties of *C. perfringens* type A enterotoxin. *Infect. Immun.*, **6**, 662-673.
- Stelma T. N., Wimsatt J. C. Kaufmann P. E. Shah D. B. (1983)** Radioimmunoimmunoassay for *Clostridium perfringens* enterotoxin and its use in screening isolates implicated in food poisoning outbreaks. *Journal Food Prot.*, **46**, 1069-1073.
- Sterne M., Warrack G. H. (1964)** The types of *Clostridium perfringens*. *Journal Pathol. Bacteriol.*, **88**, 279-283.
- Stout J. E., Yu V. L. (1997)** Current concepts: Legionellosis. *New Engl J Med*, **337**, 82-87.
- Tewari K., Wold S. M. Asrat T. (1997)** Septic shock in pregnancy associated with *Legionella pneumoniae*: case report. *Am J Obstet Gynecol*, **176**, 706-707.
- Tigges E. (1998)** Nachweis von *Salmonella* in Lebensmitteln unter Einsatz einer Säulenteknologie mit Antikörper gekoppelten Matrizen. Diplomarbeit: Landwirtschaftliche und Lebensmittel-Mikrobiologie der Landwirtschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Tolleshaug H., Skjelkvale R. Berg T. (1982)** *Infect. Immun.*, **37**, 486-491.
- Thompson L., Lindhardt C., Bubert A., Leusch H.-G. (2001)** Singelpath® *Campylobacter*: Entwicklung und Evaluierung eines immunologischen Schnelltests zum Nachweis pathogener *Campylobacter* Spezies aus Lebensmitteln, DGHM-Tagung
- Traub W. H., Karthein J. Spohr M. (1986)** Susceptibility of *Clostridium perfringens* type A to 23 antimicrobial drugs. *Chemoth.*, **32**, 439-445.
- Trautmann M., Ruhnke M. Kresken M. Brauers J. Springsklee M. Marre R. (1997)** Quinupristin/Dalfopristin (RP59500, Synercid (R)) - Mikrobiologisches und klinisches Profil der ersten parenteralen Substanzkombination aus der Gruppe der Streptogramine. *Chemother.*, **J. 6**, 31-42.
- Uemura T., Sakaguchi G. Riemann H. (1973)** *Appl. Microbiol.*, **26**, 381-385.
- Waxmann D. J., Stominger J. L. (1983)** Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics. *Ann. Rev. Biochem.*, **52**, 825-869.
- Weetall H. H., (1993)** Preparation of immobilized proteins covalently coupled through silane coupling agents to inorganic supports. *Appl. Biochem. Biotech.* **41**, 157-188
- Wenning M. (2003)** FTIR Spektroskopie, Clusteranalyse. *Pers. Mitteilung.*
- Werdeling F. (1989)** Bakteriologische Untersuchungen zum Vorkommen von Enterotoxin bildenden *Clostridium perfringens*-Stämmen in Kotproben von Hunden und Katzen. *Diss. med. vet.*, Hannover.
- Wolfson J. S., Hooper D. C. (1985)** The fluoroquinolones: structures, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **28**, 581-586.
- Wollenberger U., Renneberg R. Bier F. F. Scheller F. W. (2003)** Analytische Biochemie, Wiley VCH, Eine praktische Einführung in das Messen mit Biomolekülen.
- Yamamoto H., Sugiura M. Kosunoki S. et al. (1992)** Factors stimulating propagation of *Legionellae* in cooling tower water. *Appl Environ Microbiol*, 1394-1397.

---

**Yamamoto K., Ohishi I. Sakaguchi G. (1979)** Fluid accumulation in mouse ligated intestine inoculated with *Clostridium perfringens* enterotoxin. Appl. Environ. Microbiol., **37**, 181-186.

**Yao J. D. C., Moellering R. C. (1995)** Antibacterial agents. In: Murray P.R., Baron E. J., Tenover F. C., Tenover P. C. (eds.) Manual of Clinical Microbiology, Washington D.C.; American Society for Microbiology, **sixth Edition**, 1281-1307.

**Zorn J. (2004)** Lebensmittelvergiftungen. BSMO Business Solutions Medicine Online GmbH, Berlin.

## 7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abbildung 2.1:</b> $\beta$ -Hämolyse von <i>Clostridium perfringens</i> beim Reverse-CAMP-Test-----	28
<b>Abbildung 2.2:</b> IR-Spektralfenster nach Naumann am Beispiel von <i>Clostridium perfringens</i> -----	40
<b>Abbildung 2.3:</b> Abicap <sup>®</sup> -Säule mit Kunststoffträger für Antikörper -----	41
<b>Abbildung 2.4:</b> Strukturformeln der verwendeten Kunststoffe-----	41
<b>Abbildung 2.5:</b> Schematischer Ablauf der Bestimmung von Wechselwirkungen der Bakterien mit Kunststoffoberflächen -----	42
<b>Abbildung 2.6:</b> Modifikation von Polyethylen-Sinterkörpern des Typs 180c (Oxidation, Silanisierung und Carboxylierung) als Vorbereitung zur kovalenten Bindung von Antikörpern auf Kunststoffoberflächen-----	45
<b>Abbildung 2.7:</b> Strukturformeln von Aminogruppen zur Modifikation von Kunststoffoberflächen-----	46
<b>Abbildung 2.8:</b> Aktivierung eines modifizierten PE-Sinterkörpers (oxidiert, silanisiert, carboxyliert) und kovalente Bindung von Antikörpern -----	49
<b>Abbildung 2.9:</b> Workstation mit Abicap <sup>®</sup> -Säulen und Abicap <sup>®</sup> -Reader-----	50
<b>Abbildung 3.1:</b> PCR-Produkte von <i>Clostridium perfringens</i> Isolaten aus Lebensmitteln (A30 bis A177), (283 bp, plc-Gen, spezifisch für <i>Clostridium perfringens</i> ) und (426 bp, cpe-Gen, spezifisch für Enterotoxinbildner) -----	52
<b>Abbildung 3.2:</b> PCR-Produkte von <i>Clostridium perfringens</i> Isolaten aus Lebensmitteln (A178 bis I2905) und Patienten (B6858II bis 798) mit dem spezifischen plc-Gen (283 bp)-----	53
<b>Abbildung 3.3:</b> PCR-Produkte von <i>Clostridium perfringens</i> Isolaten von Patienten (811 bis B369) mit dem spezifischen plc-Gen (283 bp)-----	54
<b>Abbildung 3.4:</b> FT-IR-Dendrogramm einer Clusteranalyse von <i>Clostridium perfringens</i> unter Herausstellung von Stämmen mit Enterotoxinbildungsvermögen -----	55
<b>Abbildung 3.5:</b> FT-IR-Dendrogramm einer Clusteranalyse von <i>Clostridium perfringens</i> unter Gegenüberstellung von Lebensmittel- und Patientenisolaten -----	61
<b>Abbildung 3.6:</b> FT-IR-Dendrogramm einer Clusteranalyse von <i>Clostridium perfringens</i> unter Herausstellung von Isolaten bis 1981 und ab 2001-----	66
<b>Abbildung 3.7:</b> Gegenüberstellung der Ausbildung von Hemmhöfen einer Auswahl von <i>Clostridium perfringens</i> Stämmen bei der Verwendung unterschiedlicher Anzuchtmedien (Müller-Hinton-Agar/Columbia-Agar) -----	71
<b>Abbildung 3.8:</b> Vergleich der Rückhalteraten von ausgewählten humanpathogenen Bakterien gegenüber unbehandelten und geblockten Polyesterfritten nach Aufgabe auf eine Abicap <sup>®</sup> -Säule -----	73
<b>Abbildung 3.9:</b> Vergleich der Rückhalteraten von ausgewählten humanpathogenen Bakterien gegenüber unbehandelten und geblockten Polyethylenfritten Typ Porex nach Aufgabe auf eine Abicap <sup>®</sup> -Säule-----	74

<b>Abbildung 3.10:</b> Vergleich der Rückhalteraten von ausgewählten humanpathogenen Bakterien gegenüber unbehandelten und geblockten Polypropylenfritten nach Aufgabe auf eine Abicap <sup>®</sup> -Säule-----	75
<b>Abbildung 3.11:</b> Raster-Elektronenmikroskopaufnahme einer Polyesterfritte (links) und einer Polyethylenfritte Typ Porex (rechts)-----	77
<b>Abbildung 3.12:</b> Rückhalterate von <i>Listeria monocytogenes</i> pro Fritte nach Aufgabe auf eine Abicap <sup>®</sup> -Säule mit unbehandelten, hintereinander (mit und ohne Zwischenräume) geschalteten Polypropylenfritten -----	79
<b>Abbildung 3.13:</b> Rückhalterate von humanpathogenen Bakterien durch modifizierte Polyethylenfritte Typ 180c nach Aufgabe auf eine Abicap <sup>®</sup> -Säule-----	80
<b>Abbildung 3.14:</b> Vergleich der Rückhalterate ausgewählter Bakterien nach Aufgabe auf eine Abicap <sup>®</sup> -Säule mit einer unbehandelten, einer frisch und einer fünf Monate gelagerten oxidierten Polyethylen Typ 180c Fritte-----	82
<b>Abbildung 3.15:</b> Dot-Blot-ELISA von <i>Clostridium perfringens</i> (NWG: 10 <sup>5</sup> KbE/ml)-----	84
<b>Abbildung 3.16:</b> Schematische Darstellung eines ELISA-Verfahrens auf Basis von Kunststoffträgern zum Nachweis von <i>Clostridium perfringens</i> (vereinfacht) -----	84
<b>Abbildung 3.17:</b> Ablaufschema eines Durchfluss-ELISA-Verfahrens zum Nachweis humanpathogener Bakterien-----	85
<b>Abbildung 3.18:</b> Dot-Blot-ELISA von <i>Legionella pneumophila</i> Serogrp. 1 (NWG: 10 <sup>3</sup> KbE/ml) -----	88
<b>Abbildung 3.19:</b> Ablaufschema eines Testsystems zur immunologischen Anreicherung von Salmonellen mit anschließender PCR-Detektierung -----	92
<b>Abbildung 3.20:</b> Nachweisgrenze von <i>Salmonella</i> Enteritidis nach immunologischer Anreicherung auf Kunststoff-Fritten und anschließender PCR-Detektierung -----	93
<b>Abbildung 3.21:</b> Gelelektrophorese eines 149 bp Amplifikats einer <i>Listeria monocytogenes</i> Probe aus Milch nach einer Polymerase-Kettenreaktion im Thermocycler-----	94
<b>Abbildung 3.22:</b> Rückhalteraten von <i>Lactobacillus brevis</i> nach Aufgabe auf eine Abicap <sup>®</sup> -Säule mit unterschiedlichen aminomodifizierten Kunststoff-Fritten-----	95
<b>Abbildung 3.23:</b> Ablaufschema eines Testsystems zur Anreicherung von <i>Lactobacillus brevis</i> durch Aminoaffinitätsmodule mit anschließender PCR-Detektierung -----	97
<b>Abbildung 3.24:</b> Quantifikation und Spezifikation von <i>Lactobacillus brevis</i> nach einer DNA-Extraktion direkt aus einer Flüssigkultur im Vergleich zu Proben nach einer Anreicherung in aminomodifizierten Kunststoff-Fritten -----	98
<b>Abbildung 4.1:</b> Schematische Darstellung der möglichen Bindestellen der Tetrapeptidseitenketten der Mureinsäure für die silanisierten ①, ②, ③ und carboxylierten ④ Kunststoffoberflächen -----	112
<b>Abbildung 4.2:</b> Übersicht über die mögliche Einbindung von Kunststoffträgern in die mikrobiologische Analytik zum Nachweis von humanpathogenen und Verderbnis erregenden Mikroorganismen in Lebensmitteln-----	121

- 
- Abbildung 9.1:** Vergleich der Antibiotikasensitivität von Enterotoxin bildenden *Clostridium perfringens* Stämmen mit nicht Enterotoxin bildenden Stämmen gegenüber Ampicillin, Benzylpenicillin und Chephalothin (Agardiffusionstest)----- 146
- Abbildung 9.2:** Vergleich der Antibiotikasensitivität von Enterotoxin bildenden *Clostridium perfringens* Stämmen mit nicht Enterotoxin bildenden Stämmen gegenüber Chloramphenicol, Erythromycin und Gentamicin (Agardiffusionstest) ----- 147
- Abbildung 9.3:** Vergleich der Antibiotikasensitivität von Enterotoxin bildenden *Clostridium perfringens* Stämmen mit nicht Enterotoxin bildenden Stämmen gegenüber Tetrazyklin, Trimethoprim/Sulphamethoxazole und Vancomycin (Agardiffusionstest) ----- 147
- Abbildung 9.4:** Vergleich der Antibiotikasensitivität von *Clostridium perfringens* Isolaten aus Lebensmitteln mit Isolaten aus Patienten gegenüber Ampicillin, Benzylpenicillin und Chephalothin (Agardiffusionstest) ----- 148
- Abbildung 9.5:** Vergleich der Antibiotikasensitivität von *Clostridium perfringens* Isolaten aus Lebensmitteln mit Isolaten aus Patienten gegenüber Chloramphenicol, Erythromycin und Gentamicin (Agardiffusionstest) ----- 148
- Abbildung 9.6:** Vergleich der Antibiotikasensitivität von *Clostridium perfringens* Isolaten aus Lebensmitteln mit Isolaten aus Patienten gegenüber Tetrazyklin, Trimethoprim/Sulphamethoxazole und Vancomycin (Agardiffusionstest) ----- 149
- Abbildung 9.7:** Vergleich der Antibiotikasensitivität von *Clostridium perfringens* Stämmen unterschiedlicher Isolationszeiträume (1979-1981 mit 2001-2003) gegenüber Ampicillin, Benzylpenicillin und Chephalothin (Agardiffusionstest)----- 149
- Abbildung 9.8:** Vergleich der Antibiotikasensitivität von *Clostridium perfringens* Stämmen unterschiedlicher Isolationszeiträume (1979-1981 mit 2001-2003) gegenüber Chloramphenicol, Erythromycin und Gentamicin (Agardiffusionstest) ----- 150
- Abbildung 9.9:** Vergleich der Antibiotikasensitivität von *Clostridium perfringens* Stämmen unterschiedlicher Isolationszeiträume (1979-1981 mit 2001-2003) gegenüber Tetrazyklin, Trimethoprim/Sulphamethoxazole und Vancomycin (Agardiffusionstest) ----- 150

## 8 TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tabelle 2.1:</b> Stammbezeichnung/Herkunft der verwendeten Clostridien .....	17
<b>Tabelle 2.2:</b> Stammbezeichnung/Herkunft der verwendeten Legionellen.....	19
<b>Tabelle 2.3:</b> Stammbezeichnung/Zellwandstruktur ausgewählter Bakterien.....	21
<b>Tabelle 2.4:</b> Verwendete Nährmedien .....	22
<b>Tabelle 2.5:</b> Verwendete Geräte.....	23
<b>Tabelle 2.6:</b> Verwendete Puffer und Lösungen .....	23
<b>Tabelle 2.7:</b> Verwendete Kits, Chemikalien und sonstige Materialien .....	24
<b>Tabelle 2.8:</b> Verwendete Oligonukleotide.....	26
<b>Tabelle 2.9:</b> Verwendete Antikörper .....	26
<b>Tabelle 2.10:</b> Antibiotikaauswahl für Agardiffusionstest .....	29
<b>Tabelle 2.11:</b> Temperaturprogramm der Realtime-PCR von <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	34
<b>Tabelle 2.12:</b> Temperaturprogramm Realtime-PCR von <i>Lactobacillus brevis</i> .....	35
<b>Tabelle 3.1:</b> Vergleich der Antibiotikasensitivität (MHK-Werte) von Enterotoxin bildenden <i>Clostridium perfringens</i> Stämmen mit nicht Enterotoxin bildenden Stämmen (Zellwandsynthese-Inhibitoren). .....	56
<b>Tabelle 3.2:</b> Vergleich der Antibiotikasensitivität (MHK-Werte) von Enterotoxin bildenden <i>Clostridium perfringens</i> Stämmen mit nicht Enterotoxin bildenden Stämmen (Proteinsynthese-Inhibitoren). .....	57
<b>Tabelle 3.3:</b> Vergleich der Antibiotikasensitivität (MHK-Werte) von Enterotoxin bildenden <i>Clostridium perfringens</i> Stämmen mit nicht Enterotoxin bildenden Stämmen (Nukleinsäuresynthese-Inhibitoren).....	58
<b>Tabelle 3.4:</b> Vergleich des Sporulationsverhaltens von <i>Clostridium perfringens</i> Stämmen mit und ohne Enterotoxinbildungsvermögen in DRCM-Bouillon .....	59
<b>Tabelle 3.5:</b> Vergleich der Antibiotikasensitivität (MHK-Werte) von <i>Clostridium perfringens</i> Isolaten aus Lebensmitteln mit Isolaten aus Patienten (Zellwandsynthese-Inhibitoren).....	62
<b>Tabelle 3.6:</b> Vergleich der Antibiotikasensitivität (MHK-Werte) von <i>Clostridium perfringens</i> Isolaten aus Lebensmitteln mit Isolaten aus Patienten (Proteinsynthese-Inhibitoren)...	63
<b>Tabelle 3.7:</b> Vergleich der Antibiotikasensitivität (MHK-Werte) von <i>Clostridium perfringens</i> Isolaten aus Lebensmitteln mit Isolaten aus Patienten (Nukleinsäuresynthese-Inhibitoren).....	64
<b>Tabelle 3.8:</b> Vergleich des Sporulationsverhaltens von <i>Clostridium perfringens</i> Isolaten aus Lebensmitteln gegenüber Patientenisolaten in DRCM-Bouillon.....	65
<b>Tabelle 3.9:</b> Vergleich der Antibiotikasensitivität (MHK-Werte) von <i>Clostridium perfringens</i> Stämmen unterschiedlicher Isolationszeiträume (1979-1981 mit 2001-2003), (Zellwandsynthese-Inhibitoren). .....	67



---

<b>Tabelle 3.10:</b> Vergleich der Antibiotikasensitivität (MHK-Werte) von <i>Clostridium perfringens</i> Stämmen unterschiedlicher Isolationszeiträume (1979-1981 mit 2001-2003), (Proteinsynthese-Inhibitoren) .....	68
<b>Tabelle 3.11:</b> Vergleich der Antibiotikasensitivität (MHK-Werte) von <i>Clostridium perfringens</i> Stämmen unterschiedlicher Isolationszeiträume (1979-1981 mit 2001-2003), (Nukleinsäuresynthese-Inhibitoren).....	69
<b>Tabelle 3.12:</b> Vergleich des Sporulationsverhaltens und des Nachweises von <i>Clostridium perfringens</i> Isolaten bis 1981 gegenüber Isolaten ab 2001 in DRCM-Bouillon.....	70
<b>Tabelle 3.13:</b> Durchflussgeschwindigkeit flüssiger Proben durch Kunststoff-Fritten.....	76
<b>Tabelle 3.14:</b> Rückhaltekapazität von Polypropylenfritten gegenüber <i>Listeria monocytogenes</i> Suspensionen unterschiedlicher Konzentrationen .....	78
<b>Tabelle 3.15:</b> Validierungsergebnisse, Kreuzreaktionen und Nachweisgrenzen von Legionellen beim Nachweis durch einen Durchfluss-ELISA mit Abicap <sup>®</sup> -Säulen.....	89
<b>Tabelle 3.16:</b> Ergebnisse (optische Dichten) einer Messreihe von Salmonellen auf eine Abicap <sup>®</sup> -Säule nach Durchführung des Abicap <sup>®</sup> -RED-Test .....	91
<b>Tabelle 9.1:</b> Morphologie der untersuchten <i>Clostridium perfringens</i> Stämme .....	143

## 9 ANHANG

### 9.1 Morphologie der untersuchten *Clostridium perfringens* Stämme

Die Beschreibung der Morphologie erfolgte unter mikroskopischen und makroskopischen Gesichtspunkten (siehe Kapitel 3.1.1). In Tabelle 9.1 sind die charakteristischen morphologischen Merkmale der untersuchten Stämme aufgeführt.

**Tabelle 9.1:** Morphologie der untersuchten *Clostridium perfringens* Stämme

Stamm	Zelllänge [µm] Ø	Kolonien [cm] Ø	Form/Farbe der Kolonien	Erhebung	Rand
A 30 <sup>1,2</sup>	7-15	1,1	transparent, filamentös bis wurzelförmig	flach	filamentös
A112 <sup>1,2</sup>	7,5-10	0,5	transparent bis beige	flach	wellenförmig
A124 <sup>1,2</sup>	7,5	0,5	transparent, Zentrum beige (0,4 cm)	flach	gekerbt
A155 <sup>1,2</sup>	5-10	1,0	transparent, rundes Zentrum (0,2 cm)	flach	gekerbt
A 221 <sup>1,2</sup>	2,5-10	0,25	beige	knopfförmig	gekerbt
A 48 <sup>2</sup>	2,5-7,5	0,6	transparent, unregelmäßig, Zentrum beige (0,2 cm)	flach	gekerbt
A 113 <sup>2</sup>	2,5-10	0,5	transparent, wurzelförmig	flach	filamentös
A 115 <sup>2</sup>	5-10	1,0	transparent, filamentös	flach	filamentös
A 118 <sup>2</sup>	5	1,0	beige, regelmäßig	erhaben	glatt
A 120 <sup>2</sup>	7,5	0,9	beige, regelmäßig	knopfförmig	filamentös
A 121 <sup>2</sup>	1,5-7,5	0,6	transparent, filamentös, Zentrum beige und unregelmäßig (0,2 cm)	flach	gekerbt
A 141 <sup>2</sup>	1,5-7,5	0,4	transparent, filamentös	flach	Wimpern
A 142 <sup>2</sup>	5-7,5	0,7	transparent, filamentös	flach	Wimpern
A 147 <sup>2</sup>	5-12,5	0,6	transparent, filamentös	flach	gekerbt
A 149 <sup>2</sup>	2-7,5	0,5	transparent, filamentös	flach	Wimpern
A 152 <sup>2</sup>	5-7,5	0,6	transparent, filamentös, Zentrum beige (0,15 cm)	flach	gekerbt
A 156 <sup>2</sup>	5-7,5	0,9	transparent, filamentös	flach	gekerbt
A 162 <sup>2</sup>	5-7,5	0,8	transparent, filamentös, unregelmäßig	flach	gekerbt
A 164 <sup>2</sup>	5-7,5	0,5	transparent	flach	gekerbt
A 177 <sup>2</sup>	5-10	0,7	transparent, filamentös, Zentrum beige (0,2 cm)	flach	filamentös

A 178 <sup>2</sup>	2,5-7,5	0,4	transparent, regelmäßig, Zentrum beige (0,3 cm)	flach	gekerbt
A 184 <sup>2</sup>	7,5-15	0,5	transparent, unregelmäßiges Filament, Zentrum beige (0,3 cm)	knopfförmig	wellenförmig
A 193 <sup>2</sup>	5-7,5	0,8	transparent bis beige, unregelmäßig, Zentrum beige (0,3 cm)	flach	filamentös
I 2636 <sup>2</sup>	2,5-5	0,7	transparent, beiges Zentrum	flach	gekerbt
I 2905 <sup>2</sup>	2,5-5	1,1	transparentes Filament, beiges Zentrum (0,3 cm)	flach	filamentös
B 6858 II <sup>3</sup>	5-7,5	1,1	transparent, wurzelförmig	flach	filamentös
436 <sup>3</sup>	2,5-10	0,1	transparent, leicht unregelmäßig, punktförmig, Zentrum beige	knopfförmig	gekerbt
449 <sup>3</sup>	2,5-10	0,3	leicht unregelmäßig, beige mit transparenten Umrissen	navelförmig	wellenförmig
534 <sup>3</sup>	5-12,5	0,7	Filament transparent, wurzelförmig bis filamentös, Zentrum beige (0,1 cm)	flach	wellenförmig
541 <sup>3</sup>	2,5-10	0,5	Filament transparent, Zentrum beige (0,15 cm)	konvex	gekerbt
552 <sup>3</sup>	2,5-10	1,2	transparent, wurzelförmig bis filamentös, Zentrum beige (0,1 cm)	flach	gekerbt
623 <sup>3</sup>	2,5-10	0,7	transparent, filamentös, Zentrum beige (0,1 cm)	leicht konvex	gefranst
707 <sup>3</sup>	2,5-10	0,6	unregelmäßig filamentös	leicht erhaben	gekerbt
710 <sup>3</sup>	2,5-7,5	1,0	gleichmäßig filamentös, Zentrum beige (0,05 cm)	flach	gekerbt
721 <sup>3</sup>	2,5-5	0,9	gleichmäßig filamentös, Zentrum beige (0,05 cm)	flach	gekerbt
753 <sup>3</sup>	5-10	0,3	Filament transparent, Zentrum beige (0,1 cm)	leicht konvex	gekerbt
760 <sup>3</sup>	2,5-10	0,8	transparent, filamentös, Zentrum mit erhöhter Zellmasse (0,1 cm)	flach	gekerbt
779 <sup>3</sup>	2,5-5	0,2	transparent, Zentrum beige (0,1 cm)	flach	glatt
785 <sup>3</sup>	2,5-5	0,35	transparent, filamentös, Zentrum beige (0,1 cm)	flach	Wimpern
790 <sup>3</sup>	2,5-10	0,9	transparent bis beige, filamentös, Zentrum beige (0,05 cm)	flach	gekerbt
798 <sup>3</sup>	2,5-12,5	0,7	transparent bis beige, filamentös, Zentrum beige (0,1 cm)	flach	gekerbt
811 <sup>3</sup>	2,5-15	1,3	transparent, Zentrum beige (0,5 cm), unregelmäßig, wurzelförmig	flach	filamentös
840 <sup>3</sup>	2-15	0,3	transparent, Zentrum beige (0,25 cm), unregelmäßig	knopfförmig	gekerbt
842 <sup>3</sup>	2,5-5	0,3	transparent, Zentrum beige (0,25 cm), unregelmäßig	flach	gekerbt
858 <sup>3</sup>	7-10	0,4	transparent, unregelmäßig	flach	gekerbt
873 <sup>3</sup>	2-5	0,3	beige, glatt	knopfförmig	glatt

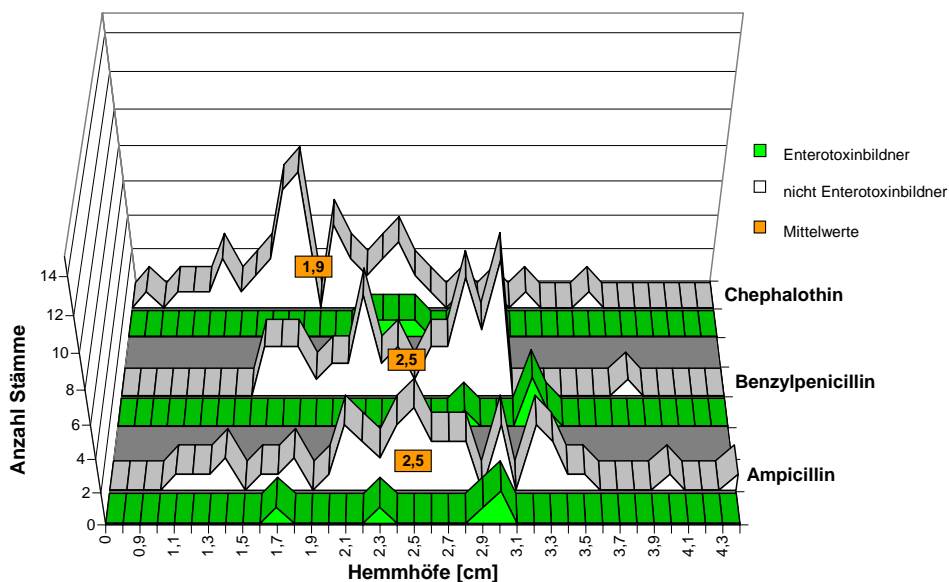
1094 <sup>3</sup>	5-12,5	0,8	transparent, Zentrum beige (0,05 cm), filamentös	flach	gekerbt
1099 <sup>3</sup>	5-12,5	1,0	Filament transparent bis beige, Zentrum beige (0,05 cm)	flach	gekerbt
1107 <sup>3</sup>	2-7,5	0,7	transparent, Zentrum beige (0,5 cm), unregelmäßig, wurzelförmig	erhaben	filamentös
B343 <sup>3</sup>	2-10	0,7	transparent, Zentrum beige (0,5 cm), unregelmäßig, wurzelförmig	flach	filamentös
B344 <sup>3</sup>	2,5-7,5	0,3	transparent, Zentrum beige (0,2 cm), unregelmäßig, wurzelförmig	knopfförmig	filamentös
B349 <sup>3</sup>	2-15	0,4	transparent, Zentrum beige (0,25 cm), unregelmäßig, wurzelförmig	flach	filamentös
B360 <sup>3</sup>	1,5-5	0,8	transparent, Zentrum beige und regelmäßig (0,3 cm), wurzelförmig	knopfförmig	filamentös
B362 <sup>3</sup>	1-5	1,2	transparent, Zentrum beige (0,3 cm), unregelmäßig, wurzelförmig	flach	filamentös
B364 <sup>3</sup>	2-12	0,7	transparent, Zentrum beige und regelmäßig (0,3 cm), wurzelförmig	knopfförmig	filamentös
B366 <sup>3</sup>	2,5-15	0,9	transparent, Zentrum beige und regelmäßig (0,25 cm), wurzelförmig	erhaben	filamentös
B369 <sup>3</sup>	2-15	0,4	transparent, Zentrum beige und regelmäßig (0,15 cm), wurzelförmig	knopfförmig	gekerbt

1 = Enterotoxinbildner    2 = Lebensmittelisolate    3 = Patientenisolate

## 9.2 Antibiotikasensitivität von *Clostridium perfringens* (Agardiffusionstest)

Die hier dargestellten Ergebnisse sind mit der unter 2.4.5.1 beschriebenen Methode ermittelt worden. Dabei bildeten sich auf Columbia-Agarplatten, die mit dem jeweiligen *Clostridium perfringens* beimpft und mit einer Auswahl von Antibiotikablättchen belegt und bebrütet wurden, charakteristische Hemmhöfe aus (fehlendes Wachstum um das Antibiotikablättchen). Von den ausgemessenen Hemmhöfen wurde für jedes eingesetzte Antibiotikum ein Spektrum für die Wirkung gegenüber die getesteten *Clostridium perfringens* Stämme erstellt.

### Einordnung der Hemmhöfe von enterotoxinbildenden Isolaten



**Abbildung 9.1:** Vergleich der Antibiotikasensitivität von enterotoxinbildenden *Clostridium perfringens* Stämmen mit nicht Enterotoxin bildenden Stämmen gegenüber Ampicillin, Benzylpenicillin und Cephalothin (Agardiffusionstest)

Einordnung der Hemmhöfe von enterotoxinbildenden Isolaten

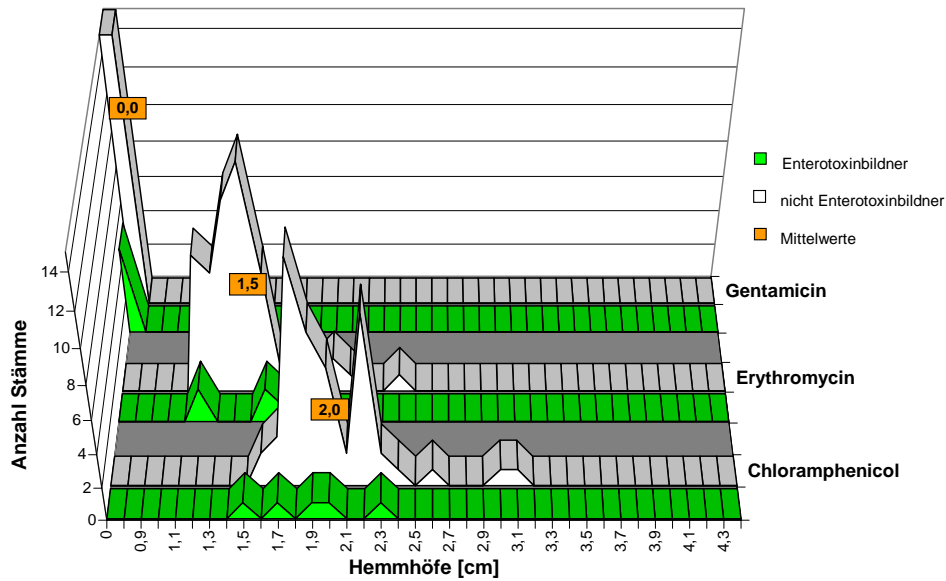


Abbildung 9.2: Vergleich der Antibiotikasensitivität von enterotoxinbildenden *Clostridium perfringens* Stämmen mit nicht Enterotoxin bildenden Stämmen gegenüber Chloramphenicol, Erythromycin und Gentamicin (Agardiffusionstest)

Einordnung der Hemmhöfe von enterotoxinbildenden Isolaten

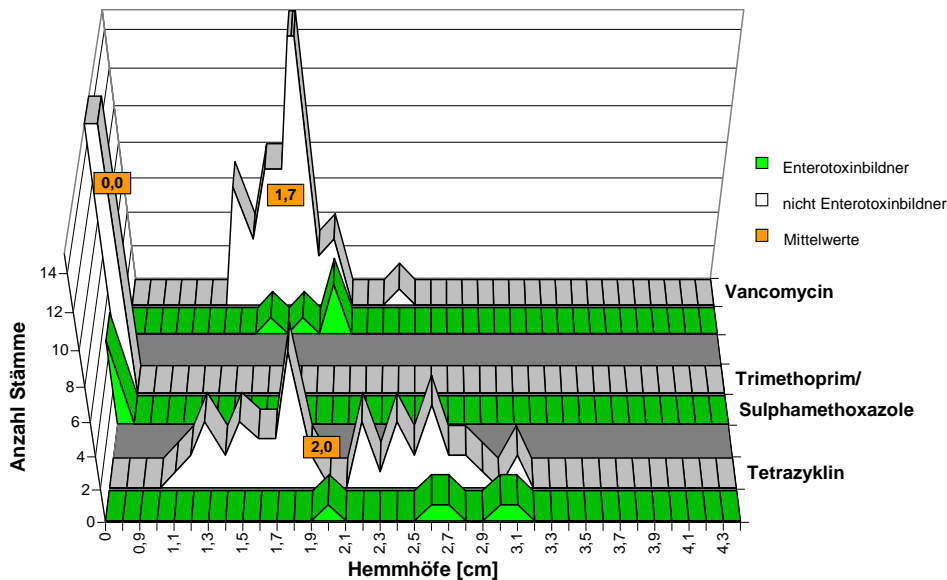


Abbildung 9.3: Vergleich der Antibiotikasensitivität von enterotoxinbildenden *Clostridium perfringens* Stämmen mit nicht Enterotoxin bildenden Stämmen gegenüber Tetrazyklin, Trimethoprim/Sulphamethoxazole und Vancomycin (Agardiffusionstest)

Vergleich der Hemmhöfe von Lebensmittel- und Patientenisolaten

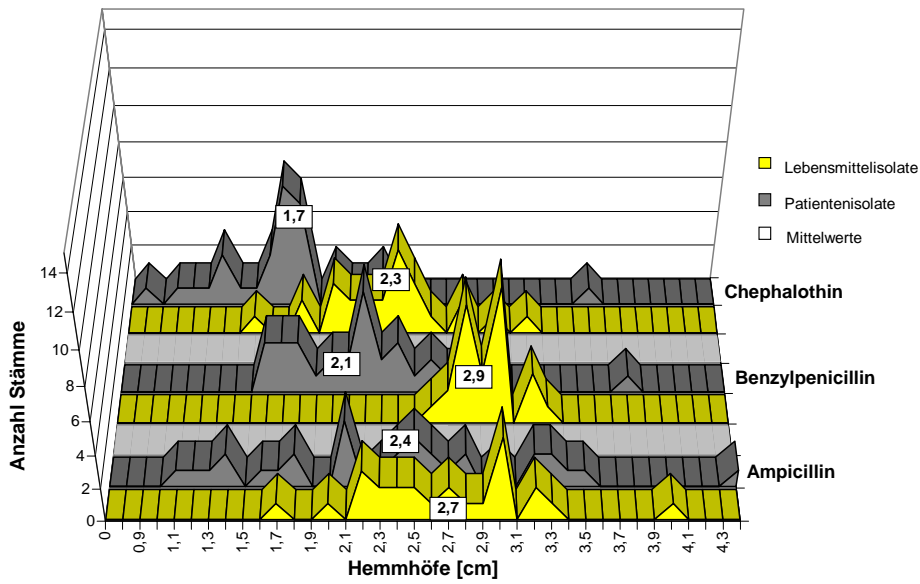


Abbildung 9.4: Vergleich der Antibiotikasensitivität von *Clostridium perfringens* Isolaten aus Lebensmitteln mit Isolaten aus Patienten gegenüber Ampicillin, Benzylpenicillin und Cephalothin (Agardiffusionstest)

Vergleich der Hemmhöfe von Lebensmittel- und Patientenisolaten

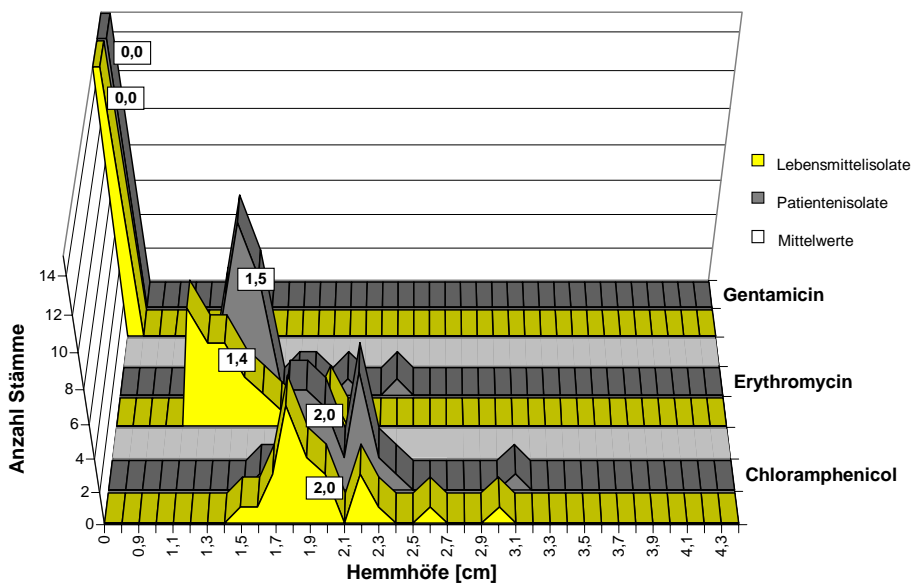


Abbildung 9.5: Vergleich der Antibiotikasensitivität von *Clostridium perfringens* Isolaten aus Lebensmitteln mit Isolaten aus Patienten gegenüber Chloramphenicol, Erythromycin und Gentamicin (Agardiffusionstest)

Vergleich der Hemmhöfe von Lebensmittel- und Patientenisolaten

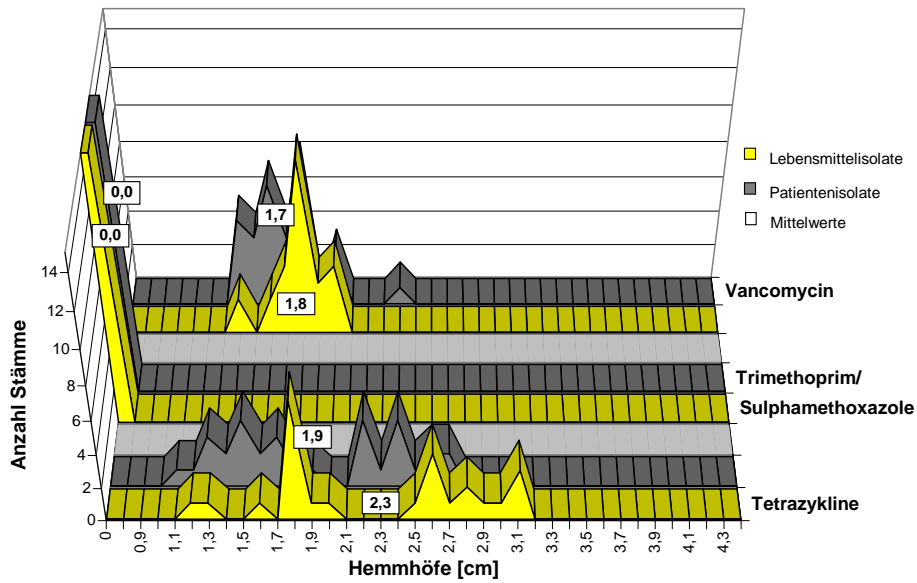


Abbildung 9.6: Vergleich der Antibiotikasensitivität von *Clostridium perfringens* Isolaten aus Lebensmitteln mit Isolaten aus Patienten gegenüber Tetrazyklin, Trimethoprim/Sulphamethoxyzole und Vancomycin (Agardiffusionstest)

Vergleich der Hemmhöfe von Isolaten bis 1981 und ab 2001

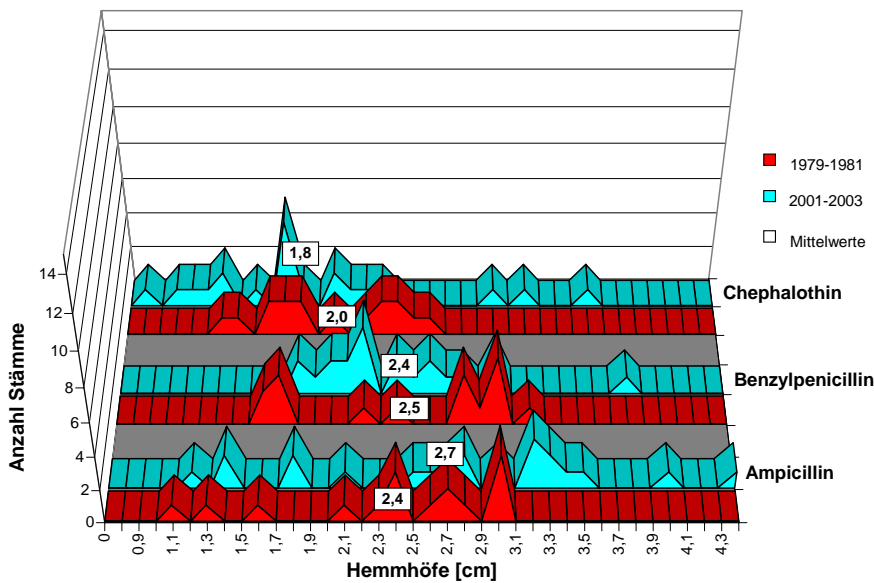
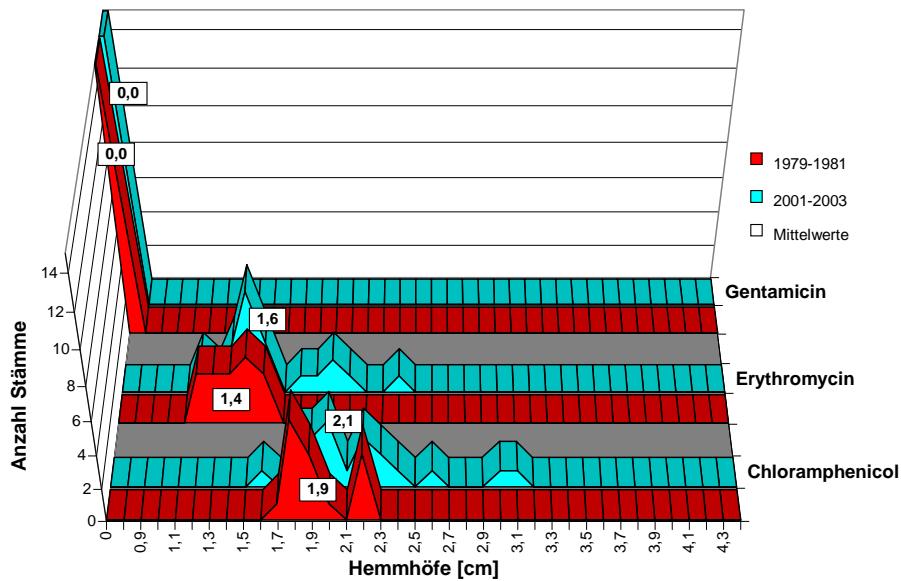


Abbildung 9.7: Vergleich der Antibiotikasensitivität von *Clostridium perfringens* Stämmen unterschiedlicher Isolationszeiträume (1979-1981 mit 2001-2003) gegenüber Ampicillin, Benzylpenicillin und Chephalothin (Agardiffusionstest)

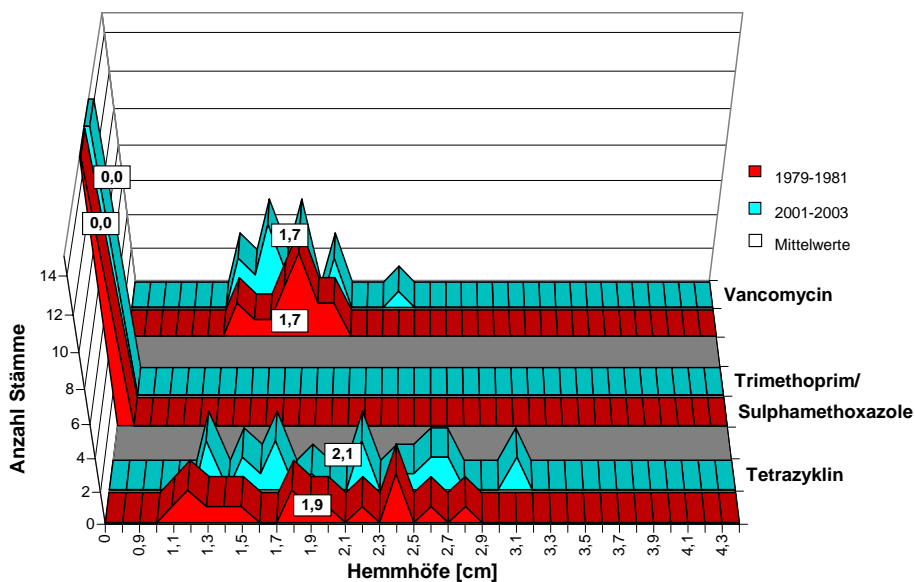


### Vergleich der Hemmhöfe von Isolaten bis 1981 und ab 2001



**Abbildung 9.8:** Vergleich der Antibiotikasensitivität von *Clostridium perfringens* Stämmen unterschiedlicher Isolationszeiträume (1979-1981 mit 2001-2003) gegenüber Chloramphenicol, Erythromycin und Gentamicin (Agardiffusionstest)

### Vergleich der Hemmhöfe von Isolaten bis 1981 und ab 2001



**Abbildung 9.9:** Vergleich der Antibiotikasensitivität von *Clostridium perfringens* Stämmen unterschiedlicher Isolationszeiträume (1979-1981 mit 2001-2003) gegenüber Tetracyclin, Trimethoprim/Sulphamethoxazole und Vancomycin (Agardiffusionstest)

### 9.3 Analysenprotokolle

#### **Dot-Blot-ELISA mit Streptavidin/Meerrettichperoxidase (Nachweis von *Clostridium perfringens* oder *Legionella pneumophila*)**

- Aufgabe von je 1 bis 2 µl Bakteriensuspension pro Dot auf eine Nitrocellulosefolie
- Folie mit PVU-Pufferlösung sechs Minuten blocken
- Waschen mit 0,1 %igen PBS-Puffer (dreimal fünf Min.)
- eine Stunde in einer spezifischen AK-Lösung inkubieren (c= 0,8 mg/ml)
- eine Stunde in einer biotinylierten Anti-Maus-IgG AK-Lösung inkubieren (c= 0,8 mg/ml)
- Waschen mit 0,1 %igen PBS-Puffer (dreimal fünf Min.)
- Zugabe von Streptavidin mit Meerrettichperoxidase (abgedeckte Inkubation sechs Min.)
- Waschen mit 0,1 %igen PBS-Puffer (dreimal fünf Min.)
- Zugabe Stoppreagenz (TMB-Substrat)
- bei Beginn einer Violettfärbung, abgießen des Substrats und Spülen mit Leitungswasser
- positive Probe wird durch violett gefärbte Dot's angezeigt

#### **Dot-Blot-ELISA mit Rabbid Anti-Maus IgG mit alkalischer Phosphatase (Nachweis von *Legionella pneumophila*)**

- Aufgabe von je 2 µl Bakteriensuspension pro Dot auf eine Nitrocellulosefolie
- Folie mit PVU-Pufferlösung sechs Minuten blocken
- Waschen mit 0,1 %igen PBS-Puffer (dreimal fünf Min.)
- eine Stunde in einer spezifischen AK-Lösung inkubieren (c= 0,8 mg/ml)
- eine Stunde in einer Rabbid Anti-Maus IgG AK-Lösung mit alkalischer Phosphatase (c= 0,5 mg/ml)
- Zugabe Stoppreagenz (BCIP/NBT-Substrat)
- bei Beginn einer Violettfärbung, abgießen des Substrats und Spülen mit Leitungswasser
- positive Probe wird durch violett gefärbte Dot's angezeigt

#### **Abicap<sup>®</sup>-ELISA (Nachweis von *Legionella pneumophila*)**

- Aufgabe von 2 x 500 µl Bakteriensuspension auf Abicap<sup>®</sup>-Säulen mit spezifischen AK
- Aufgabe von 500 µl spezifischer, biotinylierter Detektorantikörperlösung (Biotingrad ca. 16,5; Konzentration: ca. 0,8 mg/ml)
- Aufgabe von 500 µl Streptavidin mit Meerrettichperoxidase (Konzentration ca.0,5 µg/ml)
- Waschen mit Pufferlösungen

- 500 µl 0,1 %iger BSA-Puffer
- 750 µl 0,1 %iger BSA-Puffer
- 750 µl Na-Acetacitrat-Puffer
- Aufgabe von 500 µl TMP-Substrat (frisch hergestellt, unter Lichtausschluss gelagert)
- Waschen mit 500 µl ddH<sub>2</sub>O
- Messen der optischen Dichte (OD) der blau gefärbten Fritte im Abicap<sup>®</sup>-Reader

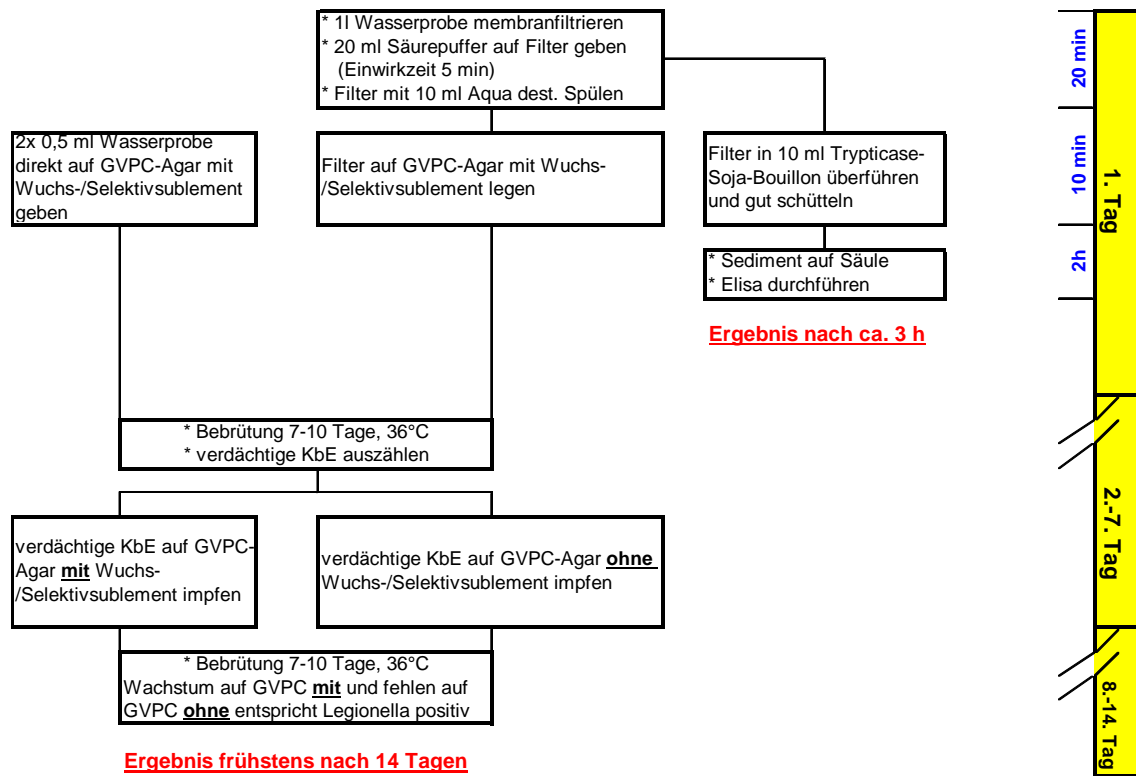
### **Immunologische Abicap<sup>®</sup>-Anreicherung mit PCR-Detektierung (Nachweis von *Salmonella* spp.)**

- Aufgabe von 2 x 500 µl Bakteriensuspension auf Abicap<sup>®</sup>-Säulen mit spezifischen AK
- Säulen unten verschließen und Aufgabe von Lysepuffer (185 µl Lyse I, 15 µl Lyse II, 10 µl Proteinase K)
- Säule oben verschließen und bei 65 °C, 20 min. inkubieren
- Auffangen des Lysats in einem Zentrifugenröhrchen
- Waschen der Säule mit 100 µl Lysepuffer III und Lotion ebenfalls im gleichen Zentrifugenröhrchen auffangen
- Zentrifugenröhrchen 15 sec. vortexen und 5 min bei –20 °C kühlen
- 10 min. Zentrifugieren bei 13000 rpm
- Überstand überführen und mit 2 Vol. 100 % EtOH versetzen und mischen
- 20 min. bei –20 °C fällen (Zeit unbedingt einhalten sonst DNA-Verlust)
- Pelletierung der DNA durch Zentrifugation, 20 min., 13000 rpm
- Überstand vollständig abpipettieren, Pellet mit 300 µl eiskaltem 70 %igen EtOH waschen und 5 min. bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand vollständig abpipettieren und DNA-Pellet trocknen
- DNA in 50 bis 100 µl TE<sup>-4</sup> oder ddH<sub>2</sub>O lösen
- 10 µl DNA-Probe mit 9,8 µl PCR-Mix (2 µl Mix 100; je 0,1 µl Primer; 1,2 µl MgCl), ad. 25 µl ddH<sub>2</sub>O in eine Realtime-PCR-Kapillare pipettieren
- Realtime-PCR durchführen (Protokoll/Einstellungen siehe Kapitel 2.4.2)

**Anreicherung mit aminomodifizierten Affinitätsmodulen und anschließender PCR-Detektierung (Nachweis von *Listeria monocytogenes*)**

- Aufgabe von 2 x 500 µl der zu untersuchenden flüssigen Probe über eine aminomodifizierte Kunststoff-Fritte in einer Abicap<sup>®</sup>-Säule
- viermaliges Waschen mit je 250 µl Ringerlösung
- die Säule unten verschließen, mit 500 µl Lyse 1 Puffer, 50 µl Lyse 2 Puffer und 10 µl Proteinase K versetzen
- Säule oben verschließen und 30 Minuten bei 65 °C inkubieren
- Auffangen des Lysats in einem Zentrifugenröhrchen
- Waschen der Säule mit 185 µl Lysepuffer 3 und Lotion ebenfalls im gleichen Zentrifugenröhrchen auffangen
- Zentrifugenröhrchen 15 sec. vortexen und 5 min bei -20 °C kühlen
- Zentrifugieren 10 min., 13000 rpm
- Überstand überführen und mit 2 Vol. 100 % EtOH versetzen und mischen
- 20 min. bei -20 °C fällen (Zeit unbedingt einhalten, sonst DNA-Verlust)
- Pelletierung der DNA durch Zentrifugation, 20 min., 13000 rpm
- Überstand vollständig abpipettieren, Pellet mit 300 µl eiskaltem 70 %igen EtOH waschen und 5 min. bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand vollständig abpipettieren und DNA-Pellet trocknen
- DNA in 50 bis 100 µl TE<sup>-4</sup> oder ddH<sub>2</sub>O lösen
- 1 µl DNA-Probe mit 19,62 µl PCR-Mix 100; je 1 µl Primer; 0,18 µl Taq-Polymerase; ad. 25 µl ddH<sub>2</sub>O in eine PCR-Kapillare pipettieren
- PCR im Thermocycler
  - Starttemperatur 95 °C, 5 min.
  - Annealingtemperaturen (35 Zyklen)  
95 °C, 15 sec.; 55 °C, 15 sec.; 72 °C, 20 sec.
  - Endtemperatur 72 °C, 7 min.
- Detektion (Gelelektrophorese)
  - 1 %iges Agarosegel mit TAE-Puffer, 70 V
  - 100 bp Marker
  - 25 µl Probe + 5 µl Blaumarker, davon je 5 µl einsetzen
  - Färbung: 5 min. mit Ethidiumbromid; 5 min mit H<sub>2</sub>O waschen

#### 9.4 Nachweis von *Legionella pneumophila* in Wasser [Integration des Abicap®-ELISA's als Schnellmethode in den Analysengang nach der Empfehlung des Umweltbundesamtes (BGBl. 11/2000)]



## 9.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bedanken bei:

Herrn Prof. Dr. Johannes Krämer für die Stellung des interessanten Themas und die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe diese Dissertation anzufertigen. Insbesondere möchte ich mich auch für die Gewährung von Freiräumen bei der Planung und Durchführung von Experimenten und die ständige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung bei fachlichen Fragestellungen bedanken, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Erwin Galinski (Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie) für die Bereitschaft zur Übernahme des Korreferats.

Den Kollegen der Arbeitsgruppe der Abt. Landwirtschaftliche und Lebensmittel-Mikrobiologie, Frau Susanne Altmann, Frau Eva Meyer, Frau Beate Silkens, Frau Paula Nöthen und Frau Dr. Barbara Birzele für das angenehme Arbeitsklima und stete Hilfsbereitschaft.

Den Mitgliedern der Projektgruppe „InnoNet“ (Förderung von innovativen Netzwerken), insbesondere bei Frau Dr. Jutta Schönling, Frau Erxlebe (Firma GEN-IAL GmbH, Troisdorf), Herrn Prof. Dr. Michael Keusgen und seiner Arbeitsgruppe (Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn) und Herrn Dr. Andreas Holländer (Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung, Golm/Potsdam) für die gute Zusammenarbeit.

Bei Frau Dipl. Oec. Mareike Wenning (Abt. Mikrobiologie - ZIEL Weihenstephan, TU München) für die Unterstützung bei der Aufnahme von FT-IR-Spektren. Herrn Knut Wichterich für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Herrn Dipl. Math. Thomas Kowalewski für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung. Herrn PD Dr. Joachim Hamacher für die Unterstützung bei der Durchführung von Dot-Blot-ELISA-Verfahren und für die Durchsicht dieser Arbeit. Frau Dipl. Biol. Michaela Haferkamp ebenfalls für die Durchsicht dieser Arbeit.

Herrn Dr. Bajtay und Herrn Dr. Langfeldt (ZISanBw, Kiel-Kronshagen), Frau Dr. Ackermann (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie, Universität Leipzig) und Herrn Dr. Leusch (INLAB GmbH, Dortmund) für die Bereitstellung der *Clostridium perfringens* Stämme. Herrn Dr. Linde (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität Regensburg) für die Bereitstellung der Legionella Stämme.

Dem Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie, die im Rahmen des Projekts „InnoNet“ (Förderung von innovativen Netzwerken) diese Arbeit finanziell unterstützt haben.

Meiner Frau Susanne für Ihre Geduld und moralische sowie seelische Unterstützung.