

**Nachweis von humanpathogenen
Mikroorganismen in Lebensmitteln mittels
moderner molekularbiologischer
Untersuchungsverfahren**

Supplement zum Abschlussbericht

**Projekt: P-LS-E / MOP A7-7
Zeitraum: 15.01.2003 - 15.01.2005**

**Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg
Bissierstrasse 5
79114 Freiburg**

Projektleiter: Dr. Klaus Pietsch
Durchführende: Annette Wieland

Inhaltsverzeichnis

1	Fragestellung des Supplements.....	3
2	Salmonella spp. in Lebensmitteln.....	3
3	Material und Methoden	6
3.1	Methode zur Typisierung von Salmonella-Serovaren mittels Pulsfeldgelelektrophorese	6
3.1.1	Theoretische Grundlagen zur Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	6
3.1.2	Standard-Protokoll für die PFGE.....	7
4	Ergebnisse.....	9
4.1	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) von <i>Salmonella spp.</i> aus Lebensmittelproben.....	9
5	Diskussion	11
5.1	Nachweis von Salmonella spp. mit molekularbiologischen Methoden	11
7	Literaturverzeichnis	13

1 Fragestellung des Supplements

In dem vorliegenden Supplement zum Abschlußbericht des Projektes „Nachweis von humanpathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln mittels moderner molekularbiologischer Untersuchungsverfahren“, das im Rahmen des Forschungsprogramms „Ernährung / Nahrungsmittelsicherheit“ der Landesstiftung Baden-Württemberg gGmbH durchgeführt wurde, sollte folgendes Thema zusätzlich zu den bisher erfolgten Untersuchungen erörtert werden: Es sollte der Fragestellung nachgegangen werden, ob im Lebensmittel durch molekularbiologische Analysen geprüft werden könne, ob es sich bei einer Salmonella-positiven Probe um einen „apathogenen“ Stamm oder einen „humanpathogenen“ Salmonella-Stamm handle. Die molekularbiologische Analyse mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) bietet die Möglichkeit, zuverlässige Daten zu epidemiologischen Zusammenhängen zu erheben. Es können damit Kausalketten vom Ausbruch und den Erkrankungsproben bis zum verursachenden kontaminierten Lebensmittel ermittelt werden. Daher wurden zusätzlich zu den bereits im Abschlußbericht beschriebenen Versuchen mit PFGE weitergehende Untersuchungen durchgeführt.

2 *Salmonella* spp. in Lebensmitteln

Nach Angaben der WHO ist Salmonella weltweit einer der vorherrschenden Erreger, der die meisten Lebensmittelinfektionen verursacht, in Deutschland jährlich über 70 000 Fälle. *Salmonella* spp. stellt damit neben *Campylobacter* in Deutschland den am meisten verbreiteten bakteriellen Enteritiserreger bei Lebensmittelinfektionen dar. In der EU wurden in den letzten Jahren um die 140 000 Fälle gemeldet, dabei zählte *S. Enteritidis* zum vorherrschenden Serovar, gefolgt von *Salmonella* Typhimurium. Untersuchungen in den USA ergaben, dass ca. 95% der nichttyphoiden und 80% der Infektionen mit *Salmonella* Typhi der Übertragung durch Lebensmitteln zugeschrieben werden können [1]. Aus medizinischer, veterinärmedizinischer wie auch aus ökonomischer Sicht ist die Salmonellose eine der bedeutendsten Zoonosen. Für Risikogruppen (Kinder, ältere Menschen und immunsupprimierte Patienten) ist die Letalität mit 5-10% nach wie vor hoch. An der Spitze der Infektionen verursachenden Lebensmittel stehen Geflügelfleisch und rohe Eier (bzw. Speisen, die Rohei enthalten). Weitere Quellen sind rohes, bzw. nicht durchgegartes Fleisch, Wurstprodukte, aber auch z.B. Gewürze oder Schokolade.

Es handelt sich bei dem Erreger um fakultativ anaerobe, gram-negative, stäbchenförmige Bakterien, die zu den Enterobacteriaceae gehören. Die Gattung *Salmonella* umfasst zwei Species, *Salmonella enterica* mit sieben Subspecies, und *Salmonella bongori*. In Europa dominiert das Serovar *S. Enteritidis* als Ursache für mehr als 60% der gemeldeten Fälle, gefolgt von *S. Typhimurium*

Nicht nur *Salmonella enterica*, auch *Salmonella bongori*, die langezeit als für den Menschen weniger pathogen galten, werden heute, nachdem immer mehr Krankheitsfälle aufgetreten sind, die sich auf *S. bongori* zurückführen ließen, ebenfalls als humanpathogen angesehen [2]. Gerade in den letzten Jahren wurden vermehrt Salmonellose-Ausbrüche beobachtet, für die auch untypische und seltene

Serovare verantwortlich waren, wie z.B. *Salmonella* Oranienburg [3] oder *Salmonella* Bovismorbificans [4,5].

Die typhösen Salmonellen (*S. Typhi*, *S. Paratyphi*) sind hochgradig an den Menschen angepasst und für diesen bereits bei geringen Infektionsdosen krankheitserregend. Verschiedene *Salmonella*-Serotypen der enteritischen Salmonellen sind an bestimmte Tierarten adaptiert und für diese sowie für den Menschen pathogen (z.B. *S. Choleraesuis* beim Schwein). Andere Serotypen der enteritischen Salmonellen sind für viele Tierarten mehr oder weniger pathogen und werden auf den Menschen meist durch Lebensmittel übertragen. Dabei ist die Infektionsdosis bei enteritischen Salmonellen meist höher als bei den typhösen Salmonellen.

Der Pathogenese der Salmonellose liegt eine komplizierte Auseinandersetzung zwischen Erreger und Wirt zugrunde. Bekannt sind mittlerweile bei *Salmonella* fünf chromosomale Pathogenitätsinseln mit ca. 129 kbp. An der Ausprägung einer Infektion des Wirtes ist eine Vielzahl von Genen und deren Produkten, wie Adhäsine (fimbriale und nicht-fimbriale); Typ-III-Sekretionssysteme mit zugehörigen Effektorproteinen, Magnesium-Transport-Systeme, cytotoxische und enterotoxische Substanzen beteiligt [20]. In den 1980er Jahre wurden außerdem *Salmonella*-Virulenzplasmide (SVP) entdeckt, die maßgeblich verantwortlich sind für die extraintestinale Vermehrungsfähigkeit im Wirt. Sie kommen bei einigen wenigen Serovaren vor. Allerdings zeigen auch andere Serovare, die diese Plasmide nicht besitzen, die gleichen Virulenz-Charakteristika.

Obgleich Salmonellen sehr differente klinische und epidemiologische Eigenschaften aufweisen, werden sie aufgrund von genomischen Analysen als taxonomisch und genetisch sehr einheitlich befunden. Sie werden als pathogenetisch totipotent und damit auch als obligat humanpathogen beurteilt [6, 7, 8].

Bezüglich der Virulenz verhalten sich die Salmonellen sehr unterschiedlich. Es treten systemische und enteritische Infektionen auf, epidemische und nicht-epidemische. Auch die Anpassung an den Wirt ist wie erwähnt unterschiedlich spezifisch. Diese Unterschiede liegen allerdings nicht am Vorkommen verschiedener genetischer Merkmale bei verschiedenen Serovaren, sondern beruhen auf unterschiedlicher Expression der Gene [9]. Es erfolgt ein Zusammenspiel von chromosomalen und plasmidkodierten Genen. Dabei laufen genau definierte Expressionsmuster der virulenzassoziierten Effektorproteine ab. Unterschiede in der Expressionsfähigkeit dieser Gene bestimmen u.a. die Fähigkeit, bestimmte Wirtsspezies und deren Gewebe zu besiedeln [20].

Es ist noch ungeklärt, welche Umweltsignale eine Virulenz auslösen können. Erstaunlicherweise wurden bei allen Vertretern von *Salmonella spp.* eine gleichartige Ausstattung mit Pathogenitätsinseln (SPI1) und einigen Genen für mehrere Effektorproteine (z.B. *sopB*, *sopD* und *sopE2*) gefunden [10]. Unterschiede in der genetischen Ausrüstung mit Genen für verschiedene Effektorproteine ließen sich zwar auch feststellen, jedoch bisher nicht mit Unterschieden in der Ausprägung der Infektion korrelieren [11].

Man findet bei den Effektorproteinen ein modulares Design vor, wobei durch kombinierte Proteinwirkungen unterschiedliche Virulenzfunktionen und damit unterschiedliche klinische Eigenschaften wie systemische und enteritische Infektionen zustande kommen. Es lassen sich derzeit anhand unterschiedlicher Kombinationen der Gene für die Virulenzfaktoren teilweise verschiedene Pathovaren (z.B. von Serotyp *S. Paratyphi B*) unterscheiden [12].

Insgesamt gesehen lassen aber Unterschiede verschiedener Serovaren auf genetischer Ebene keine klaren Rückschlüsse auf Unterschiede in ihrer jeweiligen Virulenz zu.

Wie bereits im Abschlussbericht beschrieben, eignet sich die Feintypisierung mittels PFGE für spezifische Fragestellungen der Epidemiologie. Die Bestimmung der Makrorestriktionsmuster des bakteriellen Genoms nach PFGE gilt gegenwärtig als die standardisierte genetische Fingerprint-Methode, die epidemiologisch belastbare Indizien für Infektionsquellen und Infektionswege schafft.

Somit wird die Charakterisierung von Ausbruchsisolaten oder Verdachtsproben und der Vergleich mit Humanisolaten, die regional und zeitlich damit in Bezug stehen, möglich. Im Rahmen dieses Supplements wurde mittels PFGE die Feintypisierung von acht *Salmonella*-Isolaten aus Lebensmittelproben vorgenommen. Die PFGE-Ergebnisse wurden in Kooperation mit dem Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) Berlin mit Daten verglichen, die im Rahmen des „foodborne-net“ (Forschungsnetzwerk „Lebensmittelinfektionen in Deutschland“) bzw. „German PulseNet“, erhoben worden waren.

3 Material und Methoden

3.1 Methode zur Typisierung von Salmonella-Serovaren mittels Pulsfeldgelelektrophorese

3.1.1 Theoretische Grundlagen zur Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) gehört zu den Typisierungsmethoden, mit Hilfe derer zwischen Stämmen der gleichen Spezies differenziert werden kann. Die Technik ist eine Variation der normalen Agarosegel-Elektrophorese, bei der nach einem Restriktionsverdau des gesamten Genoms die DNA-Fragmente als Restriktionsprofil aufgetrennt werden [13]. Die Analyse mit PFGE ist eine komplexe Methode, bietet aber eine hohe Diskriminationsfähigkeit und erlaubt dadurch die Zuordnung bakterieller Isolate zu bestimmten Ausbrüchen. Es lassen sich somit epidemiologische Abläufe, wie Infektionsketten und die Verknüpfung von Krankheitsfällen mit den verursachenden Lebensmittelkontaminationen nachvollziehen [14].

Die PFGE stellt eine modifizierte Submarine-Technik dar, es wird mit horizontalen „Submarine“-Gelen gearbeitet, bei denen das Agarosegel direkt im Puffer liegt. Hochmolekulare DNA-Moleküle über 20kb können durch konventionelle Elektrophorese nicht mehr aufgetrennt werden, da sie mit gleicher, limitierender Mobilität wandern. Bei der PFGE wird daher statt des konstanten elektrischen Feldes ein pulsierendes Feld angelegt, das ständig in verschiedene Richtungen wechselt („pulsiert“) [15]. Auf diese Weise müssen die Moleküle wegen der Richtungsänderung des Feldes ihre Orientierung ändern, ihre Helixstruktur wird dabei zuerst gestreckt, bei Änderung des Feldes gestaucht. Die Zeit, die das DNA-Molekül benötigt, um wieder zu relaxieren und sich bei Änderung des Feldes erneut auszurichten ist abhängig von der Molekülgröße. Dadurch bleibt nach Streckung und Umorientierung für größere Moleküle - in der gegebenen Pulsdauer- weniger Zeit für die eigentliche elektrophoretische Wanderung übrig. Die resultierende Mobilität ist abhängig von der Pulsationszeit und man kann so eine Auftrennung nach Molekülgröße bis in die Größenordnung von 10 Megabasen erzielen [16].

Für die Analyse erfolgt die Probenvorbereitung inklusive Zellaufschluss in Agaroseblöckchen, die dann in vorgeformte Geltaschen eingesetzt werden. Die großen DNA-Moleküle würden sonst beim Pipettieren durch die Scherkräfte brechen. Die Pulsdauer reicht bei diesen Techniken von 1s-90min, abhängig von den Längen der zu trennenden DNA-Moleküle. Bei längeren Pulszeiten werden größere Moleküle besser aufgelöst, bei kürzeren Pulszeiten die kleineren. Die Trennungen können bis zu mehreren Tagen dauern. Bei der verwendeten CHEF-Methode (clamped-homogenous electric field) liegen die Elektroden in hexagonaler Anordnung um das Gel vor. Die Gele werden mit Ethidiumbromid gefärbt und die Banden sind dann unter UV-Licht sichtbar.

3.1.2 Standard-Protokoll für die PFGE

Verwendet wird das von dem „Forschungsnetzwerk Lebensmittelinfektionen in Deutschland“ („food-borne-net“, German PFGE-Netzwerk „German PulseNet“) im Internet veröffentlichte Protokoll [17].

Reagenzien

Zellsuspensionspuffer (CSB):

- 100 mM Tris
- 100 mM EDTA
- pH 8,0

TE Puffer:

- 10 mM Tris
- 1,0 mM EDTA
- pH 8,0

Lysepuffer

- 50 mM Tris
- 50 mM EDTA
- 1% Sarkosyl
- 0,1 mg/ml Proteinase K
- pH 8,0

TBE-Puffer

- 50 mM Tris
- 50 mM Borsäure
- 0,5 mM EDTA

Geräte

- CHEF-DR II Systems oder CHEF-DR III Systems für die PFGE von Bio-Rad

Präparation der Zellen

Es werden Zellen einer Übernachtskultur auf TSA-Agar oder in Flüssigmedium verwendet. Die Zellen werden entweder von den Agarplatten abgeschwemmt bzw. nach Zentrifugation und Waschen des Pellets und Resuspendieren in Zellsuspensionspuffer eingesetzt.

Die Zelldichte für die Vorbereitung der Agarose-Plugs sollte ca. 0.38-0.44 bei 450 nm (Mc Farland Nr.5) betragen.

Herstellung der Agarose-Plugs

- 1,6% Agarose (InCert) oder 2,0% Agarose (Biorad Chromosomal) in TE Puffer aufkochen
- Auf 50°C abkühlen lassen und 1% SDS (Endkonzentration) zufügen
- Zu der Zellsuspension 0,5 mg/ml (Endkonzentration) Proteinase K zugeben
- Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit der Agarose mischen
- Gemisch in die Formen für die Agarose-Plugs gießen und fest werden lassen

Lyse der Zellen in den Agarose-Plugs

- Nach dem Festwerden der Plugs, diese in Lysepuffer überführen und 2 h (Minimum) unter Schütteln (Wasserbad) oder 4h ohne Schütteln bei 54°C inkubieren.

Waschen der Agarose-Plugs

- Die Plugs werden bei 50° Grad unter Schütteln im Wasserbad gewaschen
- Zweimal in mind. 5 ml sterilem Aq. dest. waschen
- Zwei- bis dreimal in mind. 5 ml TE Puffer waschen

Die Plugs können in TE-Puffer bei 4°C mehrere Monate vor der weiteren Verwendung aufbewahrt werden.

Restriktionsverdau in den Agarose-Plugs

- Plugs auf ca. 3 mm zurechtschneiden, in 50-100 ml Reaktionspuffer geben.
- Zugabe von 0,2-0,8 U/ml XbaI
- 4 h bei 37°C inkubieren

Herstellung des Agarosegels

- 1% Agarosegel (z.B. 100 ml für ein 13 cm x 14 cm Gel; BioRad-Agarose, Pulse Field Cert.) mit 0,5x TBE Puffer herstellen
- Agarose-Plugs in Geltaschen einpassen, verbliebene Lücken mit verflüssigter Agarose schließen

Laufbedingungen

- 2,0 l (für CHEF DR II) bzw. 2,5 l (für CHEF DR III) 0,5x TBE Puffer
- Beispiele für Laufbedingungen:
 - 24 h, 6 V/cm (200V), Pulszeit 0,5 s - 60 s, 1% Agarose, Temperatur: 12°C

Auswertung

- Färben des Gels 10 min im Ethidiumbromidbad (Gel kann nicht nachgefärbt werden!)
- Aufnahme und Auswertung mit Bio-Rad-Software

4 Ergebnisse

4.1 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) von *Salmonella* spp. aus Lebensmittelproben

Die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) gehört zu den Typisierungsmethoden, mit denen zwischen Stämmen der gleichen Spezies differenziert werden kann. Mit der Analyse durch PFGE wurde die Typisierung von acht verschiedenen *Salmonella*-Isolaten aus Lebensmittelproben vorgenommen. Sechs der acht Isolate waren bereits mittels des Kauffmann-White-Schemas [18] serologisch typisiert worden (Tab.1). Nach dem Kauffmann-White-Schema können Salmonellen aufgrund der Struktur ihrer Oberflächen(O)- und Geißel(H)-Antigene geordnet und anhand einer Seroformel als Serovare deklariert werden. Alle Salmonellen besitzen ein O- u. H-Antigen („Oberflächen“- bzw. „Geißel“-AG) mit verschiedenen Partialantigenen, einige Stämme außerdem ein Vi-AG (=Virulenz-AG), die eine Charakterisierung der Typen in einer AG-Formel erlauben.

Probe	Serovar	Antigenformel
1	S. Paratyphi B	4,12,b,1,2
2	S. Livingstone	6,7,d,lw
3	S. Indiana	4,12,z,1,7
4	S. Sofia	1,4,12,b,ex
5	S. Sofia	1,4,12,b,ex
6	S. Typhimurium	1,4,5,12,i,1,2
7	unbekannt	unbekannt
8	unbekannt	Gruppe II polyvalent

Tab. 1 Serologische Typisierung der *Salmonella*-Proben mit dem Kaufmann-White-Schema

Die PFGE wurde nach dem vom Forschungsnetzwerk „foodborne-net“ im Internet veröffentlichten Standard-Protokoll [25] durchgeführt.

Folgende PFGE-Bandenmuster wurden erzielt (Abb.1):

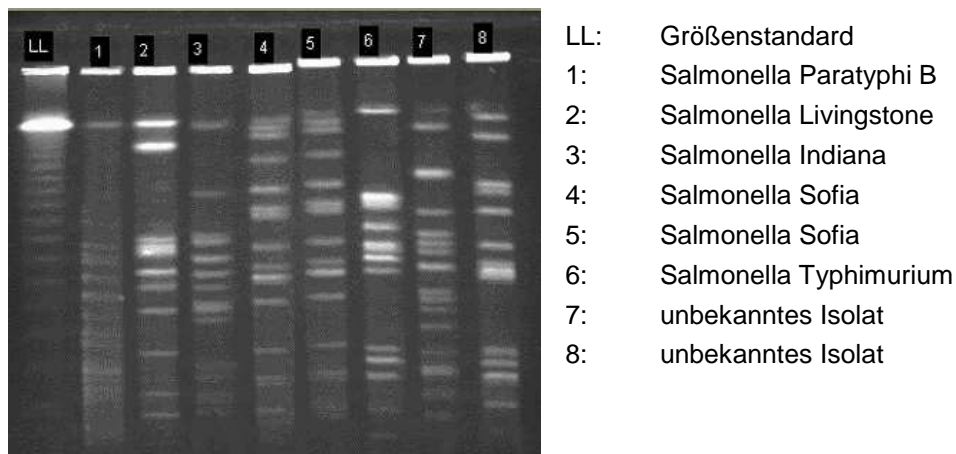


Abb. 1: Gelbild der PFGE für *Salmonella* spp. nach Foodborne-Net- Methode.

Dargestellt sind die Bandenmuster der 8 *Salmonella*-Isolate.

Diese PFGE-Ergebnisse wurden in Kooperation mit dem Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) Berlin mit einigen PFGE-Daten verglichen, die aus Humanisolaten bzw. tierischen Isolaten stammten. Es wurden jedoch keine Übereinstimmungen mit dort bereits erfassten Stämmen gefunden.

Des Weiteren wurden die PFGE-Muster der untersuchten Proben mit PFGE-Mustern verglichen, die im Rahmen des „foodborne-net“ (Forschungsnetzwerk „Lebensmittelinfektionen in Deutschland“) bzw. Geman PulseNet, erhoben worden waren und im Internet veröffentlicht wurden. Diese Vergleiche mit PFGE-Daten von Humanisolaten (Erkrankungsproben bekannter Ausbrüche) ergaben eine weitgehende Übereinstimmung der Probe Nr.8 mit dem PFGE-Muster eines Salmonella Typhimurium - Stammes (S. Typhimurium LT2). Bei der Probe 8 handelte es sich um ein Lebensmittelisolat, das bisher noch nicht als Serovar typisiert worden war. Der Vergleich mit den bekannten PFGE-Daten legt die Vermutung nahe, dass es sich ebenfalls um das Serovar Salmonella Typhimurium handeln könnte (Abb.2).

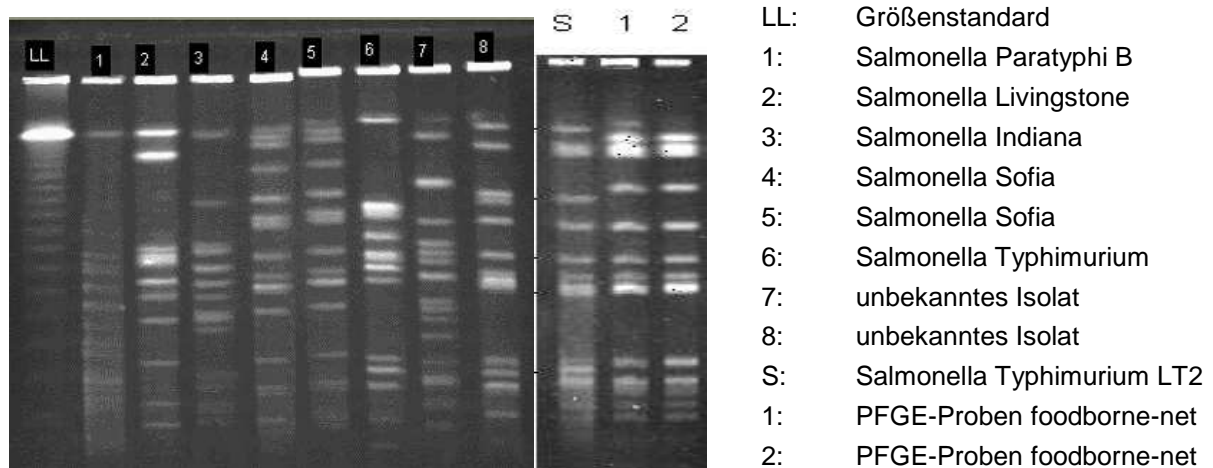


Abb. 2: Gelbild der PFGE für *Salmonella* spp. nach Foodborne-Net- Methode. Vergleich mit veröffentlichten PFGE-Mustern aus dem www.foodborne-net.de -Projekt „German PulseNet“ (German PFGE-Netzwerk). Das PFGE-Muster der Probe 8 stimmt im wesentlichen überein mit dem vom „German PulseNet“ als Salmonella Typhimurium LT2 charakterisierten Stamm.

Darüber hinaus wurden Vergleiche der vorliegenden PFGE-Bandenmuster mit den PFGE-Daten gezogen, die im Rahmen des Forschungsvorhabens bereits erhoben worden waren. Hier ergab sich keine Übereinstimmung.

5 Diskussion

5.1 Nachweis von *Salmonella* spp. mit molekularbiologischen Methoden

Aufgrund ausführlicher Recherchen der aktuellen Forschungsliteratur auf dem Gebiet der Virulenz von *Salmonella* und der Infektionsbiologie dieses Erregers kann festgestellt werden, dass molekularbiologische Analysen allein zur Klärung der anfangs gestellten Frage nicht ausreichen. Die Virulenz von *Salmonella* wird vor allem durch Prozesse auf der Proteinebene gesteuert. Die Kombination und Wirkung unterschiedlicher Effektorproteine sind für die Virulenz verschiedener *Salmonella*-Serovare verantwortlich. Dabei spielt die genetische Ausstattung eine untergeordnete Rolle. Folglich kann mit molekularbiologischer Analytik der Lebensmittelproben nicht ermittelt werden, ob eine *Salmonella*-positive Probe einen Stamm enthält, der als virulent zu bezeichnen ist, oder einen Stamm, der mit Sicherheit nicht krankheitserregend wirkt. Es kann anhand der Analyse der genetischen Zusammensetzung nicht von „pathogenen“ oder „apathogenen“ *Salmonellen* bzw. virulenten oder avirulenten Stämmen gesprochen werden. Diese Eigenschaft hängt weitgehend davon ab, von welche Gene tatsächlich exprimiert und in welcher Form und Kombination die Genprodukte an ihrem Wirkungsort vorliegen und angreifen können.

Die PFGE hat sich als Methode zur Feintypisierung von Serovaren als sehr geeignet erwiesen, um enge klonale Verwandtschaften zwischen Erregerstämmen festzustellen, die von Patienten isoliert wurden, welche u.U. örtlich weit voneinander getrennt erkrankten [19]. Durch die molekularbiologische Analyse können Stämme, die für bestimmte Ausbrüche verantwortlich sind, erfasst und wiedererkannt werden. In der vorliegenden Untersuchung wurden zusätzlich zu den bereits im Forschungsprojekt erhaltenen Ergebnissen, weitere *Salmonella*-Proben aus Lebensmitteln untersucht.

Sie wurden nach dem im Internet veröffentlichten Standardprotokoll für PFGE des „German PulseNET“ (German PFGE Netzwerk) analysiert. Anhand der verwendeten Methoden konnten von acht *Salmonella*-Stämmen, die aus verschiedenen Lebensmitteln isoliert worden waren, DNA-Fingerprint-Daten ermittelt werden.

Durch den Vergleich der hier mittels PFGE erzielten Ergebnissen mit PFGE-Daten, die im Rahmen des „foodborne-net“ (Forschungsnetzwerk „Lebensmittelinfektionen in Deutschland“ bzw. German PulseNet) erhoben worden waren (und im Internet veröffentlicht wurden), konnte eine weitgehende Übereinstimmung einer Probe mit einem PFGE-Muster eines *Salmonella* Typhimurium-Serovars gefunden werden. Die untersuchte Probe war noch nicht typisiert worden. Es könnte sich bei dem untersuchten Stamm um *Salmonella* Typhimurium handeln, obgleich kleinere Abweichungen zwischen den beiden Mustern zu erkennen sind. Allerdings treten selbst bei sehr nah verwandten Stämmen häufig unterschiedliche PFGE-Muster auf, da bereits geringfügige Unterschiede im Antibiotika-Resistenzmuster oder bei den Phagentypen einen Einfluss auf die PFGE üben.

Bei Vergleichen mit PFGE-Mustern von Humanisolaten und tierischen Isolaten, die im BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung) gewonnen worden waren, konnten keine epidemiologischen Zusammen-

hänge mit den dort vorliegenden Daten ermittelt werden. Jedoch kommen selbst bei geringen Unterschieden der Stämme bereits sehr verschiedenartige PFGE-Muster zustande. Nur bei klonaler Identität der Stämme liegt ein übereinstimmendes PFGE-Bandenmuster vor. Für die vorliegenden Untersuchungen lag nur eine relativ eingeschränkte Anzahl Proben vor, zudem standen Vergleichsdaten mit ausreichend vielen Vergleichsstämmen für eine weitergehende Identifizierung leider nicht zur Verfügung. Es zeigten sich auch Schwierigkeiten, PFGE-Daten, die in unterschiedlichen Labors erhoben wurden, miteinander zu vergleichen, selbst dann, wenn das gleiche Standardprotokoll verwendet wurde.

Die PFGE wird in der Epidemiologie erfolgreich als Surveillance-Methode zur Untersuchung von Ausbrüchen eingesetzt, um epidemiologische Zusammenhänge zu erkennen und zu verfolgen. Sie kann für verschiedene Erreger von Lebensmittelinfektionen (z.B. *Salmonella spp.*, EHEC) gleichermaßen verwendet werden. Datenbanken dieser PFGE-Muster (DNA-Fingerprints) sollen in Zukunft eine landesweite (oder auch weltweite) Vernetzung und einen nationalen bzw. internationalen Vergleich der PFGE-Ergebnisse ermöglichen.

Die Pulsfeldgelelektrophorese ermöglicht eine sehr genaue Typisierung der Mikroorganismen und die detaillierte Aufschlüsselung von von Infektionswegen. Es kann ermittelt werden, welche *Salmonella*-Typen unter den Erregern, die für bekannte Ausbrüche verantwortlich sind, vorherrschen. Allerdings lassen sich durch die Typisierung mittels DNA-Fingerprints keine Aussagen darüber machen, ob *Salmonella*-Typen, die aus Lebensmittelproben isoliert wurden, auch zu Erkrankungen führen können.

.

6 Literaturverzeichnis

Epidemiologisches Bulletin. (2003) Nr 50. Robert-Koch-Institut. www.rki.de

[1] P. Mead et al, Emerging infectious diseases (1999) 5, No.5: 607-625

[2] Wieler LH, Bauerfeind R. Salmonella -Infektionen beim Tier und deren Bedeutung für die Human- und Tiergesundheit. www.animal-health-online.de

[3] Werber D et al. International outbreak of Salmonella Oranienburg due to German chocolate. BMC Infectious Diseases (2005). 5:7.

[4] Gilsdorf A et al. A nationwide outbreak of Salmonella Bovismorbificans PT24, Germany, December 2004-March 2005. www.eurosurveillance.org

[5] Epidemiologisches Bulletin Nr.7 Februar 2005. Robert Koch-Institut.

[6] http://www.uniklinikum-giessen.de/mikrobio/bak_s1.html

[7] Werlein H, Gerlach, K. Aktuelles zu Salmonellen bei Mensch und Tier. Rückblick „Symposium 2005 in Oberschleißheim“. Hygiene Report 3/2005

[8] Vortrag von Prof. H. Tschäpe (Leiter des Nationalen Referenzzentrums für Salmonella). Robert Koch-Institut, Wernigerode. Vortrag im Rahmen des Symposiums Salmonellen bei Mensch und Tier“. Oberschleißheim, 01. Juni 2005.

[9] www.rki.de / NRZ Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger

[10] Miold S et al. Salmonella host cell invasion emerged by acquisition of mosaic of separate genetic elements, including Salmonella pathogenicity island 1 (SPI1), SPI5 and sopE2. J Bacteriol. (2001) 183(7):2348-2358.

[11] Streckel W et al. Expression profiles of effector proteins SopB, SopD1, SopE1 and AvrA differ with systemic, enteric and epidemic strains of Salmonella enterica. Mol Nutr food Res. (2004) Dec; 8(7):496-503.

[12] Prager R et al. Molecular properties of Samonella enterica Serotype Paratyphi B distinguish between its systemic and its enteric pathovars. J Clin Microbiol. (2003) 4(9): 4270-8

[13] Siegrist H H, Blanc D S. (1995) Typisierung von Bakterien: Methoden und epidemiologische Aussagekraft. Swiss-Noso, Nosokomiale Infektionen und Spitalhygiene. 03/95. Band 2 Nr.1.

[14] Peters T M et al. The Salm-gene project - a European collaboration for DNA fingerprinting for food-related salmonellosis. (2003) Eurosurveillance 02/03 Vol.8 Nr.2:46-50.

[15] Lottspeich F, Zorbas H (Hrsg.). Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg Berlin.1998.

[16] Westermeier R. Elektrophorese-Praktikum. VCH Verlag Weinheim. 1990.

[17] Enternet proposed Standard-Protocol for PFGE. www.foodborne-net.de

[18] Brandis H, Eggers HJ, Köhler W, Pulverer G. Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie. 7. Auflage 1994. Gustav Fischer Verlag.

[19] Werber D. Ausbruchsuntersuchungen zu EHEC-Erkrankungen. (2003) www.foodborne-net.de

[20] Bart S, Bauerfeind R. Virulenzplasmide bei *Salmonella enterica* - Vorkommen und Eigenschaften. (2005) Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. 118(1 / 2) 8-23.