

Aus dem Lehrstuhl für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs,
Veterinärwissenschaftliches Department der tierärztlichen Fakultät,
Ludwig-Maximilians-Universität München

Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Stolle Vorstand a.D.

Etablierung und Validierung einer DNA-Kolonie- Hybridisierung zum Nachweis von STEC in Hackfleisch

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Leonie Paasche
aus Stuttgart

München 2010

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. h.c. mult. Stolle
Korreferent/en:	Priv.-Doz. Dr. Rinder

Tag der Promotion: 13. Februar 2010

Für meine Eltern

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A. dest. / bidest.	Aqua destilliert / bidestilliert
AE	Attaching and effacing lesions
AOAC	Association of Analytical Communities
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenintriphosphat
ASU L07.18-1	Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §65 LFGB L07.18-1
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
BHI	Brain Heart Infusion (Hirn-Herz-Bouillon)
Bp	basepair (Basenpaare)
BPLS	Brilliantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose
C	Cytosin
CASO	Casein-Sojamehl-Pepton
CIN	Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin
cpm	Counts per minute
CTP	Cytosintriphosphat
CT-SMAC	Cefixime-Tellurite-Sorbitol-MacConkey
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytidintriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanintriphosphat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonucleotidacid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
dTTP	Desoxy-Thymintriphosphat
dUTP	Desoxy-Uridintriphosphat
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>eae</i>	<i>E. coli attaching and effacing-Gen</i>
ECD	<i>E. coli</i> -Direktagar
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-acetat
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. Coli</i>
<i>ehly</i>	<i>Enterohämolysin-Gen</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>E. Coli</i>
ELISA	Enzyme-linked immunoabsorbent assay
EPEC	Enteropathogene <i>E. Coli</i>
<i>Esp</i>	<i>E. coli secreted protein-Gen</i>
<i>espP</i>	<i>Serin-Protease-Gen</i>
ETEC	Enterotoxische <i>E. Coli</i>
G	Guanin
Gb ₃	Globotriaosylceramid
Gb ₄	Globotetraosylceramid
GTP	Guanintriphosphat
HC	Hämorrhagische Colitis
HUS	Hämolytisch-urämisches Syndrom

ISO	International Organization for Standardization
<i>katP</i>	<i>Katalase-Peroxidase-Gen</i>
KbE	Kolonie-bildende Einheit
LEE	locus of enterocyte effacement
LFBG	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MAC	MacConkey
mCCDA	modifiziertes Charcoal-Cefoperazone-Deoxycholate
mTSB	modifizierte Trypton-Soja-Bouillon
MUG	4-Methylumbilliferyl- β -D-Glucuronid
N	Normalität
NBT/BCIP	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid/5-Brom-4-chlor-3- indolylphosphat
OMP	outer membrane protein
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCA	Plate Count Agar
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
RBC	Rose Bengal Chloramphenicol
RKI	Robert Koch-Institut
Rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale Ribonucleicacid (ribosomale Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
<i>S. dysenteria</i>	<i>Shigella dysenteria</i>
SAS	Schweizer Akkreditierungsstelle
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natrium Dodecyl Sulfat)
SLT	Shiga-like Toxin
SMAC	Sorbitol-MacConkey
SSC	Saline Sodium Citrate (Natrium Citrat-Salzlösung)
STEC	Shiga-Toxin-bildende <i>E. Coli</i>
<i>Stx</i>	<i>Shiga-Toxin-Gen</i>
Stx	Shiga-Toxin
T	Thymin
<i>Tir</i>	<i>translocated intimin-receptor-Gen</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TE	TRIS-EDTA
T _m	Schmelztemperatur
tPA	Tissue Plasminogen Activator
TSB	Trypton-Soja-Bouillon
TTP	Thymintriphosphat
UTP	Uridintriphosphat
VT	Verotoxin
VTEC	Verotoxin-bildende <i>E. Coli</i>
WHO	World Health Organisation
x1	<i>stx1</i> -positiver <i>E.coli</i> -Referenzstamm
x2	<i>stx2</i> -positiver <i>E.coli</i> -Referenzstamm

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Inhaltsverzeichnis	III
1. Einleitung.....	1
2. Literatur	2
2.1. <i>Shiga-Toxin</i> -bildende <i>Escherichia coli</i> (STEC)	2
2.1.1. <i>Escherichia coli</i>	2
2.1.2. Allgemeines zu STEC	3
2.1.3. Vorkommen von STEC	5
2.1.4. Shiga-Toxine.....	10
2.1.5. Weitere Virulenzfaktoren von STEC.....	12
2.1.6. Identifizierung und Nachweis von STEC	14
2.2. DNA-Kolonie-Hybridisierung	19
2.2.1. Hybridisierungsverfahren	19
2.2.2. Ablauf der DNA-Kolonie-Hybridisierung	21
2.2.2.1. Übertragung der Kolonien auf die Membran	22
2.2.2.2. Membranen.....	22
2.2.2.3. Kontrollen.....	23
2.2.2.4. Lyse, Denaturierung, Fixation	23
2.2.2.5. Sonde.....	23
2.2.2.6. Hybridisierung.....	25
2.2.2.7. Sonden-Markierungsmethoden	26
2.2.2.8. Sonden-Markierung.....	27
2.2.2.9. Waschschritte.....	29
2.2.2.10. Detektion.....	29
2.3. DNA-Kolonie-Hybridisierung zum Nachweis von STEC.....	30
2.3.1. Methoden aus der Literatur	30
2.3.2. Referenzmethoden.....	37
2.3.2.1. „Isolierung und Charakterisierung Verotoxin-bildender <i>Escherichia coli</i> in Hackfleisch mittels PCR und DNA-Hybridisierungstechnik“.....	37
2.3.2.2. “Identification of Foodborne Bacterial Pathogens by Gene Probes”	39
2.4. Validierung von Methoden	40
3. Material und Methoden.....	47

3.1.	Material	47
3.1.1.	Referenzstämme	47
3.1.2.	Probenmaterial	47
3.1.3.	Reagenzien und Chemikalien	48
3.2.	Sondenmarkierung	49
3.2.1.	Vorversuche zur Optimierung Sonden-Markierung	49
3.2.1.1.	Auswahl der DNA-Extraktions-Methode	49
3.2.1.2.	PCR-Protokoll und Annealing-Temperatur	51
3.2.1.3.	Ermittlung der optimalen Template-Menge	54
3.2.2.	Markierung der Sonde	55
3.3.	DNA-Kolonie-Hybridisierung	57
3.4.	Validierung der Kolonie-Hybridisierung	65
3.4.1.	Exklusivitätstest	66
3.4.2.	Inklusivitätstest	68
3.4.3.	Inhibitionsversuch	68
3.4.4.	Bestimmung der Nachweisgrenze	69
3.4.4.1.	Vorversuche zur Nachweisgrenze	72
3.4.4.2.	Hauptversuch zur Nachweisgrenze	73
4.	Ergebnisse	74
4.1.	Markierung der Sonde	74
4.1.1.	Auswahl der DNA-Extraktionsmethode	74
4.1.2.	Annealing-Temperatur und PCR-Protokoll	75
4.1.3.	Ermittlung der optimalen Template-Menge	77
4.2.	Ergebnisse der Sonden-Markierung	78
4.3.	DNA-Kolonie-Hybridisierung	79
4.4.	Validierung	82
4.4.1.	Exklusivitätstest	82
4.4.2.	Inklusivitätstest	83
4.4.3.	Inhibitionsversuch	84
4.4.4.	Bestimmung der Nachweisgrenze	85
4.4.4.1.	Vorversuche zur Nachweisgrenze	86
4.4.4.2.	Hauptversuch zur Nachweisgrenze	86
4.5.	Kostenberechnung	91
4.5.1.	Kosten der Sonden-Markierung	91

4.5.2.	Kosten der Hybridisierung im Vergleich	92
4.5.3.	Gesamt-Kosten der DNA-Kolonie-Hybridisierung	93
5.	Diskussion	95
5.1.	Sondenherstellung	95
5.2.	Wachstum der Kolonien	97
5.3.	Übertragung der Kolonien auf die Membran	98
5.4.	Hybridisierung	101
5.5.	Isolierung und Bestätigung	102
5.6.	Validierung	103
5.7.	Kosten	104
5.8.	Vor- und Nachteile der DNA-Kolonie-Hybridisierung	104
6.	Schlussfolgerung	107
7.	Zusammenfassung	108
8.	Summary	109
9.	Anhang	110
9.1.	Geräte und Materialien	110
9.2.	Chemikalien und Reagenzien	111
9.3.	Herstellungsangaben der Lösungen	116
9.4.	Ergebnistabellen	120
10.	Literaturverzeichnis	125
11.	Tabellenverzeichnis	140
12.	Abbildungsverzeichnis	142
13.	Danksagung	143

1 Einleitung

1. Einleitung

Shiga-Toxin-bildende *Escherichia coli* (STEC) spielen als Lebensmittelerreger eine bedeutende Rolle, da es in der Vergangenheit immer wieder zu Krankheitsfällen durch den Verzehr kontaminierter Lebensmittel gekommen ist. Kleinkinder und ältere Personen sind aufgrund der möglicherweise auftretenden Komplikationen besonders gefährdet. Eine zuverlässige Nachweismethode für STEC scheint daher unerlässlich. Da Wiederkäuer nach wie vor als Hauptreservoir von STEC gelten, ist vor allem der Nachweis in Lebensmittel tierischer Herkunft von Bedeutung. Durch Erhitzen werden die Bakterien bereits nach wenigen Minuten abgetötet, weshalb insbesondere Methoden zur Untersuchung von rohem Fleisch notwendig sind. Rohwurst und unzureichend erhitztes Hackfleisch sind hier als mögliche Infektionsquellen zu nennen.

Im Labor des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie Lebensmittel tierischen Ursprungs finden derzeit eine nicht-akkreditierte PCR-Methode zum Screenen von Lebensmittelproben auf das Vorkommen der *Shiga-Toxin-* (*stx*) Gene von STEC Anwendung. Diese Methode erlaubt die schnelle molekularbiologische Identifizierung, stellt jedoch keine geeignete Methode zur gezielten Isolierung von STEC dar, da sich die *stx*-produzierenden Stämme von anderen *E. coli*-Stämmen phänotypisch nicht unterscheiden lassen.

Die DNA-Kolonie-Hybridisierung, die als molekularbiologische Methode ebenso wie die PCR auf dem Nachweis der *stx*-Gene von STEC beruht, bietet den Vorteil dass eine Isolierung und nachfolgende Charakterisierung der Bakterien möglich ist. Die auf einem Agar gewachsenen Kolonien werden auf eine Membran übertragen und die DNA freigesetzt, fixiert und mit einer spezifischen Sonde hybridisiert und dadurch die *stx*-Gene detektiert. Positive Membran-Signale können Kolonien der ursprünglichen Platte zugeordnet werden und die entsprechenden *stx*-positiven Kolonien stehen einer Subkultivierung sofort zur Verfügung. Ziel dieser Arbeit war es daher, ein DNA-Kolonie-Hybridisierungsverfahren zum Nachweis von STEC in Hackfleisch für den Einsatz im Routinelabor zu etablieren und validieren.

2. Literatur

2.1. *Shiga-Toxin*-bildende *Escherichia coli* (STEC)

2.1.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) wurden erstmals 1885 von Theodor von Escherich beschrieben (WANI et al. 2004). Bei diesen gramnegativen Bakterien handelt es sich um eine Spezies des Genus *Escherichia* innerhalb der *Enterobacteriaceae*-Familie (NATARO und KAPER 1998). Das Kauffmann-White-Schema für die Einordnung von *Salmonella* bildet in modifizierter Form auch die Grundlage zur Einteilung von *E. coli* in Serogruppen (NATARO und KAPER 1998, SELBITZ 2002). Die Einteilung erfolgt basierend auf den O- und H-Antigenen der Mikroorganismen (WANI et al. 2004). Die somatischen O-Antigene bestimmen die Serotypen (NATARO und KAPER 1998). Bei diesen Antigenen handelt es sich um Polysaccharidketten des Lipopolysaccharid (LPS) -Komplexes der äußeren Membran (KAYSER und BÖTTGER 2005). Bestimmte Serotypen können mit bestimmten klinischen Symptomen assoziiert werden, wobei nicht die Antigene für eine Virulenz verantwortlich sind. Die flagellaren H-Antigene sind Proteine (KAYSER und BÖTTGER 2005), welche nur bei begeißelten Zellen exprimiert werden (SELBITZ 2002). Besitzt ein Stamm keine Geißel und somit auch kein H-Antigen, so bezeichnet man es als H⁻ (H minus) (HEIßENHUBER et al. 2005).

Die Spezies *E. coli* ist Bestandteil der Normalflora des Darmtraktes bei Mensch und Tier (WANI et al. 2004). Einige *E. coli* sind jedoch pathogen und können zu Infektionen führen. Neben Infektionen des Harnapparates sowie Sepsis und Meningitis spielen pathogene *E. coli* eine bedeutende Rolle als Erreger von Durchfallerkrankungen (NATARO und KAPER 1998). Als mukosale Pathogene besiedeln sie dabei den Darm indem sie die intestinale Mukosa - trotz Peristaltik und Konkurrenz um Nährstoffe mit der Normalflora – kolonialisieren. Diese Eigenschaft ist das konservierteste Charakteristikum von *E. coli*-Stämmen. Die Erreger führen zu einer Schädigung ihres Wirtes (NATARO und KAPER 1998). Dabei können einige *E. coli* unterschiedliche hitzelabile und hitzestabile Toxine wie beispielsweise Shiga-

2.1 Shiga-Toxin-bildende *Escherichia coli* (STEC)

Toxine produzieren, die auf den Gastrointestinaltrakt einwirken (O'BRIEN und HOLMES 1987).

Enterovirulente *E. coli* werden in zahlreiche Pathovaren unterteilt (WANI et al. 2004). ETEC (enterotoxische *E. coli*) sind Verursacher bakterieller Durchfallerkrankungen v.a. in Dritte-Welt-Ländern und bedeutende Reisediarrhö-Erreger (KARMALI 1989). Sie heften sich an die Mukosa des Dünndarms und produzieren hitzelabile und/oder hitzestabile Toxine. EPEC (enteropathogene *E. coli*) heften sich ebenfalls an die Dünndarmmukosa und führen hier zur Schädigung der Mikrovilli. Allerdings sind sie nicht invasiv und produzieren keine Toxine (O'BRIEN und HOLMES 1987). EIEC (enteroinvasive *E. coli*) führen zu einem Dysenterie-ähnlichen Syndrom ähnlich wie *Shigella dysenteriae* (*S. dysenteriae*) (KARMALI 1989). Sie penetrieren die Epithelzellen im Darm und vermehren sich dort (O'BRIEN und HOLMES 1987). EHEC (enterohämorrhagische *E. coli*, STEC) können ebenfalls ein Zytotoxin produzieren (SLT, Shiga-like Toxin) (GYLES 2006) und führen neben wässrigen und blutigen Durchfällen zuweilen zu lebensbedrohlichen Komplikationen. Diese können in Form einer hämorrhagischen Kolitis (HC) oder des hämolytisch-urämischen Syndrom (HUS) auftreten (GYLES 2006, KARMALI et al. 1989, NATARO und KAPER 1998, TARR et al. 2005, AMMON et al. 1997).

2.1.2. Allgemeines zu STEC

KONOWALCHUK et al. (1977) und O'BRIEN et al. (1977) beschrieben, dass isolierte Toxine verschiedener *E. coli*-Stämme in kultivierten Vero- (Nierenzellen von afrikanischen Grünen Meerkatzen) und HeLa- (menschliche Zelllinie, aus einem Zervixkarzinom etabliert) Zellen zytopathische Effekte hervorrufen (WANI et al. 2004). Diese Toxinwirkung unterschied sich von den bereits bekannten nicht-zytopathischen Effekten der hitzelabilen ETEC-Enterotoxine. Aufgrund dieser Beobachtung bezeichnete man die Toxine als Verotoxine (VT) und die produzierenden Organismen als Verotoxin-bildende *E. coli* (VTEC) (KARMALI 1989, WANI et al. 2004).

Zur gleichen Zeit wurde beobachtet, dass die gleichen Toxine mit einem aus Kaninchen gewonnenem Antitoxin für das *S. dysenteriae* Typ 1-Toxin neutralisiert werden konnten (NATARO und KAPER 1998, O'BRIEN und HOLMES 1987). Die neutralisierbaren Toxine wurden daher SLT1 (Shiga-like Toxin) genannt. Als SLT 2

2.1 Shiga-Toxin-bildende *Escherichia coli* (STEC)

wurden die Toxine bezeichnet, die auf Verozellen zytopathische Effekte hervorriefen, aber nicht mit dem Antitoxin neutralisierbar waren (O'BRIEN et al. 1987).

Die zeitgleiche Entdeckung dieses Toxins von verschiedenen Wissenschaftlern resultierte in zwei unterschiedlichen Nomenklaturen (NATARO und KAPER 1998). Die Begriffe Verotoxin und Shiga-like-Toxin können daher synonym verwendet werden. *E. coli*-Stämme welche dieses Toxin produzieren werden demnach als VT-bildende (VTEC) oder SLT-bildende (STEC) *E. coli* bezeichnet. (KARMALI 1989). CALDERWOOD et al. (1996) schlugen die Bezeichnung Shiga-Toxin (Stx) für alle Zytotoxine vor, daher wird heute von Stx und nicht mehr von SLT gesprochen.

Die Benennung EHEC bezieht sich auf Stämme, die *stx* (Shiga-Toxin-Gene) besitzen und beim Menschen HC und HUS verursachen können. Dieser Begriff beinhaltet demzufolge einen klinischen Bezug, der im Begriff STEC nicht zwingenderweise enthalten ist (NATARO und KAPER 1998). Daher sind nicht alle STEC-Stämme obligat pathogen, alle EHEC-Stämme hingegen schon (HEIßENHUBER et al. 2005). Im Folgenden wird die Bezeichnung STEC für alle *stx*-positiven *E. coli* verwendet, die Bezeichnung EHEC hingegen nur, wenn Bezug auf eine menschliche Erkrankung genommen wird.

Beim Menschen können EHEC-assoziierte Erkrankungen sporadisch als Einzelerkrankungen oder als Ausbruch mit mehreren Krankheitsfällen aufgrund des Verzehrs kontaminierter Lebensmittel auftreten. Die meisten Patienten entwickeln zunächst wässrigen Durchfall, der nach ein bis zwei Tagen in blutigen Durchfall und HC, meist assoziiert mit Bauchschmerzen, übergeht (PATON und PATON 1998). Als lebensbedrohliche Komplikation kann es zur Entwicklung von HUS kommen. Diese Erkrankung ist durch akutes Nierenversagen, mikroangiopathische hämolytische Anämie und Thrombozytopenie gekennzeichnet. Einige HUS-Patienten entwickeln zudem noch neurologische Symptome (ETHELBERG et al. 2005, LYNN et al. 2005, PATON und PATON 1998). Bei 30% der Überlebenden kommt es zu permanenten Schäden wie chronischem Nierenversagen, Hypertension und neurologischen „Defiziten“. Schwerwiegende Erkrankungsfälle, so auch die Thrombotisch Thrombozytopenische Purpura, betreffen vor allem Kinder und ältere Menschen, aber auch asymptomatische Träger von STEC sind beschrieben worden (BEUTIN et al. 1998, HONG et al. 2009, PATON und PATON 1998). Diese können als Infektionsquellen für Kontaktpersonen fungieren. Die Wahrscheinlichkeit, dass

2.1 Shiga-Toxin-bildende *Escherichia coli* (STEC)

asymptomatischen Träger STEC ausscheiden und übertragen ist jedoch wesentlich geringer als bei erkrankten Personen (PARRY und SALMON 1998).

Epidemiologisch ist nach wie vor *E. coli* des Serotyps O157:H7 für eine große Anzahl an Infektionen beim Menschen verantwortlich, aber auch O26:H11, O111:H⁻, O145:H⁻, O45:H2 oder O4:H⁻ sind bedeutsame Serotypen. Ihre Verteilung variiert geographisch: in Kanada und den USA sind die Mehrzahl (USA: >80%) der von HUS-Patienten isolierten EHEC O157:H7, in Österreich und Deutschland hingegen sind 43% nicht-O157:H7, in Australien ist O111 die häufigste Variante (WANI et al. 2004). Bei einer Studie die sich mit 47 EHEC-Ausbrüchen zwischen 1992 und 1996 in Europa befasste, konnte bei 42 der Ausbrüche O157:H7 als verursachender Serotyp nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden bei dieser Untersuchung die Serotypen O111:B4, O111:B14, O86 und O103 isoliert (AMMON 1997).

Im Zusammenhang mit Erkrankungen beim Tier ist die Ödemkrankheit bei Absatzferkeln zu nennen, welche mit einer Subvariante des Shiga-Toxins 2 (Stx 2), dem Stx 2e, assoziiert ist (KARMALI 1989). Die Erkrankung wurde erstmals 1932 beschrieben (SHANKS 1938) und führt beim Ferkel zu typischen Ödemen im Kopfbereich, insbesondere an Augenlidern und am Nasenrücken. Des Weiteren treten Anorexie und neurologische Störungen wie Koordinationsproblemen und Paralysen auf (KARMALI 1989). Bei anderen Tierarten treten in der Regel keine Krankheitssymptome auf. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die Erreger über eine längere Periode (mehrere Wochen) im Rind persistieren können und mit dem Kot ausgeschieden werden. QUANTRELL et al. (2004) konnten nachweisen, dass *E. coli* O157:H7 lediglich den Endabschnitt des Rektums kolonialisieren, was ein möglicher Grund für das Ausbleiben einer Entzündungs- und Immunreaktion sein könnte.

2.1.3. Vorkommen von STEC

Rinder gelten als Hauptreservoir von STEC (GYLES 2006), sie sind die direkte oder indirekte Quelle der meisten humanen Infektionen (QUANTRELL et al. 2004). Neben der Isolation aus Rindern (ARTHUR et al. 2002, BEUTIN et al. 2003, FREMAUX et al. 2006, JOHNSON et al. 2001, KUHNERT et al. 2005, MAYRSHOFER 2005, MEICHTRI et al. 2004, SAMADPOUR et al. 1990, SUTHIENKUL et al. 1990) wurde der Mikroorganismus ebenfalls mehrfach bei Schafen und Ziegen nachgewiesen

2.1 Shiga-Toxin-bildende Escherichia coli (STEC)

(BEUTIN et al. 1995, BLANCO et al. 2002, DJORDIEVIC et al. 2001, JOHNSON et al. 2001, NOVOTNA et al. 2005). Ebenso wurde STEC beim Schwein (BEUTIN et al. 1995, GANNON et al. 1988, JOHNSEN et al. 2001, WANI et al. 2004) sowie bei diversen Zootieren (Rehen, Antilopen, Yacks, Alpacas, Lamas und Nagern) (LEOTTA et al. 2006) und Hunden und Katzen (BEUTIN et al. 1993) gefunden.

Die Prävalenz beim Rind liegt für STEC zwischen 21,1 und 82,5 % (Tab. 1). Beim Schaf lagen die Werte zwischen 25,0 und 88,0 %. In Proben von Ziegen konnte der Erreger in 50,0 bis 65,5 % der Fälle nachgewiesen werden. Beim Schwein lagen die positiven Ergebnisse zwischen 0 und 70,0 %. Eine Studie von JOHNSON et al. (2001) die sich auf den Nachweis des Serotyps O157:H7 beschränkte, wies den Erreger bei 0,19 % der untersuchten Rinder, bei 0,1 % der Schweine und keinem der Schafe nach. BLANCO et al. (2003) konnte bei 0,04 % beprobter Schafe diesen Serotyp auffinden.

2.1 Shiga-Toxin-bildende Escherichia coli (STEC)

Tab. 1: STEC-Prävalenzen bei Wiederkäuern und Schweinen

Quelle	Land	Prävalenz von:	Art der Probe	Tierart	Prävalenz [%] (Gesamtzahl)
ARTHUR et al. 2002	USA	nicht-O157	Schlachtkörper	Rind	53,9 (180/334) ¹ bzw. 8,3 (27/326) ²
BEUTIN et al. 1993	Deutschland, Dänemark	STEC	Kotproben	Schwein Rind Schaf Ziege	7,5 (9/120) 21,1 (30/142) 66,6 (80/120) 56,1 (37/66)
BLANCO et al. 2003	Spanien	O157:H7 nicht-O157:H7	Darmspülung	Schaf	0,04 (5/1300) 36,0 (462/1300)
FEGAN und DESMARCHELIER 1999	Australien	STEC	Kotproben	Schaf	88,0 (127/144)
FRATAMICO et al. 2004	USA	STEC	Kotproben	Schwein	70,0 (484/687)
FREMAUX et al. 2006	Frankreich	STEC	Kotproben	Rind	35,0 (145/1309)
JOHNSON et al. 2001	Norwegen	O157:H7	Darminhalt	Rind Schwein Schaf	0,19 (3/1541) 0,1 (2/1976) 0 (0/665)
KUHNERT et al. 2005	Schweiz	STEC	Kotproben	Rind	57,6 (514/966)
MAYRSHOFER 2005	Deutschland	STEC	Kotproben	Rind	48,6 (120/247)
MEICHTRI et al. 2004	Argentinien	STEC	Kotproben	Rind	69,0 (138/200)

2.1 Shiga-Toxin-bildende Escherichia coli (STEC)

Quelle	Land	Prävalenz von:	Art der Probe	Tierart	Prävalenz [%] (Gesamtzahl)
NOVOTNA et al. 2005	Jordanien	STEC	Darm-spülung	Schaf Ziege	25,0 (8/32) ³ bzw. 57,1 (8/14) ⁴ 65,5 (19/29) ³ bzw. 50,0 (9/18) ⁴
SAMADPOUR et al. 1990	USA	STEC	Kotproben	Rind	30,0 (9/28)
SUTHIENKUL et al. 1990	Thailand	STEC	Darm-spülung Kotprobe Schlacht-körper	Schwein Rind	0 (0/201) 40,0 (58/145) ⁵ 82,5 (33/40) ⁵ 22,0 (11/50) ⁵

¹ = vor Eviszeration

² = nach Eviszeration

³ = Intensivhaltung

⁴ = Extensivhaltung

⁵ = berechnet mit Hilfe der Literaturangaben

In die Lebensmittelkette gelangt STEC durch Kontamination der Schlachtkörper mit Faezes oder Darminhalt beim Schlachtprozess (WANI et al. 2004). Tabelle 2 zeigt einige Untersuchungen zur Prävalenz von STEC in Rind-, Lamm-, Schweine- und Hähnchenfleisch. Die ermittelte Prävalenz in Rindfleischproben lag zwischen 0 und 26 % für STEC (AUVRAY et al. 2007, BARLOW et al. 2006, BERGAMINI et al. 2007, GÓMEZ et al. 2002, SAMADPOUR et al. 1994, SAMADPOUR et al. 2002, SAMADPOUR et al. 2006) und zwischen 0,17 und 1,2 % für die Serogruppe O157 (CAHED et al. 2003, ROLDÁN et al. 2007, SAMADPOUR et al. 2006). Die Prävalenz von STEC lag bei untersuchten Lammfleischproben zwischen 55 % (BARLOW et al. 2006) und 48 % (SAMADPOUR et al. 1994), bei Schweinefleisch lag sie bei 17 % (BARLOW et al. 2006) bzw. 18 % (SAMADPOUR et al. 1994). In Hähnchenfleisch wurde STEC in den in der Tabelle angeführten Studien nicht nachgewiesen (BARLOW et al. 2006, CAHED et al. 2003). Des Weiteren konnten STEC auch bereits in Putenfleisch, Fisch und Morcilla (argentinischer Blutwurst) (OTEIZA et al.

2.1 Shiga-Toxin-bildende Escherichia coli (STEC)

2006, SAMADPOUR et al. 1994) sowie in Milch und Käseprodukten (GÓMEZ et al. 2002, REY et al. 2006, ROLDÁN et al. 2007, STEPHAN et al. 2008) gefunden werden. Es wurde ebenso von Ausbrüchen berichtet welche mit kontaminiertem Blattgemüse assoziiert wurden (MANDRELL 2007). Aber auch Übertragungen von Mensch zu Mensch und fäkal-orale Wege wurden beschrieben (WANI et al. 2004, AMMON 1997). Des Weiteren wurde von Infektionen durch kontaminiertes Trinkwasser berichtet (AMMON 1997).

2.1 Shiga-Toxin-bildende Escherichia coli (STEC)

Tab. 2: Prävalenzen von STEC und *E. coli* O157:H7 in Lebensmittelproben

Quelle	Land	Prävalenz von	Art der Probe	Prävalenz [%] (Gesamtzahl)
ADWAN et al. 2004	Israel	STEC	Rindfleisch	14,7 (44/300)
AUVRAY et al. 2007	Frankreich	STEC	Rinderhackfleisch	16 (21/164)
BARLOW et al. 2006	Australien	STEC	Rinderhackfleisch Lammfleisch ² Schweinefleisch ³ Hähnchenfleisch	26 (21/164) 55 (152/279) 17 (1/6) 0 (0/54)
BERGAMINI et al. 2007	Brazilien	STEC	Rinderhackfleisch	3,5 (4/114) bzw. 0 (0/136) ¹
CAHED et al. 2003	Belgien	O157:H7	Rinderhackfleisch Schweinehackfleisch Hähnchenfilet	0,17 (4/2341) 0 (0/159) 0 (0/181)
GOMÉZ et al. 2002	Argentinien	STEC	Gefrorene Hamburger	8,4 (8/95)
MORA et al. 2007	Spanien	STEC	Rinderhackfleisch	12 (95/785)
ROLDÁN et al. 2007	Argentinien	O157:H7	Rinderhackfleisch	1,2 (3/250)
SAMADPOUR et al. 2006	USA	STEC O157	Rinderhackfleisch	3,5 (6/1750) 1,1 (20/1750)
SAMADPOUR et al. 2002	USA	STEC	Rinderhackfleisch	16,8 (45/296)
SAMADPOUR et al. 1994	USA	STEC	Rinderhackfleisch Lammfleisch Schweinefleisch Hähnchen	23 (14/60) 48 (10/21) 18 (9/51) 12 (4/33)

¹ = Proben von zwei verschiedenen Regionen

² = Lammkotelets, Lammhackfleisch

³ = Schweinewurstchen, Schweinehackfleisch

2.1.4. Shiga-Toxine

Das definierende Charakteristikum von STEC sind die Toxine Stx1 und Stx2 (NATARO und KAPER 1998). Das STEC-Holotoxin (ca. 70 kDa) besteht aus einer A-

2.1 Shiga-Toxin-bildende *Escherichia coli* (STEC)

Untereinheit (32 kDa) und fünf B-Untereinheiten (je 7,7 kDa) (PATON und PATON 1998, WANI et al. 2004). Der grundlegende Aufbau der A- und B-Untereinheit ist bei allen Vertretern von STEC konserviert (NATARO und KAPER 1998).

Die A-Untereinheit besteht aus einem A₁- (28 kDa) und einem A₂-Peptid (4 kDa), welche über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Das A₁-Peptid besitzt enzymatische Aktivität (N-Glykosidase-Aktivität). Das A₂-Peptid dient als Verbindungsstück mit den B-Untereinheiten (NATARO und KAPER 1998). Der Hauptrezeptor ist hierbei Globotriaosylceramid (Gb₃) (PATON und PATON 1998, NATARO und KAPER 1998). Betroffen sind Zellen die Gb₃-Rezeptoren besitzen, wie endotheliale Zellen und intestinale Zellen (NATARO und KAPER 1998). Auch kommt Gb₃ als Bindungsglykolipid auf Vero-Zellen vor (KARMALI 1989). Ebenso findet sich dieser Rezeptortyp auf HeLa-Zellen. Die mit der Ferkel-Ödemkrankheit assoziierte Stx2-Variante, Stx2e, bindet jedoch mit einer weitaus geringeren Affinität an HeLa-Zellen als an Vero-Zellen (WANI et al. 2004). Dies ist darin begründet, dass diese Subvariante vorwiegend an Globotetraosylceramid- (Gb₄) -Rezeptoren bindet und diese auf HeLa-Zellen nicht vertreten sind. Daher werden HeLa-Zellen seltener für den Stx-Nachweis eingesetzt (NATARO und KAPER 1998, PATON und PATON 1998). Jedoch kann Stx2e mit dem Antiserum gegen Stx2 neutralisiert werden (KARMALI 1989). Tabelle 3 zeigt Eigenschaften zur Differenzierung der Stx.

Tab. 3: Eigenschaften zur Unterscheidung von Stx (nach DELORME 2008)

Toxin	Zytotoxische Aktivität in Zellkultur:		Neutralisierung mit Antitoxin gegen:		Kodierung	Toxin-Rezeptor
	Vero	HeLa	Stx1	Stx2		
<i>S. dysenteriae</i> Typ 1	+	+	+	-	Chromosom	Gb3
Stx1, c, d	+	+	+	-	Phage	Gb3
Stx2	+	+	-	+	Phage	Gb3
Stx2c	+	-	-	+	Phage	Gb3
Stx2d	(+)	-	-	+	Phage	Gb3
Stx2e	+	-	-	+	Chromosom	Gb4
Stx2f	+	-	-	+	Phage	Gb3
Stx2g	+	+	-	+	Phage	Gb3

2.1 Shiga-Toxin-bildende *Escherichia coli* (STEC)

Nach Bindung der Toxine an die Zellmembran werden diese durch einen Prozess der Rezeptor-medierten Endozytose in das Zellinnere aufgenommen. Im Zytoplasma wird das Toxin anschließend aus dem endosomalen Vesikel freigesetzt (PATON und PATON 1998). Die A-Untereinheit wird transloziert und die N-Glykosidase-Aktivität des A₁-Peptids entfernt einen Adenin-Rest an der eukaryotischen ribosomalen 28S RNA (NATARO und KAPER 1998). Dadurch wird die Peptid-Elongation der Proteinsynthese inhibiert, was letztendlich zum Zelltod führt (PATON und PATON 1998).

Stx bestehen aus zwei Hauptgruppen, die immunologisch nicht kreuzreagieren: sie werden als Stx1 und Stx2 bezeichnet (NATARO und KAPER 1998). Ein STEC-Stamm kann nur Stx1, nur Stx2 oder beide Toxine produzieren (WANI et al. 2004). Kodiert werden die Toxine durch die *stx*-Gene (*stx1*, *stx2*), welche auf 2 verschiedenen Bakteriophagen liegen (NATARO und KAPER 1998, PATON und PATON 1998, WANI et al. 2004). Die *stx1*- und *stx2*-Gene haben ca. 55 % Aminosäuresequenz-Übereinstimmung zueinander (WANI et al. 2004).

Stx1 ist identisch mit dem Shiga-Toxin von *S. dysenteriae* Typ 1 (NATARO und KAPER 1998, WANI et al. 2004). Bei einigen Stx1-Stämmen liegt lediglich eine Variation einer Aminosäure vor (PATON und PATON 1998, WANI et al. 2004). Bei Stx2 hingegen kommen Unterschiede von mehreren Aminosäuren vor (NATARO und KAPER 1998), so dass mehrere Sequenzvarianten unterschieden werden können (WANI et al. 2004). Im Zusammenhang mit menschlichen Infektionen wird Stx2 als bedeutsamer als Stx1 eingestuft (PATON und PATON 1998, WANI et al. 2004). Eine mögliche Erklärung ist darin zu sehen, dass die Transkription von Stx1 von Wirtsfaktoren wie der Eisenverfügbarkeit abhängt und das Eisenlevel im Darm niedrig ist (PATON und PATON 1998). Stx2 hingegen wird unabhängig vom Eisengehalt transkribiert (WANI et al. 2004).

2.1.5. Weitere Virulenzfaktoren von STEC

Multiple Virulenzfaktoren (Tab. 4) tragen zur Pathogenität von STEC bei. Eine Hauptdeterminante der Virulenz ist die Fähigkeit, an intestinale Zellen zu binden und so den Darm zu kolonialisieren (WANI et al. 2004). Behilflich sind dabei Adhärenzfaktoren, die sich auf der Oberfläche der Mikroorganismen befinden und die Anheftung an Zielzellen ermöglichen (SELBITZ 2002). Sie führen dazu, dass einige

2.1 Shiga-Toxin-bildende *Escherichia coli* (STEC)

STEC-Stämme „Attaching and Effacing Lesions“ (AE) in Enterozyten verursachen können. Die Bakterien heften sich hierbei an die Mikrovilli und es findet eine Signaltransduktion in den Enterozyten statt, die zu einer Aggregation des zytoskelettalen Aktins und damit zur Zerstörung der Mikrovilli führt. Der Prozess wird durch bakterielle Proteine mediiert, die im LEE (Locus of enterocyte effacement) in der sogenannten Pathogenitätsinsel kodiert sind (WANI et al. 2004). LEE ist im *E. coli*-Chromosom enthalten. Das Outer Membrane Protein (OMP) **Intimin**, welches auf dem *eae*-Gen (*E.coli-attaching-and-effacing*-Gen) im LEE von *E. coli* O157:H7 kodiert ist, könnte an AE-Läsionen beteiligt sein (NATARO und KAPER 1998, WANI et al. 2004). Das Intimin mediiert die Anheftung der Bakterien an die Enterozyten. Allerdings besitzen nicht alle, von Patienten mit HUS und HC isolierten, STEC-Stämme LEE. Daraus lässt sich schließen, dass Intimin für die humane Virulenz nicht essentiell ist (WANI et al. 2004). Zusätzlich zu den Adhärenzfaktoren sind weitere Virulenzfaktoren auf dem LEE kodiert. Das *tir*-Gen (*translocated intimin-receptor*-Gen) kodiert einen **Intimin-Rezeptor**. Die Sekretion des **Esp-Proteins** wird durch das *esp*-Gen (*E. coli secreted protein*-Gen) bedingt. Dieses Protein ist an der Initiierung einer Signaltransduktion beteiligt, welche letztendlich zu AE-Läsionen führen. Ebenso im LEE kodiert ist das **Typ-III-Sekretionssystem**, welches für die Sekretion und Translokation des eben genannten Proteins verantwortlich ist (PATON und PATON 1998).

Ein weiterer Virulenzfaktor der an der Entwicklung eines wässrigen Durchfalls zu Beginn einer STEC-Infektion beitragen könnte, ist ein **hitzestabiles Enterotoxin EAST1**. Es wird durch das *astA*-Gen kodiert (PATON und PATON 1998).

Enterohämolysin ist ein Virulanzfaktor, der auf einem 60 MDa-Plasmid kodiert ist (WANI et al. 2004). Ursprünglich wurde er bei einigen EPEC-Stämmen gefunden (BEUTIN et al. 1988) und später auch bei STEC-Stämmen nachgewiesen (BEUTIN et al. 1989). Auf bestimmten Blutagar-Platten unterscheidet sich dieses Enterohämolysin in seiner Inkubationszeit (20-24 h bei +37 °C) und der Morphologie der Hämolysezone (trüber und kleiner) von den durch das *E. coli*-Hämolysin verursachten Veränderungen (BEUTIN et al. 1988). Nahezu alle O157:H7 und viele nicht-O157:H7-Stämme besitzen das für das Enterohämolysin kodierende *ehly*-Gen (NATARO und KAPER 1998). Hämolysin ist ein porenbildendes Cytosin (WANI et al. 2004) und führt über die Lyse von Erythrozyten zur Freisetzung von Häm und

2.1 Shiga-Toxin-bildende Escherichia coli (STEC)

Hämoglobin. Dieses wiederum kann von den Bakterien als Eisenquelle genutzt werden (NATARO und KAPER 1998).

Alle O157:H7-Stämme enthalten zusätzlich das hoch-konservierte pO157-Plasmid. Hierauf befinden sich ebenfalls Enterohämolsine kodiert (NATARO und KAPER 1998, SCHMIDT und KARCH 1996). Ebenfalls auf dem Plasmid befindet sich das *katP*-Gen, welches für eine **Katalase-Peroxidase** kodiert. Sie ist möglicherweise bei der Detoxifizierung von oxidierten und hierdurch bakteriotoxischen Produkten beteiligt, welche beispielsweise von lysierten Makrophagen freigesetzt werden (BRUNDER et al. 1996). Des Weiteren auf dem pO157-Plasmid gelegen ist bei vielen O157-Stämmen das *espP*-Gen, durch welches die **Serin-Protease EspP** kodiert wird. Sie kann Pepsin A und den humanen Koagulationsfaktor V schädigen und somit zur Entstehung mukosaler Hämorrhagien bei HC-Patienten beitragen (BRUNDER et al. 1997).

Tab. 4: Virulenzfaktoren von STEC

Virulenzfaktor	Gen	Lokalisation	Funktion
Intimin	<i>eae</i>	Chromosomal im LEE	Adhärenz an Enterozyten
Intimin-Rezeptor-Protein	<i>tir</i>	Chromosomal im LEE	Rezeptor für Adhärenzfaktor Intimin
Esp-Protein	<i>esp</i>	Chromosomal im LEE	Initiation einer Signaltransduktion
Typ-II-Sekretionssystem	<i>sepA</i> bis <i>sepI</i>	Chromosomal im LEE	Sekretion und Translokation von Esp-Protein
EAST1	<i>astA</i>	Chromosomal	Beteiligung an wässrigem Durchfall
Katalase-Peroxidase	<i>katP</i>	pO157-Plasmid	Detoxifizierung von bakteriotoxischen Produkten
Serin-Protease	<i>espP</i>	pO157-Plasmid	Hämorrhagien
Enterohämolysin	<i>ehyl</i>	60 MDa-Plasmid pO157-Plasmid	Lyse von Erythrozyten

2.1.6. Identifizierung und Nachweis von STEC

Bei der Identifizierung von STEC bedient man sich drei Gruppen von Nachweismethoden: dem Nachweis der Zytotoxizität, des Toxins und des Toxingens (WANI et al. 2004).

2.1 Shiga-Toxin-bildende *Escherichia coli* (STEC)

Der Nachweis der **Zytotoxizität** von Stx gegenüber Vero-Zellen ist der „Gold-Standard“ zur Bestätigung vermeintlich Stx-bildender Isolate (WANI et al. 2004). Die Sensitivität von Vero-Zellen gegenüber Stx wurde erstmals von KONOWALCHUK et al. (1977) beschrieben. Bei dieser Methode werden Vero-Zell-Monolayer mit sterilen Extrakten oder Filtraten von Probenmaterial für 42-72 h inkubiert und anschließend auf zytopathische Effekte untersucht (PATON und PATON 1998). Der Nachweis aller Stx-Varianten ist hierbei möglich, da Vero-Zellen sowohl Gb₃- als auch Gb₄-Rezeptoren in der Plasmamembran aufweisen (WANI et al. 2004). HeLa-Zellen hingegen besitzen keine Gb₄-Rezeptoren und sind aufgrund dessen weniger empfindlich gegenüber Stx_{2e}. Bei Schwierigkeiten hinsichtlich der Isolation der Organismen spielt der Beleg der Zytotoxizität eine bedeutende Rolle, allerdings ist die Methode arbeits- und zeitintensiv (PATON und PATON 1998).

Der Nachweis des **Stx-Toxins** erfolgt mittels serologischer Methoden. Diese gelten als unkompliziert (WANI et al. 2004). Der Nachweis erfolgt mittels einer Antigen-Antikörper-Reaktion von markierten Antikörper gegen das Stx-Antigen. Die Reaktion kann direkt oder indirekt nachgewiesen werden (N.N. 2006a). Die Detektion von STEC unabhängig vom Serotyp ist mit dieser Methode möglich (PATON und PATON 1998). Die hierfür am häufigsten verwendete Methode ist der Enzyme linked immunosorbant assay (ELISA) (WANI et al. 2004), wobei es sich zumeist um sogenannte Sandwich-ELISA handelt. Hierbei werden immobilisierte Antikörper als „capture“-Liganden zum Binden der Toxine eingesetzt. Der Inkubation folgt die Zugabe eines zweiten Stx-spezifischen Antikörpers und eines Anti-Antikörper-Enzym-Konjugates (i.d.R. alkalische Phosphatase) (PATON und PATON 1998). Auch bei dem Kolonie-Immunoblot handelt es sich um eine serologische Methode zum Nachweis des von den Bakterien gebildeten Toxins. Dazu wird ein geeigneter Agar mit aufliegender Membran mit der Voranreicherungskultur inkubiert und die bewachsene Membran anschließend mit monoklonalen Antikörpern gegen das Stx prozessiert. Durch eine Farbreaktion über Antikörper-gekoppelte Enzyme wird ein positives Ergebnis sichtbar gemacht (N.N. 2006a).

Die Identifizierung von STEC kann zudem über den Nachweis des **Toxingens** erfolgen. Hierfür kann u.a. die PCR sowie die DNA-Kolonie-Hybridisierung eingesetzt werden (WANI et al. 2004). Dabei handelt es sich um molekularbiologische Methoden, welche auf dem Nachweis bestimmter Gene basieren (HILL et al. 2001).

2.1 Shiga-Toxin-bildende *Escherichia coli* (STEC)

Sie beruhen auf der Einzigartigkeit bestimmter Gensequenzen für den jeweiligen Organismus (WALTER und DOUGAN 1989). Beim Nachweis von pathogenen Mikroorganismen bedient man sich hierbei dem Auffinden Virulenz-assoziiertes Gene (SWAMINATHAN und FENG 1994), sprich Genen die bei der Pathogenese eine bedeutende Rolle spielen (HILL und KEASLER 1991). Dies können, wie im Fall von STEC, Gene sein, die für spezifische Toxine kodieren (SWAMINATHAN und FENG 1994).

Vorteilhaft an DNA-basierten Detektionsverfahren ist, dass sie es ermöglichen, festzustellen, ob ein gesuchter Mikroorganismus in einer Probe ist, ohne dass eine vorhergehende Isolierung von Reinkulturen erforderlich ist (BETTELHEIM und BEUTIN 2003, WANI et al. 2004). Der Schritt der Kultivierung kann somit entfallen (OLSEN 2000), was eine Zeitersparnis bedeutet (HILL und KEASLER 1991). Detektiert werden Gene. Dies bedeutet dass der Nachweis nicht an die Toxin-Expression gekoppelt ist (RILEY und CAFFREY 1990). Im Vergleich zu kulturellen Nachweismethoden ist auch der Nachweis phänotypisch atypischer Bakterien möglich.

Bei der PCR handelt es sich um eine Nukleinsäure-Amplifikationsmethode (LAZCKA et al. 2007). Sie wurde 1987 von Kary B. Mullis entwickelt und ermöglicht *in vitro* die Herstellung millionenfacher Kopien von Nukleotidsequenzen (BANGSOW et al. 2002). Hierbei lagern sich spezifische Oligonukleotide, sogenannte Primer, flankierend an den DNA-Abschnitt an, welcher amplifiziert werden soll. Im Fall von STEC werden für den zu amplifizierenden Abschnitt beispielsweise Sequenzen der *stx*-Gene gewählt (BETTELHEIM und BEUTIN 2003). Einige PCR-Assays für STEC kombinieren verschiedene Primer-Paare für *stx1* und *stx2* oder für *stx2*-Varianten (ARTHUR et al. 2002, FRATAMICO et al. 2004, SUTHIENKUL et al. 1994), andere verwenden ein einziges Primer-Paar für alle *stx* (BARLOW et al. 2006, GALLIEN et al. 1996, KARCH und MEYER 1989). Die Reaktion besteht aus drei Schritten (BANGSOW et al. 2002, OLSEN 2000), die sich durch unterschiedliche Temperaturen auszeichnen (INNIS und GELFAND 1990). Im ersten Schritt wird die doppelsträngige Ziel-DNA denaturiert, um Einzelstränge zu erhalten (OLSEN 2000). Dies erfolgt bei Temperaturen zwischen +94 und +100 °C (SWAMINATHAN und FENG 1996). Anschließend wird auf +40 bis 60 °C gekühlt (BUSCH et al. 2007, INNIS et al. 1990). Die Abkühlung ermöglicht das spezifische Anlagern (Annealing)

2.1 Shiga-Toxin-bildende *Escherichia coli* (STEC)

der Primer an die einzelsträngige DNA (OLSEN 2000). Diesem Schritt folgt die Elongation des zu amplifizierenden Fragmentes (BANGSOW et al. 2002). Hierbei werden die zwischen den Primern gelegenen Sequenzen mit Hilfe eines Enzyms (DNA-Polymerase) durch Einfügen von Nukleotid-Triphosphaten (dNTPs) ergänzt (BANGSOW et al. 2002, SWAMINATHAN und FENG 1996). Nach Abschluss eines Zyklus wird die DNA erneut denaturiert und es folgen 25-35 weitere Zyklen (INNIS und GELFAND 1990). Jeder neu entstandene Doppelstrang dient als Matrize (Template) im neuen Zyklus, so dass es im Prinzip zu einer exponentiellen Amplifikation der Ziel-Sequenz kommt (LAZCKA et al. 2007). Das Vorhandensein der Amplifikate kann anschließend mittels Gelelektrophorese detektiert werden (OLSEN 2000, LAZCKA et al. 2007). Bei der Gelelektrophorese handelt es sich um ein trägergebundenes Verfahren zur Separierung von Biomolekülen, wobei als Trägersubstanz für die Elektrophorese von Nukleinsäuren Agarose und Polyacrylamid-Gelsysteme zum Einsatz kommen (DECHERT 2002). Die Trennung der Moleküle erfolgt zum einen aufgrund des Siebeffekts des Trägermaterials, zum anderen aufgrund der Ladung der Nukleinsäure-Moleküle. Diese liegen unter elektrophoretischen Bedingungen als Anionen vor und bewegen sich im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode, wobei die Beweglichkeit von der Größe bzw. Länge der Moleküle abhängt. Die Detektion erfolgt durch Anfärbung der Doppelstränge im Gel, meistens mit Ethidiumbromid und dessen Anregung im UV-Licht (DECHERT 2002). Neben der Gelelektrophorese im Anschluss an die PCR besteht bei der Real-Time PCR die Möglichkeit, die Entstehung der Amplifikate in Echtzeit während der PCR zu verfolgen. Hierbei werden die Amplifikate mit Hilfe von fluoreszenten Farbstoffen sichtbar gemacht. Zum Einen können sequenzunspezifische Farbstoffe wie SYBR-Green verwendet werden (MÜLHARDT 2003). Zudem ist eine sequenzspezifische Detektion über fluoreszenz-markierte SONDENSYSTEME möglich (BANGSOW et al. 2002). Mittels PCR kann die Markierung von DNA-Sonden für Hybridisierungsreaktionen erfolgen (PATON und PATON 1998).

Abbildung 1 stellt eine Vorgehensweise für die Isolation und Charakterisierung von STEC dar (WANI et al. 2004). Hierbei wird sowohl die PCR als auch die DNA-Kolonie-Hybridisierung eingesetzt.

2.1 Shiga-Toxin-bildende *Escherichia coli* (STEC)

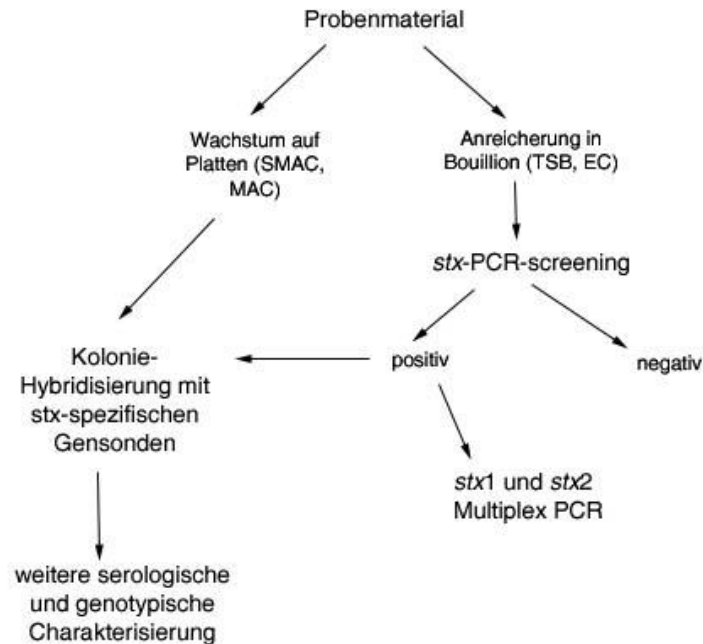


Abb. 1: Schema zum Nachweis von STEC nach WANI et al. (2000)

Biochemisch ist eine Differenzierung von nicht-O157-STEC-Serotypen und kommensalen *E. coli* nicht möglich (WANI et al. 2004). Allerdings besitzen viele nicht-O157-Serotypen ebenso wie O157 das *ehyI*-Gen. Diese Stämme wachsen zwar auf Standard-Blutagar nicht hämolytisch, auf Schafblut- Rose Bengal Chloramphenicol-Agar produzieren sie aber nach 18-24 h bei 37 °C hämolytische Zonen (PATON und PATON 1998).

Dagegen ist eine biochemische Differenzierung des Serotyps O157:H7 von anderen *E. coli* und nicht-O157 möglich (Tab. 5) (RATNAM et al. 1988). O157 fermentiert Sorbitol nicht, andere *E. coli* hingegen zu 72-94 % schon (NATARO und KAPER 1998). Auch viele O157:H⁻ Stämme fermentieren kein Sorbitol, so dass das Selektivnährmedium SMAC der Isolation dieser beiden Stämme dient (WANI et al. 2004). Der SMAC Agar hat im Gegensatz zu Standard MAC 1% Sorbitol anstelle von Lactose. Kolonien, welche Sorbitol nicht fermentieren können, wachsen daher farblos. Eine Variante von SMAC enthält die Antibiotika Cefixime und Tellurite

2.2 DNA-Kolonie-Hybridisierung

(CT-SMAC), welche das Wachstum der meisten nicht-O157:H7 Stämme inhibieren (NATARO und KAPER 1998).

Eine weitere biochemische Unterscheidungsmöglichkeit zur Abgrenzung von O157:H7 von anderen Stämmen ist die Unfähigkeit von O157:H7 β -Glucuronidase zu produzieren (PATON und PATON 1998). Dieses Enzym hydrolysiert 4-Methylumbilliferyl- β -D-Glucuronid (MUG), so dass sich β -Glucuronidase-produzierende Stämme auf entsprechenden Nährmedien, im Gegensatz zu O157:H7, mittels UV-Licht über eine vorhandene Fluoreszenz identifizieren lassen (NATARO und KAPER 1998).

Tab. 5: Eigenschaften von *E. coli* nach RATNAM et al. (1988)

Reaktionen	nicht-O157	O157 :H7
β -Glucuronidase	positiv	negativ
Sorbitol	positiv	negativ
Lactose	positiv	positiv
Indol	positiv	positiv
Arabinose	positiv	positiv
Maltose	positiv	positiv
Rhamnose	positiv	positiv

Zur weiteren Charakterisierung von STEC-Isolaten können O-H-Serotypisierung oder die Phagen-Typisierung eingesetzt werden (WANI et al. 2004). Die Typisierung hat eine begrenzte klinische Bedeutung, ist aber epidemiologisch wichtig, vor allem zur Aufklärung von Ausbrüchen (PATON und PATON 1998).

2.2. DNA-Kolonie-Hybridisierung

2.2.1. Hybridisierungsverfahren

Zum Nachweis bestimmter Gensequenzen pathogener Mikroorganismen kommen DNA-basierte Hybridisierungs-Methoden zum Einsatz (BETTELHEIM und BEUTIN 2003). Von Hybridisierung spricht man bei der Bildung eines doppelsträngigen DNA-Moleküls aus zwei komplementären Einzelsträngen (HOFF et al. 2002), so dass sich

2.2 DNA-Kolonie-Hybridisierung

DNA-Einzelstücke mit übereinstimmender Sequenz aneinander lagern (HILL et al. 2003).

Bei der **Liquid-Hybridisierung** handelt es sich um ein sogenanntes einphasiges Verfahren, bei dem sich sowohl die Sonde als auch die Ziel-DNA in Lösung befinden, in der sich auch die Hybride bilden (OLSEN et al. 2000). Die Hybridisierungsprodukte werden anschließend auch in der Lösung nachgewiesen (MEINKOTH und WAHL 1984). Die Methode ist schneller als Methoden bei denen die Zielsequenz erst an eine feste Phase gebunden wird (WALKER und DOUGAN 1989). Allerdings ist nach der Hybridisierung ein Separationsschritt zur Detektion der Sonden-Zielsequenz-Duplexes notwendig (WALKER und DOUGAN 1989).

Die **DNA-Kolonie-Hybridisierung** ist hingegen ein zwei-phasiges Verfahren, die im Vergleich zur Hybridisierung in Lösungen in festen Phasen erfolgt (SWAMINATHAN und FENG 1994). Es handelt sich um eine Transfertechnik, bei welcher Bakterienkolonien auf eine geeignete Membran oder einen Filter transferiert werden (HOFF et al. 2002). Anschließend erfolgt die Lyse der Bakterien auf der Membran, um die DNA freizulegen. Es folgt die Denaturierung der Bakterien-DNA zu Einzelsträngen und die Fixierung der Stränge auf der Membran (SWAMINATHAN und FENG 1994). Im Anschluss erfolgt die *in-situ* Hybridisierung mit einer geeigneten Sonde (FRATAMICO und BAYLES 2005, NATARO und KAPER 1998). Die Sonden sind markiert, was eine spätere Detektion der entstandenen Hybride ermöglicht (SWAMINATHAN und FENG 1994). Nicht gebundene Sonden werden durch Waschschriffe entfernt (HILL et al. 2001). Im letzten Schritt der DNA-Kolonie-Hybridisierung werden die Hybride sichtbar gemacht (HILL und KEASLER 1991). Positive Signale stellen sich als intensiv-gefärbte Punkte, die sich deutlich vom Hintergrund abheben, auf der Membran dar (HOFF et al. 2002).

Ein weiteres Hybridisierungs-Verfahren welches in fester Phase erfolgt ist der **Dot-Blot** (BEUTIN et al. 2004, BRIAN et al. 1992). Im Gegensatz zur Kolonie-Hybridisierung, bei welcher komplette Bakterienzellen von einer Agarplatte auf einen Filter oder eine Membran transferiert werden und anschließend *in-situ* auf dieser Membran lysiert werden (SWAMINATHAN und FENG 1994), werden beim Dot-Blot zuvor gereinigte Nukleinsäuren oder Zelllysate punkt- oder bandenförmig auf die Membran übertragen (Hoff et al. 2002). Eine große Anzahl von Proben kann auf

2.2 DNA-Kolonie-Hybridisierung

diese Weise gleichzeitig untersucht werden (WALKER und DOUGAN 1989). Obgleich Ergebnisse schnell erzielt werden können (HOFF et al. 2002), wird häufig mehr Zeit für die Prähybridisierung benötigt um Regionen der Membran zu blocken, da ansonsten die Sonden nicht spezifisch an die Membran binden würden (WALKER und DOUGAN 1989).

Ebenfalls zur den Festphasen-Hybridisierung zählt die **Sandwich-Hybridisierung**, bei welcher über PCR amplifizierte DNA in Mikrotiterplatten gegeben wird (FACH et al. 2001), worin die DNA durch „Capture“-Sonden an die feste Phase gebunden wird. Die gelabelte „Detection“-Sonde hybridisiert ebenfalls mit der Zielsequenz und kann über eine Farbreaktion sichtbar gemacht werden. Diese Methode ist schnell, da die feste Phase bereits vor Versuchsbeginn geblockt werden kann. Zudem kommt es durch die kombinierte Spezifität der „Capture“ und „Detection“-Sonde nur zu einem geringen Anteil von unspezifischen Signalen (WALKER und DOUGAN 1989).

2.2.2. Ablauf der DNA-Kolonie-Hybridisierung

Die DNA-Kolonie-Hybridisierung ist neben der PCR eine relevante DNA-basierte Methode für das Auffinden von Bakterien in Lebensmitteln (OLSEN 2000, WANI et al. 2004). Sie gliedert sich in mehrere Schritte, durch welche DNA von Bakterienkolonien als Einzelstrang fixiert und über markierte genspezifische Sonden detektiert wird (Abb. 2).

2.2 DNA-Kolonie-Hybridisierung

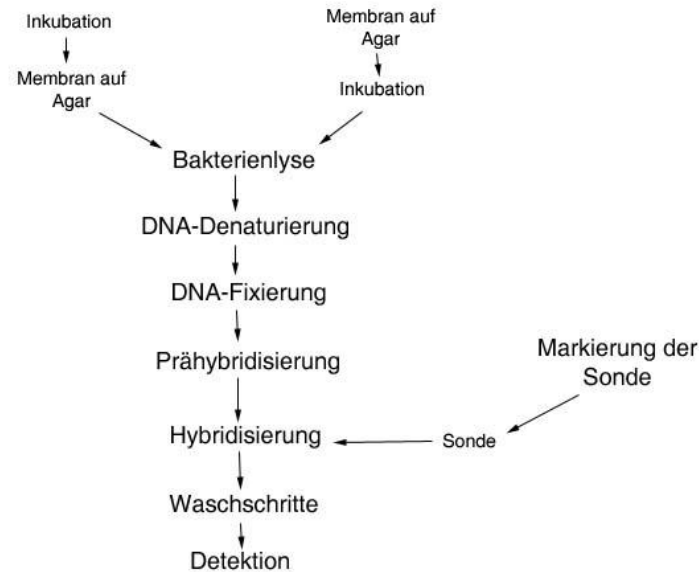


Abb. 2: Ablaufschema der DNA-Kolonie-Hybridisierung

2.2.2.1. Übertragung der Kolonien auf die Membran

Bei der Übertragung der Kolonien auf die Membran unterscheidet man die „Colony Lift“- und die „Direct Spotting“-Methode (HU und WU 2000). Im ersten Schritt der „Colony Lift“-Methode wird zu untersuchendes angereichertes Probenmaterial auf einen Agar ausgestrichen und bis zum Auftreten sichtbarer Kolonien inkubiert (OLSEN 2000). Im Anschluss an diese Inkubation werden die gewachsenen Bakterienkolonien durch Auflegen einer Membran auf den Agar auf diese übertragen (FRATAMICO und BAYLES 2005, HILL et al. 2001). Bei ihr kann die Agarplatte nach dem Kolonientransfer weiter bebrütet und für die spätere Isolation positiver Kolonien herangezogen werden (N.N. 2006). Nachteil bei dieser Methode ist jedoch, dass es beim Abziehen der Membran vom Agar zu einer inkompletten Adhäsion der Bakterien an die Membran kommen kann (WEAGANT et al. 1999). Bei der „Direct Spotting“-Methode (HU und WU 2000), wird dagegen die Membran bereits vor der Inkubation mit der Probe auf den Nähragar gelegt und der Agar mitsamt aufliegender Membran bebrütet (OLSEN 2000).

2.2.2.2. Membranen

Für die DNA-Kolonie-Hybridisierung können Nylon- sowie Nitrocellulose-Membranen eingesetzt werden. Nylon-Membranen besitzen aber den Vorteil, reißfester zu sein

2.2 DNA-Kolonie-Hybridisierung

und eine höhere Bindungskapazität zu haben. Hierdurch werden Nukleinsäuren besser fixiert und damit eine höhere Signalintensität bedingt (HOFF et al. 2002). Nitrocellulose-Membranen sind hingegen brüchig und binden die DNA nicht kovalent (HALL 1995). Sie sind jedoch kostengünstiger (MEINKOTH und WAHL 1984) und haben einen geringeren Hintergrund als Nylon-Membranen (HALL 1995).

2.2.2.3. Kontrollen

Bei der DNA-Kolonie-Hybridisierung sollten positive und negative Kontrollen mitgeführt werden. Die Ausspatelung der Kontrollen sollte auf der gleichen Art von Agar erfolgen wie die der Proben. Sie sollten zudem zeitgleich mit den Proben unter den gleichen Bedingungen der Hybridisierung zugeführt werden. Sie dienen dem Nachweis des Erfolgs des Zellwachstums wegen des verwendeten Agartyps, der Lyse und den weiteren Hybridisierungsschritten (HILL et al. 2001).

2.2.2.4. Lyse, Denaturierung, Fixation

Die ersten Schritte der DNA-Kolonie-Hybridisierung gliedern sich in die Lyse der Bakterienzellwand und die Denaturierung der DNA (FRATAMICO und BAYLES 2005, NATARO und KAPER 1998). Dies sowie die Fixation der DNA auf der Membran wird durch Anhebung des pH-Wertes in Kombination mit einer Temperaturerhöhung (HILL et al. 2001) oder durch die Einwirkung von UV-Strahlung, das sogenannte UV-Crosslinken, erreicht (STEPHAN et al. 2008). GRUNSTEIN und HOGNESS (1975) beschreiben die Möglichkeit, die Lyse und Denaturierung durch Verwendung von NaOH zu erreichen. Des Weiteren kann Dampf und Mikrowellenstrahlung dafür eingesetzt werden. Eine Denaturierung der DNA kann generell durch Temperaturen über +94 °C erreicht werden (HILL et al. 2001). Zur Entfernung von Zellresten von der Membran wird häufig Proteinase K verwendet (ESPIÉ et al. 2006, GRÖTZBACH 2007, N.N. 2000, N.N. 2006, STEPHAN et al. 2008,)

2.2.2.5. Sonde

Bei Sonden handelt es sich um kurze DNA-Moleküle, die zu Detektion spezifischer DNA-Sequenzen eingesetzt werden (WALKER und DOUGAN 1989). Zum Nachweis pathogener Bakterien wird als Zielsequenz meist ein Gen gewählt, das in der

2.2 DNA-Kolonie-Hybridisierung

Pathogenese eine Rolle spielt (HILL und KEASLER 1991). Bedeutend ist, dass die Sonde mit der entsprechenden spezifischen DNA-Sequenz hybridisiert und nicht unspezifische Hybride mit anderen DNA-Abschnitten bildet (ECHEVERRIA et al. 1986).

Die ersten zur DNA-Kolonie-Hybridisierung eingesetzten Sonden waren Polynukleotid-Sonden (WANI et al. 2004). Hierbei handelt es sich um geklonte Sonden, welche in Plasmide oder Phagen-Vektoren eingefügt wurden (WALKER und DOUGAN 1989). Für die Klonierung genomischer Sequenzen wird zuerst die DNA mechanisch oder enzymatisch in Fragmente von geeigneter Größe zerlegt. Die so erhaltenen Fragmente werden anschließend in einen Klonierungsvektor, zum Beispiel in einen Bakteriophagen oder in ein Plasmid eingefügt (PERRETT 1993). Diese werden in eine Wirtszelle eingeführt, welche die gewünschte DNA-Sequenz vermehrt. Es folgt die Isolierung und Reinigung der entstandenen Fragmente aus den Wirtszellen (HILL et al. 2000). Hierfür wird die Plasmid-DNA mit einer geeigneten Restriktions-Endonuklease zerlegt (FEINBERG und VOGELSTEIN 1983). Es folgt eine Gelelektrophorese zur Isolierung der Sonden-Fragmente (SOMMERFELT et al. 1988) und anschließend werden die mit Ethidium-Bromid gefärbten Fragmente ausgeschnitten (FEINBERG und VOGELSTEIN 1983). Dieser Prozess ist zeitaufwendig und technisch anspruchsvoll (ECHEVERRIA 1986) und die Herstellung größerer Sondenmengen ist schwierig (SOMMERFELT et al. 1988). Zudem können diese Sonden mit Sequenzen des Klonierungsvektors kontaminiert sein (ECHEVERRIA 1986, SOMMERFELT 1988). Dies macht eine Kontrolle der Reaktionsfähigkeit der Sonde mit der Vektor-DNA vor dem Einsatz erforderlich.

Durch die Entwicklung von DNA-Sequenzierungsmethoden und der automatisierten Synthese von Oligonukleotiden wurde es möglich, kürzere DNA-Sonden (18-30 bp) im Labor chemisch herzustellen (HILL et al. 2001, PATON und PATON 1998). Die Herstellung kann mit Hilfe von DNA-Synthetizern erfolgen (ECHEVERRIA et al. 1986), womit größere Sonden-Mengen hergestellt werden können (SOMMERFELT et al. 1988). Synthetische Oligonukleotid-Sonden sind besonders spezifisch für eine spezielle DNA-Region (ECHEVERRIA et al. 1986, HILL et al. 2001, SOMMERFELT et al. 1988). Bei *E. coli* beispielsweise stehen die Chancen lediglich 1:15.000, dass eine 18 bp lange Sonde an mehr als einem Gen binden kann. Bei einer Sondenlänge von 22 bp reduziert sich die Wahrscheinlichkeit auf eins zu vier Millionen (HILL et al.

2.2 DNA-Kolonie-Hybridisierung

2001). Zudem besitzen Oligonukleotid-Sonden eine höhere Hybridisierungs-Kinetik, so dass die Hybridisierung mit diesen kurzen Sonden schneller als mit Polynukleotid-Sonden erfolgen kann (VALENTINE et al. 1991).

Bei einer Länge von 19-20 bp binden Sonden bedingt durch ihre Kürze schnell an die Ziel-DNA. Zudem bestehen hohe Signalunterschiede zwischen perfekten und nicht-perfekten Hybriden (MEINKOTH und WAHL 1984, SOMMERFELT 1988). Oligonukleotid-Sonden können aufgrund ihrer hohen Spezifität bereits eine einzige Basenveränderung erkennen und aufgrund dessen nicht mehr an die Ziel-DNA binden (WALKER und DOUGAN 1989). Allerdings können solche minimalen Änderungen nach wie vor für die Produktion des gleichen oder ähnlichen Genproduktes kodieren, so dass es erwünscht sein kann, auch solche mutationsbedingt veränderte DNA-Abschnitte zu detektieren (ECHEVERRIA et al. 1986, SOMMERFELT 1988). Längere Oligonukleotid-Sonden können solche Einzelbasen-Mismatches überbrücken und so die Sensitivität verbessern ohne die Spezifität zu erniedrigen. Die Sensitivität von Polynukleotid-Sonden wird durch einzelne Nukleotid-Fehlpaarungen weit weniger beeinflusst. Durch die Empfindlichkeit der Oligonukleotid-Sonden kann die Bindung der Sonde an die Ziel-DNA bei suboptimalen Hybridisierungs- und Wasch-Bedingungen zu schwach für einen positiven Nachweis sein (SOMMERFELT 1988).

2.2.2.6. Hybridisierung

Nach Zugabe der Sonde kommt es auf der Membran zur Hybridisierung (WALKER und DOUGAN 1989). Eine Hybridisierung findet statt wenn zwischen der einzelsträngigen Sonde und dem Ziel-DNA-Einzelstrang Wasserstoffbrücken gebildet werden und so ein stabiler Doppelstrang entsteht (ECHEVERRIA et al. 1986). Die Reassoziationskonstante von Einzelsträngen zu einem Doppelstrang wird maßgeblich von der Schmelztemperatur T_m beeinflusst. Die T_m ist definiert als die Temperatur bei welcher nur noch die Hälfte aller DNA-Stränge als Doppelstrang vorliegen und kann mittels Formel berechnet werden (HOFF et al. 2002, MEINKOTH und WAHL 1984). Die maximale Rate der Hybridisierung der Sonde an die Ziel-DNA wird bei Temperaturen erreicht, die ca. 20 bis 25 °C unter der T_m liegen (WALKER und DOUGAN 1989). Ein gutes Verständnis der Parameter, welche die Stabilität von Hybriden beeinflussen, ist zur Wahl optimaler Konditionsbedingungen erforderlich (MEINKOTH und WAHL

2.2 DNA-Kolonie-Hybridisierung

1984). Bestimmte Salz- und Temperaturbedingungen können die Bildung von komplementären Doppelsträngen begünstigen. Beispielsweise erhöhen monovalente Kationen wie Na^+ die T_m (HOFF et al. 2002). Agenzien wie Formamide senken die T_m dagegen (WALKER und DOUGAN 1989). Auch der Gehalt der Basen Guanin und Cytosin wirkt sich auf die T_m aus. Ein höherer Gehalt an Guanin und Cytosin innerhalb eines komplementären Bereichs steigert die T_m (KESSLER 1995, MEINKOTH und WAHL 1984), da die zwischen Guanin und Cytosin vorhandenen drei Wasserstoff-Brücken im Vergleich zu zwei Wasserstoff-Brücken zwischen Adenin und Thymin zu einer höheren Stabilität innerhalb des Stranges führen (BOLSOVER et al. 2003). Mit zunehmender Länge komplementärer Bereiche wird die Assoziation von Basenpaaren favorisiert (HOFF et al. 2002). Basenfehlpaarungen hingegen führen zu einer Instabilität und machen eine Dissoziation wahrscheinlicher (MEINKOTH und WAHL 1984, WALKER und DOUGAN 1989).

2.2.2.7. Sonden-Markierungsmethoden

Die Markierung der Sonde kann mittels Nick-Translation, Random-Priming und PCR erfolgen (Hoff et al. 2002). Bei klonierten DNA-Fragmenten bedient man sich häufig der Nick-Translation- oder Random-Priming-Technik (HILL et al. 2001). Die Nick-Translation war die erste entwickelte Methode zur Markierung von Hybridisierungs sonden (KESSLER 1995). Hierbei erzeugt eine pankreatische Desoxyribonuklease (DNase I) Strangbrüche, sogenannte „Nicks“ im DNA-Doppelstrang (MEINKOTH und WAHL 1994, MIKOSCH 2000). Die Nicks dienen als Startpunkte (MIKOSCH 2000) für das sogenannte Kronberg-Enzym (eine DNA-Polymerase I aus *E. coli*). Die Exonuklease-Aktivität des Enzyms entfernt dNTPs und die Polymerase-Aktivität fügt markierte dNTPs ein (KESSLER 1995). Problematisch bei diesem Verfahren ist, dass bei der Markierung kleinerer Fragmente (< 400 bp) eine starke Degradierung der DNA eintritt, wodurch zu kurze (< 100 bp) DNA-Fragmente entstehen, die sehr schlechte oder unspezifische Hybridisierungen hervorrufen (MIKOSCH 2000).

Die Random-Priming Technik wurde erstmals von FEINBERG und VOGELSTEIN (1983) beschrieben. Bei dieser Technik wird die DNA mit Restriktions-Endonukleasen geschnitten und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und

2.2 DNA-Kolonie-Hybridisierung

sichtbar gemacht. Die Restriktions-Fragmente werden anschließend aus dem Gel ausgeschnitten (FEINBERG und VOGELSTEIN 1983). Das Klenow-Fragment einer *E. coli* DNA-Polymerase fügt in die erhaltenen Fragmente modifizierte Nukleotide ein (KESSLER 1995). FEINBERG und VOGELSTEIN (1983) markierten mit dieser Methode DNA radioaktiv mit ^{32}P (^{32}P). Später erfolgte die nicht-radioaktive Markierung mit Substanzen wie beispielsweise Biotin oder Digoxigenin (DIG) (KESSLER 1995). Mit Hilfe der Random-Priming-Technik können auch geringe Mengen von nur 0,02 $\mu\text{g/ml}$ DNA effektiv markiert werden (FEINBERG und VOGELSTEIN 1983).

Des Weiteren kann die Markierung der Sonden für Hybridisierungsreaktionen durch den Einsatz der PCR erfolgen (KESSLER 1995, PATON und PATON 1998). Beispielsweise werden für die Amplifikation von DNA-Fragmenten Digoxigenin-markierten Nukleotide verwendet. Diese Nukleotide werden so in die Sonden-DNA eingebaut (PATON und PATON 1998). Von Vorteil ist, dass eine große Menge an Sonde hergestellt werden kann (HOFF et al. 2002).

2.2.2.8. Sonden-Markierung

Zur Markierung von Sonden unterscheidet man radioaktive von nicht-radioaktiven Verfahren (PATON und PATON 1998, HOFF et al. 2002). Der Einsatz radioaktiv markierter Sonden ist hoch sensitiv. Markiert wurde anfänglich mit ^{32}P (^{32}P) oder ^{32}S (^{32}S) (PATON und PATON 1998). Alternativ ist eine Markierung mit ^3H (^3H), ^{35}S , ^{125}I (^{125}I) oder ^{14}C (^{14}C) möglich (WALKER und DOUGAN 1989). Die Detektion erfolgt über Autoradiographie (HILL et al. 2001).

Trotz der großen Sensitivität radioaktiv markierter Sonden werden viele nicht-radioaktive Markierungen verwendet (HILL et al. 2001). Der Grund hierfür liegt an den Problemen bezüglich der Handhabung der Radioisotope (PATON und PATON 1989) und auch an der kostspieligen Entsorgung (HILL et al. 2001). Die Radioaktivität stellt des Weiteren ein Umweltrisiko (RILEY und CAFFREY 1990) und so auch ein Gesundheitsrisiko für den Menschen dar (WALKER und DOUGAN 1989). Zum anderen haben radioaktiv markierte Sonden nur eine kurze Halbwertszeit und die erforderliche lange Expositionszeit für die autoradiografische Dokumentation führt zu einer Verzögerung des Nachweises (PATON und PATON 1989, RILEY und CAFFREY 1990).

2.2 DNA-Kolonie-Hybridisierung

Bei den nicht-radioaktiven Markierungsmethoden basiert der Nachweis auf einer Interaktion diverser biologischer Zielmoleküle mit spezifischen Bindungspartnern. Hierbei wird eine enzymatische, photochemische oder chemische Gruppe (die sogenannte „reporter group“) optisch, luminescent, fluorescent oder durch metallische Fällung detektiert (KESSLER 1995). Man kann zwischen Methoden, die nach der Hybridisierung direkt detektiert werden können und solchen die indirekt detektiert werden unterscheiden (WALKER und DOUGAN 1989).

Bei der direkten Methode wird die „reporter group“ direkt an die Sonde gekoppelt (KESSLER 1995). Hierbei kann es sich um Enzyme, wie alkalische Phosphatasen oder alkalische Peroxidasen sowie fluoreszente Farbstoffe wie Fluoreszin handeln (WALKER und DOUGAN 1989). Die Signale werden chemiluminescent oder durch die Anreicherung von Silber sichtbar gemacht (KESSLER 1995). Nachteil der direkten Methode ist die schlechte Sensitivität, da nur eine limitierte Anzahl von „reporter groups“ jeweils an die Sonde angefügt werden kann (WALKER und DOUGAN 1989)

Bei der indirekten Methode gehen an die Sonde angefügte, modifizierte Gruppen eine nicht-kovalente Interaktion mit einem universellen Indikator-Molekül ein, welches spezifisch an die modifizierte Gruppe bindet (KESSLER 1995). Die erste beschriebene indirekte Methode war die Detektion mit Hilfe von Biotin, welches an die Sonden-DNA gebunden wurde und mit einem Avidin-Enzym-Konjugat oder einem Anti-Biotin-Antikörper durch einen Substratumsatz nachgewiesen wurde (WALKER und DOUGAN 1989, GUERSIMARE et al. 1999). Die Detektion der Substrate erfolgt kolorimetrisch oder chemiluminescent (WALKER und DOUGAN 1989).

Alternativ zum Biotin-Streptavidin-System werden bei den indirekten Methoden Hapten-markierte Nukleotid-Derivate eingesetzt (Hoff et al. 2002), wobei die Detektion hier mittels Antikörper gegen das Hapten erfolgt (WALKER und DOUGAN 1989). Die Antikörper sind mit einem Enzym wie beispielsweise einer alkalischen Phosphatase konjugiert, welche die Abspaltung einer Phosphatgruppe im Substrat bewirkt. Das dabei emittierte Licht wird detektiert (Hoff et al. 2002). Beispielhaft ist die Sonden-Markierung mit dem Hapten DIG, einem chemisch-abgeleiteten Glykosid der Cardenolide Digoxin und Lanatorid C (KESSLER 1995). Hierbei werden mit DIG markierte dNTPs in die Sonde eingebaut (N.N. 2006). Die Detektion gebundener DIG-Moleküle erfolgt mit spezifischen DIG-Antikörpern (KESSLER 1995). DIG-

2.2 DNA-Kolonie-Hybridisierung

markierte Sonden gelten als spezifisch, sensitiv und geeignet zur Hybridisierung für sowohl Rein- als auch Mischkulturen. Ein Vorteil ist, dass die Lagerung bei -20 °C über sechs Monate lang möglich ist und eine bis zu vierfache Wieder-Verwendung ohne eine signifikante Reduktion der Sensitivität bereits beschrieben wurde (RILEY und CAFFREY 1990).

2.2.2.9. Waschschritte

Während der Hybridisierung nicht gebundene Sonden werden anschließend durch Waschschritte entfernt (HILL et al. 2001). Um die Hybridisierung der Sonde an ähnliche aber nicht-identische Sequenzen zu minimieren, kann eine Anpassung der Temperatur sowie der Salz- und/oder Formamid-Konzentration sowohl während der Hybridisationsreaktion als auch während der Waschschritte durchgeführt werden (MEINKOTH und WAHL 1984). Die Wahl einer geeigneten Temperatur ermöglicht die Zusammenlagerung komplementärer Stränge. Sie wird in der Regel empirisch bestimmt. Eine geeignete Temperatur führt dazu, dass nur korrekt gepaarte Stränge auch gebunden bleiben, man spricht in diesem Fall von hoch-stringenten Waschbedingungen. Zu hohe Temperaturen hingegen begünstigen ein Aufbrechen der Wasserstoffbrücken zwischen den gepaarten DNA-Basen und führen zu falsch-negativen Ergebnissen. Bei zu niedrigen Temperaturen werden wiederum Basenfehlpaarungen und somit falsch-positive Ergebnisse begünstigt (HILL et al. 2001).

2.2.2.10. Detektion

Die Darstellung der Ergebnisse bei Verwendung radioaktiv-markierter Sonden erfolgt mittels Autoradiographie. Hierbei wird ein Röntgenfilm auf die Membran platziert und in eine Röntgenkassette gelegt. Die Kassette wird einige Stunden durch die Röntgenstrahlung der Sonden belichtet und der Film anschließend entwickelt. Da die radioaktiv-markierte Sonde an Areale auf dem Filter gebunden hat, wo Zellen mit den gleichen Genen wie die der Sonde vorhanden sind, zeichnen sich positive Signale durch das Vorhandensein von Radioaktivität aus (HILL et al. 2001). Positive Signale sind als schwarze Punkte auf dem entwickelten Röntgenfilm sichtbar und heben sich deutlich vom Hintergrund ab (HILL et al. 2001, HOFF et al. 2002).

2.3 DNA-Kolonie-Hybridisierung zum Nachweis von STEC

Zur Detektion nicht-radioaktiver Sonden werden verschiedene biologische Zielmoleküle genutzt. Bei den direkten Methoden sind fluoreszente Farbstoffe direkt an die Sonde gekoppelt. Bei indirekten Systemen wird an der Sonde eine modifizierte Gruppe angefügt, an welche ein Indikatormolekül bindet. Standard Indikatormoleküle sind DIG, Biotin und Fluoreszein (KESSLER 1995). Ein an das Indikatormolekül gekoppelter Enzymkomplex setzt ein chromogenes Substrat um, was zur Entstehung von Farbpunkten auf der Membran führt (HILL et al. 2001, KESSLER 1995).

Die Größe positiver Signale korreliert in etwa mit der Größe der Kolonien auf dem Agar. Die Signalintensität hängt von der Art der Sonde und der Expositionszeit ab (HOFF et al. 2002). Positiv identifizierte Kolonien präsentieren eine KbE (Kolonie-bildende Einheit) die das gesuchte Gen enthält. Kolonien, welche mit der Sonde reagiert haben, können für die Erstellung von Reinkulturen und weitere Identifikationen verwendet werden (HILL und KEASLER 1991).

2.3. DNA-Kolonie-Hybridisierung zum Nachweis von STEC

2.3.1. Methoden aus der Literatur

In den letzten 20 Jahren gab es nur eine begrenzte Anzahl von Studien die sich mit dem Nachweis von STEC mittels DNA-Kolonie-Hybridisierung befassten (Tab. 6).

2.3 DNA-Kolonie-Hybridisierung zum Nachweis von STEC

Tab. 6: Nachweis von STEC mittels DNA-Kolonie-Hybridisierung aus Reinkultur und verschiedenen Proben

Quelle	Land	Probenart
ARTHUR et al. 2002	USA	Schlachtkörper Rind
BARLOW et al. 2006	Australien	Rinderhackfleisch, Lammkoteletts
BETTELHEIM et al. 1990	Thailand	Stuhlproben
BEUTIN et al. 1993	Deutschland, Dänemark	Kotproben versch. Tierarten
BROWN et al. 1989	Thailand	Stuhlproben
ESPIÉ et al. 2006	Frankreich	Darmspülungen HUS-Patienten, Lebensmittelproben, Tierproben*
FEGAN und DESMARCHELIER 1999	Australien	Kotproben Lamm
FRATAMICO et al. 2004	USA	Kotproben Schwein
FREMAUX et al. 2006	Frankreich	Kotproben Rind Umgebungsproben
GALLIEN et al. 1996	Deutschland	bespikte Milchproben
HULL et al. 1993	Thailand	Stuhlproben
KARCH und MEYER 1989	Deutschland	Reinkulturen
KUMAR et al. 2004	Japan	Meeresfrüchte Rindfleisch
MEICHTRI et al. 2004	Argentinien, Brasilien	Kotproben Rind
NEWLAND und NEILL 1988	USA	Reinstämme
SAMADPOUR et al. 1990	USA	Lebensmittel Kotproben Kalb
SCHMIDT et al. 1994	Deutschland	Stuhlproben
STEPHAN et al. 2008	Schweiz	Rohmilchkäse
SUTHIENKUL et al. 1990	Thailand	Lebensmittel Darmspülungen und Kotproben von Rind, Schwein, Huhn

* = Kotproben, Wasserproben von Trinknäpfen, Futtermittelproben

Als Sonden-Markierungsmethoden kamen die Techniken Random-Priming (ARTHUR et al. 2002, BETTELHEIM et al. 1990, ESPIÉ et al. 2006, KUMAR et al. 2004, NEWLAND und NEILL 1989, SAMADPOUR et al. 1990, STEPHAN et al. 2008), Nick-Translation (BROWN et al. 1989, HULL et al. 1993, SUTHIENKUL et al. 1990) und PCR (BARLOW et al. 2006, BEUTIN et al. 1993, FEGAN und DESMARCHELIER 1999, FRATAMICO et al. 2004, GALLIEN et al. 1996, SCHMIDT et al. 1994) zum Einsatz (Tab. 7). ESPIÉ et al. (2006) und STEPHAN et al. (2008) verwendeten für die Random-Technik das „DIG High Prime Kit“ von Roche. Gelabelt wurde häufig mit radioaktiven [α - 32 P]dNTPs (BETTELHEIM et al. 1990, BROWN

2.3 DNA-Kolonie-Hybridisierung zum Nachweis von STEC

et al. 1989, HULL et al. 1993, KUMAR et al. 2004, SAMADPOUR et al. 1990, SUTHIENKUL et al. 1990) sowie mit Hilfe von DIG (BARLOW et al. 2006, BEUTIN et al. 1993, ESPIÉ et al. 2006, FEGAN und DESMARCHELIER 1999, FRATAMICO et al. 2004, GALLIEN et al. 1996, SCHMIDT et al. 1994, STEPHAN et al. 2008).

Tab. 7: STEC-Sonden-Markierung in der Literatur

Quelle	Markierungsmethode			Markierung mit
	Random Priming	Nick Translation	PCR	
ARTHUR et al. 2002	x			Keine Angaben
BARLOW et al. 2006			x	DIG
BETTELHEIM et al. 1990	x			[alpha-32P]dCTP
BEUTIN et al. 1993			x	DIG
BROWN et al. 1989		x		[alpha-32P]dNTP
ESPIÉ et al. 2006	x			DIG
FEGAN und DESMARCHELIER 1999			x	DIG
FRATAMICO et al. 2004			x	DIG
GALLIEN et al. 1996			x	DIG
HULL et al. 1993		x		[32P]dNTP
KARCH und MEYER 1989	Keine Angaben			[gamma-32P]dATP
KUMAR et al. 2004	x			[alpha-32P]dCTP
MEICHTRI et al. 2004	Keine Angaben			UTP
NEWLAND und NEILL 1988	x			[alpha-32P]dCTP
SAMADPOUR et al. 1990	x			[alpha-32P]dATP [alpha-32P]dCTP
SCHMIDT et al. 1994			x	DIG
STEPHAN et al. 2008	x			DIG
SUTHIENKUL et al. 1990		x		[alpha-32P]dNTP

Nicht alle Studien gehen auf die Herstellung und Länge der Sonde ein (ARTHUR et al. 2002, BARLOW et al. 2006, FRATAMICO et al. 2004, FEGAN und DESMARCHELIER 1999, FREMAUX et al. 2006, MEICHTRI et al. 2004, STEPHAN et al. 2008). Häufig werden Polynukleotid-Sonden mit Längen zwischen 282 bp und 1.142 bp für *stx1* eingesetzt. Für *stx2* lag die Sondenlänge zwischen 270 und 860 bp. ESPIÉ et al. (2006) verwendeten eine 323-bp-lange Sonde für das *stx*-Gen. Die Fragmente stammten aus verschiedenen Plasmiden oder dem *stx*-Gen von STEC-Stämmen (BETTELHEIM et al. 1990, BEUTIN et al. 1993, BROWN et al. 1989, HULL et al. 1993, KUMAR et al. 2004, SAMADPOUR et al. 1990, SUTHIENKUL et al.

2.3 DNA-Kolonie-Hybridisierung zum Nachweis von STEC

1990). Lediglich die Untersuchung von KARCH und MEYER (1989) hybridisierte mit Oligonukleotid-Sonden mit einer Länge von 20 und 41 Basen, welche nicht genauer charakterisiert werden. Für die Herstellung findet meist die Klonierung Anwendung (BETTELHEIM und BEUTIN 1990, BEUTIN et al. 1993, BROWN et al. 1989, HULL et al. 1993, KUMAR et al. 2004, NEULAND und NEILL 1988, SAMADPOUR et al. 1990, SUTHIENKUL et al. 1990), SCHMIDT et al. (2008) sowie ESPIÉ et al. (2006) setzten die PCR ein (Tab. 8).

Tab. 8: STEC Polynukleotid-Sonden aus der Literatur

Quelle	Länge [bp]	Für	Herstellungs-methode
BETTELHEIM et al. 1990, BROWN et al. 1989, HULL et al. 1993, SAMADPOUR et al. 1990, SUTHIENKUL et al. 1990	1,142	<i>stx1</i>	Klonierung
	842	<i>stx2</i>	
BEUTIN et al. 1993	750	<i>stx1</i>	Klonierung
	850	<i>stx2</i>	
ESPIÉ et al. 2006	323	<i>Stx</i>	PCR
KUMAR et al. 2004	900	<i>stx1</i>	Klonierung
	860	<i>stx2</i>	
NEULAND und NEILL 1988	1,142	<i>stx1</i>	Klonierung
	842	<i>stx2</i>	
SCHMIDT et al. 1994	282	<i>stx1</i>	PCR
	270	<i>stx2</i>	

Auf die zur Sondenherstellung eingesetzten Primer gehen sechs der dargestellten Studien ein. BARLOW et al. (2006) sowie GALLIEN et al. (1996) verwendeten MK-Primer für *stx1* und *stx2* nach KARCH und MEYER (1989). ESPIÉ et al. (2006) verwendeten ebenfalls ein Primerpaar für beide Gene. Drei Studien setzen separate Primer für die beiden Gene ein (ARTHUR et al. 2002, FRATAMICO et al. 2004, SCHMIDT et al. 1994).

SUTHIENKUL et al. (1990) setzten als Positivkontrollen für *stx1* *E. coli* C600 (933J) und für *stx2* *E. coli* C600 (933W) ein. Als Negativkontrolle diente der Stamm C600. SCHMIDT et al. (1994) verwendete den Stamm C600 (H19J) für *stx1*. Die *stx2*- und Negativkontrolle waren wie bei SUTHIENKUL et al. (1990).

2.3 DNA-Kolonie-Hybridisierung zum Nachweis von STEC

Zur Untersuchung der jeweiligen Proben erfolgte die Anzucht der Keime auf verschiedenen Agars. Es kamen Luria Betrani-Agar (FRATAMICO et al. 2004), Tryptischer Soja-Agar (ARTHUR et al. 2002, SCHMIDT et al. 1994), HC-Agar (BARLOW et al. 2006), Eosin Methylen Blau-Agar (FEGAN und DESMARCHELIER 1999), Schafblut-Agar (STEPHAN et al. 2008) oder MAC-Agar zum Einsatz (HULL et al. 1993, ESPIÉ et al. 2006, GALLIEN et al. 1996, SUTHIENKUL et al. 1990). Die angegebene Temperatur für die Inkubation betrug - bis auf die Bebrütung des Schafblutagars bei +42 °C (STEPHAN et al. 2008) - einheitlich +37 °C (ARTHUR et al. 2002, BARLOW et al. 2006, ESPIÉ et al. 2006, FEGAN und DESMARCHELIER 1999, FRATAMICO et al. 2004, GALLIEN et al. 1996, HULL et al. 1993, SAMADPOUR et al. 1999, SUTHIENKUL et al. 1990, SCHMIDT et al. 1994). Die Dauer der Inkubation wurde mit mindestens 11 h (ARTHUR et al. 2002) bzw. 14 h (SCHMIDT et al. 1994) angegeben, meist jedoch mit 18-20 h (FEGAN und DESMARCHELIER 1999, FRATAMICO et al. 2002, GALLIEN et al. 1996) bzw. 24 h (STEPHAN et al. 2008) oder über Nacht (ESPIÉ et al. 2006, HULL et al. 1993, SUTHIENKUL et al. 1990).

Nach der Inkubation sollten optimalerweise 200-400 Kolonien auf dem Agar gewachsen sein (HULL et al. 1993, SUTHIENKUL et al. 1990). SAMADPOUR et al. (1999) gaben eine Spanne von 50-1.000 Kolonien an und nach ARTHUR et al. (1999) sollten es 2.000 Kolonien sein. STEPHAN et al. (2008) und ESPIÉ et al. (2006) gaben an, dass von den ausgepatelten 10^{-5} und 10^{-6} Verdünnungen die Platte mit den meisten Einzelkolonien für den Blot herangezogen wurden. GALLIEN et al. (1996) zogen Platten heran, wo sich gut getrennt gewachsene Einzelkolonien entwickelt hatten.

Die Lyse der Zellen sowie die Denaturierung und Fixierung der DNA wurde in der Literatur häufig nicht genauer beschrieben. BARLOW et al. (2006), FEGAN und DESMARCHELIER (1999) sowie STEPHAN et al. (2008) wiesen darauf, dass die Fixierung der DNA mit Cross-Linking durch Bestrahlung im UV-Licht erfolgte. SCHMIDT et al. (1994) führte ein 2-stündiges „Backen“ bei +80 °C durch. STEPHAN et al. (2008) inkubierten die Membranen nach dem Cross-Linking für 2 h bei +37°C, und entfernten danach anschließend die Zellreste mit Proteinase K-Lösung. ESPIÉ et al. (2006) führte die DNA-Fixierung durch Backen bei +80°C durch und setzte für die Zellrest-Entfernung ebenfalls Proteinase K ein.

2.3 DNA-Kolonie-Hybridisierung zum Nachweis von STEC

Für die Hybridisierungs-Schritte verweisen einige Studien auf den Einsatz von Hersteller-Kits und somit die Durchführung nach Herstellerangaben. Dabei werden insbesondere die Kits von Roche und Boehringer verwendet (BARLOW et al. 2006, ESPIÉ et al. 2006, FRATAMICO et al. 2004, FEGAN und DESMARCHELIER 1999, GALLIEN et al. 1996, STEPHAN et al. 2008), wobei Boehringer 1998 von Roche übernommen wurde. ARTHUR et al. (2002) führten die Hybridisierung nach Anleitung des „ECL Random Prime Labeling and Detection Kits“ von Amersham (München) durch.

Die Temperatur sowie die Zeitdauer für die Prähybridisierung und Hybridisierung waren teilweise recht unterschiedlich. Die Prähybridisierung erfolgte bei RT (SAMADPOUR et al. 1990) bzw. zwischen +42 und +68°C für bis zu 1 h (FREMAUX et al. 2002, GALLIEN et al. 1996, KARCH und MEYER 1989, NEWLAND und NEILL 1988, SCHMIDT et al. 1994, STEPHAN et al. 2008). Die Hybridisierung wurde bei +37 bis +68 °C bei einer Dauer von 18-20 h bzw. über Nacht durchgeführt (ARTHUR et al. 2002, BARLOW et al. 2006, BEUTIN et al. 1993, BROWN et al. 1989, FREMAUX et al. 2006, KARCH und MEYER 1989, NEWLAND und NEILL 1988, SAMADPOUR et al. 1990, SCHMIDT et al. 1994, STEPHAN et al. 2008) (Tab. 9). GALLIEN et al. (1996) führten die Hybridisierung für 3 h bei +42 °C durch.

2.3 DNA-Kolonie-Hybridisierung zum Nachweis von STEC

Tab. 9: Prähybridisierungs- und Hybridisierungstemperaturen und -dauer in der Literatur

Quelle	Prähybridisierung		Hybridisierung	
	Temperatur [+°C]	Dauer [min]	Temperatur [+°C]	Dauer [h]
ARTHUR et al. 2002	k.A.	k.A.	60	k.A.
BARLOW et al. 2006	k.A.	k.A.	68	k.A.
BEUTIN et al. 1993	k.A.	k.A.	68	20
BROWN et al. 1989	k.A.	k.A.	68	ü.N.
FREMAUX et al. 2006	42	60	42	ü.N.
GALLIEN et al. 1996	42	60	42	3
KARCH und MEYER 1989	46	60	50	18
NEWLAND und NEILL 1988	68	60	68	ü.N.
SAMADPOUR et al. 1990	RT	5-30	37	ü.N.
SCHMIDT et al. 1994	68	60	60	ü.N.
STEPHAN et al. 2008	42	60	42	ü.N.

ü.N.= über Nacht
k.A.= keine Angaben
RT= Raumtemperatur

DIG Easy Hyb wurde als Prähybridisierungs- und Hybridisierungslösung verwendet (ESPIÉ et al. 2006, FREMAUX et al. 2006, GALLIEN et al. 1996, STEPHAN et al. 2008). Andere Studien gaben selbst-hergestellte Lösungen an (BEUTIN et al. 1993, BROWN et al. 1989, KARCH und MEYER 1989, NEWLAND und NEILL 1988, SAMADPOUR et al. 1990).

Als Membranen verwendete ein Großteil der Studien Nylon-Membranen (ARTHUR et al. 2002, FEGAN und DESMARCHELIER 1999, FRATAMICO et al. 2004, ESPIÉ et al. 2006, GALLIEN et al. 1996, STEHAN et al. 2008). Andere hingegen verwendeten Nitrocellulose-Membranen (BEUTIN et al. 1993, HULL et al. 1993, KARCH und MEYER 1989, SCHMIDT et al. 1994).). Es finden sich auch Angaben zur Verwendung von Filterpapier (Whatman no. 541) anstelle von Membranen (BETTELHEIM et al. 1990, BROWN et al. 1989, NEWLAND und NEILL 1988, SAMADPOUR et al. 1990, SUTHIENKUL et al. 1990).

2.3 DNA-Kolonie-Hybridisierung zum Nachweis von STEC

2.3.2. Referenzmethoden

2.3.2.1. „Isolierung und Charakterisierung Verotoxin-bildender *Escherichia coli* in Hackfleisch mittels PCR und DNA-Hybridisierungstechnik“

Die amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 des Lebensmittel-, Bedarfgegenstände- und Futtermittelgesetzbuchs (LFGB) beschreibt in der Methode L07.18-1 „Nachweis, Isolierung und Charakterisierung Verotoxin-bildender *Escherichia coli* (VTEC) in Hackfleisch mittels PCR und DNA-Hybridisierungstechnik“ (N.N. 2006). Nach einer fünfstündigen Inkubation des Probenmaterials in Flüssiganreicherung (modifizierte Tryptische Soja-Bouillon (m-TSB) mit Novobiocinzusatz) erfolgt die Übertragung der Anreicherung oder einer Verdünnung dieser auf MAC-Agar und die anschließende Bebrütung bei +37 °C über Nacht. Die Kolonien werden anschließend auf eine Nylonmembran übertragen indem die Membran auf den Agar gelegt, mit einem Spatel leicht angedrückt und wieder abgezogen wird. Auf die Verwendung von Positiv- und Negativkontrollen zur Feststellung der Effizienz der Hybridisierungsreaktion wird nicht hingewiesen. Allerdings wird bei der Beschreibung der PCR-Methode auf ein Mitführen von Referenzstämmen zur Kontrolle der Reaktion aufmerksam gemacht, und geeignete Referenzstämme benannt. Angeführt ist *E. coli* C600 JI als Referenzstamm für *stx1*, C600 W34 als Referenzstamm für *stx2* und C600 als Negativkontrolle.

Die Lyse und Denaturierung der Bakterien erfolgt mit NaOH. Die Fixierung der freigelegten DNA auf der Membran wird durch einstündige Erhitzung bei +80 °C oder „Cross-Linking“ erreicht. Hierunter versteht man die Bestrahlung von DNA mit UV Licht, was zur Herstellung kovalenter Bindungen zwischen der DNA und einem Bindungspartner führt (MOLNAR et al. 1995). Die Prähybridisierung erfolgt bei der Verwendung von DIG Easy Hyb-Lösung für eine Stunde bei +42 °C.

Die Markierung der im nächsten Schritt einzusetzenden Hybridisierungs-Sonde wird in der Methode ASU L07.18-1 mit Hilfe der PCR durchgeführt. Als erster Schritt erfolgt die Amplifikation der *stx*-Gene aus den zur Sondenherstellung verwendeten Referenzstämmen *E. coli* C600 JI (positiv für *stx1*) und C600 W34 (positiv für *stx2*) mittels einer ersten PCR. Als Primer kommen MK1 und MK2 zum Einsatz, alternativ können auch die Primerpaare KS7/KS8 und LP43/44 verwendet werden (Tab. 10).

2.3 DNA-Kolonie-Hybridisierung zum Nachweis von STEC

Die PCR-Produkte der ersten PCR werden einer zweiten PCR zugeführt, bei welcher nun markierte dNTPs eingesetzt werden. Für die Markierung wird die Verwendung von DIG-11-dUTP angeführt. Die markierten DNA-Amplifikate werden anschließend elektrophoretisch in Agarose getrennt. Durch den Einbau von mit DIG-markierten dNTPs sind die Amplifikate im elektrischen Feld weniger beweglich als unmarkierte Amplifikate und zeichnen sich bei der Verwendung der MK-Primern durch eine scheinbare Länge von 400 bis 450 bp aus. Die Banden werden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und durch Aufkochen in autoklaviertem Wasser und anschließendes Abkühlen gelöst.

Tab. 10: Primersequenzen für den Nachweis von *stx1* und *stx2* (N.N. 2006)

Primer	Sequenz
MK-Primer für <i>stx1</i> und <i>stx2</i>	
MK1	5'-ttt acg ata gac ttc tcg ac-3'
MK2	5'-cac ata taa att att tcg ctc-3'
KS-Primer für <i>stx1</i>	
KS7	5'-ccc gga tcc atg aaa aaa aca tta tta ata gc-3'
KS8	5'-ccc gaa ttc agc tat tct gag tca acg-3'
LP-Primer für <i>stx2</i>	
LP43	5'-atc cta ttc ccg gga gtt tac g-3'
LP4	5'-gcg tca tcg tat aca cag gag c-3'

Die Hybridisierung wird bei derselben Temperatur durchgeführt wie die Prähybridisierung (+42 °C). Sie sollte mindestens für 3 h, jedoch besser über Nacht erfolgen. Als Hybridisierungslösung wird ebenfalls DIG Easy Hyb, dieses Mal mit zugefügter Sonde, eingesetzt. Für die Waschung der Membran kommen SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) und 2x SSC (Saline Sodium Citrate) bei Raumtemperatur (RT) sowie SDS und 0,5x SSC bei +68 °C zum Einsatz. Für die Detektion bei RT wird auf die Angaben der Hersteller der jeweils eingesetzten Kits verwiesen. Beispielhaft ist im Anhang die Verwendung des DIG Nucleic Acid Detection Kits der Firma Roche Diagnostics angeführt, welche in Kapitel 3.3 unter Material und Methoden genau beschrieben wird.

Die Validierung der Methode erfolgte mittels Ringversuch. 11 Laboratorien erhielten 10 Hackfleischproben aus 2 Grundmatrices. Die ersten neun Proben waren bereits mit natürlichen STEC kontaminiert. Die Begleitflora wurde mit 10^5 bis 10^6 KBE/g

2.3 DNA-Kolonie-Hybridisierung zum Nachweis von STEC

angegeben. Je 5 Proben wurden einheitlich mit den Referenzstämmen gespikt. Die Beimpungskonzentration lag zwischen 54 und 308 KbE/25 g Hackfleisch. Die Untersuchung der Proben erfolgte parallel mittels PCR mit den MK-Primern und mittels DNA-Kolonie-Hybridisierung. In der PCR erwiesen sich alle Proben als STEC-positiv. Die Hybridisierung ergab bei 8 der Laboratorien eine 100-prozentige Nachweisrate. Eine Labor identifizierte jeweils 4 der 5 Proben als positiv, da die Probe transport-bedingt eine Begleitflora von 10^9 KbE/g aufwies. Ein Labor machte keine Angaben und ein Labor hatte bedingt-auswertbare Ergebnisse aufgrund methodischer Fehler.

2.3.2.2. "Identification of Foodborne Bacterial Pathogens by Gene Probes"

Die U.S. Food & Drug Administration (FDA), Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN) beschreibt im „Bacteriological Analytical Manual“ (BAM) die Identifikation von Lebensmittelerregern mit Hilfe von Sonden (HILL et al. 2001). Neben der PCR zur Sondenherstellung wird die DNA-Kolonie-Hybridisierung erläutert.

Die Inkubation der in Butterfield-Puffer (Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water, bestehend aus KH_2PO_4 und Aqua dest.) vorangereicherten Proben erfolgt für 24 h bei +43 °C auf HC-Agar. Die Membran wird nach der Inkubation auf dem Agar platziert, mit einem Glas-Spatel leicht angedrückt und nach fünf Minuten wieder abgezogen. Für die Kontrollen wird auf Referenzstämmen aus diversen Quellen verwiesen (Tab. 11). Sie können bei -70 °C in 10% Glycerol gelagert werden.

2.4 Validierung von Methoden

Tab. 11: Referenzstämme für die Hybridisierung von *stx*

Referenzstamm	Eigenschaften	Quelle
C600	negativ für <i>sxt1</i> und <i>stx2</i>	STROCKBINE et al. 1986
O157:H7 (933)	positiv für <i>stx1</i> und <i>stx2</i>	RILEY et al. 1983
C600 (933J)	positiv für <i>stx1</i>	O'BRIEN et al 1984, STROCKBINE et al. 1986
O26 :H11 (H30)	positiv für <i>stx1</i>	O'BRIEN et al. 1982, KONOWALCHUK et al. 1977

Die Lyse der Zellen und Denaturierung der DNA erfolgt mit 0,5 M NaOH in 1,5 M NaCl. Die Fixierung der DNA auf der Membran geschieht mithilfe von Mikrowellenstrahlen.

Die Hybridisierungslösung wird selbst hergestellt und besteht aus 6x SSC, 5x Denhardt-Lösung (bestehend aus Ficoll, Polyvinyl pyrrolidone, Bovines Serum Albumin, Aqua dest.) sowie 10 MM EDTA (Ethylen-diamin-tetra-acetat). Sonifizierte (mit Ultraschall-Strahlung behandelte) Kalbsthymus-DNA wird 5 min gekocht und anschließend zur Lösung hinzugefügt. Nach der Inkubation der Membran in der Hybridisierungslösung für 15 min bei RT wird die Sonde hinzugefügt. Als Sonden-Markierung wird die radioaktive End-Markierung von Oligonukleotiden mittels [γ -³²P]dATP angeführt. Für die Sondenherstellung wird beispielhaft auf die Verwendung von zwei synthetischen Oligonukleotid-Sonden aus der Sequenz der A-Untereinheit der *stx1*- und *stx2*-Gene (Nukleotide 473-490 und 472-490) hingewiesen (SZABO et. al. 1986). HC-Agar dient der Selektion *stx*-positiver *E. coli*-Stämme.

Die Hybridisierungstemperatur wird mit +37 °C angegeben. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht. Gewaschen werden die Membranen in 3x SSC bei 56 °C und 2x SSC bei RT. Die Detektion erfolgt autoradiographisch.

2.4. Validierung von Methoden

Ziel einer Validierung ist es, eine Methode zu charakterisieren und zu testen, ob diese für einen bestimmten Zweck geeignet ist (HÜBNER et al. 2002, OSCROFT 2007). Dagegen trifft die Validierung keine Aussage darüber, ob eine Methode in allen Situationen und im jeweiligen Labor funktionieren wird (OSCROFT 2007).

2.4 Validierung von Methoden

Messunsicherheiten können bei mikrobiologischen Prüfverfahren oft nicht genau bestimmt werden, da sich die Untersuchungen auf sich dynamisch-verhaltende lebende Materie in Bezug auf Vermehrung, Absterben, Schädigung und Inaktivierung bezieht. Somit handelt es sich immer nur um eine Annäherung an den wahren Wert (HÜBNER et al. 2002).

Die Wahl einer Methode kann sich nach gewissen Standards beispielsweise ISO-Normen, Publikationen oder Herstellerangaben bei Einsatz bestimmter Produkte richten (OSCROFT 2007). Eine normierte internationale Arbeitsvorschrift zur Validierung mikrobiologischer qualitativer Verfahren ist die DIN EN ISO 16140:2003. Als weitere Vorschriften zur Validierung gelten die AOAC International (Association of Analytical Communities) (FELDSINE et al. 2002), die National Veterinary Institute (Protocol for the Validation of Alternative Microbiological Methods in the Nordic Countries) (N.N. 2007) sowie die SAS (Schweizerische Akkreditierungsstelle; Leitfaden zur Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren zur Abschätzung der Messunsicherheit im Bereich der Lebensmittel- und Umweltmikrobiologie) (BAUMGARTNER et al. 2006). BAUMGARTNER et al. (2006) orientieren sich dabei an Anweisungen der Publikation „In house-Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren“ von HÜBNER et al. (2002).

Validiert werden zum einen **Alternativverfahren** (z.B. Schnellverfahren), welche grundsätzlich durch einen Methodenvergleich zu bereits existierenden Referenzmethoden getestet werden (BAUMGARTNER et al. 2006, HÜBNER et al. 2002, FELDSINE et al. 2002). Gemäß der DIN EN ISO 16140:2003 gliedert sich die Validierung von Alternativverfahren in zwei Schritte: zunächst wird das Alternativverfahren gegenüber dem Referenzverfahren vergleichend untersucht. Im folgenden Schritt werden beide Methoden im Ringversuch getestet (N.N. 2003). Zum anderen können **neue Methoden** validiert werden, für die bislang noch keine genormten Prüfanweisungen (Standard- bzw. Referenzmethoden) bestehen (BAUMGARTNER et al. 2006; FELDSINE et al. 2002, HÜBNER et al. 2002). Bei neuen Methoden gründet die Validierung auf internen Laborversuchen mit künstlich kontaminiertem, definiertem Referenzmaterial (HÜBNER et al. 2002).

Beurteilt wird die Methode anhand von Validierungskriterien (HÜBNER et al. 2002). Diese Kriterien für alternative und neue Methoden sind in Tabelle 12 aufgelistet. Werden diese im Vergleich zu einer Referenzmethode ermittelt, werden sie als

2.4 Validierung von Methoden

„relative Validierungskriterien“ bezeichnet (N.N. 2003). Bei der Validierung muss hierbei prinzipiell zwischen qualitativen und quantitativen Prüfverfahren unterschieden werden (BAUMGARTNER et al. 2006). Bei qualitativen Verfahren wird ermittelt, ob z.B. ein Mikroorganismus in einer bestimmten Menge von einer bestimmten Matrix vorhanden ist oder nicht. Bei quantitativen Verfahren geht es um die Ermittlung der vorhandenen Menge des zu analysierenden Mikroorganismus in einer bestimmten Matrix (BAUMGARTNER et al. 2006; FELDSINE et al. 2002). Quantitative Verfahren dienen zum Beispiel der Überwachung von Grenzwerten (N.N. 2003).

Tab. 12: Validierungsparameter für qualitative und quantitative Methoden nach HÜBNER et al. (2002)

Validierungskriterium	qualitative Methode	quantitative Methode
Anwendungsbereich	x	x
Spezifität	x	x
Sensitivität	x	x
Richtigkeit	x	x
Wiederholbarkeit (Präzision)	x	x
Vergleichbarkeit (Robustheit)	x	x
Nachweisgrenze	x	
Bestimmungsgrenze		x
Linearität		x
Falsch-positive Rate	x	
Falsch-negative Rate	x	
Statistische Übereinstimmung*	x	x

*= nur für Alternativverfahren

Die Auswahl der zum Einsatz kommenden Probe richtet sich nach dem Untersuchungsziel (BAUMGARTNER et al. 2006). Bei der Lebensmittelproduktion angewandte Technologien wie beispielsweise Fermentation oder Kochen sollten dabei berücksichtigt werden. Je nachdem, für welchen Anwendungsbereich die zu validierende Methode eingesetzt werden soll, werden eine bzw. mehrere Produkt- und Lebensmittelkategorien (Matrices) für die Validierung herangezogen (HÜBNER

2.4 Validierung von Methoden

et al. 2002). Dabei sollten Matrices gewählt werden, bei welchen die Pathogenität, z.B. durch Lebensmittelvergiftungen oder Lebensmittel-Rückrufaktionen bekannt ist (FELDSINE et al. 2002) und diese somit relevant für die Gefährdung der menschlichen Gesundheit sind (HÜBNER et al. 2002). Mögliche Produkte- und Lebensmittelkategorien sind in den Anhängen der AOAC-Richtlinie und der ISO-Norm 16140 angegeben (HÜBNER et al. 2002). Als relevante Lebensmittelkategorien für *E. coli* O157:H7 und STEC sind Fleisch- und Fleischprodukte sowie Fisch und Meeresfrüchte, aber auch Milchprodukte sowie Gemüse und Obst aufgelistet (FELDSINE et al. 2002). Kenntnisse über die Prävalenz der nachzuweisenden Mikroorganismen im jeweiligen Lebensmittel sind zusätzlich zu berücksichtigen (BAUMGARTNER et al. 2006, HÜBNER et al. 2002).

Bei der Matrix-Wahl ist ebenso zu beachten, ob die Methode für ein bestimmtes oder universell für Lebensmittel angewandt werden soll. Ist die Methode für den Nachweis von Mikroorganismen in einem ganz bestimmten Lebensmittel vorgesehen, so sollte dieses als Matrix eingesetzt werden. Dient sie dem Nachweis in allen Lebensmitteln, so sollten mindestens vier verschiedene Matrices für die Validierung gewählt werden (BAUMGARTNER et al. 2006, HÜBNER et al. 2002).

Handelt es sich bei der Validierung um einen **Methodenvergleich**, sind pro Produkt- bzw. Lebensmittelkategorie mindestens 20 natürlich kontaminierte und 20 natürlich nicht kontaminierte Proben zu untersuchen. Diese sind sowohl mit dem Alternativ- als auch mit dem Referenzverfahren zu testen (HÜBNER et al. 2002). Idealerweise sollten natürlich kontaminierte Lebensmittel für die Validierung zum Einsatz kommen. Ist dies jedoch nicht möglich, so ist eine künstliche Kontamination zulässig (FELDSINE et al. 2002). Man spricht bei der künstlichen Kontamination auch vom „Spiken“ der Proben mit dem jeweiligen Mikroorganismus (BAUMGARTNER et al. 2006). Das Spektrum der natürlich vorkommenden Eigenflora sollte bei den künstlich kontaminierten Proben auf alle Fälle abgedeckt sein (HÜBNER et al. 2002).

Wird eine **neue Methode** untersucht, so sind die jeweiligen Produkt- und Lebensmittelkategorien mit mindestens 20 verschiedenen Stämmen des Zielorganismus künstlich zu kontaminieren. Weitere 20 Proben sollen nicht mit dem Zielorganismus, dafür aber mit einer anderen Spezies kontaminiert sein. Dabei sollte die Konzentration zehnmal über der Nachweisgrenze bzw. Bestimmungsgrenze liegen (HÜBNER et al. 2002).

2.4 Validierung von Methoden

Die weiteren Validierungskriterien zur Beurteilung einer Methode sind in Tabelle 13 erläutert (HÜBNER et al. 2002). Bei mikrobiologischen Prüfverfahren stehen die Spezifität und Sensitivität im Vordergrund (BAUMGARTNER et al. 2006).

Tab. 13: Begriffsbestimmung der Validierungskriterien für qualitative und quantitative Methoden nach HÜBNER et al. (2002)

Validierungsparameter	Begriffsbestimmung
Spezifität	Grad, zu welchem eine Methode von anderen Komponenten der Probe beeinflusst wird. Ist die Methode spezifisch, so wird sie von anderen Komponenten nicht beeinflusst
Sensitivität	
Qualitativ	Die Fähigkeit der zu validierenden Methode, den Zielorganismus nachzuweisen, wenn er von der Referenzmethode nachgewiesen wird, bzw. in der Probe enthalten ist
Quantitativ	Fähigkeit eines Prüfverfahrens, innerhalb einer gegebenen Matrix leichte Änderungen in der Anzahl der Mikroorganismen nachzuweisen
Richtigkeit (Effizienz)	Maß für die Abweichung vom wahren bzw. richtigen Wert.
Wiederholbarkeit (Präzision)	Vergleich von Resultaten wiederholter Messungen derselben Probe unter gleichen Bedingungen
Vergleichbarkeit (Robustheit)	Vergleich von Resultaten wiederholter Messungen derselben Probe unter wechselnden Bedingungen
Nachweisgrenze	Kleinste Konzentration an Mikroorganismen, die mit genügender statistischer Sicherheit nachgewiesen werden kann
Bestimmungsgrenze	Kleinste Konzentration an Mikroorganismen, die noch mit akzeptabler Richtigkeit und Präzision bestimmt werden kann
Linearität	Fähigkeit einer Methode, in einer gegebenen Matrix Resultate zu geben, die proportional zur Anzahl der Mikroorganismen in der Probe sind
Falsch-positive Rate	Anzahl Resultate mit positiver Abweichung
Falsch-negative Rate	Anzahl Resultate mit negativer Abweichung
Statistische Übereinstimmung	Maß der Übereinstimmung zweier Prüfverfahren bezüglich eines Analysenparameters

Die Richtigkeit kann mittels einer validierten Zweitmethode (wenn möglich einer Referenzmethode), über künstliche Kontamination (Spiken) oder mit einem Referenzmaterial bestimmt werden. Wird die Richtigkeit mit einer Zweitmethode ermittelt, so bezeichnet diese den Grad der Übereinstimmung der Resultate, welche

2.4 Validierung von Methoden

mit der zu validierenden und der Referenzmethode an mindestens 20 gleichen Proben erhalten werden. Gespikt werden Proben, wenn kein zertifiziertes Referenzmaterial und keine Zweitmethode zur Verfügung stehen. Der nachzuweisende Organismus wird zu 6-20 Proben hinzugefügt und die Konzentrationen bestimmt. Im Vergleich mit zertifiziertem Referenzmaterial genügen 6-10 Bestimmungen (BAUMGARTNER et al. 2006).

Zur Abschätzung der Nachweisgrenze sind pro Produkt- und Lebensmittelkategorie Verdünnungsreihen von mindestens drei verschiedenen Konzentrationen anzufertigen. Als tiefe Konzentrationen gelten Werte von 1 bis 10 KbE, mittlere sind 10 bis 100 KbE und hohe Konzentrationen sind über 100 KbE (HÜBNER et al. 2002). Die erste Beimpfungskonzentration sollte der Negativkontrollen die zweite der theoretischen Nachweisgrenze und die dritte einem Wert oberhalb der Nachweisgrenze entsprechen (N.N. 2003). Es sind 4 verschiedene Stämme des Zielkeims zu verwenden, mit welchen die Matrices künstlich kontaminiert werden (HÜBNER et al. 2002). Ebenso sollte eine Negativkontrolle mitgeführt werden. Die Nachweisgrenze ist demnach der tiefste Wert, bei welcher alle Resultate positiv ausfallen (BAUMGARTNER et al. 2006). Als Nachweisgrenze für qualitative Verfahren gilt 1 KbE/25 g (HÜBNER et al. 2002).

Für die Ermittlung der Bestimmungsgrenze sind ebenso drei verschiedene Konzentrationen mit vier Stämmen des Mikroorganismus anzusetzen. Die Bestimmungsgrenze liegt bei quantitativen Plattierverfahren bei 2000-3000 KbE/g (HÜBNER et al. 2002).

Die DIN EN ISO 16140:2003 gibt als Validierungskriterien zudem die Inklusivität und Exklusivität an. Hierfür werden keine Lebensmittelproben, sondern nur Reinkulturen von Stämmen eingesetzt. Unter Inklusivität versteht man die Eignung eines alternativen Prüfverfahrens den Zielorganismus in einem breiten Spektrum von Stämmen nachzuweisen (N.N. 2003). Inklusive Keime sind Zielkeim der Methode und müssen detektiert werden (HÜBNER et al. 2002). Zur Ermittlung der Inklusivität sollten mindestens 50 verschiedene Stämme des Zielorganismus eingesetzt werden und die Beimpfungskonzentration sollte zehn- bis 100fach größer als die geringste Nachweiskonzentration des alternativen Verfahrens sein. Die Exklusivität beinhaltet die Abwesenheit störender Einflüsse eines relevanten Spektrums von anderen Mikroorganismen als dem Zielkeim bei alternativen Verfahren (N.N. 2003). Exklusive

2.4 Validierung von Methoden

Keime dürfen von der Methode nicht detektiert werden (HÜBNER et al. 2002). Hier sollten mindestens 30 Reinkulturen eingesetzt werden und die Beimpungskonzentration sollte der Konzentration entsprechen, die in allen Lebensmitteln zu erwarten ist (N.N. 2003).

3 Material und Methoden

3. Material und Methoden

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer DNA-Kolonie-Hybridisierung zum Nachweis von STEC zur Einführung im Routinelabor. Das Vorgehen gliederte sich in die Markierung der Sonde mittels PCR und das Hybridisierungsverfahren selbst. Der Sonden-Markierung voraus gingen Vorversuche zur Optimierung der PCR. Die Hybridisierung wurde in Anlehnung an die ASU L07.18-1 (N.N. 2006) durchgeführt, wobei in den Vorversuchen die Methode vergleichend mit kommerziell-erhältlichen und selbst-hergestellten Reagenzien erfolgte. Für beide möglichen Vorgehensweisen sowie die Sonden-Markierung wurde eine Kostenaufstellung angefertigt. Es wurden drei verschiedene Agars getestet und die Methode für den Einsatz im Routinelabor in mehreren Schritten validiert.

3.1. Material

3.1.1. Referenzstämme

Die beiden *stx1*- und *stx2*-positiven Referenzstämme (x1, x2) stammten vom Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), Nationales Referenzlabor *E. coli*, Dessau. Bei dem *stx1*-positiven Stamm handelte es sich um *E. coli* C600 J1 (x1), der Stamm für *stx2* war *E. coli* C600 W34 (x2).

3.1.2. Probenmaterial

Für die Validierung der Methode wurde Probenmaterial mit den Referenzstämmen x1 und x2 beimpft, um die Nachweisgrenze des Verfahrens zu bestimmen. Als Probenmaterial kam Rinderhackfleisch zum Einsatz. Die Wahl dieser Matrix liegt darin begründet, dass Rinder als bedeutende Infektionsquelle für EHEC-Infektionen gelten (Kapitel 2.1.3) und die Wahrscheinlichkeit einer natürlichen Kontamination dieses Lebensmittels gegeben ist. Zudem bezieht sich die ASU L07.18-1 auf die Untersuchung von Hackfleisch (N.N. 2006). Die Proben stammten aus dem Routinelabor des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs. Bis zu ihrer Verwendung wurden sie bei -20 °C eingefroren.

3.1 Material

3.1.3. Reagenzien und Chemikalien

Für die Vorversuche der DNA-Kolonie-Hybridisierung wurden die kommerziell-erhältlichen Reagenzien der Firma Roche (N.N. 2000) im Vergleich mit selbst-hergestellten Lösungen gemäß der ASU L07.18-1 (N.N. 2006) eingesetzt (Tab. 14). Einige der Lösungen mussten für beide Methoden selbst hergestellt werden und waren identisch (Tab. 15). Die genauen Angaben zur Herstellung der Lösungen sind im Anhang beschrieben (Kapitel 9.3). Des Weiteren wurden einige Materialien und Reagenzien für beide Versuche eingesetzt. Das für die Herstellung verwendete einfach bzw. zweifach destillierte Wasser wurde in die Kostenberechnung nicht mit einbezogen. Für die Hauptversuche wurden anschließend ausschließlich die selbst-hergestellten Lösungen verwendet. Alle weiteren verwendeten Reagenzien und Chemikalien sind dem Anhang zu entnehmen (Kapitel 9). Die für die Vor- und Hauptversuche verwendete Sonde wurde mit dem „PCR DIG Probe Synthesis Kit“ (Roche) markiert.

Tab. 14: Zusammensetzung kommerzieller und selbst-hergestellter Lösungen für die DNA-Kolonie-Hybridisierung

Lösung	Kommerziell	selbst-hergestellt
10x Blocking-Stammlösung	Flasche 3 des DIG Wash and Block Buffer Sets (Roche)	10 g Blocking-Reagent 90 ml Maleinsäurepuffer-Stammlösung
10x Maleinsäurepuffer-Stammlösung	Flasche 2 des des DIG Wash and Block Buffer Sets (Roche)	11,6 g Maleinsäure 8,8 g NaCl 1 l A. dest.
1x Blockinglösung	Flasche 3 des DIG Wash and Block Buffer Sets (Roche) 1:10 verdünnen mit Flasche 2 des Sets.	10 ml Blocking-Stammlösung 90 ml Maleinsäurepuffer-Stammlösung
Detektionspuffer	Flasche 4 des des DIG Wash and Block Buffer Sets (Roche) 1:10 mit A. bidest. Verdünnen	15,8 g TRIS 5,9 g NaCl 1 l A. dest.
Hybridisierungslösung	DIG Easy Hyb (Roche)	1 g Lauroylsarcosin 1 g SDS 1 l 5x SSC 10 g Blocking-Reagent
Waschpuffer	Stammlösung Flasche 1 des DIG Wash and Block Buffer Sets (Roche) 1:10 mit A. bidest. verdünnen	3 ml 0,3% Tween 20 97 ml Maleinsäurepuffer-Stammlösung

3.2 Sondenmarkierung

Tab. 15: Gemeinsame Lösungen und Materialien für die DNA-Kolonie-Hybridisierung

Lösung	Herstellung
„High Stringency Buffer“ (Waschlösung 2)	5 ml SDS 1 l 0,04x SSC
„Low Stringency Buffer“ (Waschlösung 1)	5 ml SDS 1 l 2x SSC
10x TE-Puffer	Stammlösung 1:10 mit A. bidest. verdünnen
Anti-DIG-AP-Konjugat (Roche)	3 µl mit 15 ml 1x Blockinglösung verdünnen
Äquilibrierungslösung	175,32 g NaCl 88,23 g Tri-Natriumcitrat 1 l A. bidest.
Denaturierungslösung	20 g NaOH 87,66 g NaCl 1 l A. bidest.
NBT/BCIP-Färbelösung (Roche)	200 µl mit 10 ml A. bidest verdünnen
Neutralisierungslösung	121,14 g TRIS 87,66g NaCl 1 l A. bidest.
Proteinase K (Quiagen)	1:10 mit 2x SSC verdünnen
Material	Hersteller
Whatmann Filterpapier 3MM CHR	Carl Roth GmbH
Nylon-Membranen	Roche

3.2. Sondenmarkierung

Die Sonde für die Hybridisierungsreaktion wurde mithilfe des „PCR DIG Probe Synthesis Kits“ markiert (Roche). Da die Markierung mittels PCR erfolgte, wurden im ersten Schritt die Parameter der PCR optimiert, um im zweiten Schritt bestmögliche Markierungs-Ergebnisse zu erzielen.

3.2.1. Vorversuche zur Optimierung Sonden-Markierung

3.2.1.1. Auswahl der DNA-Extraktions-Methode

Zur Ermittlung der optimalen DNA-Extraktionsmethode wurden vier verschiedene Methoden getestet. Zwei Methoden wurden mit dem Reinigungskit InstaGene Matrix (Bio-Rad) durchgeführt, wobei einmal nach Herstellerangaben und einmal modifiziert vorgegangen wurde. Des Weiteren wurden zwei Methoden, die sich der thermischen Lyse bedienen, eingesetzt. Bei der ersten handelte es sich um ein in-house

3.2 Sondenmarkierung

Verfahren, die zweite erfolgte nach Angaben der ASU L07.18-1 (N.N. 2006) (Tab. 16). Zur Einschätzung der DNA-Ausbeute wurde anschließend an die jeweilige Exktraktion eine photometrische Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Zunächst wurden fünf Kolonien der Referenzstämme x1 sowie x2 von einer PCA-Platte entnommen und in Pepton gegeben. Die Anreicherung erfolgte für beide Stämme jeweils im Doppelansatz. Es folgte die Inkubation für 16 h bei +37°C im Wasserbad. Die Anreicherungen wurden anschließend für die verschiedenen DNA-Extraktionen verwendet.

Methode 1: InstaGene nach Anleitung der Firma Bio-Rad

1 ml der Anreicherung wurde für 1 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das im Tube verbliebene Pellet in 200 µl InstaGene resuspendiert. Nach 10-sekündigem Vortexen wurde die Lösung für 15 min auf +56 °C erhitzt. Nach erneutem Vortexen für 10 s wurde 8 min bei +100 °C erhitzt. Zuletzt wurde für 2 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. 180 µl des Überstands wurden abpipettiert und als DNA-Extrakt bei -20 °C aufbewahrt.

Methode 2: InstaGene modifiziert

Für Methode 2 wurden die einzelnen Schritte wie in Methode 1 durchgeführt. Allerdings wurde bei einer Ausgangsmenge der Anreicherung von 100 µl das entstehende Pellet in 50 µl resuspendiert. Somit betrug das Verhältnis Anreicherung zu InstaGene in dieser Methode 2:1, in Methode 1 hingegen betrug es vergleichsweise 5:1. Nach der letzten Zentrifugation wurden nur 40 µl Überstand am Ende der Reinigung als Template bei -20 °C aufbewahrt.

Methode 3: in-house Kochmethode

100 µl Anreicherung wurden 4 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 100 µl autoklaviertem Wasser resuspendiert und für 10 s gevortext. Anschließend erfolgte eine Erhitzung für 10 min bei +100 °C. Zuletzt wurde eine 2-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm durchgeführt. 80 µl des Überstandes standen im Anschluss als Template zur Verfügung.

Methode 4: ASU L 07.18-1 (N.N. 2006)

1 ml Anreicherung wurde 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 1 ml autoklaviertes Wasser resuspendiert. Nach erneutem 10-minütigem Zentrifugieren bei 10.000 rpm wurde der Überstand abermals verworfen und das Pellet in 250 µl Wasser gegeben. Es folgte eine 15 min

3.2 Sondenmarkierung

andauernde Erhitzung auf +100 °C. 230 µl des Überstandes stellen den gewonnenen DNA-Extrakt dar.

Tab. 16: Ablauf der vier getesteten DNA-Extraktionsmethoden

Schritt	Methode 1 InstaGene	Methode 2 InstaGene mod.	Methode 3 in-house Kochmethode	Methode 4 ASU L 07.18-1
Anreicherung	1.000 µl	100 µl	100 µl	1.000 µl
Zentrifugation	1 min 12.000 rpm	1 min 12.000 rpm	4 min 13.000 rpm	10 min 10.000 rpm
Überstand	verwerfen	verwerfen	verwerfen	verwerfen
Resuspension des Pellets in	200 µl InstaGene	50 µl InstaGene	100 µl autoklav. Wasser	1.000 µl autoklav. Wasser
Vortexen (~5 s)	ja	ja	nein	nein
Zentrifugation	keine	keine	keine	10 min 10.000 rpm
Überstand	nicht verwerfen	nicht verwerfen	nicht verwerfen	verwerfen
Erhitzen	15 min +56 °C	15 min +56 °C	10 min +100 °C	nein
Vortexen (~5 s)	ja	Ja	nein	nein
Resuspension	keine	keine	keine	Sediment in 250 µl autoklav. Wasser
Erhitzen	8 min +100 °C	8 min +100 °C	nein	15 min +100 °C
Zentrifugation	2 min 12.000 rpm	2 min 12.000 rpm	keine	keine
Überstand	180 µl	40 µl	80 µl	230 µl

3.2.1.2. PCR-Protokoll und Annealing-Temperatur

Für die spätere Sonden-Markierung sollten beide Sonden in einem gemeinsamen PCR-Durchlauf markiert werden. Für die Wahl der optimalen Bedingungen für eine Sonden-Markierungs-PCR-Reaktion wurden verschiedene Protokolle und Annealing-Temperaturen getestet. Hierfür wurden für den Nachweis von *stx1* und *stx2* jeweils 8 Reaktionsansätze hergestellt. Durch Nutzung eines Temperatur-Gradienten während der Anlagerungsphase wurde eine optimale Annealing-Temperatur für die PCR gewählt. Die eingesetzten Reaktionskomponenten sind Tabelle 17 zu entnehmen.

3.2 Sondenmarkierung

Das Volumen betrug 25 µl je Ansatz. Pro Ansatz wurde 12,5 µl MasterMix 2.5x (Eppendorf, Hamburg), mit 2,5 µl KS7/8-Primer für *stx1* bzw. LP43/44-Primer für *stx2* (MWG Biotech, Ebersberg), 7 µl molekularbiologisches Wasser (H₂O) und 3 µl Template verwendet.

Tab. 17: Pipettierschema der PCR zur Annealing-Temperatur-Optimierung

Komponente	Endkonzentration	Volumen
H ₂ O add		7,0 µl
Master Mix2,5x	1x	12,5 µl
Primer*	100-200 nM	2,5 µl
Template	10-200 ng	3,0 µl
Gesamt		25,0 µl

*KS7 und KS8 für *stx1*, LP43 und LP44 für *stx2*

Das Intervall für den Temperatur-Gradienten wurde von +50 bis +65 °C gewählt. Die dazwischen liegenden Temperaturen wurden von der Thermocycler-Software (iCycler, Bio-Rad) festgelegt (Tab. 19). Die Ermittlung einer optimalen Annealing-Temperatur wurde insgesamt für drei verschiedene PCR-Programme durchgeführt (Tab. 18). Anwendung fanden das PCR-Programm nach Angaben der Firma Roche (N.N. 2000) und die in der ASU L07.18-1 (N.N. 2006) für LP- und KS-Primer genannten Programme.

3.2 Sondenmarkierung

Tab. 18: Drei PCR-Protokolle zur Annealing-Temperatur-Optimierung

Schritt	Temperatur [+ °C]			Zeit		
	R	KS	LP	R	KS	LP
Cycle 1						
Initiale Denaturierung	95	94	94	2 min	5 min	5 min
Cycle 2 (35x)						
Denaturierung	95	94	94	30 s	30 s	90 s
Annealing*	50-65	50-65	50-65	30 s	60 s	60 s
Elongation	72	72	72	40 s	40s	90 s
Cycle 3						
Abschließender Syntheseschritt	72	72	72	7 min	5 min	5 min

R: Protokoll nach Roche

KS: Protokoll nach ASU L 07.18-1 für KS-Primer

LP: Protokoll nach ASU L 07.18-1 für LP-Primer

* der Temperatur-Gradient war für die alle Protokolle gleich (

Tab. 19)

Tab. 19: Stufen des Temperatur-Gradienten (50-65°C)

Reihe	H	G	F	E	D	C	B	A
Annealing-Temperatur [+ °C]	50,0	51,1	53,0	55,7	59,5	62,3	64,0	65,0

Nach Abschluss der PCR wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Hierfür wurde ein zwei-prozentiges Gel angefertigt. Dazu wurden 0,6 g Agarose (Certified Molecular Biology Agarose, Bio-Rad) in 30 ml 0,5x Puffer (1,5 ml 10x TBE-Puffer (Bio-Rad) ad 30 ml Aqua bidest) gelöst. Das Gemisch wurde für etwa 1 min bis zum Klarwerden in der Mikrowelle erhitzt und anschließend nach kurzem Abkühlen in eine Gelkammer gegossen. Es wurden 15er Kämmen eingesetzt und das Gel wurde bis zum Festwerden in der Kammer belassen. Der Laufpuffer bestand aus 247 ml Aqua bidest. und 13 ml 10x TBE-Puffer.

Es wurden 1 µl Loading Buffer (Bio-Rad) und 4 µl des Reaktionsgemisches vermischt und anschließend 4 µl in die Slots des Gels pipetiert. Von dem Molekulargewichtsmarker EZ load 100 bp PCR Molecular Ruler (Bio-Rad) wurde links und rechts der PCR-Produkte 3 µl in die Slots pipetiert. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung bei 100 V für 40 min. Zur Färbung wurde das Gel unter leichtem Schütteln 15 min in Ethidium-Bromid-Lösung (0,5 µg/ml) (Bio-Rad)

3.2 Sondenmarkierung

belassen und 5 min in bidestilliertem Wasser gewaschen. Es folgte die Darstellung der Ergebnisse im UV-Gerät GelDoc 1000 (Bio-Rad) mit der Quantity One Software (Bio-Rad).

Für das so ausgewählte PCR-Programm (Protokoll für KS-Primer nach ASU L07.18-1, N.N. 2006) (Tab. 18) wurde der optimale Temperaturbereich für das Primerannealing noch weiter eingegrenzt. Hierfür wurde ein Temperaturgradient zwischen +50 und +60°C gewählt (Tab. 20). Die Gelelektrophorese erfolgte wie beschrieben.

Tab. 20: Stufen des Temperatur-Gradienten (50-60°C)

Reihe	H	G	F	E	D	C	B	A
Annealing-Temperatur [+ °C]	50,0	50,8	52,1	53,9	56,6	58,3	59,5	60,0

3.2.1.3. Ermittlung der optimalen Template-Menge

Mittels modifizierter InstaGene-Extraktion (Methode 2) wurden die Anreicherungen der Referenzstämme extrahiert. Zur Ermittlung der optimal einzusetzenden Template-Menge wurden 8 PCR-Ansätze mit unterschiedlichen Template-Mengen verwendet (Tab. 21). Für Ansatz 1, 2 und 3 wurden 1:30-, 1:20- und 1:10-Verdünnungen des Templates angefertigt. Für Ansatz 4 bis 8 wurde das extrahierte Template unverdünnt zugegeben. Die Ausgangskonzentration betrug im Durchschnitt 38 ng/µl. Um ein Reaktionsvolumen von insgesamt 25 µl zu erreichen, wurden je nach Template-Menge das eingesetzte Volumen an molekularbiologischem Wasser variiert. Template und Wasser ergaben damit zusammen eine Menge von 10 µl. Das Gemisch bestand außerdem aus jeweils 2,5 µl Primer (KS-Primer für *stx1*; LP für *stx2*) und 12,5 µl MasterMix 2,5x. Als PCR-Protokoll diente das Protokoll der ASU L07.18-1 (N.N. 2006) für KS-Primer mit einer Annealing-Temperatur von +58 °C (Tab. 22).

3.2 Sondenmarkierung

Tab. 21: Pipettierschema zur Optimierung der einzusetzenden Template-Menge

Komponente	Ansatz							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Verdünnungsstufe Template	1:30	1:20	1:10	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1
H ₂ O [µl]	9,0	9,0	9,0	9,0	8,0	7,0	5,0	2,0
Master Mix [µl]	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
Primer* [µl]	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Template [µl]	1,0	1,0	1,0	1,0	2,0	3,0	6,0	8,0

*= KS- oder LP-Primer

Tab. 22: PCR-Protokoll für die Ermittlung der optimalen Template-Menge

Schritt	Temperatur [+ °C]	Zeit
Cycle 1		
Initiale Denaturierung	94	5 min
Cycle 2 (35x)		
Denaturierung	94	30 s
Annealing	58	60 s
Elongation	72	40 s
Cycle 3		
Abschließender Syntheseschritt	72	5 min

3.2.2. Markierung der Sonde

Nachdem die PCR-Parameter optimiert waren, wurde die extrahierte DNA mit DIG-11-dUTP mittels PCR, laut Angaben des „DIG Application Manual for Filter Hybridization“ (Roche) markiert (N.N. 2000). Hierfür wurden zwei Reaktionsgemische angesetzt (Tab. 23). Ein Ansatz diente dabei der Sonden-Markierung, der zweite Ansatz der Kontrolle einer erfolgreichen Markierung. Mit Hilfe der Konzentrationsangaben wurden die optimalen Mengen der einzelnen Reaktionskomponenten ermittelt. Alle Reaktionsgemische bestanden aus molekularbiologischem Wasser, PCR-Puffer mit MgCl₂ und einer Polymerase von Roche.

3.2 Sondenmarkierung

Tab. 23: Pipettierschema für die PCR zur Sonden-Markierung

	(A) DIG-markierte Sonde	(B) nicht-markierte Kontroll-sonde	End- konzentration
H ₂ O	33,25 µl	33,25 µl	
PCR DIG Probe Synthesis Mix	5,00 µl	-	200 µM dNTPs
PCR-Puffer mit MgCl ₂	5,00 µl	5,00 µl	1x
dNTP stock solution	-	5,00 µl	200 µM dNTPs
Polymerase	0,75 µl	0,75 µl	2,6 U
Primer*	5,00 µl	5,00 µl	0,1-1,0 µM je Primer
Template	1,00 µl	1,00 µl	1-50 ng DNA
Gesamt	50,00 µl	50,00 µl	

*=KS- oder LP-Primer

Das Reaktionsgemisch A diente dem Markieren der Sonde mit DIG-11-dUTP und somit der eigentlichen Herstellung der Sonde. Es wurde der „PCR DIG Probe Synthesis Mix“ (Roche) bestehend aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP sowie DIG-11-dUTP zum Markieren eingesetzt. Es wurden jeweils ein Ansatz für x1 mit KS-Primern und ein Ansatz für x2 mit LP-Primern erstellt. Als Template diente die extrahierte DNA der Referenzstämme x1 und x2.

Reaktionsgemisch B fungierte als Funktions-Kontrolle der PCR. Es wurde statt dem „PCR DIG Probe Synthesis Mix“ die „dNTP Stock Solution“ (Roche) hinzugefügt, welche keine DIG-markierten Nukleotide enthält. Auch hier wurde jeweils ein Ansatz für x1 und x2 erstellt. Primer und Template entsprachen denen in Ansatz A.

Da es sich nicht um eine Hot Start Polymerase handelte, wurden die Komponenten auf Eis in die entsprechenden Gefäße (Mini-Tubes) pipettiert. Die PCR erfolgte im iCycler-Thermocycler (Bio-Rad). Das verwendete Protokoll ist Tab. 22 zu entnehmen. Es erfolgte eine Gelelektrophorese mit anschließender Färbung mit Ethidium-Bromid (siehe Kapitel 3.2.1.2).

3.3 DNA-Kolonie-Hybridisierung

3.3. DNA-Kolonie-Hybridisierung

Als Grundlage zur Durchführung der DNA-Kolonie-Hybridisierung dienten sowohl die Angaben der ASU L07.18-1 (N.N. 2006) als auch das „DIG Application Manual for Filter Hybridization“ (N.N. 2000). Eingesetzt wurde das DIG-System, ein System zur nicht-radioaktiven Markierung und Detektion von Nukleinsäuren. Hierbei bindet die zuvor hergestellte und mit Digoxigenin-markierte Sonde an spezifische DNA-Abschnitte (Ziel-DNA) der gesuchten Bakterien. Durch Zugabe eines Anti-DIG-Antikörpers, welcher an die Ziel-DNA-Sonden-Hybride bindet und an den eine alkalische Phosphatase gekoppelt ist, kommt es zu einer Substrat-Umsetzungsreaktion. Diese indirekte Nachweis-Methode ist an einen Farbstoff gebunden und wodurch die Reaktion sichtbar wird (Kapitel 2.2.2.10). Im Folgenden wird der Ablauf der DNA-Kolonie-Hybridisierung wie sie im Rahmen der Etablierung des Verfahrens durchgeführt wurde, beschrieben. Bis zum Erhalt der Ergebnisse müssen insgesamt vier Tage eingeplant werden. Die ersten beiden Tage sind für die Vorbereitung der einzusetzenden Agar-Platte aufzuwenden. Die Dauer der DNA-Kolonie-Hybridisierung an Tag 3 und 4 berechnet sich auf 4 bis 5 bzw. 3 bis 4 h, abhängig von der Menge der zu hybridisierenden Membranen.

Tag 1-2

Inkubation

Kolonien der Referenzstämmen wurden in ein Anreicherungs-nährmedium überführt und nach 16 h Inkubation bei +37 °C wurde eine Verdünnungsreihe angefertigt. 100 µl einer geeigneten Verdünnung wurden anschließend auf einer Agarplatte ausgespatelt und die Platte über Nacht bei +37 °C inkubiert. Zum Nachweis von *stx* mittels DNA-Kolonie-Hybridisierung wurden im Rahmen der Etablierung drei verschiedene Agars getestet (Abb. 3). Zum einen wurde der bereits in den Vorversuchen verwendete nicht-selektive PCA eingesetzt. Zum anderen kamen zwei selektive Agars zum Einsatz: MAC-Agar nach ASU L07.18-1 (N.N. 2006) und ECD mit MUG. Um auf den Agars verwendbare Einzelkolonien zu erhalten, wurde die über-Nacht-Anreicherung (ca. 10^{10} KbE/ml) der Referenzstämmen x1 und x2 entsprechend verdünnt (ca. 10^3 KbE/ml) und 100 µl jeweils im Vierfach-Ansatz auf PCA, MAC-Agar und ECD ausgespatelt und für 24 h bei 37 °C inkubiert.

3.3 DNA-Kolonie-Hybridisierung

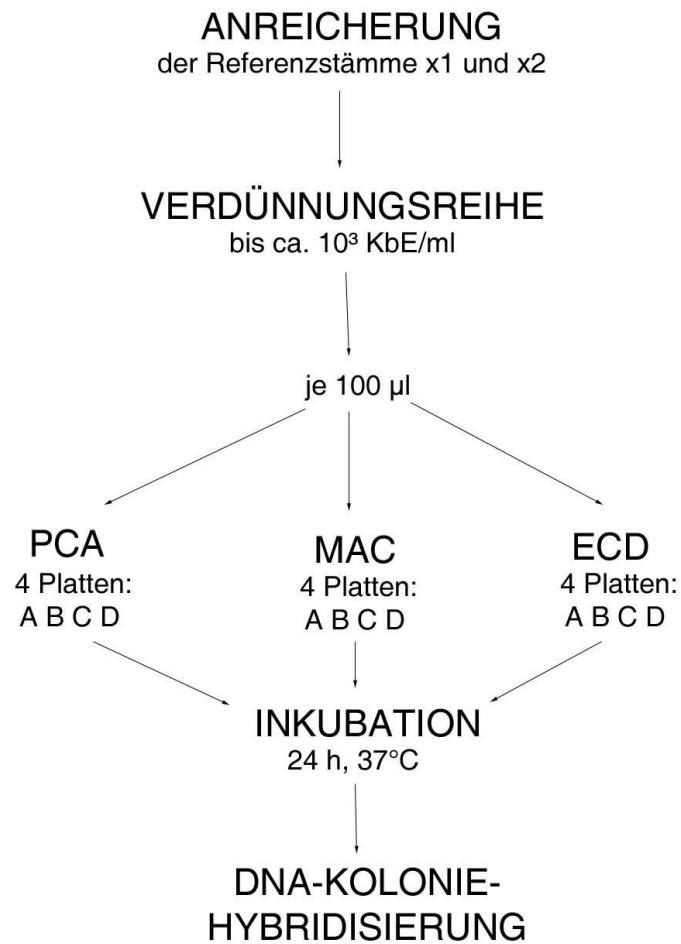


Abb. 3: Versuchsablauf zum Agar-Test

x1= *stx1*-positiver Referenzstamm
x2= *stx2*-positiver Referenzstamm

Die auf den Platten gewachsenen Kolonien wurden mittels Klarsichtfolie gezählt, welche später zur Auswertung der Membran-Signale herangezogen wurde (Abb. 4).

3.3 DNA-Kolonie-Hybridisierung

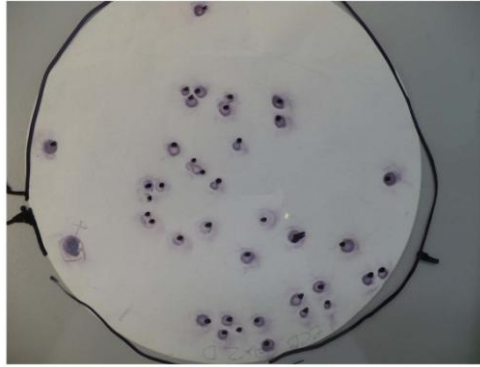


Abb. 4: Beispiel für die Übereinstimmung der Folienschablone und der gefärbten Membran

Tag 3

Membran auf Agar

Platten, auf denen gut abgesetzten Einzelkolonien gewachsen waren, wurden für ca. 30 min (teilweise über Nacht) bei +7 °C gekühlt. Zwischenzeitlich wurde ein zugeschnittener Whatman-Filter auf dem Arbeitsplatz ausgelegt. Runde Nylon-Membranen wurden mit der Pinzette vorsichtig fixiert und am Rand an drei Stellen zur späteren Orientierung markiert. Auf die gekühlten Platten wurde nun blasenfrei die Nylon-Membran gelegt (Abb. 5).

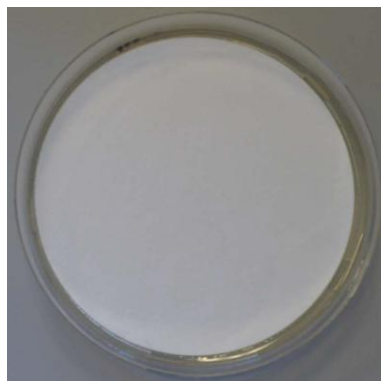


Abb. 5: Nylon-Membran auf einem bewachsenen Agar

Die drei Markierungen der Membran wurden auf die Plattenunterseite übertragen. Nach 1-2 min wurde die Membran vom Agar abgezogen und mit der Kolonienseite

3.3 DNA-Kolonie-Hybridisierung

nach oben auf den Whatman-Filter abgelegt (Abb. 6). Für die Positivkontrolle wurde ein „+“ auf der Membran aufgezeichnet und der entsprechende Referenzstamm (x1 oder x2) daneben aufgetragen. Die Agarplatten (Mutterplatten) wurden für weitere 6 h zur späteren Subkultivierung in den Brutschrank gelegt.

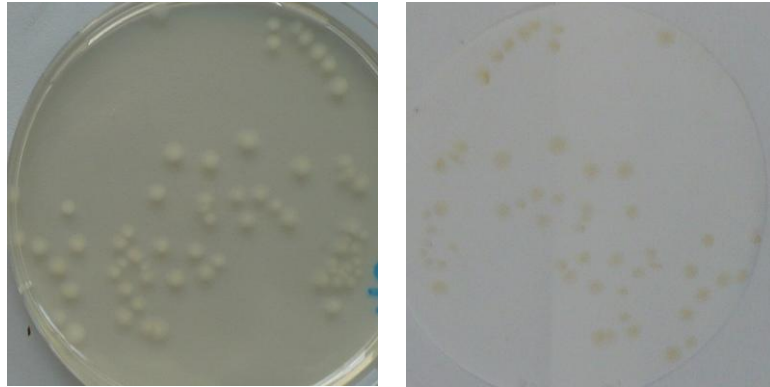


Abb. 6: Abklatsch der Kolonien vom Agar auf die Membran

Lyse, Denaturierung und Fixation

Die Lyse der Bakterien zum Zweck der Freilegung der DNA erfolgte mittels Denaturierungs-, Neutralisierungs- und Äquilibrierungslösung. Diese wurden wie im Anhang beschrieben hergestellt (Kapitel 9.3).

Whatman-Filterpapier wurde erneut zugeschnitten, in eine Plastikschiene gelegt und für jede Membran mit 5 ml (Roche: 1 ml) Denaturierungslösung getränkt. Die Membranen wurden mit der Kolonien-seite nach oben auf den Filter gelegt und 15 min dort belassen. Anschließend folgte eine Trocknung für 5 min auf frischem Filterpapier.

Auf einen neuen Whatman-Filter wurde je Membran 5 ml (Roche 1 ml) Neutralisierungslösung aufgetragen. Die Membranen wurden auf diesem abermals 15 min inkubiert und zur anschließenden Trocknung 5 min auf frisches Filterpapier gelegt.

Im Folgeschritt wurden die Membranen 10 min in eine Plastikschiene gelegt, die je Membran 40 ml Äquilibrierungslösung (20x SSC) enthielt und bei 450 rpm auf dem Rüttler bei RT inkubiert. Nach diesem Schritt konnten die Membranen auch

3.3 DNA-Kolonie-Hybridisierung

übereinander gelegt werden. Es folgte abermals ein 5-minütiges Trocknen auf frischem Filterpapier.

Jede Membran wurde nun einzeln in eine sterile Petrischale gegeben. Diese wiederum wurde in eine sterile Plastiktüte gelegt und 30 bis 60 min bei +80 °C im Hybridisierungssofen gebacken. Dies diente der Fixierung der DNA auf der Membran.

Entfernen der Zellreste

Proteinase K (>600 mAU/ml; Qiagen) wurde 1:10 mit 2x SSC verdünnt. Die aus dem Hybridisierungssofen entnommenen Membranen wurden einzeln in neue Petrischalen gegeben. Auf jede Membran wurde 800 µl (Roche 500 µl) verdünnte Proteinase K-Lösung aufgetropft. Die Schalen wurden 1 h bei +37 °C im Hybridisierungssofen inkubiert.

Im Anschluss wurden die Zellreste auf den Membranen entfernt. Dazu wurden die Membranen auf frisches Filterpapier gelegt und mit einem *A. bidest.* benetzten Filterpapier bedeckt. Ein Reagenzglas wurde gleichmäßig unter leichtem Druck über die Membranen gerollt. Das Filterpapier wurde vorsichtig abgezogen. Sofern noch Zellreste vorhanden waren, wurde der Vorgang wiederholt. Alternativ wurden für die Etablierung weitere Möglichkeiten der Entfernung der Zellreste untersucht. Statt mit einem Reagenzglas wurde die mit Filterpapier bedeckte Membran mit einem Spatel bzw. einem Lineal abgefahren. Zudem wurde versucht, Zellreste mit einem mit *A. bidest.* befeuchteten Tupfer direkt zu entfernen.

Prähybridisierung

Im Anschluss erfolgte die Prähybridisierung. Sie diente der Absättigung unspezifischer Bindungen und der Einstellung eines optimalen pH-Wertes um die spätere Sondenbindung zu gewährleisten. Die Membranen wurden mit einer sterilen Pinzette mit der Kolonieseite nach innen in ein Hybridisierungsröhrchen (Schott, Mainz, Deutschland) gegeben. Je Röhrchen wurden 20 ml Hybridisierungs-Lösung hinzugegeben. Die Prähybridisierung erfolgte für 1 h bei +68 °C (Roche: +42 °C) im Hybridisierungssofen (Abb. 7).

3.3 DNA-Kolonie-Hybridisierung



Abb. 7: Hybridisierungssofen

Hybridisierung

Die zuvor hergestellte Sonde wurde 5 min bei +99 °C im Heizblock denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Es folgte die Zugabe von auf die Hybridisierungstemperatur vorgewärmter „DIG Easy Hyb“-Hybridisierungslösung. Das Mischverhältnis betrug dabei 2 µl Sonde pro 1 ml Hybridisierungslösung. War die Sonde bereits mit Hybridisierungslösung gemischt, erfolgte ein 3-minütiges Kochen des Sonden-Hybridisierungslösung-Gemisches (Roche: 5 min bei +68 °C) und sofortiges Kühlen auf Eis.

Die Hybridisierungsröhrchen wurden aus dem Ofen genommen und die Hybridisierungslösung entfernt. Je Röhrchen wurden nun 2 ml des Sonde-Hybridisierungslösung-Gemisches hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation über Nacht im Hybridisierungssofen bei +60 °C (Roche: +42 °C).

Tag 4

Waschschritte

Die Hybridisierungsröhrchen wurden aus dem Ofen genommen und die Sonden wurden in je zwei 1,5 ml Tubes (Eppendorf) aufgefangen und zur späteren Wiederverwendung bei -20 °C aufbewahrt. Die Membranen wurden mit einer sterilen Pinzette aus den Hybridisierungsröhrchen genommen und in einer Plastikschaale bei RT auf einem Rüttler für zweimal 5 min in jeweils 20 ml „Low Stringency Buffer“ gewaschen. Dieser Schritt diente der Entfernung nicht-spezifisch gebundener Sonde.

3.3 DNA-Kolonie-Hybridisierung

Während dessen wurde in Hybridisierungsröhrchen je 40 ml „High Stringency Buffer“ auf +60 °C (Roche +68 °C) vorgewärmt. Nach Abschluss der Waschschrirte mit „Low Stringency Buffer“ wurden die Membranen in die Röhrchen eingefügt und zweimal 15 min bei +60 °C (Roche: +68 °C) mit dem „High Stringency Buffer“ im Hybridisierungsofen gewaschen. Hierbei sollten Basenpaarungen, bei welchen die Homologie zwischen der Sonde und der DNA weniger als 95% betrug, entfernt werden.

Detektion

Die folgenden Schritte erfolgten bei RT auf dem Rüttler bei 450 rpm. Die Membranen wurden für 1-5 min in je 50 ml (Roche: 100 ml) Waschpuffer gewaschen. Es folgte eine Inkubation für 30 min in je 40 ml 1x Blockinglösung. Das Blocken der Membran diente der Verhinderung unspezifischer Interaktionen der Anti-DIG-AP-Konjugat mit der Membran.

Das Anti-DIG-AP-Konjugat (750 U/ml) wurde anschließend für 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Pro Membran wurden 3 µl mit 15 ml 1x Blockinglösung verdünnt. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei RT.

Im Anschluss an die Inkubation wurden die Membranen zweimal je 15 min in je 40 ml Waschpuffer gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Es folgte die Äquibrierung der Membran in 20 ml Detektionspuffer für 2 min zur Einstellung des pH-Wertes auf 9,5.

Für die Färbung wurden pro Membran 80 µl einer NBT/BCIP-Stammlösung mit 4 ml (Roche: 200 µl in 10 ml) Detektionspuffer gemischt. Für die Farbreaktion wurden 4 ml (Roche: 10 ml) dieser Färbelösung in sterile Petrischalen gegeben und die Membranen darin im Dunkeln 2-5 h gefärbt (Abb. 8).

3.3 DNA-Kolonie-Hybridisierung



Abb. 8: Inkubation während der Färbereaktion im Dunkeln

Nach Sichtbarwerden einer deutlichen Färbung (ca. 2-3 h) wurden die Membranen zum Stoppen der Reaktion für 5 min in je 50 ml TE-Puffer bei RT und 450 rpm gewaschen. Es folgte die Trocknung der Membranen auf Filterpapier.

Auswertung der Kolonieblots

Nach Ablauf der Hybridisierung wurden die deutlich positiven, fraglich positiven sowie negativen Signale auf der Membran im Vergleich mit der Zähl-Schablone bestimmt. Als positiv wurden lila-farbene Kolonienabdrücke beurteilt (Abb. 9). Deutlich und fraglich Positive wurden durch den Abgleich mit der Signalstärke der Postitivkontrolle unterschieden. Da die Membran einen kleineren Durchmesser als der Agar aufweist, wurden am Rand gewachsene Kolonien beim Transfer nicht erfasst und somit bei der Zählung nicht berücksichtigt. Grau-gelbe Kolonien bedeuteten hingegen ein negatives Ergebnis. Die Membranen wurden dunkel und trocken bei RT zu Dokumentationszwecken aufbewahrt. Lichteinwirkung führt zur kompletten Verfärbung der Membranen.

3.4 Validierung der Kolonie-Hybridisierung

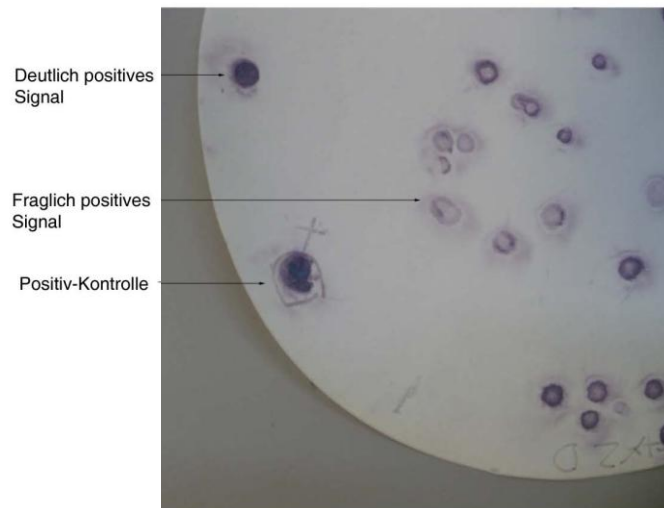


Abb. 9: Bewertung der Signal-Intensität

Subkultivierung

Nach 6 h abermaliger Inkubation der Mutterplatten wurden diese bis zum Abschluss des Blots bei +7 °C aufbewahrt. Positive Signale auf der Membran wurden den jeweiligen ursprünglichen Kolonien auf der Agar-Platte zugeordnet. Als positiv identifizierte Einzelkolonien wurden mit einer sterilen Öse abgenommen und auf einem neuen Agar ausgestrichen und bebrütet. Auf diese Weise subkultivierte Keime konnten Bestätigungsreaktionen zugeführt werden.

3.4. Validierung der Kolonie-Hybridisierung

Für die Validierung der Methode wurden die selbst-hergestellten Lösungen eingesetzt. Die DNA-Kolonie-Hybridisierung wurde in modifizierter Form gemäß der Angaben der ASU L07.18-1 (N.N. 2006) durchgeführt. Die Validierung gliederte sich in mehrere Teile. Die ersten beiden Teile bestanden aus einem Inklusivitäts- und Exklusivitätsversuch, um die spezifische Bindung der Sonden an *stx1*- bzw. *stx2*-Gensequenzen zu untersuchen. Des Weiteren wurde getestet, inwieweit sich *stx1*- und *stx2*-positive *E. coli* gegenseitig im Wachstum hemmen. Zuletzt sollte die Nachweisgrenze des Verfahrens ermittelt werden.

3.4 Validierung der Kolonie-Hybridisierung

3.4.1. Exklusivitätstest

Um die Exklusivität der DNA-Kolonie-Hybridisierung zu testen, wurden 15 „Nicht-Zielkeime“ sowie die nachzuweisenden Zielkeime (x1 bzw. x2) eingesetzt (Tab. 24). Es sollte überprüft werden, ob die Sonden spezifisch nur an *stx*-Gene binden und nicht an DNA-Sequenzen anderer Mikroorganismen. Die Bakterien wurden mit üblichen Methoden angezchtet. Um eine spätere Identifizierung auf der Membran zu ermöglichen, wurden sie mit fortlaufenden Nummern versehen. Bei Nummer 1 bis 10 handelte es sich um Bakterien-Stämme mit DSM-Nummern (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH). 11 und 12 waren die *stx1*- und *stx2*-positiven *E. coli* Referenzstämme x1 und x2 (Kapitel 3.1.1). Die letzten vier Stämme, versehen mit den Nummern 13 bis 16, waren bestätigte Isolate aus Proben des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs (LmHyg).

3.4 Validierung der Kolonie-Hybridisierung

Tab. 24: Bakterien-Stämme für den Exklusivitätstest

Nr.	Stamm	Nährboden	Bebrütung
1	<i>Aeromonas hydrophila</i> DSM 30016	Blutplatte	24 h, +30 °C, aerob
2	<i>Citrobacter freundii</i> DSM 30039	PCA	24 h, +30 °C, aerob
3	<i>Enterobacter cloacae</i> DSM 30054	Blutplatte	24 h, +37 °C, aerob
4	<i>E. coli</i> DSM 787	ECD	24 h, +42 °C, aerob
5	<i>Proteus mirabilis</i> DSM 788	Blutplatte	24 h, +42 °C, aerob
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 939	PS	24 h, +25 °C, aerob
7	<i>Salmonella typhimurium</i> DSM 554	BPLS	24 h, +37 °C, aerob
8	<i>Shigella sonnei</i> DSM 5570	Blutplatte	24 h, +42 °C, aerob
9	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 799	BP	24 h, +37 °C, aerob
10	<i>Streptococcus agalactiae</i> DSM 6784	Blutplatte	24 h, +37 °C, aerob
11	<i>E. coli</i> C600 J1, <i>stx1</i> -positiv BgVV (x1)	PCA	24 h, +37 °C, aerob
12	<i>E. coli</i> C600 W34, <i>stx2</i> -positiv BgVV (x2)	PCA	24 h, +37 °C, aerob
13	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> LmHyg	CIN	20 h, +30 °C, aerob
14	<i>Camphylobacter jejuni</i> LmHyg	mCCDA	48 h, + 37 °C, microaerophil
15	<i>Camphylobacter coli</i> LmHyg	mCCDA	48 h, + 37 °C, microaerophil
16	<i>E. coli</i> LmHyg	ECD	24 h, +42 °C, aerob

BP= Baird-Parker

BPLS= Brilliantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose

CIN= Cefsulodin-Igrasan-Novobiocin

mCCDA= modifiziert Charcoal-Cefoperazone-Desoxychylate

PS= Pseudomonas

Für die Untersuchung der Exklusivität wurden zwei Membranen mittels Bleistift-Markierungen in 16 Felder eingeteilt. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde Kolonienmaterial von der jeweiligen Agar-Platte abgenommen und je Feld an drei

3.4 Validierung der Kolonie-Hybridisierung

Stellen aufgetragen. Anschließend wurden die Membranen mit der *stx1*- bzw. *stx2*-Sonde hybridisiert.

3.4.2. Inklusivitätstest

Für die Untersuchung der Inklusivität der Methode wurden *E. coli*-Isolate aus Tonsillen und Kotproben kleine Wiederkäuer eingesetzt. Von diesen Isolaten wurde Kolonienmaterial von der Platte abgenommen und in einer PCR mit den KS- und LP-Primern der ASU L07.18-1 (N.N. 2006) (Tab. 10) getestet. Die Extraktion der Template-DNA erfolgte durch Zugabe von Kolonienmaterial zu 100 µl molekularbiologischem Wasser und 10-minütigem Kochen mit anschließender Zentrifugation für eine Minute. PCR-Protokoll, Pipettierschema (Kapitel 3.2.1.3) und Gelelektrophorese (Kapitel 3.2.1.2) entsprachen den Vorversuchen.

In der PCR mit den KS- bzw. LP-Primern (*stx1* bzw. *stx2*) positive Isolate wurden für den Inklusivitätstest eingesetzt. Hierfür wurden wie beim Exklusivitätstest bereits beschrieben Membranen in entsprechend viele Felder eingeteilt und Kolonienmaterial von den Agarplatten mit einer sterilen Pipettenenspitze in die Felder aufgetragen. Es wurde pro Isolat und Feld an 4 Stellen Material aufgetragen. Zudem wurde in einem Feld Kolonienmaterial des jeweiligen Referenzstammes aufgetragen, dieses diente als Positivkontrolle. Die Membranen wurden anschließend mit der entsprechenden Sonde hybridisiert.

3.4.3. Inhibitionsversuch

Um zu untersuchen, ob sich die Referenzstämme x1 und x2 gegenseitig im Wachstum hemmen, wurde ein Inhibitionsversuch durchgeführt (Abb. 10). Hierfür wurden abermals 5 Kolonien wie bereits beschrieben über Nacht angereichert. Anschließend wurde für beide Stämme eine Verdünnungsreihe angefertigt. Um verschiedene Mengen-Verhältnisse beider Keime auf einer Platte zu erhalten, wurden die Keime in 3 unterschiedlichen Verhältnissen gemischt. Die Konzentration sollte jeweils insgesamt bei ca. 10^3 KbE/ml liegen. In Röhrchen „X“ wurde x1 und x2 zu gleichen Teilen gemischt. In „Y“ sollte verhältnismäßig (ca. 1:5) weniger x1 als x2 vorhanden sein. Bei „Z“ waren die Verhältnisse umgekehrt, hier überwog x1 gegenüber x2 (5:1). Es wurden jeweils 100 µl der „X“, „Y“ und „Z“-Röhrchen auf PCA ausgespatelt und über Nacht bei +37 °C bebrütet.

3.4 Validierung der Kolonie-Hybridisierung

Nach der Bebrütung wurden die Kolonien gezählt und die Membranen analog Kapitel 3.3 mittels DNA-Kolonie-Hybridisierung untersucht. Jeweils eine Membran des Doppelansatzes wurde mit der *stx1*-Sonde und eine mit der *stx2*-Sonde hybridisiert.

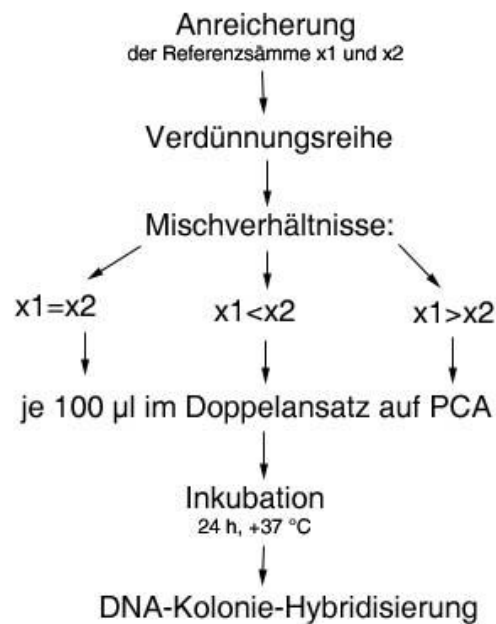


Abb. 10: Ablaufschema des Inhibitionsversuchs

x1= *stx1*-positiver Referenzstamm
x2= *stx2*-positiver Referenzstamm

3.4.4. Bestimmung der Nachweisgrenze

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze der DNA-Kolonie-Hybridisierung in Anlehnung an die ASU L07.18-1 (N.N. 2006) von STEC in Hackfleisch wurde Probenmaterial mit den Referenzstämmen beimpft und anschließend mittels DNA-Kolonie-Hybridisierung untersucht (Abb. 11). Als Untersuchungsmaterial dienten zwei Rinderhackfleischproben aus dem Probenaufkommen des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs. Die Proben wurden bis zur Verwendung für die DNA-Kolonie-Hybridisierung bei -20 °C tiefgefroren. Sie wurden vor dem Einsatz mittels PCR auf eine eventuelle natürliche Kontamination mit STEC untersucht. Die PCR mit anschließender Gelelektrophorese und Ethidium-Bromid-

3.4 Validierung der Kolonie-Hybridisierung

Färbung wurde wie bereits in den Vorversuchen zur Sonden-Markierung durchgeführt (Kapitel 3.2.1.2). Desweiteren wurde im Routinelabor die Gesamtkeimzahl und der Gehalt an *Enterobacteriaceae* sowie *E. coli* bestimmt.

Für die Beimpfung der Proben wurden die Referenzstämme wie bereits zuvor über Nacht angereichert und eine Verdünnungsreihe angefertigt. Es wurden 3 Beimpfungskonzentrationen gewählt, welche im niedrigen, mittleren und hohen Bereich liegen sollten. Für das Spiken wurde aufgrund dessen die 10^{-6} -, 10^{-8} - und 10^{-10} -Verdünnung der Übernachtenreicherung herangezogen. Je 1 ml dieser Verdünnungen wurde zu je 10 g des Probenmaterials gegeben und für 1 min im Stomacher homogenisiert. Die Beimpfung erfolgte getrennt für x1 und x2. Zudem wurde eine Negativkontrolle mit 1 ml unbeimpfter Pepton-Lösung angesetzt.

Die sechs beimpften und die eine unbeimpfte Probe wurden anschließend zu 90 ml modifiziertes Casein-Sojamehl-Pepton (mCASO) mit Novobiocin gegeben und abermals 1 min homogenisiert. Diese **Voranreicherung** wurde 5 h bei RT unter Rütteln inkubiert.

Im Anschluss an die Inkubation bei RT wurde jeweils 1 ml der Voranreicherung zu 4 ml Anreicherungsmedium (mCASO ohne Novobiocin) gegeben. Die **Anreicherung** wurde für 16 bis 18 h bei +37 °C im Wasserbad bebrütet. Die Voranreicherungen wurden bis zum nächsten Tag bei +6 °C gelagert.

Am Folgetag wurde das vorangereicherte bzw. angereicherte Probenmaterial auf dem Selektivagar ECD ausgespatelt. Von der Voranreicherung wurde hierfür direkt 100 µl auf dem Agar ausplattiert. Die Anreicherung musste vor dem Ausspateln verdünnt werden. Die Verdünnung erfolgte in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS). Die Verdünnungskonzentrationen betragen 1:10, 1:50, $1:10^3$, $1:10^4$ und 10^5 . Hiervon wurden ebenfalls je 100 µl auf ECD aufgebracht.

Die Platten wurden im Brutschrank über Nacht bei +42 °C inkubiert. Für die DNA-Kolonie-Hybridisierung wurden mit Einzelkolonien gut bewachsene Platten gewählt. Waren weniger als 8 Kolonien gewachsen, konnten die Kolonien mehrerer Platten nummeriert und mit einer sterilen Pipettenspitze auf eine Membran übertragen werden. Die DNA-Kolonie-Hybridisierung erfolgte wie bereits beschrieben (Kapitel 3.3)

3.4 Validierung der Kolonie-Hybridisierung

Zudem wurde die Indol-Reaktion getestet, indem ein Tropfen Indol-Reagenz auf die Platten gegeben wurde. Eine Rotfärbung der Kolonien zeigt eine positive Indol-Reaktion an und ist ein Indiz dafür, dass es sich bei den Keimen um *E. coli*-Stämme handelt.

Die Mutterplatten wurden nach dem Kolonien-Transfer zur erneuten Bebrütung für 6 h bei +42 °C in den Brutschrank gelegt. Sie dienen der späteren Subkultivierung.

3.4 Validierung der Kolonie-Hybridisierung



Abb. 11: Vorgehensweise zur Bestimmung der Nachweisgrenze

x1= *stx1*-positiver Referenzstamm
x2= *stx2*-positiver Referenzstamm

3.4.4.1. Vorversuche zur Nachweisgrenze

Die Vorversuche zur Nachweisgrenze dienten dazu, das Wachstum der Keime in der Voranreicherung und Anreicherung genauer zu bestimmen. Es wurden 100 µl der Voranreicherung sowie 100 µl der verdünnten Anreicherung (1:10, 1:50, 1:10⁻³, 1:10⁻⁴) des Probenmaterials auf ECD ausgespatelt und inkubiert. Das Kolonien-Wachstum auf den Platten wurde am nächsten Tag beurteilt. Für die DNA-Kolonie-Hybridisierung wurden geeignete Platten ausgewählt.

3.4 Validierung der Kolonie-Hybridisierung

3.4.4.2. Hauptversuch zur Nachweisgrenze

Für den Versuch der Nachweisgrenze wurde eine Hackfleischprobe wie beschrieben mit den Referenzstämmen gespikt. Von den für die Beimpfung verwendeten Verdünnungsstufen wurden zur Beurteilung der Ausgangskonzentration jeweils 100 µl im Doppelansatz auf PCA ausgespatelt und die Platten bei +37 °C über Nacht bebrütet.

Das beimpfte Probenmaterial wurde anschließend vorangereichert und angereichert. Eine unbeimpfte Probe wurde ebenfalls mitgeführt. 100 µl der Voranreicherung und 100 µl der verdünnten Anreicherung ($1:10^{-4}$, $1:10^{-5}$) wurden auf ECD aufgebracht und inkubiert. Das Ausplattieren des vorangereicherten und verdünnten angereicherten Probenmaterials wurde von zwei Personen parallel durchgeführt, ebenso wie die spätere DNA-Kolonie-Hybridisierung.

Von der Anreicherung wurde eine PCR mit den KS- und LP-Primern durchgeführt. Dazu wurden als Extraktionsmethoden zum einen die Methode der ASU L07.18-1 (N.N. 2006) sowie die modifizierte InstaGene-Extraktionsmethode im Vergleich eingesetzt (Kapitel 3.2.1.1). Das Pipettierschema für die PCR, das Protokoll, die Gelelektrophorese sowie die Ethidium-Bromid-Färbung sind in Kapitel 3.2.1.2 beschrieben.

Nach der Bebrütung der Platten wurden geeignete Platten hybridisiert. Die Mutterplatten wurden nach dem Kolonien-Transfer für weitere 6 h bei +42 °C inkubiert und Kolonien die auf der Membran ein positives Hybridisierungs-Signal ergaben wurden später von der Platte subkultiviert und in einer weiteren PCR-Reaktion bestätigt.

4. Ergebnisse

4.1. Markierung der Sonde

Die Sonde wurde durch die Inkorporation von DIG während einer PCR-Reaktion markiert. Um den Ablauf der Markierungs-Reaktion optimal zu gestalten, erfolgte in mehreren Schritten eine Anpassung der für die PCR relevanten Parameter. Die Vorversuche für die Markierungs-Reaktion dienten dazu, eine Extraktionsmethode für die Gewinnung der Template-DNA, ein geeignetes PCR-Protokoll und eine optimale Annealing-Temperatur zu finden. Zudem wurde bestimmt, welche Template-Menge für die Markierungs-Reaktion optimal ist.

4.1.1. Auswahl der DNA-Extraktionsmethode

Aus vier verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden sollte ein geeignetes Verfahren ermittelt werden. Der Vergleich dieser Extraktionsmethoden sollte als ein Anhaltspunkt dienen, um für die spätere Sondenherstellung die DNA-Menge grob abschätzen zu können. Für diese sollten optimalerweise 10-50 ng DNA pro Reaktionsgemisch als Template hinzugefügt werden (N.N. 2000). Daher sollte der DNA-Gehalt der Extraktionen 10 ng/µl nicht unterschreiten.

Gemessen gegen den Leerwert von molekularbiologischem Wasser erhielt man mit Hilfe des Bio-Photometers (Eppendorf) für DNA-Extraktionsmethode 1 Werte zwischen 60 und 70 ng/µl. Im Durchschnitt lag der Wert bei 68,5 ng/µl. Methode 2 lieferte durchschnittliche Werte von 38,3 ng/µl. Extraktionsmethode 3 ergab DNA-Mengen von 14,5 ng/µl. Die DNA-Ausbeute mit Methode 4 war mit durchschnittlich 197 ng/µl wesentlich höher (Tab. 25).

Tab. 25: Durchschnittlich gemessene DNA-Extraktionswerte

Methode	InstaGene	InstaGene mod.	in-house Kochmethode	ASU L07.18-1
gegen H ₂ O	69 ng/µl	38 ng/µl	15 ng/µl	197 ng/µl

4.1 Markierung der Sonde

Die Werte der InstaGene-Extraktionen lagen im mittleren Bereich und schienen daher für die Sonden-Markierung geeignet. Nachdem die modifizierte Methode mit durchschnittlich 38 ng/µl Aubeute genau im optimalen Bereich für die Sonden-Markierung lag und aufgrund der reduzierten Volumina Kosten reduziert werden können, wurde diese Methode für das weitere Vorgehen gewählt. Bei der in-house Kochmethode war die DNA-Ausbeute gering, was die Gefahr barg, unter die Vorgaben von 10 ng zu fallen. Die Methode nach ASU L07.18-1 konnte dagegen sehr viel extrahiert werden, was einen zusätzlichen Verdünnungsschritt erforderlich machen würde um auf die Vorgaben von 10 bis 50 ng zu kommen.

4.1.2. Annealing-Temperatur und PCR-Protokoll

Um die optimale Annealing-Temperatur zu bestimmen, wurden PCRs mit einem Temperatur-Gradienten für die Annealing-Phase zwischen +50 und 65 °C durchgeführt. Die Thermocycler-Software legte die dazwischen liegenden Temperaturwerte selbstständig fest. Drei Protokolle wurden vergleichend für die PCR eingesetzt. Die Ergebnisse der Gelelektrophorese zu den PCR-Gradienten können Abb. 12 und Abb. 13 entnommen werden. Rechts und links der Reaktionsgemische wurden Molekulargewichtsmarker, deren Banden jeweils 100 bp Abstand darstellen, in die Slots pipettiert. Als deutlich und somit Indiz für eine optimale Annealing-Temperatur wurden Banden beurteilt, welche sich intensiv und scharf vom schwarzen Hintergrund abzeichneten. Für x1 waren Banden mit einer Größe von 282 bp, für x2 mit 585 bp zu erwarten. Eindeutig positive Banden waren demnach für x1 mit den KS-Primern zwischen +50,0 und +59,5 °C für das Protokoll „KS“ nach ASU L07.18-1 (N.N. 2006) (Tab. 18) und zwischen +51,1°C und +55,7 °C für die beiden anderen Protokolle (Protokoll „LP“ nach ASU L07.18-1 (N.N. 2006), Protokoll „R“ nach Roche). x2 mit den LP-Primer lieferte deutliche Banden zwischen +50,0°C und +64,0 °C für die ASU L07.18-1 Protokolle und zwischen +50,0°C und +59,5 °C für das Roche Protokoll.

4.1 Markierung der Sonde

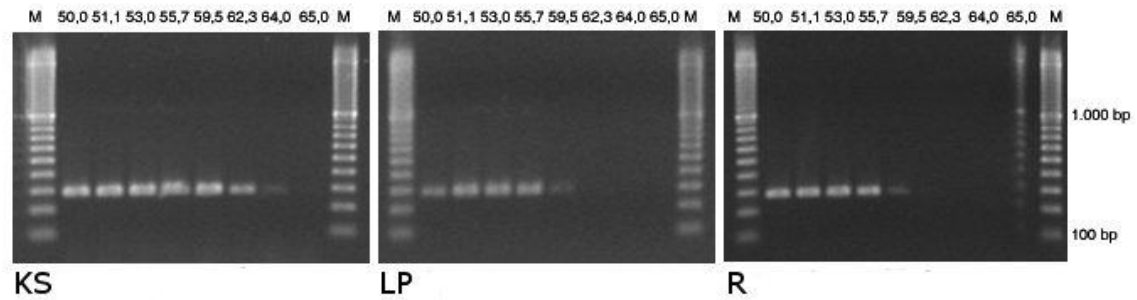


Abb. 12: x1-PCR-Ergebnis mit KS-Primern (3 verschiedene Protokolle, verschiedene Annealing-Temperaturen [+ °C])

M: Molekulargewichtsmarker

KS: Protokoll nach ASU L 07.18-1 (N.N. 2006) für KS-Primer

LP: Protokoll nach ASU L 07.18-1 (N.N. 2006) für LP-Primer

R: Protokoll nach Roche

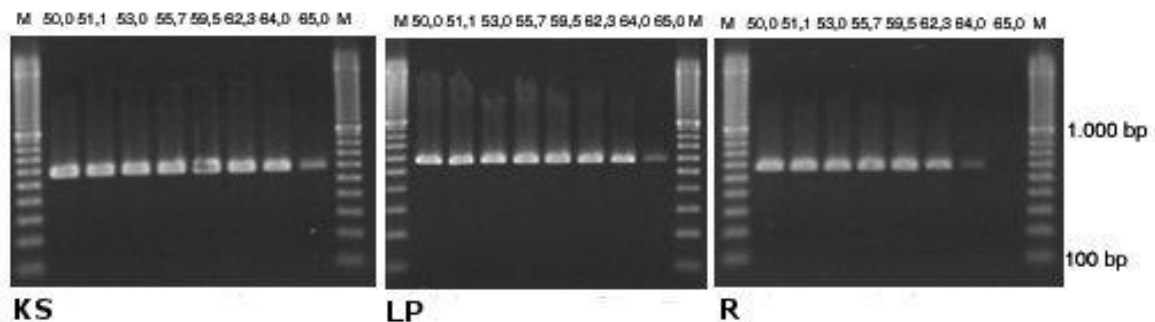


Abb. 13: x2-PCR-Ergebnis mit LP-Primern (3 verschiedene Protokolle, verschiedene Annealing-Temperaturen [+ °C])

M: Molekulargewichtsmarker

KS: Protokoll nach ASU L 07.18-1 (N.N. 2006) für KS-Primer

LP: Protokoll nach ASU L 07.18-1 (N.N. 2006) für LP-Primer

R: Protokoll nach Roche

Die KS-Primer zeigten im Gel mit dem Protokoll der ASU L07.18-1 (N.N. 2006) für KS-Primer (KS-Protokoll) die meisten positiven Banden mit den unterschiedlichen Annealing-Temperaturen. Für das weitere Vorgehen wurde demnach das Protokoll dieses Protokoll verwendet, da die LP-Primer in allen drei Protokollen bei nahezu allen Annealing-Temperaturen gleich gut reagierten.

4.1 Markierung der Sonde

Zur näheren Bestimmung der Annealing-Temperatur bei Verwendung des „KS“-Protokolls für beide Primer wurde die PCR mit einem Gradienten zwischen +50 und +60 °C durchgeführt. Die Ergebnisse der PCR sind im Gel (Abb. 14) zu sehen. Die KS-Primer wiesen zwischen +50,8 und +58,3 °C deutliche Banden auf. Die Banden der LP-Primer waren bei allen Annealing-Temperaturen deutlich zu erkennen.

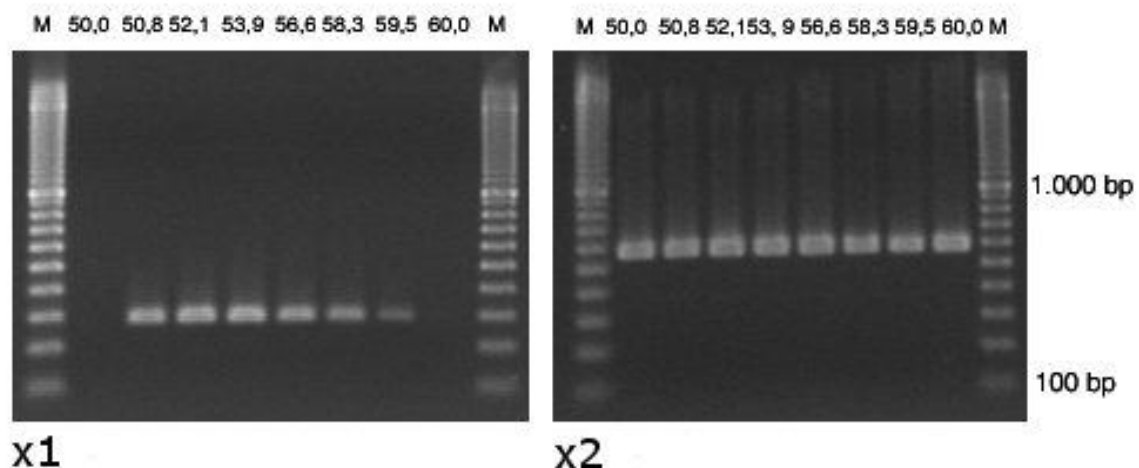


Abb. 14: x1- und x2-PCR-Ergebnis mit dem KS-Protokoll (verschiedene Annealing-Temperaturen [+°C])

M: Molekulargewichtsmarker
x1= *stx1*-positiver Referenzstamm mit KS-Primern
x2= *stx2*-positiver Referenzstamm mit LP-Primern

Für die folgenden PCRs sollte eine gemeinsame Annealing-Temperatur für beide Primer gewählt werden, bei welcher diese spezifisch an das DNA-Template binden. Aufgründdessen sollte die Temperatur möglichst hoch sein. Für die folgenden PCRs wurde eine Annealing-Temperatur von +58 °C eingesetzt.

4.1.3. Ermittlung der optimalen Template-Menge

Um die optimale Template-Menge zu ermitteln, wurde mit Zugabe acht verschiedener Volumina zum Reaktionsgemisch gearbeitet. Die Extraktion der DNA erfolgte mit der modifizierten InstaGene-Methode (Methode 2, Kapitel 3.2.1.1). Die Ausgangskonzentration lag gemäß der photometrischen Ermittlung im Durchschnitt bei 38 ng/μl. Deutliche Banden konnten für die KS-Primer mit allen unverdünnten Templaten ermittelt werden. Mit den LP-Primern konnten für alle Template-Mengen gute Banden erzielt werden (Abb. 15). Da für die Sonden-Markierung nach Roche

4.2 Ergebnisse der Sonden-Markierung

(N.N. 2000) eine optimale DNA-Menge zwischen 10 und 50 ng/ μ l im Reaktionsgemisch vorliegen soll, wurde für die Sonden-Markierung 1 μ l unverdünntes Template pro Reaktionsansatz hinzugefügt, da für beide Primer mit dem Protokoll gute Ergebnisse erbracht wurden.

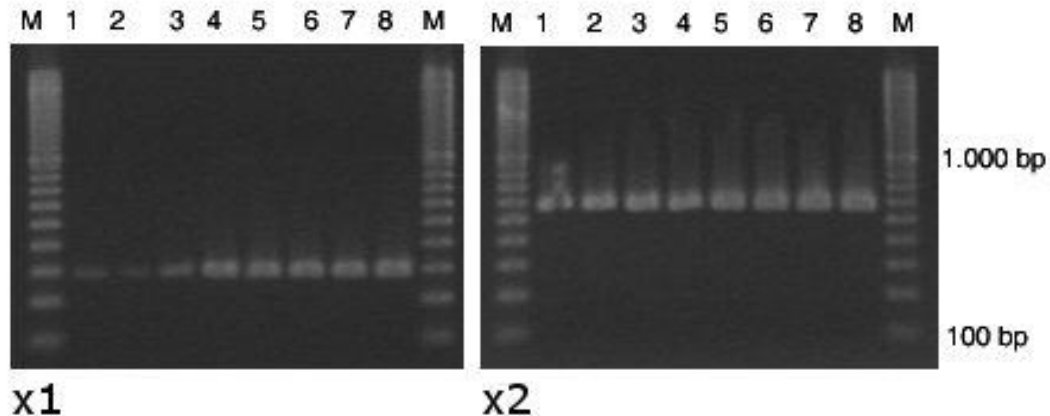


Abb. 15: PCR-Ergebnisse beim Einsatz verschiedener Template-Mengen

x1= *stx1*-positiver Referenzstamm mit KS-Primern

x2= *stx2*-positiver Referenzstamm mit LP-Primern

Banden:

M: Molekulargewichtsmarker

1= 1 μ l Template (1:30)

5= 2 μ l Template

2= 1 μ l Template (1:20)

6= 3 μ l Template

3= 1 μ l Template (1:10)

7= 6 μ l Template

4= 1 μ l Template

8= 8 μ l Template

4.2. Ergebnisse der Sonden-Markierung

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Sonden-Markierung wurde eine PCR mit verschiedenen Reaktionsgemischen durchgeführt (Abb. 16). Die ersten beiden Reaktionsgemische stellten die DIG-markierten Sonden für den Nachweis von *stx1* (KS-Primer) und *stx2* (LP-Primer) dar. Jeweils ein weiteres Reaktionsgemisch für *stx1* und *stx2* enthielt keine DIG-markierten dNTPs und diente als Kontrolle des erfolgreichen Ablaufs der PCR-Reaktion.

4.3 DNA-Kolonie-Hybridisierung

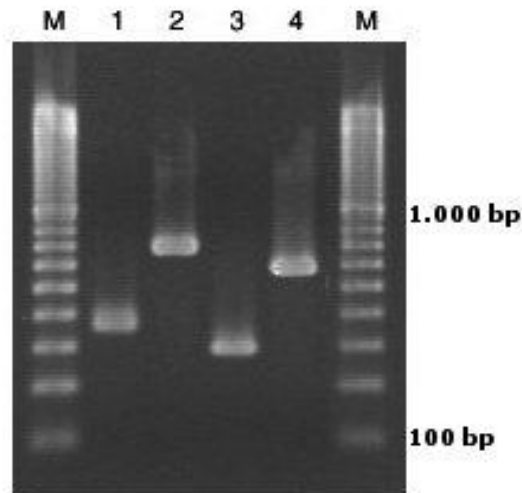


Abb. 16: Ergebnisse der Sonden-Markierungs-PCR

Banden:

M= Molekulargewichtsmarker

1= DIG-gelabelte Sonde für *stx1* (KS-Primer)

2= DIG-gelabelte Sonde für *stx2* (LP-Primer)

3= ungelabelte Sonde für *stx1* (KS-Primer)

4= ungelabelte Sonde für *stx2* (LP-Primer)

Der Erfolg der Markierungs-Reaktion konnte anhand des Laufverhaltens der PCR-Produkte im Gel beurteilt werden. Die markierten und unmarkierten Sonden ergaben deutlich sichtbare Banden. Die unmarkierten Sonden wiesen die zu erwartende Größe auf. Bei der Verwendung von KS-Primern für *stx1* sollte ein 282 bp-großes und im Fall der LP-Primer bei *stx2* ein 584 bp-großes Fragment entstehen. Die gelabelte Sonde stellten sich länger als das ungelabelte Fragment dar, da sie aufgrund der Markierung mit DIG sich im elektrischen Feld langsamer bewegt.

4.3. DNA-Kolonie-Hybridisierung

Für die DNA-Kolonie-Hybridisierung wurden die Referenzstämme *E. coli* C600 J1 (x1) sowie *E. coli* C600 W34 (x2) angereichert und verschiedene Verdünnungen auf PCA gebracht. Für die Etablierung der Methode wurden unter anderem Platten für die DNA-Kolonie-Hybridisierung verwendet, auf denen die Bakterien ein gutes Wachstum aufwiesen, sich aber nicht zwingend als gut abgesetzte Einzelkolonien

4.3 DNA-Kolonie-Hybridisierung

darstellten. Als erfolgreiche Bindung der Sonde und somit positives Ergebnis galt eine lila Färbung auf der Membran in Kolonigröße (Abb. 17).

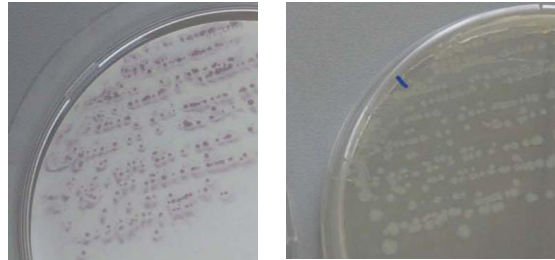


Abb. 17: Beispiel *stx2*-positive Kolonien (Membran – Agar)

Im Vergleich der Verschiedenen Methoden zur Zellrest-Entfernung erwies sich die Entfernung mittels Abrollen mit einem Reagenzglas am effektivsten. Der befeuchtete Wattetupfer schien die Zellreste gut zu entfernen, nach der Detektion waren jedoch keine Hybridisierungs-Signale auf der Membran sichtbar. Durch Abfahren mit einem Lineal wurden die Zellreste auch nach mehrmaligem Wiederholen nur unvollständig entfernt. Der Spatel führte zwar zu einer restlosen Material-Entfernung, der ausgeübte Druck war jedoch zu groß und führte zu einer Schädigung der Membran, da diese nach der Detektion gesamt eingefärbt war.

Ein drei verschiedener Agars (PCA, MAC, ECD) wurde eine DNA-Kolonie-Hybridisierung durchgeführt. Ein Vergleich zwischen Mutterplatte, Membran nach dem Transfer der Kolonien sowie der Membran nach Abschluss der Hybridisierung zeigt Abb. 18.

4.3 DNA-Kolonie-Hybridisierung

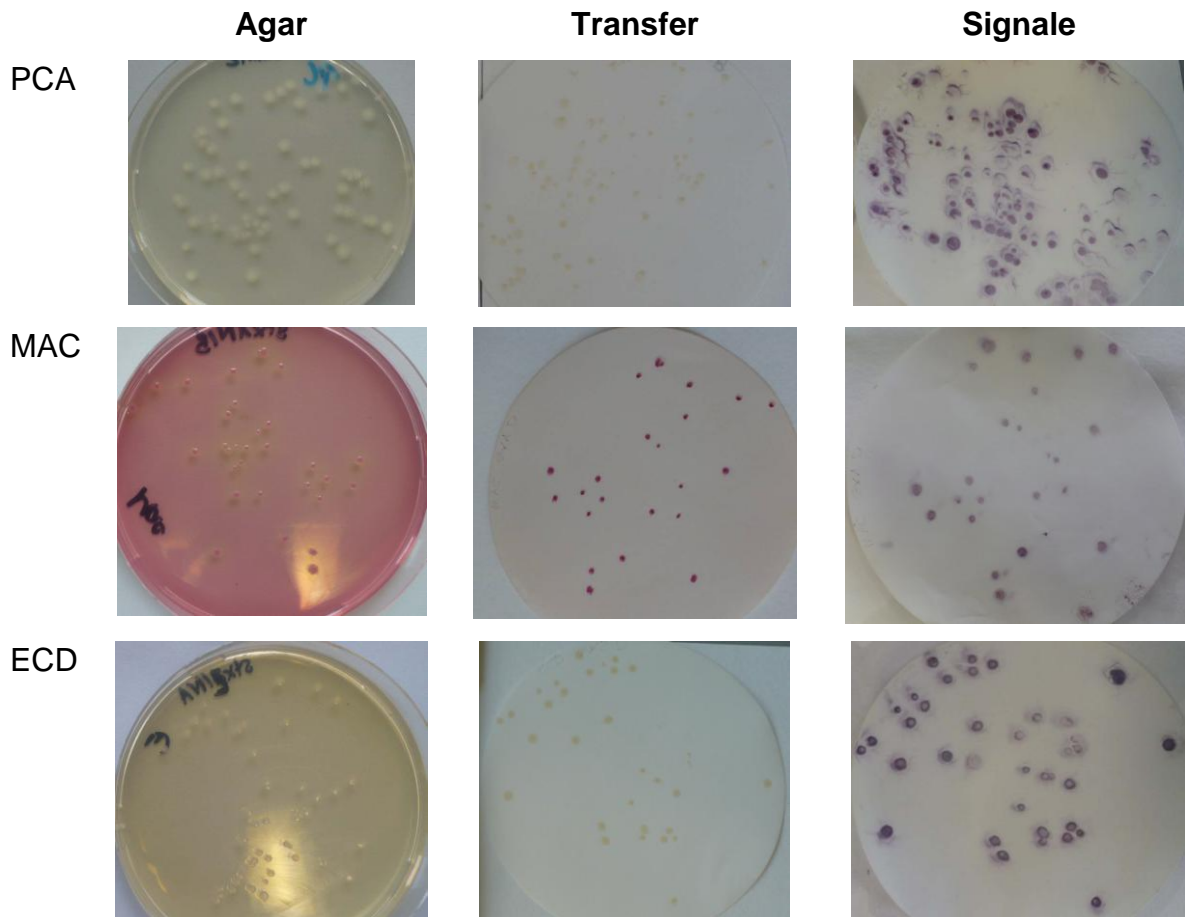


Abb. 18: Agar-Wachstum, Kolonie-Transfer und Signale auf der Membran auf drei verschiedenen Agars

Prozentual gesehen wurden die meisten positiven Ergebnisse mit PCA erzielt, hier waren lediglich 2,0 bis 2,5% der Kolonien negativ (Tab. 26). Die DNA-Kolonie-Hybridisierung unter Einsatz von MAC-Agar erzielte die schlechtesten Ergebnisse. Bei x1 waren 61,4% der Ergebnisse negativ. Die Ergebnisse für ECD lag zwischen den Werten der beiden anderen Agars. Die negativen Ergebnisse wurden durch einen unvollständigen Transfer von der Mutterplatte auf die Membran bedingt. Vor allem beim MAC-Agar war dies sehr deutlich: alle offensichtlich transferierten Kolonien waren in der Hybridisierung positiv, negative Ergebnisse zeigten jene Kolonien, die augenscheinlich komplett auf dem Agar verblieben waren. Bei ECD gelang der Transfer der Kolonien auf die Membran teilweise nicht zuverlässig, jedoch deutlich besser als mit MAC-Agar. Bei ECD sowie bei PCA waren auch teilweise

4.4 Validierung

schlecht transferierte Kolonien in der Hybridisierung noch fraglich positiv. Teilweise wurden negative Ergebnisse durch ein sehr dichtes Wachstum der Kolonien auf dem Agar bedingt, auch hier war der Transfer auf die Membran nicht vollständig.

Tab. 26: Beurteilung der Effizienz der DNA-Kolonie-Hybridisierung mit drei verschiedenen Agars

Agar	Kolonien	x1 [%]			Kolonien	x2 [%]		
		+	(+)	-		+	(+)	-
PCA (A-D)	205	73,7	24,9	1,5	350	68,3	30,9	0,9
MAC (A-D)	143	38,5	0,7	60,8	87	36,8	62,1	1,1
ECD (A-D)	222	36,5	26,6	36,9	241	51,0	46,9	2,1

x1= *stx1*-positiver Referenzstamm

x2= *stx2*-positiver Referenzstamm

+: deutlich positives Membransignal

(+): fraglich positives Membransignal

-: kein Signal

Für das weitere Vorgehen wurde für die Versuche mit den Reinkulturen PCA verwendet, da der Transfer hier am besten funktionierte und im Vergleich mit den anderen Agars die meisten positiven Ergebnisse erzielt wurden. Für die Beimpfung von Hackfleisch wurde für die Ausplattierung des angereicherten Probenmaterials der selektive ECD gewählt. Mit diesem Agar konnten bei x1 weniger negative und bei x2 mehr eindeutig positive Ergebnisse im Vergleich zum MAC-Agar erzielt werden. Zudem war die Beurteilung der Indol-Reaktion möglich.

4.4. Validierung

4.4.1. Exklusivitätstest

Zur Ermittlung ob die Sonde spezifisch an *stx*-Gene von STEC und nicht an die DNA anderer Keime bindet, wurde ein Exklusivitätstest durchgeführt. Nach Abschluss der DNA-Kolonie-Hybridisierung wurde das Auftreten von Signalen in den jeweiligen Feldern beurteilt. Alle „Nicht-Ziel-Keime“ führten zu negativen Signalen. Mit der *stx1*-Sonde wurde nur der Zielkeim x1, mit der *stx2*-Sonde nur x2 angefärbt, was für die Spezifität der Sonde spricht.

4.4 Validierung

4.4.2. Inklusivitätstest

Um zu Ermitteln, ob die Sonden an *stx*-positive Isolate aus dem Routine-Labor binden, wurde ein Inklusivitätstest durchgeführt. Von den 23 mittels PCR untersuchten Isolate erwiesen sich 16 *stx1*-Stämme als positiv. Bei 5 Stämmen war die Bande sehr deutlich, bei 11 eher schwach ausgeprägt. Bei den 14 *stx2*-Stämme zeigten alle ein positives Ergebnis, wobei 12 deutlich und zwei schwach ausgeprägt waren.

Die in der PCR-positiven Isolate wurden für die Überprüfung der Inklusivität eingesetzt. Pro Membran und Sonde wurden die Keime und die jeweilige Positivkontrolle an vier Stellen aufgetragen. Die Positivkontrollen ergaben auf beiden Membranen ein positives Signal. Von den *stx1*-Isolaten waren 13 von 16 (82,1%) positiv bzw. fraglich positiv (Tab. 27). Drei der Stämme waren in der Hybridisierung negativ. Bei den *stx2*-Isolaten waren 13 von 14 (92,9%) positiv bzw. fraglich positiv. Ein Stamm war negativ. Die Ergebnisse der Hybridisierung korrelierten größtenteils nicht mit der Bandenstärke der PCR.

4.4 Validierung

Tab. 27: PCR- und Hybridisierungsergebnisse des Inklusivitätstests im Vergleich

Keim	PCR-Ergebnis	Hybridisierungsergebnis
<i>stx1</i>		
WK 1	(+)	-
WK 2	(+)	-
WK 3	(+)	-
WK 4	+	+
WK 5	+	+
WK 6	+	+
WK 7	(+)	(+)
WK 8	+	(+)
WK 9	(+)	(+)
WK 10	(+)	(+)
WK 11	(+)	(+)
WK 12	+	+
WK 13	(+)	(+)
WK 14	(+)	+
WK 15	(+)	(+)
WK 16	(+)	+
<i>stx2</i>		
WK 6	+	+
WK 11	+	(+)
WK 13	+	(+)
WK 12	+	(+)
WK 14	+	+
WK 17	+	+
WK 18	+	+
WK 19	+	-
WK 20	+	+
WK 21	(+)	+
WK 22	(+)	+
WK 23	+	(+)
WK 24	+	+
WK 25	+	+

(+): schwache bis sehr schwache Bande im Gel / schwaches bis sehr schwaches Hybridisierungssignal auf der Membran

4.4.3. Inhibitionsversuch

Um zu untersuchen, ob sich die x1- und x2-Referenzstämme gegenseitig im Wachstum hemmen, wurden beide Stämme in unterschiedlichen Verhältnissen auf

4.4 Validierung

denselben Agar aufgebracht. Die in der DNA-Kolonie-Hybridisierung erhaltenen positiven Signale der 6 Membranen (X, Y, Z im Doppelansatz) wurden nach Abschluss der Färbereaktion gezählt und mit den zuvor auf Platte gezählten Kolonien verglichen (Tab. 28).

Tab. 28: Ergebnisse des Inhibitionsversuchs

	stx1-Sonde		stx2-Sonde	
	Kolonien auf PCA	Positive Signale auf Membran (%)	Kolonien auf PCA	Positive Signale auf Membran (%)
X (x1=x2)	94	38 (40,4)	107	44 (41,1)
Y (x1<x2)	15	3 (20,0)	14	14 (100)
Z (x1>x2)	7	3 (42,9)	2	2 (100)

x1= stx1-positiver Referenzstamm

x2= stx2-positiver Referenzstamm

Prozentual betrachtet waren bei einem ausgewogenen x1-x2-Verhältnis (Membran X) in der Ausgangs-Verdünnung mit 40,4% mit der *stx1*-Sonde und 41,1% mit der *stx2*-Sonde etwas weniger als die Hälfte der Kolonien in der DNA-Kolonie-Hybridisierung positiv. Das Wachstum der beiden *stx*-Keime schien sich nicht gegenseitig zu beeinflussen. Bei der Membran Y, bei welcher x2 in der Verdünnung überwog, waren bei Hybridisierung mit der *stx1*-Sonde 20% und mit der *stx2*-Sonde alle Kolonien positiv. x2 schien somit auf dem Agar gegenüber x1 zu überwiegen. Bei der dritten Membran (Z), bei welcher x1 gegenüber x2 überwogen hatte, waren 42,2% (*stx1*-Sonde) gegenüber 100% (*stx2*-Sonde) positiv. Die Wachstums-Hemmung von x2 gegenüber x1 war deutlich ausgeprägt. Aufgrund der hier ermittelten Werte wurde die Beimpfung des Hackfleischs für den folgenden Versuch mit x1 und x2 jeweils getrennt durchgeführt, da x2 ein stärkeres Wachstum zeigte.

4.4.4. Bestimmung der Nachweisgrenze

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze von STEC mittels DNA-Kolonie-Hybridisierung in Hackfleisch wurde Probenmaterial mit den Referenzstämmen beimpft und das Probenmaterial anschließend in einer Hybridisierung untersucht. Der Versuchsaufbau gliederte sich in einen Vor- und einen Hauptversuch, für die jeweils eine unterschiedliche Hackfleischprobe verwendet wurde. Der Hauptversuch wurde von zwei Personen parallel durchgeführt.

4.4 Validierung

4.4.4.1. Vorversuche zur Nachweisgrenze

Das Probenmaterial für den Vorversuch war in der zuvor durchgeführten PCR *stx*-negativ. *E. coli* und Enterobacteriaceae waren mit den angewendeten Verfahren nicht nachweisbar ($<10^2$ KbE/ml). Die Gesamtkeimzahl betrug $3,6 \times 10^3$ KbE/ml.

Das Probenmaterial wurde anschließend mit x1 bzw. x2 beimpft, angereichert und ausplattiert. Das Platten-Wachstum der Kolonien des Ausstrichs aus der Voranreicherung sowie der $1:10^3$ und $1:10^4$ -Verdünnungen der Anreicherung wurde beurteilt. Einzelkolonien waren lediglich bei dem Direktausstrich gewachsen (zwischen 0 und 8). Aus der verdünnten Anreicherung waren die Platten mit Bakterien überwuchert. Lediglich auf Platten der $1:10^4$ -Verdünnung waren abgrenzbare Einzelkolonien gewachsen. Hier waren schätzungsweise >800 KbE je Agar gewachsen.

Die Einzelkolonien der Platten der Voranreicherung wurden geblottet. Da es sich um wenige Einzelkolonien auf verschiedenen Platten handelte, wurden die Kolonien nummeriert und mittels steriler Pipettenspitze auf zwei Membranen (je eine für x1 und für x2) aufgetragen. Von den 5 für die DNA-Kolonie-Hybridisierung verwendeten Einzelkolonien der x1-Platten und den 13 Kolonien der x2-Platte zeigten alle nach der Hybridisierung positive Membransignale.

Zur Einordnung der auf dem Agar gewachsenen Bakterien wurde die Indol-Reaktion der Keime getestet. Alle Keime erwiesen sich als Indol-positiv.

4.4.4.2. Hauptversuch zur Nachweisgrenze

Eine weitere Rinderhackfleischprobe wurde für den Hauptversuch verwendet. Die Probe war in der PCR ebenfalls *stx*-negativ. Die Gesamtkeimzahl lag bei $4,2 \times 10^3$ KBE/ml. Enterobacteriaceae und *E.coli* wurden mit den angewandten Methoden nicht nachgewiesen ($<10^2$ KBE/ml). Die Proben wurden anschließend mit drei Verdünnungsstufen der angereicherten Referenzstämme beimpft.

Parallel dazu wurden die Keimzahl der verwendeten Verdünnungsstufen bestimmt. Nach 16 h waren auf den 10^{-6} -Platten zwischen 140 und 206 Kolonien gewachsen (Tab. 29). Bei den 10^{-8} -Platten waren keine bzw. vier und eine Kolonie zählbar. Die

4.4 Validierung

10^{-10} -Verdünnung ergab kein Wachstum auf der Platte. Die Konzentration der Übernachtenreicherung lag bei ca. 10^9 KbE/ml.

Tab. 29: Kolonienwachstum der für die Beimpfung verwendeten Verdünnungsstufen

geimpfte Verdünnungsstufe	x1		x2	
10^{-6}	159	140	206	167
10^{-8}	4	0	0	1
10^{-10}	0	0	0	0

x1= *stx1*-positiver Referenzstamm

x2= *stx2*-positiver Referenzstamm

Die PCR der Voranreicherungskultur ergab eine positive Bande mit beiden der gewählten Extraktionsmethoden (ASU L07.18-1 (N.N. 2006) und modifizierte InstaGene-Methode) für die 10^{-6} -Verdünnung. Für x1 war mit der Extraktion nach ASU L07.18-1 (N.N. 2006) zudem eine positive Bande bei der 10^{-8} -beimpften Probe im Gel sichtbar. Mit der InstaGene-Extraktion zeigte sich dagegen nur eine sehr schwache Bande. Alle anderen Ansätze waren negativ (Abb. 19).

4.4 Validierung

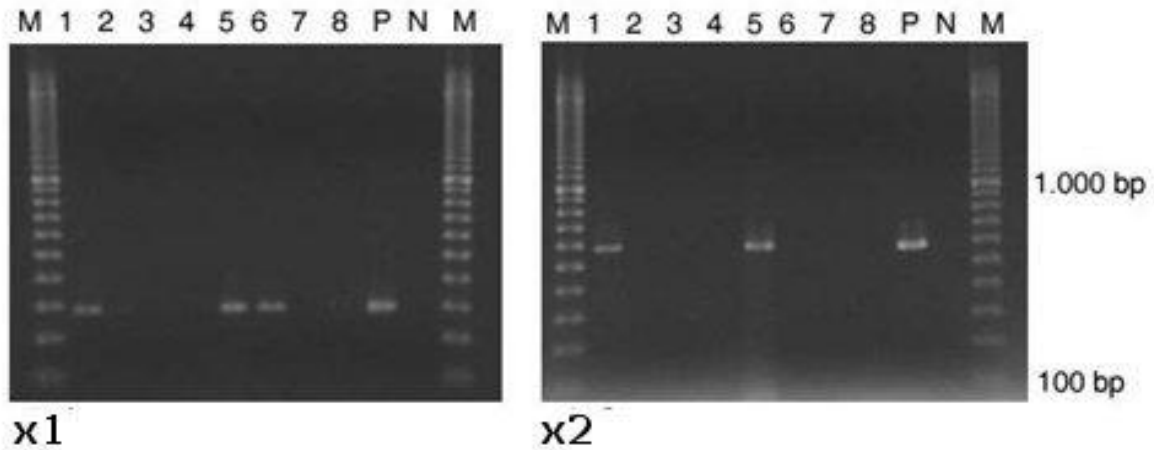


Abb. 19: PCR-Ergebnisse der beimpften Proben

- M: Molekulargewichtsmarker
- x1: *stx1*-positiver Referenzstamm mit KS-Primern
- x2: *stx2*-positiver Referenzstamm mit LP-Primern
- P: Positivkontrolle
- N: Negativkontrolle
- 1-4: DNA-Extraktion mit modifizierter InstaGene-Reinigung
- 5-8: DNA-Extraktion nach ASU L07.18-1
 - 1,5: geimpfte Verdünnungsstufe 10^{-6}
 - 2,6: geimpfte Verdünnungsstufe 10^{-8}
 - 3,7: geimpfte Verdünnungsstufe 10^{-10}
 - 4,8: unbeimpfte Probe

Das Probenmaterial der Voranreicherung sowie der zwei Verdünnungsstufen ($1:10^4$, $1:10^5$) der Anreicherung wurden von zwei Personen auf ECD ausplattiert und inkubiert sowie mittels DNA-Kolonie-Hybridisierung untersucht. Die Ausstriche der Voranreicherung enthielten wenige Einzelkolonien und wurden für die DNA-Kolonie-Hybridisierung herangezogen. Allerdings wurden aufgrund des minimalen Kolonienwachstums die Kolonien nummeriert und mittels steriler Pipettenspitze auf eine Membran übertragen. Die Platten mit der $1:10^5$ -Verdünnung wiesen >1000 KbE auf, mit Ausnahme der *stx2*-beimpften 10^{-8} und 10^{-10} Proben. Hier waren keine Kolonien gewachsen. Die unbeimpften Proben zeigten auf ECD ebenfalls ein starkes Kolonienwachstum. Die Platten der $1:10^4$ -Verdünnung waren überwuchert (Tab. 30).

4.4 Validierung

Tab. 30: Kolonienwachstum aus der Voranreicherung und verdünnten Anreicherung auf ECD

geimpfte Verdünnungs- stufe	Person 1				Person 2			
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁸	10 ⁻¹⁰	neg.	10 ⁻⁶	10 ⁻⁸	10 ⁻¹⁰	neg.
Referenzstamm x1								
Voranreicherung	3	2	1	0	4	0	1	0
Anreicherung 1:10 ⁴	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Anreicherung 1:10 ⁵	++	++	++	++	++	++	++	++
Referenzstamm x2								
Voranreicherung	4	0	1	0	4	1	0	1
Anreicherung 1:10 ⁴	+++	0	0	+++	+++	0	0	+++
Anreicherung 1:10 ⁵	++	0	0	++	++	0	0	++

x1= *stx1*-positiver Referenzstamm

x2= *stx2*-positiver Referenzstamm

+++= überwuchert

++= >1.000 Einzelkolonien

Von den Platten der Voranreicherungs-Kultur zeigten alle übertragenen Kolonien der 10⁻⁶-Beimpfung (sowohl x1 als auch x2) auf der Membran ein positives Hybridisierungs-Signal. Die Kolonien der anderen Beimpfungskonzentrationen sowie der unbeimpften Proben erwiesen sich als negativ (Tab. 31). Die Indol-Reaktion korrelierte mit den Hybridisierungs-Ergebnissen: in der Hybridisierung positive Isolate waren auch Indol-positiv, negative erwiesen sich als Indol-negativ.

4.4 Validierung

Tab. 31: Kolonienwachstum, Hybridisierungs-Ergebnis und Indol-Aktivität der Platten der Voranreicherung

	KbE auf ECD		Signale der Hybridisierung		Indol-Reaktion	
	Pers. 1	Pers. 2	Pers. 1	Pers. 2	Pers. 1	Pers. 2
Referenzstamm x1						
10 ⁻⁶	3	4	3	4	3	4
10 ⁻⁸	2	0	0	/	0	/
10 ⁻¹⁰	1	1	0	0	0	0
neg.	0	0	/	/	/	/
Referenzstamm x2						
10 ⁻⁶	5	4	5	2	(3)	(2)
10 ⁻⁸	0	1	/	0	/	0
10 ⁻¹⁰	0	0	/	/	/	/
neg.	2	1	0	0	0	0

x1= *stx1*-positiver Referenzstamm

x2= *stx2*-positiver Referenzstamm

/: kein Kolonienwachstum auf der Platte, daher keine weitere Untersuchung

(): schwach positiv

Vier der in der Hybridisierung als positiv getesteten Keime wurden anschließend von der Mutterplatte subkultiviert. Dazu wurde Kolonienmaterial vom ursprünglichen Agar, welches durch 6 h Inkubation bei +42 °C nachgewachsen war, mit einer sterilen Öse entnommen und erneut auf Agar ausgespatelt und über Nacht bebrütet. Die Bestätigung erfolgte mittels PCR und ergab ein positives Ergebnis für alle gestesten Kolonien.

Von den 1:10⁵-Verdünnung der Anreicherung waren in der DNA-Kolonie-Hybridisierung die x1-Proben mit der 10⁻⁶ und 10⁻⁸-Beimpfung für *stx1* und die x2-Proben mit der 10⁻⁶-Beimpfung für *stx2* positiv. Die Kolonien der 10⁻¹⁰ sowie die x2-Platten der 10⁻⁸-Beimpfung waren negativ. Zur Bestätigung wurde eine PCR mit Kolonienmaterial der Mutterplatten durchgeführt. Die Ergebnisse korrelierten mit den Hybridisierungs-Signalen: positive und negative Kolonien in der DNA-Kolonie-Hybridisierung wurden in der PCR ebenfalls bestätigt. Die Indol-Aktivität stimmte ebenfalls mit den vorherigen Ergebnissen überein. Alle in der DNA-Kolonie-Hybridisierung als STEC identifizierten Keime waren Indol-positiv. Bei den restlichen Bakterien war die Reaktion negativ.

4.5 Kostenberechnung

4.5. Kostenberechnung

Die DNA-Kolonie-Hybridisierung gliederte sich in die Markierung der Sonde mittels PCR und in die eigentliche Hybridisierung. Letztere wurde vergleichend mit kommerziell-erhältlichen und selbst-hergestellten Materialien durchgeführt. Die im Folgenden angeführten Kosten für die Reagenzien sind ohne die gesetzliche Mehrwertsteuer von 19% angegeben.

4.5.1. Kosten der Sonden-Markierung

Für die Markierung der Sonde wurde das „PCR DIG Probe Synthesis“-Kit der Firma Roche, eingesetzt. Es wurden zwei markierte Sonden, jeweils eine für *stx1* und eine für *stx2*, und ebenfalls jeweils eine unmarkierte Kontrollsonde erstellt. Somit ergaben sich pro Markierungsvorgang vier Reaktionsansätze. Limitierende Komponente des Kits war die Polymerase. Für einen Reaktionsansatz von insgesamt 50 µl wurden 0,75 µl des Enzyms benötigt. Da im Kit 30 µl vorhanden waren, reicht ein Kit maximal für 40 Reaktionsansätze á 50 µl. Bei vier Reaktionsansätzen wäre ein Kit für 10 Sonden-Markierungen ausreichend. Bei einem Gesamtpreis von 392,00 € pro Kit errechnet sich pro Markierungsdurchgang eine Kostenbelastung von 39,20 €.

Die Sonde wurde nach der Markierung zum Einsatz in der DNA-Kolonie-Hybridisierung verdünnt. 2 µl des PCR-Produkts wurden mit jeweils 1 ml der Hybridisierungslösung verdünnt. Bei einem Reaktionsansatz von insgesamt 50 µl und der Verwendung von 4 µl in der Kontroll-PCR blieben 54 µl für die Verdünnung. Es konnten somit 27 ml Sonde mit einem PCR-Ansatz hergestellt werden. Pro Membran kamen 2 ml dieses Sonden-Hybridisierungslösungs-Gemischs zum Einsatz. Die Sondenmenge reichte damit für ca. 13 Membranen. Nach der Hybridisierung wurde die Sonde bei -20 °C eingefroren und bis zu zehnmal wiederverwendet. Ein PCR-Ansatz war folglich ausreichend für die Hybridisierung von bis zu 130 Membranen. Unter Berücksichtigung der errechneten Kosten für einen Markierungsdurchgang liegen die Sonden-Kosten pro Membran bei ca. 0,30 €. Laut Roche (N.N. 2000) genügt ein Ansatz für 650 cm² Membran. Umgerechnet auf die verwendeten Membranen mit einem Durchmesser von 8,2 cm und somit einer Membranfläche von 53 cm² können rund 12 Membranen hybridisiert werden. Roche gibt zudem an, dass jede Sonde bis zu 3- bis 5-mal verwendet werden kann. Insgesamt ergibt sich hieraus, dass mit einer Sonden-PCR 36 bis 60 Membranen

4.5 Kostenberechnung

hybridisiert werden können. Die Kosten würden sich so auf 0,65 bis 1,08 € pro Membran belaufen.

Die Sonden wurden zwei Jahre bei -20 °C gelagert und erwiesen sich in dieser Zeit als stabil. Roche (N.N. 2000) gibt eine Mindest-Lagerzeit von einem Jahr an.

4.5.2. Kosten der Hybridisierung im Vergleich

Die DNA-Kolonie-Hybridisierung erfolgte in den Vorversuchen vergleichend mit kommerziell-erhältlichen Komponenten der Firma Roche sowie mit selbst-hergestellten Lösungen gemäß der Anleitung der ASU L07.18-1 (N.N. 2006). Die Komponenten des „DIG Wash and Block Buffer“-Sets von Roche waren einzeln nicht erhältlich, die Kosten der Einzelkomponenten wurde daher als Teilwert des Gesamtpreises berechnet. Sofern Lösungen kommerziellen erhältlich oder eine eigene Herstellung nicht möglich war, wurden für beide Methoden die gleichen Lösungen verwendet. Die zu verwendenden Mengen pro Membran sind nach dem „DIG Application Manual for Filter Hybridization“ von Roche (N.N. 2000) und der ASU L07.18-1 (N.N. 2006) ebenfalls teilweise unterschiedlich und wurden bei der Kostenberechnung berücksichtigt (Tab. 32). Die Berechnung der Kosten wurde anhand der im Anhang befindlichen Tabelle 40 der Preise je Liter durchgeführt.

4.5 Kostenberechnung

Tab. 32: Reagenzienkosten zur DNA-Kolonie-Hybridisierung

Lösung	Kommerziell		selbst-hergestellt	
	Menge [ml]/ Membran	Preis [€]/ Membran	Menge [ml]/ Membran	Preis [€]/ Membran
Denaturierungslösung	1	0,01	5	0,01
Neutralisierungslösung	1	0,01	5	0,03
20x SSC	40	0,14	40	0,14
Proteinase K-Lösung	0,5	1,50	0,8	2,40
Prähybridisierungslösung	20	7,90	20	0,38
Hybridisierungslösung	2	0,79	2	0,04
Low Stringency Buffer	40	0,03	40	0,03
High Stringency Buffer	80	0,04	40	0,02
Waschpuffer	180	16,16	130	0,10
Blocking-Lösung	40	3,59	40	0,67
Anti-DIG-AP-Konjugat	15	3,79	15	2,91
Detektionspuffer	20	1,51	20	0,02
Färbelösung	10	3,10	4	0,94
TE-Puffer	50	0,19	50	0,19
Preis gesamt [€]		38,76		7,88

Pro Membran ergab sich bei Verwendung der von Roche angegebenen Komponenten und Mengen (N.N. 2000) ein Preis von rund 39 €. Mit den selbst-hergestellten Lösungen nach Angaben der ASU L07.18-1 (N.N. 2006) beliefen sich die Kosten pro Membran auf ca. 8 €. Die teils hohen Kostenunterschiede der Reagenzien kommen mitunter dadurch zustande, dass für die Verdünnung der Komponenten selbst-hergestellte oder kommerzielle Lösungen verwendet wurden.

Zusätzlich fielen die Kosten für die Membranen an, die für eine Membran 3,87 € betrug. Pro Membran wurde schätzungsweise zudem ein Filterpapier verwendet, dessen Kosten ca. 2,10 € betragen.

4.5.3. Gesamt-Kosten der DNA-Kolonie-Hybridisierung

Unter Berücksichtigung der Kosten der zur Hybridisierung verwendeten Sonde sowie der eingesetzten Lösungen und der Fixkosten für Membran und Filterpapier ergeben sich pro Durchlauf nach der ASU L07.18-1 (N.N. 2006) rund 14 €. Verwendet man stattdessen die Komponenten von Roche und beachtet die Hersteller-Angaben ergeben sich bei einem viermaligen Einsatz der Sonde Kosten von rund 46 € (Tab. 33).

4.5 Kostenberechnung

Tab. 33: Gesamtkosten der DNA-Kolonie-Hybridisierung

Komponente	nach Roche (N.N. 2000) [€]	nach ASU L07.18-1 (N.N. 2006) [€]
Sonde	0,82*	0,30 [†]
Lösungen	39,27	7,88
Membran	3,87	
Filterpapier	2,10	
Gesamt	46,06	14,15

* bei viermaliger Verwendung jeder Sonde

[†] bei zehnmaliger Verwendung jeder Sonde

5. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine DNA-Kolonie-Hybridisierung zum Nachweis von STEC in Hackfleisch etabliert und validiert werden. Schwerpunkt lag auf der Herstellung der Hybridisierungs-Sonden für die *stx*-Gene sowie der Optimierung des Verfahrens.

5.1. Sondenherstellung

Die Sonden wurden mittels PCR markiert. Um diese Markierung durchzuführen, bedurfte es der Extraktion der DNA *stx1*- und *stx2*-positiver Referenzstämme zum Einsatz als Template in der PCR. Die Extraktion wurde mit vier Methoden vergleichend durchgeführt. Zwei Methoden nutzten InstaGene, bei den beiden anderen Methoden handelte es sich um Kochmethoden. Bedeutend für die Markierungs-Reaktion war die DNA-Ausbeute, da die DNA-Menge für das PCR-Reaktionsgemisch optimalerweise zwischen 10 und 50 ng liegen sollte. Die modifizierte InstaGene-Extraktion liefert mit 38 ng/µl einen mittleren Wert, der optimal zu sein schien. Da diese 50 µl InstaGene im Vergleich zu 200 µl bei Methode 1 benötigt wurden, stellte diese Extraktionsmethode zudem eine kostengünstigere Variante dar.

Für die Markierung der Sonden gibt es zwei gängige Methoden: die PCR und die Klonierung. In diesem Fall wurde wie in den meisten neueren Literaturquellen (ARTHUR et al. 2002, BARLOW et al. 2006, BEUTIN et al. 1993, ESPIÉ et al. 2006, FEGAN und DESMARCHELIER 1999, GALLIEN et al. 1996, SCHMIDT et al. 1994, STEPHAN et al. 2008) die PCR als Verfahren gewählt. Es können mit ihr große Mengen Sonde hergestellt werden (HOFF et al. 2002). Zudem sind die Materialien und Geräte, welche für eine PCR benötigt werden, in den meisten Laboratorien vorhanden. Die Methode ist schnell und mit Hilfe eines unmarkierten Kontrollansatzes kann der Erfolg der Markierung mittels Gelelektrophorese und anschließender Färbung mit Ethidium-Bromid sichtbar gemacht werden. Die früher verwendete Klonierung (BETTELHEIM et al. 1990, BEUTIN et al. 1993, BROWN et al. 1989, HULL et al. 1993, SAMADPOUR et al. 1990, SUTHIENKUL et al. 1990)

5.1 Sondenherstellung

hingegen gilt als zeitaufwendig und anspruchsvoll (ECHEVERRIA 1986) und es können nicht so große Mengen an Sonde hergestellt werden (SOMMERFELT et al. 1988).

Die Sonden-Markierung kann radioaktiv oder nicht-radioaktiv erfolgen. In dieser Arbeit erfolgte die Markierung mit DIG, eine nicht-radioaktive Substanz die in neueren Studien häufig zur Markierung verwendet wird (BARLOW et al. 2006, BEUTIN et al. 1993, ESPIÉ et al. 2006, FEGAN und DESMARCHELIER 1999, FRATAMICO et al. 2004, GALLIEN et al. 1996, SCHMIDT et al. 1994, STEPHAN et al. 2008). Hierbei wurden DIG-markierte dNTPs während der PCR in die DNA eingefügt. Die Markierung mit DIG ist somit relativ einfach und schell. Zudem birgt sie im Vergleich zu radioaktiven Substanzen kein gesundheitliches Risiko und die Sonden können über einen längeren Zeitraum gelagert werden (RILEY und CAFFREY 1990). Ebenso gesundheitlich unbedenklich ist die Markierung mit Biotin, die jedoch in der Markierung von *stx*-Sonden in der Literatur kaum Anwendung zu finden scheint. Sie wurde als erste Methode zur indirekten Sonden-Markierung beschrieben (GUERSIMARE et al. 1999, WALKER und DOUGAN 1989). Ihr mangelt es jedoch gegenüber DIG-markierten Sonden an Sensitivität (EASTEAL et al. 1991). Radioaktiv-markierte Sonden gelten als sensitiv (RILEY und CAFFREY 1990, WALKER und DOUGAN 1989), sie zeichnen sich jedoch durch eine kurze Halbwertszeit aus und müssen deshalb kurz vor der Verwendung hergestellt werden. Die bei dem radioaktiven Zerfall freigesetzte Strahlung hat zudem eine schädigende Wirkung auf die Sonden-DNA (EASTEAL et al. 1991). Die Radioaktivität ist zudem mit Gefahren für Mensch und Umwelt verbunden (RILEY und CAFFREY 1990, WALKER und DOUGAN 1989) und die Entsorgung der Radioisotope ist kostspielig (HILL et al. 2001). Aufgrunddessen findet diese Markierungs-Methode insbesondere in früheren Literaturquellen Anwendung (BETTELHEIM et al. 1990, BROWN et al. 1989, HULL et al. 1993, KARCH und MEYER 1989, NEWLAND und NEILL 1988, SAMADPOUR et al. 1990, SUTHIENKUL et al. 1990).

Der Nachweis der beiden *stx*-Gene kann mit einer Sonde für beide Toxin-Gene oder mit zwei unterschiedlichen Sonden erfolgen. In dieser Arbeit wurde jeweils eine Sonde für den Nachweis von *stx1* und *stx2* markiert. Für die Sonden-Markierung wurden die in der ASU L07.18-1 (N.N. 2006) beschriebenen KS- und LP-Primer verwendet. Die Markierung erfolgte mit dem „PCR DIG Probe Synthesis Kit“ von

5.2 Wachstum der Kolonien

Roche. Die meisten in der Literatur angeführten Studien benutzen für die Hybridisierung der beiden *stx*-Gene ebenfalls getrennte Sonden (BETTELHEIM et al. 1990, BEUTIN et al. 1993, BROWN et al. 1989, HULL et al. 1993, KUMAR et al. 2004, NEWLAND und NEILL 1988, SAMADPOUR et al. 1990, SUTHIENKUL et al. 1990). Einige Literaturquellen verwenden nur eine Sonde (BARLOW et al. 2006, ESPIÉ et al. 2006, GALLIEN et al. 1996). Vorteil bei der Verwendung von zwei Sonden ist, dass bereits in diesem Schritt eine Einteilung der Isolate in *stx1* und *stx2* erfolgen kann und die nachfolgende Bestätigungsreaktion gezielt auf die jeweiligen Gene durchgeführt werden kann. Bei der Bestätigung mittels PCR, wie in der ASU L07.18-1 (N.N. 2006) beschrieben, werden auch zwei unterschiedliche Primer für die Folge-PCR eingesetzt. Ein Nachteil bei der Verwendung von zwei separaten Sonden ist, dass für jede zu untersuchende Probe zwei Platten ausplattiert werden müssen, um diese dann mit jeweils einer der beiden Sonden zu hybridisieren.

Die markierte Sonde wurde über einen Zeitraum von zwei Jahren bei -20 °C zwischen den jeweiligen Verwendungen tiefgefroren. Roche (N.N. 2000) gibt eine mögliche Lagerungsdauer von mindestens einem Jahr an. RILEY und CAFFREY (1990) sprechen von einer möglichen Lagerung von sechs Monaten. SURZYCKI (2003) gibt die Lagerung in der Hybridisierungslösung mit ein bis zwei Jahren an. Wie hier gezeigt werden konnte, ist eine mindest zwei-jährige Lagerung durchaus möglich.

Es konnte gezeigt werden, dass ein zehn-maliger Einsatz der Sonde möglich ist. Roche (N.N. 2000) spricht von einer drei- bis fünf-maligen Verwendung. Hier zeigt sich, dass die Angaben der Hersteller ohne Spezifitäts-Verlust überschritten werden können, was eine Kosten- und Arbeitseinsparung.

5.2. Wachstum der Kolonien

Zur Optimierung der DNA-Kolonie-Hybridisierung wurden drei verschiedene Agarplatten im Vergleich untersucht: der nicht-selektive PCA- und die selektiven ECD- und MAC-Agars. ECD wies ein gutes Einzelkolonie-Wachstum auf. Bei ECD-Agar liegt die Spezifität für *E. coli* mit 99,2 % gegenüber MAC-Agar mit 99,8 % zwar niedriger (HEIZMANN et al. 1988), die Übertragung der Kolonien auf die Membran war allerdings besser als mit MAC-Agar. Für die Untersuchung von Proben, bei

5.3 Übertragung der Kolonien auf die Membran

denen Begleitflora zu erwarten ist, wurde ECD in dieser Arbeit als geeigneter Agar eingestuft.

Die ASU L07.18-1 (N.N. 2006) beschreibt die Verwendung von MAC-Agar. Einige Literaturquellen setzen ebenfalls MAC-Agar ein (HULL et al. 1993; SUTHIENKUL et al. 1990, ESPIÉ et al. 2006). Dieser Agar hat den Vorteil, dass er selektiv für gramnegative Bakterien ist und zudem eine Unterscheidung zwischen Laktose-positiven (rosa Kolonien) wie *E. coli* (RATNAM et al., 1988) und Laktose-negativen (farblose Kolonien) möglich ist. HEIZMANN et al. (1988) konnten zeigen, dass die Spezifität von MAC-Agar für *E. coli*-Stämme bei 99,8 % liegt. Die Übertragung von dem Agar auf die Membran erwies sich in dieser Arbeit jedoch als unzuverlässig, häufig blieb das Kolonienmaterial auf dem Agar zurück und bedingte so negative Hybridisierungs-Signale. Er wurde aufgrunddessen nicht für weitere Hybridisierungs-Reaktionen eingesetzt.

Mit dem PCA war der Transfer der Kolonien auf die Membran zuverlässiger als mit den beiden anderen Agars. Nachteil dieses Agars ist jedoch seine fehlende Selektivität, was bei der Untersuchung von Proben einen Nachteil darstellt. Deshalb wurde PCA für die Etablierung und Validierung der DNA-Kolonie-Hybridisierung mit den Reinkulturen verwendet, nicht jedoch für die Ausspatelung beimpfter Hackfleischproben.

5.3. Übertragung der Kolonien auf die Membran

Für die Übertragung der Kolonien auf die Membran gibt es zwei gängige Methoden: der „Colony Lift“ und das „Direct Spotting“. In dieser Arbeit wurde die Methode des „Colony Lifts“ eingesetzt. Hierbei werden die Membranen einige Minuten auf den bewachsenen Agar gelegt und danach abgezogen. In der Literatur wird diese Methode ebenfalls häufig angewendet (ESPIÉ et al. 2006, FRATAMICO et al. 2004, GRÖTZBACH 2007, KOBAYASHI und VIDOTTO 1998, MAYRSHOFER 2005, PROHASKA 2009, STEPHAN et al. 2008, SUTHIENKUL et al. 1990). Vorteil der „Colony Lift“-Technik ist, dass Kolonien welche ein positives Membran-Signal ergaben, unmittelbar der Kolonie auf dem Agar zugeordnet, isoliert und weiter charakterisiert werden können. Nachteil der Methode liegt in dem teilweise unvollständigen Transfer der Kolonien von dem Agar auf die Membran. Alternativ zu

5.3 Übertragung der Kolonien auf die Membran

dieser Methode ist es möglich, das Probenmaterial direkt auf die Membran aufzutragen, welche auf einem Agar liegt, und die Kolonien direkt auf dem Agar wachsen zu lassen („Direct Spotting“) (STRACHNAN und READ 2004). Bei vergleichenden Untersuchungen beider Möglichkeiten konnten mit der Methode des „Direct Spotting“ mit 75% positiver Ergebnisse ein durchschnittlich besseres Resultat erzielt werden als mit der nachträglichen Übertragung der Kolonien auf die Membran („Colony Lift“, 59%) (HU und WU 2000). Bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse konnte jedoch gezeigt werden, dass der Unterschied beider Methoden nicht signifikant war. Allerdings ist eine Subkultivierung der Kolonien auf der Mutterplatte mit der „Direct Spotting“-Methode nicht möglich. Außerdem besteht die Gefahr, Membranen unnötig zu verwenden falls keine Kolonien wachsen. Von Vorteil ist die „Direct Spotting“-Methode dann, wenn die Membranen für spätere Hybridisierungs-Zwecke gelagert werden sollen. Sie können bis zum Einsatz bei -80 °C gelagert werden, was bei der Aufbewahrung von Genbanken nützlich sein kann (HILL et al. 2002).

Das Belassen der Membran auf dem Agar wurde für 1 bis 2 min durchgeführt. Da die ASU L07.18-1 (N.N. 2006) hierzu keine Angaben macht, richtete sich die Dauer nach Roche (N.N. 2000). In weiteren Quellen wird die Dauer ebenfalls mit 1 bis 2 min angegeben (GRÖTZBACH 2007) angegeben. Laut MAYRSHOFER (2005) sollte die Membran auf dem Agar belassen bleiben, bis an allen Stellen befeuchtet ist. Hier war das nach bereits wenigen Sekunden der Fall. In anderen Studien wurden die Membranen für 5 (KOBAYASHI und VIDOTTO 1997, STEPHAN et al. 2008) oder 10 min (ESPIÉ et al. 2006) belassen. Alle hier angeführten Studien sowie weitere Untersuchungen (ARTHUR et al. 2002, DUATTA et al. 2001, FEGAN und DESMARCHELIER 1999, FRATAMICO et al. 2004, GALLIEN et al. 1996, PROHASKA et al. 2009) benutzten Nylon-Membranen. Auch in dieser Arbeit wurden gemäß ASU L07.18-1 (N.N. 2006) Nylon-Membranen verwendet. Diese gelten gegenüber den Nitrocellulose-Membranen als reißfester (HOFF et al. 2002). Die Bindungskapazität von Nylon-Membranen ist mit 500 µg/cm² gegenüber 100 µg/cm² bei Nitrocellulose-Membranen erheblich höher (HALL 1995). Nitrocellulose-Membranen kommen in älteren Literaturquellen zum Einsatz (BEUTIN et al. 1993, HILL et al. 1983, HULL et al. 1993, KARCH und MEYER 1989, KIRII et al. 1987, SCHMIDT et al. 1994). Sie binden Fragmente <200 bis 300 bp schlecht (MEINKOTH und WAHL 1989) und sind weniger stabil als Nylon-Membranen (HALL 1995). In

5.3 Übertragung der Kolonien auf die Membran

einigen Studien wird zudem Filterpapier eingesetzt (BETTELHEIM et al. 1990, BROWN et al. 1989, NEULAND und NEILL 1988, SAMADPOUR et al. 1990, SUTHIENKUL et al. 1990). Angaben zur Effektivität dieser Möglichkeit finden sich in der Literatur nicht. Möglicherweise handelt es sich hier um eine kostengünstige Alternative zu Nylon- und Nitrocellulose-Membranen.

Für die DNA-Kolonie-Hybridisierung wurden - wie von GALLIEN et al. (1996) beschrieben - Platten mit gut gewachsenen, voneinander getrennten Einzelkolonien verwendet. Die optimale Menge um eine vollständige Übertragung auf die Membran und eine spätere Identifizierung positiver Kolonien zu gewährleisten lag zwischen 100 und 200 Kolonien. Die Literaturangaben liegen mit 200 bis 300 bzw. 400 Kolonien (BROWN et al. 1989, HULL et al. 1993, MAYRSHOFER 2005, SUTHIENKUL et al. 1990) etwas darüber. Bei einigen Quellen liegt die Kolonienanzahl mit 1000 bzw. 2000 Kolonien sogar deutlich höher (ARTHUR et al. 1991, SAMADPOUR et al. 1990). Bei sehr vielen Kolonien auf dem Agar ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Kolonien sich teilweise überlagern allerdings wesentlich größer und die Gefahr, dass die Kolonien aufgrunddessen unvollständig übertragen werden ist somit höher. Zudem erschwert eine hohe Anzahl die spätere Zuordnung positiver Membran-Signale zu den Kolonien auf der Mutterplatte.

Zur Untersuchung beimpfter Proben wurde das Probenmaterial in zwei Schritten angereichert. Dazu wurde Probenmaterial in einem hochselektiven Medium (mCASO mit Novobiocin) 5 h bei RT vorangereichert, um vorhandene Begleitflora zu hemmen. 1 ml der Voranreicherung wurde in ein weniger selektives Medium (mCASO) überführt, um vorhandene STEC-Keime anzureichern und 16 bis 18 h bei +37 °C bebrütet. Kolonien der Platten der Voranreicherung und einer 1:10⁵-Verdünnung der Anreicherung wurden hybridisiert. Es waren auf den Voranreicherungs-Platten nur wenige Einzelkolonien gewachsen, die 1:10⁵-Platten waren überwuchert. Die Ergebnisse der DNA-Kolonie-Hybridisierung der Platten beider Anreicherungsverfahren bei der niedrigsten Beimpfungskonzentration stimmten überein: die Kolonien erwiesen sich jeweils als positiv. Mit der mittleren Beimpfungskonzentration wurden nur aus der Anreicherung mit dem Referenzstamm x1 positive Hybridisierungs-Signale erzielt. Das Voranreicherungs-Verfahren kann parallel zum Anreicherungs-Verfahren durchgeführt werden da dies keine zusätzlichen Schritte, Medien und Zeit benötigt, und Kolonien können mittels

5.4 Hybridisierung

Pipettenspitze von mehreren Platten auf eine Membran übertragen werden um Material einzusparen. Eine sehr geringe Kontamination von Proben kann jedoch falsch-negative Ergebnisse erbringen, wie es bei der mittleren Beimpfungskonzentration der Fall war. Die Anreicherung hingegen erwies sich als positiv, ein Zeichen dafür dass bei gering-kontaminierten Proben ein zweiter nicht-selektiver Anreicherungs-schritt durchaus sinnvoll erscheint. Da die 1:10⁵-Verdünnungen zu einem überwucherten Platten-Wachstum führten, sollte die nächsthöhere Verdünnung (1:10⁶) ausplattiert werden. Eine 1:10 oder 1:50-Verdünnung wie sie in der ASU L07.18-1 (N.N. 2006) angeführt ist, scheint nicht geeignet, da hier die Platten überwuchert waren.

5.4. Hybridisierung

Nachdem die Kolonien auf die Membran übertragen waren, wurden die Bakterien lysiert und die DNA denaturiert und auf der Membran fixiert. Die Lyse und Denaturierung erfolgte mit NaOH. Auch in der Literatur findet die alkalische Lyse Anwendung (ESPIÉ et al. 2006, KOBAYASHI und VIDOTTO 1997, SCHMIDT et al. 1994, STEPHAN et al. 2008). Anschließend wurden die Membranen für 1 h bei +80 °C im Hybridisierungs-Ofen fixiert. Die Dauer der Fixierung richtete sich nach der ASU L07.18-1 (N.N. 2006). Bei der Etablierung des Verfahrens wurden jedoch mit einer kürzeren Dauer von 30 min ebenfalls positive Ergebnisse erzielt. Eine 2-stündige Fixierung (DUATTA et al. 2001, SCHMIDT et al. 1994) scheint demnach nicht notwendig. TAKAHASHI et al. (2008) fixieren ebenfalls für 1 h, jedoch bei 120 °C. Alternativ kann die Fixierung der DNA im UV-Licht erfolgen (BARLOW et al. 2006, FEGAN und DESMARCHÉLIER 1999, KOBAYASHI und VIDOTTO 1997, N.N. 2000, STEPHAN et al. 2006). Die UV-Behandlung kann jedoch zu strukturellen Veränderungen der DNA führen (REED und MANN 1985).

Nach der Lyse, Denaturierung und Fixierung der DNA auf der Membran wurden die Zellreste auf verschiedene Arten entfernt, um eine gut geeignete Methode zu ermitteln. Die ASU L07.18-1 (N.N. 2006) macht hierzu die Angaben, die Membran zwischen mit *A. bidest.* befeuchtetem Filterpapier zu rollen. Es wurden Methoden aus der Literatur zum Vergleich eingesetzt. GRÖTZBACH (2007) führte die Entfernung von Zellresten durch Rollen mit einem Glas über die Oberfläche eines auf der

5.5 Isolierung und Bestätigung

Membran platzierten mit *A. bidest.* befeuchteten Filterpapier durch. In diese Arbeit wurde ein Reagenzglas verwendet. Die Zellreste war nach ein- bis zweimaligem Abrollen (je nach verwendetem Agar) vollständig entfernt. PROHASKA (2009) platzierte die Membranen auf einem mit *A. bidest.* befeuchteten Filterpapier, um sie dann mit einem sterilen, ebenfalls mit *A. bidest.* befeuchteten Wattetupfer abzufahren. Es musste jedoch festgestellt werden, dass dies scheinbar nicht nur zu Entfernung der Zellreste führte, da das Ergebnis der Hybridisierung negativ war. Es liegt nahe, dass auch die fixierten DNA-Stücke durch den Wattetupfer entfernt wurden. Roche (N.N. 2000) gibt in seinem Manual an, die Zellreste durch Abfahren mit einem Lineal oder ähnlichen Gegenstand (hier wurde ein Spatel verwendet) zu entfernen. Die Zellrückstände wurden jedoch durch Einsatz eines Lineals nur unvollständig entfernt und auch bei mehrmaligem Wiederholen waren noch Reste auf der Membran erkennbar. Die Verwendung eines Spatels führte zwar im Vergleich zum Abfahren mit dem Lineal zu einer schnellen Entfernung der Zellreste, aber die Membran wurde hierdurch beschädigt und war nach dem Färben komplett lila eingefärbt. Somit schien die Entfernung durch Rollen mit einem Reagenzglas am effektivsten.

Die Hybridisierungstemperatur lag bei Verwendung selbst-hergestellter Lösungen bei +68 °C, entsprechend den Angaben der ASU L07.18-1 (N.N. 2006). Mit Roche-Lösungen wurde die Hybridisierung bei +42 °C durchgeführt. Die mit „DIG Easy Hyb“ gemischten Sonden führten auch bei der höheren Temperatur zur Bindung. Die in der selbst-hergestellten Lösung verdünnten Sonden hingegen funktionierten bei +42 °C nicht. Da die Sonden in den selbst hergestellten Hybridisierungslösung bei dieser Temperatur nicht zu binden schienen, scheint neben der Sonde die Zusammensetzung der jeweiligen Lösungen einen Einfluss auf die optimale Hybridisierungstemperatur zu haben.

5.5. Isolierung und Bestätigung

Von den in der DNA-Kolonie-Hybridisierung positiven Kolonien wurde eine Reinkultur angelegt. Die Mutterplatten wurden hierfür nach dem „Colony Lift“ zur weiteren Bebrütung bei +37 °C (PCA) bzw. +42 °C (ECD) für 6 h kultiviert. Die Dauer der Inkubation richtete sich nach der ASU 07.18-1 (N.N. 2006). GALLIEN et al. (1996)

5.6 Validierung

fürten die Inkubation ebenfalls für 6 h durch. Nach dieser Zeitspanne waren die Kolonien zwar nicht vollständig nachgewachsen, es war jedoch genügend Kolonienmaterial auf den Platten vorhanden, um eine Subkultur anzulegen. Eine über-Nacht-Bebrütung (> 16 h) führte zu einem überwucherten Wachstum und war somit unbrauchbar, weil so eine Zuordnung der Membran-Signale zu den Kolonien nicht mehr möglich war.

Nach der Subkultivierung erfolgte die Bestätigung der Isolate. Die bereits ermittelten Virulenzkriterien können hierbei beispielsweise mittels PCR bestätigt werden (GALLIEN 1996). Diese wird in der ASU L07.18-1 (N.N. 2006) sowie in der Literatur (BARLOW et al. 2006, ESPIÉ et al. 2006, FEGAN und DESMARCHELIER 1999, FREMAUX et al. 2006, STEPHAN et al. 2008) als Bestätigungsreaktion genannt und wurde auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Alle auf der Membran mittels DNA-Kolonie-Hybridisierung als positiv identifizierten Kolonien konnten in dieser Arbeit mittels PCR bestätigt werden.

5.6. Validierung

Im Rahmend des Exklusivitätstests sollte untersucht werden, ob die Sonde spezifisch an *stx1*- bzw. *stx2*-Gene bindet. Der Inklusivitätstest sollte zeigen, ob die Sonden andere *stx*-positive Isolate als die Referenzstämme bindet. Alle der hier untersuchten Nicht-Zielkeime erwiesen sich als negativ. Die Spezifität des Verfahrens lag in dieser Arbeit bei 100%.

Mit der *stx1*-Sonde waren im Inklusivitätstest 13 von 16 der Isolate positiv. Die Hybridisierung *stx2*-positiver Isolate ergab 13 von 14 positive Ergebnisse. Die Sensitivität der *stx1*-Sonde war mit 81% gegenüber der *stx2*-Sonde mit 93% etwas geringer. Die Spezifität und Sensitivität der Sonden lag im Rahmen (CYAN et al. 1990, NEWLAND und NEILL 1988).

Die Nachweisgrenze der Methode in Hackfleisch lag in der vorliegenden Arbeit mit beiden Sonden bei ca. 10^3 KbE/10 g. Laut ASU L07.18-1 (N.N. 2006) liegt die Nachweisgrenz zwischen 54 und 308 KbE/25 g Hackfleisch. Die hier ermittelte Nachweisgrenze lag somit oberhalb der Angaben der ASU L07.18-1 (N.N. 2006). SAMADPOUR et al. (1990) konnten mittels DNA-Kolonie-Hybridisierung eine

5.7 Kosten

Nachweisgrenze von 1,3 KbE/g ermitteln. Diese liegt unter der hier ermittelten Nachweisgrenze. Allerdings wurden die Probenanreicherungen länger inkubiert. In Studien mit *S. flexneri*-beimpften Stuhlproben konnten positive Ergebnisse bei 2×10^6 und 2×10^4 KbE/ml erzielt werden und lagen damit oberhalb der Nachweisgrenze dieser Arbeit (DUATTA et al. 2001).

5.7. Kosten

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die eigene Herstellung von Lösungen wie sie in der ASU L07.18-1 (N.N. 2006) angeführt ist, mit rund 8 € pro Membran wesentlich günstiger ist als die Verwendung kommerzieller Lösungen und Reagenzien von Roche (ca. 39 € pro Membran) (N.N. 2000). Dennoch verwenden viele Literaturangaben Hersteller-Kits für die Durchführung (ARTHUR et al. 2002, BARLOW et al. 2006, ESPIÉ et al. 2006, FEGAN und DESMARCHELIER 1999, FRATAMICO et al. 2004, STEPHAN et al. 2008). Der Grund hierfür liegt vermutlich in der Einfachheit der Verwendung solcher Kits. Die Lösungen müssen größtenteils nur entsprechend verdünnt werden und sind danach gebrauchsfertig. Bei der eigenen Herstellung müssen die einzelnen Komponenten der Lösungen eingewogen und die fertigen Lösungen müssen zum Teil autoklaviert werden. Zudem werden viele verschiedene Reagenzien für die Herstellung benötigt. Jedoch lassen sich diese problemlos über einen längeren Zeitraum lagern und sind sehr ergiebig. Hersteller-Kits wie das „DIG Wash Block and Buffer Set“ reichen hingegen nur für eine begrenzte Zahl von Untersuchungen. In Anbetracht der angeführten Punkte empfiehlt sich zur Kosteneinsparung folglich die eigene Herstellung. Für die gleichen Kosten und etwas mehr Zeitaufwand können mehr Membranen als mit kommerziellen Kits hybridisiert werden.

5.8. Vor- und Nachteile der DNA-Kolonie-Hybridisierung

Ein bedeutender Vorteil der DNA-Kolonie-Hybridisierung ist, dass STEC-Kolonien gezielt von der Mutterplatte isoliert werden können (GALLIEN et al. 1996). So gelingt die Erstellung von Reinkulturen (HILL und KEASLER 1991). Dies ermöglicht die

5.8 Vor- und Nachteile der DNA-Kolonie-Hybridisierung

weitere Charakterisierung der Isolate, was insbesondere epidemiologisch von Bedeutung ist.

Die DNA-Kolonie-Hybridisierung beruht auf dem Nachweis lebender Bakterien. Sofern kein Wachstum auf der Agar-Platte erfolgt, kann auch keine Hybridisierung durchgeführt werden. Hierbei hat die DNA-Kolonie-Hybridisierung der PCR gegenüber einen Vorteil, da bei der PCR auch tote Zellen ein positives Ergebnis bedingen können (LAZCKA et al. 2007).

Auf der Agar-Platte ist eine phänotypische Unterscheidung *stx*-positiver und anderer *E. coli* nicht möglich. Durch die Möglichkeit der exakten Zuordnung positiver Membran-Signale zu den Kolonien auf der Platte kann durch die DNA-Kolonie-Hybridisierung auch eine Identifizierung aus Mischkulturen erfolgen (HILL und KEASLER 1991). Dies ist v.a. bei der Untersuchung von Proben mit hoher Begleitflora von Bedeutung.

Die DNA-Kolonie-Hybridisierung benötigt jedoch im Gegensatz zur PCR eine höhere Menge der Ziel-Sequenz um ein positives Signal zu erbringen (GILBREATH et al. 2009). Allerdings ist die hohe Sensitivität der PCR auch ein potentieller Nachteil, da durch Probenkontamination falsch-positive Ergebnisse erzielt werden können (VALENTINE et al. 1991). Bei der DNA-Kolonie-Hybridisierung sind solche falsch-positiven Ergebnisse nicht möglich, sofern die Spezifität der verwendeten Sonde ausreichend hoch ist.

Die DNA-Kolonie-Hybridisierung ist nicht davon abhängig, dass die charakterisierenden Toxine gebildet werden, wie dies beispielsweise beim Vero-Zell-Test der Fall ist. Der Nachweis beruht auf der Identifizierung der Toxin-Gene (RILEY und CAFFREY 1990). Dies kann aber auch nachteilig sein, da v.a. die exprimierten *stx*-Gene von Bedeutung sind.

Des Weiteren ist die Durchführung der DNA-Kolonie-Hybridisierung mit einem hohen Zeitaufwand verbunden (KWAGA et al. 1992, VALENTINE et al. 1991). In dieser Arbeit lag die Zeitspanne von der Übertragung der Kolonien bis zum sichtbaren Ergebnis mit ca. 18 h etwas unter der von CYAN (1990) beschriebenen Dauer von 24 h. GALLIEN et al. (1996) geben zwar an, durch einer 3 h Hybridisierung könne die Hybridisierung und Detektion innerhalb eines Arbeitstages erfolgen. Beachtet man

5.8 Vor- und Nachteile der DNA-Kolonie-Hybridisierung

jedoch dass die Arbeitsschritte in dieser Arbeit vor und nach einer 3 h Hybridisierung bei mind. 4 und 3 h lagen, würde das eine Zeitpanne von mind. 10 h bedingen und ist damit für ein Routinelabor nicht praktikabel.

Zudem ist die Methode mit einem hohen Arbeitsaufwand verbunden (KWAGA et al. 1992). Die Methode benötigt zwar keine besondere Laborausstattung (CYAN 1990), ist aber sowohl in der Vorbereitung als auch in der Durchführung selbst sehr arbeitsintensiv. Sie ist nicht so einfach durchzuführen wie die PCR (SJÖLING et al. 2007). Die Durchführung ist komplizierter als die PCR und bedarf damit einer Einarbeitung des Laborpersonals.

6. Schlussfolgerung

- Eine Sonden-Markierung mittels PCR und DIG ist schnell, einfach und birgt im Vergleich zur radioaktiven Markierung keine gesundheitlichen Risiken.
- Die Verwendung von zwei Sonden für die *stx*-Gene ist zur Charakterisierung der Kolonien sinnvoll um bereits im Schritt der DNA-Kolonie-Hybridisierung Informationen zum Vorkommen von *stx1* und *stx2* zu erhalten.
- Bei der Verwendung von Reinstämmen kann der nicht-selektive PCA verwendet werden, da mit diesem im Vergleich zu den beiden getesteten Selektivagars eine nahezu vollständige Übertragung der Kolonien auf die Membran erzielt wurde.
- Zur Probenuntersuchung ist aufgrund der hier vorkommenden Begleitflora die Verwendung eines Selektivagars indiziert. Von den untersuchten Selektivagars eignet sich ECD besser zum Einsatz für die DNA-Kolonie-Hybridisierung als MAC-Agar.
- Auf dem einzusetzenden Agar sollten für die „Colony Lift“-Methode nicht mehr als 200 KbE gewachsen sein. Eine größere Kolonienzahl kann aufgrund des dichten Wachstums zu einer unvollständigen Übertragung der Kolonien führen und eine Zuordnung positiver Membran-Signale zu den Kolonien der Agar-Platte ist schwierig.
- Die Nachweisgrenze der Methode lag sowohl mit die *stx1*- als auch für *stx2*-Sonde bei 10^3 KbE/10 g.
- Die Herstellung eigener Lösungen ist deutlich kostengünstiger als die Verwendung kommerzieller Lösungen, obgleich sie arbeitsaufwendiger ist.
- Die DNA-Kolonie-Hybridisierung stellt eine geeignete Methode zur Isolierung von STEC dar, sie ist jedoch zeit- und arbeitsaufwendig.

7. Zusammenfassung

Bei der DNA-Kolonie-Hybridisierung handelt es sich um eine molekularbiologische Methode, bei der mittels Sonde die *stx*-Gene von STEC hybridisiert und detektiert werden. Sie ermöglicht eine gezielte Isolierung *stx*-positiver Stämme von der Platte. Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines DNA-Kolonie-Hybridisierungs-Verfahrens für das Routinelabor.

Das Vorgehen gliederte sich zum Einen in die Herstellung der *stx1*- und *stx2*-Sonden, und zum Anderen in die Etablierung und Validierung der DNA-Kolonie-Hybridisierung selbst. Die Markierung der Sonden erfolgte mit DIG-markierten dNTPs, welche in einem PCR-Prozess in die amplifizierten DNA-Sequenzen eingefügt wurden. Für die Etablierung der Methode wurde das Verfahren modifiziert nach der ASU L07.18-1 (N.N. 2006) mit selbst-hergestellten Lösungen und nach Roche (N.N. 2000) mit kommerziellen Lösungen vergleichend durchgeführt und die Kosten berechnet. Des Weiteren wurden drei verschiedene Agars (PCA, MAC, ECD) getestet. Die Validierung des Nachweisverfahrens gliederte sich in die Beurteilung der Exklusivität und Inklusivität sowie die Bestimmung der Nachweisgrenze in Rinderhackfleisch.

Der Einsatz selbst-hergestellter Lösungen im Vergleich zu kommerziellen erwies sich als erheblich kostengünstiger. Hingegen ist die Verwendung kommerzieller Lösungen mit einem geringeren Arbeitsaufwand verbunden. Es konnte zudem gezeigt werden, dass ECD im Vergleich zu dem in der ASU L07.18-1 (N.N. 2006) genannten MAC-Agar bessere Ergebnisse erbrachte. Die besten Resultate lieferte PCA, dessen Einsatz aufgrund seiner mangelnden Selektivität jedoch nur bei der Verwendung von Reinkulturen indiziert ist. Im Exklusivitäts- und Inklusivitätstest erwies sich die Sonde als ausreichend spezifisch und sensitiv. Die Nachweisgrenze in Hackfleisch lag in dieser Arbeit bei 10^6 KbE/10 g.

Zusammenfassend betrachtet stellt die DNA-Kolonie-Hybridisierung eine sinnvolle Methode zur Isolierung von STEC dar. Sie erfordert jedoch einen erheblichen Zeit- und Arbeitsaufwand.

8 Summary

8. Summary

Establishment and Validation of a DNA colony hybridization method for the detection of STEC in minced meat

DNA colony hybridization is a molecular detection method utilizing a DNA-probe which hybridizes the *stx*-genes of STEC. The method allows the selective isolation of *stx*-positive strains from the agar. The aim of this study was to establish a DNA-Colony-Hybridization-method for use in a routine laboratory.

The study was divided into the development of *stx1*- and *stx2*-probes as well as the establishment and validation of the method. For the labelling of the probes, DIG-labelled dNTPs were inserted into the amplified DNA-sequence using PCR. The method was established following the ASU L07.18-1 (N.N. 2006), slightly modified, using self-made solutions, and according to Roche (N.N. 2000) using commercially available solutions. The cost of both procedures was calculated. Furthermore, three different agars (PCA, MAC, ECD) were tested. The validation of the method consisted of an evaluation of the exclusivity and inclusivity as well as the determination of the detection rate in minced beef.

The use of self-made solutions compared to commercial solutions proved to be much cheaper. On the contrary, using commercial solutions saves labour time. Furthermore, it could be shown that the ECD agar achieved better results compared to the MAC-agar mentioned in the ASU L07.18-1 (N.N. 2006). Best results were obtained using PCA, but as this agar is not selective, it should merely be used when working with pure strains. The exclusivity test showed the probes hybridize specifically, as the non-target strains were not hybridized. In the inclusivity and exclusivity test, the probes proved to be sufficiently specific and sensitive. The detection rate in minced meat was found to be 10^6 KbE/10 g.

Concluding, DNA colony hybridization is a useful method for the isolation of STEC. However, it is time consuming and labour-intensive.

9. Anhang

9.1. Geräte und Materialien

Tab. 34: Geräte und Materialien

Analysewaage <i>Sartorius Competence</i>	Sartorius, Göttingen
Aqua Bidest Bereiter <i>Fistream™ Cyclon™</i>	Fisons PLC, Suffolk, GB
Autoklav <i>3850EL</i>	Systemec, Wetttenberg
Bio Photometer <i>6131</i>	Eppendorf, München
Dampfsterilisator <i>Varioklav 500</i>	H+P, Oberschleißheim
Elektrophoresekammer <i>Sub-Cell GT</i>	Bio-Rad, München
Hybridisierungsgläser <i>GL 45</i>	Schott, Mainz
Hybridisierungsofen <i>Hybridizer HB-100</i>	VWR, Darmstadt
Laborflaschen mit Gewinde <i>Duran</i>	Schott, Mainz
Magnetrührer mit Heizfunktion <i>IKAMAG RCT basic</i>	IKA-Werke, Staufen
PCR-Werkbank <i>BIOCAP^{DNA} CAPTAIR bio</i>	Erlab, Köln
pH-Meter <i>535</i>	WTW, Weilheim
Plastikschalen <i>melamin®</i> , 13 x 25 x 6 cm, 21 x 32 x 3 cm	Zeta, Bahretal
Präzisionswaage <i>CE 3202 S-OCE</i>	Sartorius, Göttingen
Schüttler <i>IAK-VIBRO-FIX VF2</i>	IKA-Werke, Staufen
Schüttler <i>Suentifica 2x³</i>	Velp, Usmate, Italien
Schüttler <i>VF2</i>	Janke & Kunkel, Staufen
Sicherheitswerkbank <i>H212</i>	Kendro, Langenselbold
Stomacher <i>400 CIRCULATOR</i>	Seward, Worthing, UK
Thermoblock <i>ThermoStat plus</i>	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler <i>iCycler iQ</i>	Bio-Rad, München
Thermomischer <i>Thermomixer comfort</i>	Eppendorf, Hamburg
UV-Kamera <i>GelDoc EQ</i> mit <i>Quantity One Software</i> <i>PC/Mac</i>	Bio-Rad, München
Wasserbad <i>Sw22</i>	Julabo, Seelbach

9.2 Chemikalien und Reagenzien

Zentrifuge 5415 D

Eppendorf, Hamburg

Tab. 35: Verbrauchs-Materialien

Nylon Membrane for Colony and Plaque Hybridization	Art. 11 699 075 001	Roche, Mannheim
PCR-Tubes 0,2 ml Eight-Tube strip und 200 µl Thin Wall Cap	Art. 951010022	Eppendorf, München
Petrischalen steril	Art. 300305	Waldeck, Münster
Reaktionsgefäße Safe-Lock-Tubes 2.0ml/1.5ml	Art. 022363204 Art. 02236352	Eppendorf, Hamburg
Steriles Wasser Molecular Biology Grade Water	Art. 0032 006.302	Eppendorf, Hamburg
Stomacher-Beutel BagLight	Art. C09 11 029	Interscience, Saint Nom la Bretèche, Frankreich
Uvette	Art. 952010051	Eppendorf, Hamburg
Whatman Filterpapier 3MM CHR Gel Blotting Papier 460 x 570 mm	Art. 3030-392	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

9.2. Chemikalien und Reagenzien

Tab. 36: Hersteller-Kits

DIG Nucleic Acid Detection Kit	Art. 11175041910	Roche, Mannheim
Bestehend aus:		
- Anti-DIG AP Konjugat, 750 U/ml		
- Färbelösung NBT/BCIP, 50x Stammlösung		
- Blocking-Reagent		
- DIG-labeled Control DNA, 5 µg/ml		
- DNA Dilution Buffer, 50 g/ml		
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Art. 11636090910	Roche, Mannheim
Bestehend aus:		
-Enzym-Mix (Polymerase)		
-PCR DIG Probe Synthesis Mix (10x konz.)		
-PCR-Puffer mit MgCl ₂ (10x konz.)		

9.2 Chemikalien und Reagenzien

- dNTP stock solution (10x konz.)
- Control Template
- Control PCR Primer Mix (50 pmol)

DIG Wash and Block Buffer Set Art. 11585762001 Roche, Mannheim

Bestehend aus:

- 10xWaschpuffer (1 l)
- 10xMaleinsäurepuffer (500 ml)
- 10xBlocking-Solution (500 ml)
- 10xDetektionspuffer (100 ml)

Tab. 37: sonstige Chemikalien und Reagenzien

100xTE Puffer	Art. 1052.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
20% SDS	Art. 1057.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agar technical (Agar No. 3)	Art. LP0013	Oxoid, Wesel
Baird-Parker-Agar	Art. 1.05406.0500	Merck, Darmstadt
<p>Typische Zusammensetzung (g/l): Pepton aus Casein 10,0; Fleischextrakt 5,0; Hefeextrakt 1,0; Natriumpyruvat 10,0; Glycerin 12,0; Lithiumchlorid 5,0; Agar-Agar15,0 Herstellung: 58 g in 1 l A. dest. lösen durch auf dem Heizblock. Autoklavieren. Bei +50 bis +45 °C 50 ml Eigeblb Tellurit-Emulsion (Merck, Art. 1.03785) zugeben.</p>		
Blutplatte <i>Blood Agar Base No. 2</i>	Art. CM0271	Oxoid, Wesel
<p>Typische Zusammensetzung (g/l): Protease Pepton 15,0; Leberextrakt 2,5; Hefeextrakt 5,0; Natriumchlorid 5,0; Agar 12,0 Herstellung: 40 g in 1 l A. dest. suspendieren und bis zum vollständigen Lösen erhitzen. Autoklavieren. Nach dem Abkühlen auf +45 bis +50 °C 5-10% steriles Blut zusetzen.</p>		
Brain Heart Infusion (BHI)	Art. CM 0225	Oxoid, Wesel
<p>Typische Zusammensetzung (g/l): Kalbshirn Infusionsfeststoffe 12,5; Rinderherz Infusionsfeststoffe 5,0; Protease Pepton 10,0; Glucose 2,0; Natriumchlorid 5,0; Di-Natriumphosphat 2,5 Herstellung: 37 g in 1 l A. dest. lösen. Autoklavieren.</p>		

9.2 Chemikalien und Reagenzien

Brilliantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar (BPLS)	Art. 1.10747	Merck, Darmstadt
Typische Zusammensetzung (g/l): Pepton aus Fleisch 10,0; Fleischextrakt 5,0; Hefeextrakt 3,0; Di-Natriumhydrogenphosphat 0,6; Lactose 10,0; Saccharose 10,0; Phenolrot 0,9; Brilliantgrün 0,0047; Agar-Agar 12,0 Herstellung: 51,5 g in 1 l A. dest. lösen durch Erhitzen auf dem Heizblock. Nicht autoklavieren.		
Caseinpepton-Glucose-Hefeextrakt-Agar (PC)	Art. 1.05463.0500	Merck, Darmstadt
Typische Zusammensetzung (g/l): Pepton aus Casein 5,0; Hefeextrakt 2,5; D(+) Glucose 1,0; Agar-Agar 14,0 Herstellung: 22,5 g in 1 l A. dest. lösen durch Erhitzen auf dem Heizblock. Autoklavieren.		
modifizierte Caseinpepton-Sojamehl-Pepton-Bouillon (mCASO)	Art. 1.05459.0500	Merck, Darmstadt
Typische Zusammensetzung (g/l): Pepton aus Casein 17,0; Pepton aus Sojamehl 3,0; (+)-Glucose 2,5; Natriumchlorid 5,0; di-Kaliumhydrogenphosphat 2,5 Herstellung: 30g CASO- Bouillon in 1l A. dest. lösen. Zugabe von 1,5 g Gallesalz No. 3 (Oxoid, Art. LP0056). Autoklavieren.		
modifizierte Caseinpepton-Sojamehl-Pepton-Bouillon (mCASO) mit Novobiocin	Art. 1.09205.0500	Merck, Darmstadt
Typische Zusammensetzung (g/l): Pepton aus Casein 17,0; Pepton aus Sojamehl 3,0; (+)-Glucose 2,5; Di- Natriumhydrogenphosphat 4,0; Gallesalz Nr. 3 1,5 Herstellung: 33 g in 1l A. dest. lösen. Autoklavieren.		
Cefsulodin-Igrasan-Novobiocin-Agar (CIN)	Art. 1.16434.0500	Merck, Darmstadt
Typische Zusammensetzung (g/l): Pepton aus casein 10,0; Pepton aus Fleisch 10,0; Hefeextrakt 2,0; D(-)mannitol 20,0; Natrium-Pyruvat 2,0; Natriumchlorid 1,0; Magnesiumsulfat 0,01; Gallesalze 1,0; Neutralrot 0,03; Kristallviolett 0,001; Agar-Agar 12,5 Herstellung: 58,5 g <i>Yersinia</i> Agar Basis in 1 l A. dest. lösen. Autoklavieren. Pro 500 ml 1 Flasche <i>Yersinia</i> Selektivsupplement (Merck, Art. 1.16466.001) hinzugügen. Abkühlung des Basismediums auf + 50 °C, Zugabe von 1 ml Ethanol absolut (Merck, Art. 100974) (vergällt).		
Certified Molecular Biology Agarose	Art. 161-3102	Bio-Rad, München
DIG Easy Hyb	Art. 11603558001	Roche, Mannheim

9.2 Chemikalien und Reagenzien

Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Art. 6580	Merck, Darmstadt
Ethidium-Bromid, 10 µg/ml	Art. 161-0433	Bio-Rad, München
EZ load 100 bp PCR Molecular Ruler	Art. 170-8353	Bio-Rad, München
Fluorocult <i>Escherichia coli</i> Direkt-Agar (ECD)	Art. 1.04038.0500	Merck, Darmstadt
<p>Pepton aus Casein 20,0; Lactose 5,0; Natriumchlorid 5,0; Gallesalze 1,5; Di- Kaliumhydrogenphosphat 4,0; Agar-Agar 15,0; Tryptophan 1,0; 4-Methylumbilliferyl-β-D- Glucuronide 0,07 Herstellung: 5,31 g in 1 l A. dest. lösen. Autoklavieren.</p>		
Galle-Salz <i>Bile Salt No.3</i>	Art. LP0056	Oxoid, Wesel
HCl 1 mol/L	Art. 9057.1000	J.T. Baker, Griesheim
Indol-Reagenz <i>Bactident Indol</i>	Art. 1.11350.0001	Merck, Darmstadt
InstaGene™ Matrix	Art. 732-6030	Bio-Rad, München
Kaliumhydrogenphosphat	Art. 4873	Merck, Darmstadt
Mac Conkey-Agar No. 3 (MAC)	Art. CM115	Oxoid, Wesel
<p>Typische Zusammensetzung (g/l): Pepton 20,0; Lactose 10,0; Gallesalz No. 3 1,5; Natriumchlorid 5,0; Neutralrot 0,03; Kristallviolett 0,001; Agar 15,0 Herstellung: 51,5 g in 1 l A. dest. auf dem Heizblock bis zum Kochen lösen. Autoklavieren.</p>		
Maleinsäure	Art. K304.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
MasterMix 2.5x	Art. 0032 002.250	Eppendorf, Hamburg
modifizierter Charcoal-Cefoperazone- Desoxychylate-Agar (mCCDA)	Art. CM0739	Oxoid, Wesel
<p>Typische Zusammensetzung (g/l): Nährbouillon No. 2 25,0; Bakteriologische Aktivkohle 4,0; Casein- Hydrolysat 3,0; Natrium-Desoxycholat 1,0; Eisen- Sulfat 0,25; Natrium-Pyruvat 0,25; Agar 12,0 Herstellung: 22,75 g in 500 ml A. dest. auf dem Heizblock bis zum Kochen lösen. Autoklavieren. Abkühlen auf +50 °C. Zugabe von 1 Fläschchen CCDA Selektivsupplement (Oxoid, Art. SR0155).</p>		
NaCl, M 58,44 g/mol	Art. P029.2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
NaOH, M 40,00 g/mol	Art. P031.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

9.2 Chemikalien und Reagenzien

NaOH, 1 mol/l	Art. 1.09137.100	J.T. Baker, Griesheim
Nucleic Acid Sample Loading Buffer	Art. 161-0767	Bio-Rad, München
Peptonwasser		
Herstellung:		
1,0 g Pepton aus Fleisch, pankreatisch verdaut	Art. 1.07214.1000	Merck, Darmstadt
8,5 g Natriumchlorid in 1 l A. dest. lösen. Bis zum Kochen erhitzen. Autoklavieren.	Art. 1.06404.0500	Merck, Darmstadt
Peptonwasser mit Agar: zusätzlich 0,75 g Agar Technical zugeben.	Art. LP0013	Oxoid, Wesel
Primer		MWG Biotech, Ebersberg
- MK		
- KS7, KS8		
- LP43, LP44		
Proteinase K	Art. 19131	Qiagen, Hilden
Pseudomonas-Agar	Art. CM0559	Oxiod, Wesel
Typische Zusammensetzung (g/l): Gelatine Pepton 16,0; Magnesiumchlorid 1,4; Agar 11,0 Herstellung: 24,2 g in 1 l A. dest. lösen. 5 ml Glycerin zufügen und bis zum vollständigen Erhitzen lösen. Autoklavieren. Abkühlen auf +50 °C. Zugabe eines Fläschchens Pseudomonas- EF-C-Selektivsupplement (Oxoid, Art. SR102).		
Puffer für Laufpuffer / Agarosegel Tris- Boric-EDTA	Art. 161-0733	Bio-Rad, München
Zusammensetzung: 10x TBE, 89mM Tris, 89mM boric acid, 2mM EDTA, pH 8.3		
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Art. 4088.3	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TRIS PUFFERAN®	Art. 5429.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tween® 20	Art. 9127.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

9.3 Herstellungsangaben der Lösungen

9.3. Herstellungsangaben der Lösungen

Denaturierungslösung

	Packungsangabe	Herzustellende Lösung	Zugabe zu 1l A. bidest.
NaOH	1 M 40,00 g/mol	0,5 M	20 g
NaCl	1 M 58,44 g/mol	1,5 M	87,66 g

Die Substanzen werden in der entsprechenden Menge Wasser unter Schütteln gelöst.

Neutralisierungslösung pH 7,5

	Packungsangabe	Herzustellende Lösung	Zugabe zu 1l A. bidest
TRIS	1 M 121,14 g/mol	1 M	121,14 g
Tri- Natriumcitrat	1 M 294,10 g/mol	0,3 M	88,23 g

Die Substanzen werden in der entsprechenden Menge Wasser unter Schütteln gelöst. Der pH wird mit 1 N HCl und 1 N NaOH eingestellt.

20x SSC (Äquibrierungslösung), pH 7,0

	Packungsangabe	Herzustellende Lösung	Zugabe zu 1l A. bidest
NaCl	1 M 58,44 g/mol	3 M	175,32 g
Tri- Natriumcitrat	1 M 294,10 g/mol	0,3 M	88,23 g

Die Substanzen werden in der entsprechenden Menge Wasser unter Schütteln gelöst. Bei großen pH- Abweichungen wird dieser mit 1 N NaOH eingestellt .

2x SSC (1:10 Verdünnung)

20xSSC	100 ml
A. bidest.	900 ml

9.3 Herstellungsangaben der Lösungen

5x SSC (1:4 Verdünnung):

20xSSC	10 ml
A. bidest.	30 ml

0,04x SSC (1:500 Verdünnung):

20xSSC	20 ml
A. bidest.	499 ml

Low stringency Buffer / Waschlösung 1:

2xSSC	1 l
SDS	5 ml

Milchig trüb, bei +50°C mit Magnetrührer auflösen.

High stringency Buffer / Waschlösung 2:

0,04xSSC	1 l
SDS	5 ml

Milchig trüb, bei +50°C mit Magnetrührer auflösen.

Proteinase-K-Lösung:

Proteinase K jeweils frisch 1:10 mit 2x SSC verdünnen.

Hybridisierungslösung

Fertige Lösung von Roche, DIG Easy Hyb

Eigene Herstellung der Prähybridisierungslösung:

1 g N-Lauroylsarcosin und 1 g SDS in 1 l 5x SSX lösen. 10 g Blocking-Reagent hinzufügen, 1 h bei +70 °C unter Rühren erhitzen.

9.3 Herstellungsangaben der Lösungen

Waschpuffer- Stammlösung

Der Waschpuffer (DIG Wash and Block Buffer Set, Roche) muss 1:10 mit A. bidest. verdünnt werden. Vor Gebrauch gut schütteln. Lagerung: +15 bis +25 °C

Eigene Herstellung des Waschpuffers:

3 ml 0,3% Tween 20 mit 97 ml Maleinsäurepuffer-Stammlösung verdünnen.

Antikörperkonjugat- Lösung

Anti-DIG AP-conjugate (DIG Nucleic Acid Detection Kit, Roche)

Lagerung: Verdünnung jeweils frisch herstellen. Bei ca. +4°C ca. 12 Stunden stabil. Angebrochene Ampulle bei +2 bis +8 °C aufbewahren.

Ampulle vor dem Gebrauch 5 min bei 10.000 g zentrifugieren.

3 µl Antikörperkonjugat mit 15 ml Blocking solution verdünnen.

Detektionspuffer (pH 9,5)

Detection Buffer (DIG Wash and Block Buffer Set, Roche) 1:10 mit A. bidest. verdünnen.

Lagerung: +15 bis +25 °C.

Eigene Herstellung des Detektionspuffers:

15,76 g TRIS und 5,58 g NaCl zu 900 ml A. dest. geben, den pH mit 1 N HCl auf 9,5 einstellen. Anschließend mit A. dest. auf 1 l auffüllen.

Färbelösung (NBT/ BCIP)

200 µl Farbsubstratlösung (NBT/ BCIP, Gefäß 4) (DIG Nucleid Acid Detection Kit, Roche) mit 10 ml verdünntem Detection Buffer mischen.

Lagerung: die Lösung immer frisch herstellen. Stock solution lichtgeschützt lagern. Lagerung der Tabletten und der Stock solution nach dem Öffnen bei +2 bis +8 °C.

10xTE- Puffer (pH 8.0)

Die Stammlösung (Carl-Roth GmbH) muss 1:10 verdünnt werden.

9.3 Herstellungsangaben der Lösungen

Maleinsäurepuffer-Stammlösung

Der Maleinsäure- Puffer (DIG Wash and Block Buffer Set, Roche) muss 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt werden. Lagerung: +15- +25°C

Eigene Herstellung:

11,6 g Maleinsäure und 8,77 g NaCl in 900 ml A. dest. lösen. pH mit 2 N NaOH auf 7.5 einstellen und mit A. dest. auf 1 l auffüllen. Autoklavieren.

10xBlocking-Stammlösung

Entspricht des DIG Wash and Block Buffer Sets der Firma Roche.

Eigene Herstellung:

10 g Blocking-Reagenz in 90 ml Maleinsäure-Stammlösung bei 65°C auf dem Heizblock under ständigem Rühren lösen. Autoklavieren.

Lagerung bis zu 4 Wochen bei + 4 °C möglich.

1xBlocking-Lösung

Die Blocking solution (DIG Wash and Block Buffer Set, Roche) muss 1:10 mit dem Maleinsäurepuffer-Stammlösung verdünnt werden. Vorher schütteln. In 100 ml-Portionen aufgeteilt, kann die Blocking Lösung bei -20 °C aufbewahrt werden.

Eigene Herstellung:

10 ml der 10xBlocking-Lösung mit 90 ml Maleinsäurepuffer-Stammlösung verdünnen.

PBS

Natriumchlorid	8,50 g
Dinatriumhydrogenphosphat	1,14 g
Kaliumdihydrogenphosphat	0,50 g
A. bidest	ad 1 l

Alle Komponenten in A. bidest. lösen. Der pH wird mit 1 N NaOH eingestellt.

9.4 Ergebnistabellen

9.4. Ergebnistabellen

Tab. 38: Ergebnisse der Messung der DNA-Extraktion

		ng/µl	A ₂₃₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₃₂₀	A _{260/280}	A _{260/230}
<u>Anreicherung 1</u>								
Methode 1	x1	65	0.898	11.292	0.544	-0.157	2.37	1.44
	x2	60	0.836	1.199	0.488	-0.144	2.46	1.43
Methode 2	x1	39	0.772	0.779	0.405	-0.057	1.92	1.01
	x2	40	0.945	0.801	0.459	0.061	1.74	0.85
Methode 3	x1	16	0.245	0.314	0.178	0.025	1.76	1.28
	x2	17	0.343	0.339	0.212	0.028	1.60	0.99
Methode 4	x1	241	1.660	1.446	1.348	0.996	1.07	0.87
	x2	381	2.393	2.287	2.198	0.96	1.04	2.011
<u>Anreicherung 2</u>								
Methode 1	x1	79	1.183	1.583	0.824	0.085	1.92	1.34
	x2	70	1.183	1.404	0.767	0.117	1.83	1.26
Methode 2	x1	39	0.600	0.774	0.432	0.078	1.79	1.29
	x2	35	0.669	0.704	0.410	0.060	1.71	1.16
Methode 3	x1	10	0.127	0.200	0.106	0.010	1.88	1.57
	x2	15	0.294	0.309	0.194	0.044	1.59	1.05
Methode 4	x1	63	0.540	0.379	0.230	-0.147	1.65	0.70
	x2	104	0.799	0.622	0.450	0.014	1.38	0.78

x1= stx1-positiver Referenzstamm

x2= stx2-positiver Referenzstamm

9.4 Ergebnistabellen

Tab. 39: Ergebnisse der Effizienz der DNA-Kolonie-Hybridisierung

Referenz-keim	Membran	Kolonienzahl auf Agar	Signale auf Membran		
			deutlich positiv	fraglich positiv	negativ
x1					
PCA	A	60	45	15	0
	B	68	52	13	3
	C	43	22	21	0
	D	34	32	2	0
MAC	A	46	6	0	40
	B	45	11	0	34
	C	23	16	0	7
	D	29	22	1	6
ECD	A	55	10	4	41
	B	65	8	23	34
	C	48	25	22	1
	D	54	38	10	6
x2					
PCA	A	142	129	12	1
	B	123	81	42	0
	C	44	14	28	2
	D	41	15	26	0
MAC	A	39	20	19	0
	B	35	12	23	0
	C	3	0	2	1
	D	10	0	10	0
ECD	A	86	34	47	5
	B	72	37	35	0
	C	45	17	28	0
	D	38	35	3	0

x1= stx1-positiver Referenzstamm

x2= stx2-positiver Referenzstamm

9.4 Ergebnistabellen

Tab. 40: Kosten der Einzelkomponenten zur Preisberechnung

Chemikalie	Hersteller	Menge	Preis [€]
Anti-DIG-AP-Konjugat	Roche	200 µl	177,00
Blocking-Reagenz	Roche	27 g	44,00
DIG Easy Hyb	Roche	500 ml	197,50
DIG Wash Block and Buffer Set	Roche	Washing Buffer 2x 500 ml; Maleic Acid Buffer, Blocking-Solution: 500 ml; Detectionbuffer: 100 ml	188,50
Maleinsäure	Merck	500g	21,10
Membranen	Roche	50 Stück	193,50
NaCl	Roth	5 kg	32,65
NaOH	Roth	500 g	10,45
Natriumcitrat	Roth	500 g	12,75
NBT/BCIP	Roche	8 ml	94,00
N-Lauroylsarcosin	Merck	100 g	15,60
Proteinase K	Qiagen	2 ml	60,00
SDS (flüssig)	Roth	1 l	92,70
TE-Puffer	Roth	1 l	37,95
TRIS	Roth	500 g	22,50
Tween 20	Merck	500 ml	33,50
Whatman Filterpapier	Roth	100 Stück	210,00

9.4 Ergebnistabellen

Tab. 41: Kosten der kommerziellen und selbst-hergestellten Gebrauchs-Lösungen für die DNA-Kolonie-Hybridisierung

Lösung	kommerziell			selbst hergestellt		
	Menge Einzelkomponenten für 1 l	Preis Einzelkomponente für 1 l [€]	Preis Lösung gesamt pro 1 l [€]	Komponente	Preis pro 1l [€]	Preis gesamt pro 1 l [€]
Hybridisierungslösung	2x DIG Easy Hyb (500 ml)	395,00	395,00	1 l 5x SSC 1 g N-Lauroylsarcosin 1 g SDS 10 g Blockingreagent	0,80 1,56 0,46 16,30	19,12
Anti-DIG-AP-Konjugat	0,2 ml Antikörper-Lösung 1l 1x Blocking-Lösung	177,00 75,40	252,40	0,2 ml Antikörper-Lösung 1l Blocking-Lösung 1x	177,00 16,80	193,80
10x Blockinglösung	*2x Flasche 3	89,76	89,76	100g Blockingreagenz 900 ml Maleinsäurepuffer	163,00 0,50	163,50
1x Blockinglösung	*100 ml Flasche 3 900 ml Flasche 2	8,97 80,78	89,75	100 ml Blockinglösung 10x 900 ml Maleinsäurepuffer	16,30 0,50	16,80
Detektionspuffer	**10x 100 ml Flasche 4	89,80	89,80	15,76 g TRIS 5,85 g NaCl	0,71 0,04	0,75
Färbelösung	20 ml NBT/BCIP-Lösung 1 l Detektionspuffer verd.	235,00 75,40	310,40	20 ml NBT/BCIP-Lösung 1l Detektionspuffer verd.	235,00 0,75	235,75
Maleinsäurepuffer-Stammlösung	*2x Flasche 2	89,76	89,76	11,6 g Maleinsäure 8,77 g NaCl	0,49 0,06	0,55
Waschpuffer	*1000 ml Flasche 1	89,76	89,76	970 ml Maleinsäure 30 ml Tween 20 0,3%	0,53 0,20	0,73

*= Komponenten des DIG Wash and Block Buffer Sets der Firma Roche

Lösungen nur im Kit á 188,50 € erhältlich. Kosten wurden entsprechend der enthaltenen Menge je Lösung berechnet.

9.4 Ergebnistabellen

Tab. 42: gleichbleibende Kosten der Gebrauchs-Lösungen für die DNA-Kolonie-Hybridisierung

Lösung	Menge Einzelkomponenten für 1 l	Preis Einzelkomponenten für 1 l [€]	Preis Lösung gesamt pro 1 l [€]
Denaturierungslösung	20 g NaOH 87,66 g NaCl	0,42 0,57	0,99
Neutralisierungslösung	121,14 g TRIS 87,66 g NaCl	5,45 0,57	6,02
High Stringency Buffer	1 l 0,04x SSC 5 ml SDS	0,02 0,46	0,48
Low Stringency Buffer	1 l 2x SSC 5 ml SDS	0,30 0,46	0,79
Äquilibrierungslösung (20xSSC)	175,32 g NaCl 88,23 g Natriumcitrat	1,14 2,23	3,37
5x SSC*	250 ml 20x SSC	0,80	0,80
2x SSC	100 ml 20x SSC	0,33	0,33
0,04x SSC	2 ml 20x SSC	0,02	0,02
Proteinase K-Gebrauchslösung	100 ml Proteinase K 900 ml 2x SSC	3000,00 0,33	3000,33
TE-Puffer	100 ml TE-Stamm-lösung	37,95	3,80

*= nur für Methode nach ASU L07.18-1 (N.N. 2006)

10. Literaturverzeichnis

10. Literaturverzeichnis

- ADWAN G.M., ADWAN K.M. (2004)
Isolation of shiga toxigenic *Escherichia coli* from raw beef in Palestine
Int J Food Microbiol **97**: 81- 84
- AMMON A. (1997)
Surveillance of enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) infections and haemolytic uraemic syndrome (HUS) in Europe
Euro Surveill **2**: www.eurosurveillance.org/em/v02n12/0212-221.asp
- ARTHUR T.M., BARKOCY-GALLAGHER G.A., RIVERA-BETANCOURT M., KOOHMARAIE M. (2002)
Prevalence and Characterization of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* on Carcasses in Commercial Beef Cattle Processing Plants
Appl Environ Microbiol **68**: 4847-4852
- AUVRAY F., LECUREUIL C., TACHÉ J., LECLERC V., DEPPERIOIS V., LOMBARD B. (2007)
Detection, isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail-minced beef using PCR-based techniques, immunoassays and colony hybridization
Letters Appl Microbiol **46**: 646-651
- BANGSOW T., HUCH R., MALE D., MÜLLER S. (2002)
Polymerase-Kettenreaktion (PCR)
in: SCHRIMPF G. (Hrsg.): Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Anleitungen für das molekularbiologische Labor
3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg – Berlin, Deutschland: 147-168
- BARLOW R.S., GOBIUS K.S., DESMARCHELIER P.M. (2006)
Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and lamb cuts: Results of a one-year study
Int J Food Microbiol **111**: 1-5
- BAUMGARTNER A., BISCHOFBERGER T., BISSIG-CHOISAT B., DALLA TORRE M., EMCH H., GAFNER J.-L., HÜBNER Ph., MEYER R., MÜLLER Ch., SCHEFFELDT P., SPAHR U., STEPHAN R., WÄSPI U. (2006)
SAS, Schweizerische Akkreditierungsstelle
Leitfaden zur Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren und zur Abschätzung der Messunsicherheit im Bereich Lebensmittel- und Umweltmikrobiologie
Dokument Nr. 328.dw, Rev. 01
- BERGAMINI A.M.M., SIMOES M., IRINO K., GOMES T.A.T., GUTH B.E.C. (2007)
Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains in ground beef in Sao Paulo, Brazil
Braz J Microbiol **38**: 553-556

10. Literaturverzeichnis

- BETTELHEIM K.A., BEUTIN L. (2003)
Rapid laboratory identification and characterization of verocytotoxigenic (Shiga toxin producing) *Escherichia coli* (VTEC/STEC)
J Appl Microbiol **95**: 205-217
- BETTELHEIM K.A., BROWN J.E., LOLEKHA S., ECHEVERRIA P. (1990)
Serotypes of *Escherichia coli* That Hybridized with DNA Probes for Genes Encoding Shiga-Like Toxin I, Shiga-Like Toxin II, and Serogroup O157 Enterohemorrhagic *E. coli* Fimbriae Isolated from Adults with Diarrhea in Thailand
J Clin Microbiol **28**: 239-295
- BEUTIN L., GEIER D., STEINRÜCK H., ZIMMERMANN S., SCHEUTZ F. (1993)
Prevalence and Some Properties of Verotoxin (Shiga-Like-Toxin)-Producing *Escherichia coli* in Seven Different Species of Healthy Domestic Animals
J Clin Microbiol **31**: 2483- 2488
- BEUTIN L., GEIER D., ZIMMERMANN S., KARCH H. (1995)
Virulence Markers of Shiga-Like Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains Originating from Healthy Domestic Animals of Different Species
J Clin Microbiol **33**: 631-635
- BEUTIN L., KRAUSE G., ZIMMERMANN S.,KAULFUSS S., GEIER K. (2004)
Characterization of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Human Patients in Germany over a 3-Year Period
J Clin Microbiol **42**: 1099-1108
- BEUTIN L., MONTENEGRO M.A., ORSKOV I., ORSKOV F., PRADA J., ZIMMERMANN S., STEPHAN R. (1989)
Close Association of Verotoxin (Shiga-Like-Toxin) Production with Enterohemolysin Production in Strains of *Escherichia coli*
J Clin Microbiol **27**: 2559- 2564
- BEUTIN L., ZIMMERMANN S., GLEIER K. (1998)
Human Infections with Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Other Than Serogroup O157 in Germany
Emerg Infect Dis **4**: 635-639
- BLANCO M., BLANCO J.E., MORA A., REY J., ALONSO M., HERMOSO M., HERMOSO J., ALONSO M.P., DAHBI G., GONZÁLEZ E.A., BERNÁDEZ M.I., BLANCO J. (2003)
Serotypes, Virulence Genes, and Intimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Isolates from Healthy Sheep in Spain
J Clin Microbiol **41**:1351-1356
- BOLSOVER S.R., HYAMS J.S., SHEPHARD E.A., WHITE H.A., WIEDEMANN C.G. (2003)
DNA structure and the genetic code
in: Cell biology: a short course
2. Auflage, John-Wiley & Sons Inc., New Jersey, USA: 65-86

10. Literaturverzeichnis

BRIAN M.J., FROSOLONO M., MURRAY B.E., MIRANDA A., LOPEZ E.L., GOMEZ H.F., CLEARY T.G. (1992)
Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infection and Hemolytic-Uremic Syndrome
J Clin Microbiol **30**: 1801-1806

BROWN J.E., ECHEVERRIA P., TAYLOR D.N., SERIWATANA J., VANAPRUKS V., LEXOMBOON U., NEILL R.N., NEWLAND J.W. (1989)
Determination by DNA Hybridisation of Shiga-Like-Toxin-Producing *Escherichia coli* in Children with Diarrhea in Thailand
J Clin Microbiol **27**: 291-294

BRUNDER W., SCHMIDT H., KARCH H. (1996)
KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7
Microbiol **142**: 3305-3315

BRUNDER W., SCHMIDT H., KARCH H. (1997)
EspP, a novel extracellular serin protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves Human coagulation factor V
Mol Microbiol **24**: 767-778

BUSCH U., HEIßENHUBER I., MESSELHÄUSER U., HÖRMANSDORFER S., SING A. (2007)
Nachweis Shigatoxin-bildender/ Enterohämorrhagischer *Escherichia coli* (STEC/EHEC) mittels Real-Time PCR
Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, **2**: 144-148

CALDERWOOD S.B., ACHESON D.W.K., KEUSCH G.T., BARRET T.J., GRIFFIN T.M., STROCKBINE N.A., SWAMINATHAN B., KAPER J.B., LEVINE M.M., KAPLAN B.S., KARCH H., O'BRIEN A.D., OBRIG T.G., TAKEDA J., TARR P.I., WACHSMUTH I.K. (1996)
Proposed new nomenclature for SLT (VT) family
AMS News **62**: 118-119

CHAHED A., GHAFIR Y., CHINA B., DIERICK K., De ZUTTER L., PIÉRARD D., DAUBE G. (2005)
Survey of the contamination of foodstuffs of animal origin by Shiga toxin producing *Escherichia coli* serotype O157:H7 in Belgium from 1999-2003
Eurosurveillance **10**: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=527>

DECHERT (2002)
Gelelektrophorese
in: SCHRIMPF G. (Hrsg.): Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Anleitungen für das molekularbiologische Labor
3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg – Berlin, Deutschland: 39-88

10. Literaturverzeichnis

DELORME S. (2008)

Untersuchungen zum Nachweis von verotoxigenen *E. coli* (VTEC), speziell Serovar O157, in Lebensmitteln tierischen Ursprungs mit verschiedenen Anreicherungsverfahren
Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades im Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

DJORDJEVIC S.P., HORNITZKY A., BAILEY G., GILL P., VANSELOW B., WALKER K., BETTELHEIM K.A. (2001)

Virulence Properties and Serotypes of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from Healthy Australian Slaughter-Age Sheep
J Clin Microbiol **39**: 2017-2021

DUATTA S., CHATTERJEE A., DUATTA P., RAJENDRAN K., ROY S., PARMANIK K.C., BHATTACHARYA S.K. (2001)

Sensitivity and performance characteristics of a direct PCR with stool samples in comparison to conventional techniques for diagnosis of *Shigalle* and enteroinvasive *Escherichia coli* infection in children with acute diarrhoea in Calcutta, India
J Med Microbiol **50**: 667-674

EASTEAL S., MC LEOD N., REED K. (1991)

Principles of DNA Profiling
in: DNA profiling: principles, pitfalls and potential: a handbook of DNA-based Evidence for the legal, forensic and Law Enforcement Profession
Harwood Academic Publishers GmbH, Chur, Switzerland: 42-64

ELLIOTT E.J., ROBINS- BROWN R.M., O'LOUGHLIN E.V., BENNETT- WOOD V., BOURKE J., HENNING P., HOGG G.G., KNIGHT J., POWELL H., REDMOND D. and CONTRIBUTORS TO THE AUSTRALIAN PAEDIATRIC SURVEILLANCE UNIT (2001)

Nationwide study of hus: clinical, microbiological and epidemiological features
Arch Dis Child **85**: 125-131

ESCHEVERRIA P., TAYLOR D.N., SERIWATANA J., MOE C. (1986)

Comparative study of synthetic oligonucleotide and cloned polynucleotide enterotoxin gene probes to identify enterotoxigenic *Escherichia coli*
J Clin Microbiol **25**: 106-109

ESPIÉ E., GRIMON F., VAILLANT V., MONTET M.P., CARLE I., BAVAI C., de VALK H., VERNOZY-ROZAND C.

O148 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* outbreak: microbiological investigation as a useful complement to epidemiological investigation
Clin Microbiol Infect **12**: 992-998

ETHELBERG S., OLSEN K.E.P., SCHEUTZ F., JENSEN C., SCHILLERUP P., ENGBERG J., PETERSEN A.M., OLESEN B., GERNER- SMIDT P., MERLBAK K. (2005)

Virulence Factors for Hemolytic Uremic Syndrome, Denmark
Emerg Infect Dis **11**: 503-504

10. Literaturverzeichnis

- FACH P., PERELLE S., DILASSER F., GROUT J. (2001)
Comparison between a PCR-ELISA test and the vero cell assay for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy products and characterization of virulence traits of the isolated strains
J Appl Microbiol **90**: 809-818
- FACH P., PERELLE S., DILASSER F., GROUT J. (2001)
Comparison between PCR-ELISA test and vero cell assay for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy products and characterization of virulence traits of the isolated strains
J Appl Microbiol **90**: 809-818
- FAGAN N., DESMARCHELIER P. (1999)
Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep and pre-slaughter lambs in eastern Australia
Letters Appl Microbiol **28**: 335-339
- FEGAN N., DESMARCHELIER P. (1999)
Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep and pre-slaughter lambs in Eastern Australia
Letters Appl Microbiol **28**: 335
- FEINBERG A.P., VOGELSTEIN B. (1983)
A technique for Radiolabeling DNA Restriction Endonuclease Fragments to High Specific Activity
Anal Biochem **132**: 6-13
- FELDSINE P., ABEYTA C., ANDREWS W.H.
AOAC International Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis
J AOAC Int **85**: 1187-1200
- FRATAMIC P.M., BAYLES D.O. (2005)
Molecular Approachs for Detection, Identification and Analysis of Foodborne Pathogens
in: FRATAMICO P.M., BHUNIA A.K., SMITH J.L.: Foodborne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology
Caister Academic Press, Norfolk, UK: 1-14
- FRATAMICO P.M., BAGI L.K., BUSH E.J., SOLOW B.T. (2004)
Prevalence and Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Swine Feces Recovered in the National Animal Health Monitoring System's Swine 2000 Study
Appl Env Food Microbiol **70**: 7173-7178
- FREMAUX B., RAYNAUD S., BEUTIN L., VERNOZY ROZAND L. (2006)
Dissemination and persistence of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) strains from French Dairy farms
Vet Microbiol **117**: 180- 191

10. Literaturverzeichnis

- GALLIEN P., KLIE H., PERLBERG K.-W., PROTZ D. (1996)
Einsatz von Nylon Membranen zur gezielten Isolierung und Charakterisierung
Verotoxin-bildender *Escherichia coli* mittels DNA-Sonden
Berl Münch Tierärztl Wschr **109**: 431-433
- GALLIEN P., RICHTER H., MUCH C., FRÖBE I., PERLBERG K.-W., PROTZ D.
(1997)
Optimierung der Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis und zur
Charakterisierung Shigatoxin produzierender *Escherichia coli* (STEC) in
Lebensmitteln
Berl Münch Tierärztl Wschr **110**: 422-426
- GANNON V.P.J., GYLES C.L., FRIENDSHIP R.W. (1988)
Characteristics of Verotoxigenic *Escherichia coli* from Pigs
Can J Vet Res **52**: 331-337
- GANNON V.P.J., KING R.K., KIM J.Y., GOLDSTEYN THOMAS E.J. (1992)
Rapid and Sensitive Method for Detection of Shiga-Like Toxin-Producing *Escherichia coli* in Ground Beef Using the Polymerase Chain Reaction
Appl Environ Microbiol **58**: 3809-3815
- GILBREATH J.J., SHIELDS M.S., SMITH R.L., FARRELL L.D., SHERIDAN P.P.,
SPIEGEL K.M. (2009)
Shiga Toxins, and the Genes Encoding Them, in Fecal Samples from Native Idaho
Ungulates
Appl Environ Microbiol **75**: 862-865
- GÓMEZ D., MILIWEBSKY E., PASCUA C., BACHKIER A., MANFREDI E., ZOTTA
M., NARIO F., FIGUÍN A., SANZ M., ETCHEVERRÍA A., PADOLA N., PARMA A.,
RIVAS M. (2002)
Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from frozen
hamburgers and soft cheese
Rev Argent Microbiol **34**: 66-71
- GRÖTZBACH B. (2007)
Nachweis von pathogener *Yersinia enterocolitica* in Rohfleisch- und
Rohfleischerzeugnissen von Rind, Schwein und Geflügel mit modernen
molekularbiologischen Methoden
Inaugural Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München
- GRUNSTEIN M., HOGNESS D.S. (1975)
Colony hybridisation: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a
specific gene
Proc Natl Acad Sci **72**: 3961-3965
- GUARSIMARA A., IVANOV I., LEHRACH H. (1999)
A method of one step-enzyme labelling of short oligonucleotide probes for filter
hybridization
Nucleic Acid Res **27**: 703-705

10. Literaturverzeichnis

- GYLES C. L. (2006)
Shiga-toxin producing *Escherichia coli*: An overview
J Anim Sci **85**: E45-E62
- HALL L. (1995)
Genomic mapping and gene structure analysis
in: HAMES B.D., HIGGINS S.J.: Gene probes 2
Oxford University Press, New York, USA: 119-150
- HEIßENHUBER A., HAUTMANN W., LUDWIG M.-S., BUSCH U., WILDNER M. (2005)
Leitfaden Labordiagnostik von Shigatoxinbildenden und anderen darmpathogenen *Escherichia coli*-Stämmen
Arbeitsversion
Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
- HEIZMANN W., DÖLLER P.C., GUTBROD B., WERNER H. (1988)
Rapid Identification of *Escherichia coli* by Fluorocult Media and Positive Indol Reaction
J Clin Microbiol **26**: 2682-2684
- HILL W., MADDEN J.M., McCARDELL B.A., SHAH D.B., JAGOW J.A., PAYNE W.L., BOURIN B.K. (1983)
Foodborne Enterotoxigenic *Escherichia coli*: Detection and Enumeration by DNA Colony Hybridization
Appl Environ Microbiol **45**: 1324-1130
- HILL W.E., DATTA A.R., FENG P., LAMPEL K.A., PAYNE W.L. (2001)
Identification of Foodborne Bacterial Pathogens by Gene Probes
Bacteriological Analytical Manual Online, <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bama-24.html>, 05.06.2008
- HILL W.E., KEASLER S.P. (1991)
Identifcation of foodborne pathogens by nucleic acid hybridization
Int J Food Microbiol **12**: 67-76
- HOFF C., MIKOSCH T., SERANSKI P. (2002)
Blottingverfahren und Hybridisierungen
in: SCHRIMPF G. (Hrsg.): Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Anleitungen für das molekularbiologische Labor, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg – Berlin, Deutschland: 223-248
- HONG S., OH K.-H., CHO S.-H., KIM J.-C., PARK M.-S., LIM H.-S., LEE B.-K. (2009)
Asymptomatic healthy slaughterhouse workers in South Korea carrying Shiga toxin-producing *Escherichia coli*
FEMS Immunol Med Microbiol **56**: 41-47
- HU T.-L., WU S.-C. (2000)
Comparison of colony lift with direct spotting methods of blot preparation on the effect of colony hybridization in the detection of environmental organisms
J Microbiol Immunol Infect **33**: 123-126

10. Literaturverzeichnis

- HÜBNER P., GAUTSCH S., JEMMI T. (2002)
In house-Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren
Mitt Lebensmittelunters Hyg **93**: 118-139
- HULL A.E., ACHESON D.W.K., ECHEVERRIA P., DONOHUE-ROLFE A., KEUCH G.T. (1993)
Mitomycin Immunoblot Colony Assay for Detection of Shiga-Like Toxin-Producing *Escherichia coli* in Fecal Samples: Comparison with DNA Probes
J Clin Microbiol **31**: 1167-1172
- INNIS M.A., GELFAND D.H. (1990)
Optimization of PCRs
in: INNIS M.A., GELFAND D.H., SNINSKY J.J., WHITE T.J.: PCR-Protocols - A Guide to Methods and Applications
Academic Press Inc., San Diego, USA: 3-12
- JOHNSEN G., WASTESON Y., HEIR E., BERGET O.I., HERIKSTAD H. (2001)
Escherichia coli O157:H7 in faeces from cattle, sheep and pigs in the southwest part of Norway during 1998 and 1999
Int J Food Microbiol **65**:193- 200
- JOHNSON G., WASTESON Y., HEIR E., BERGET O.I., HERIKSTAD H. (2001)
Escherichia coli O157:H7 in faeces from cattle, sheep and pigs in the southwest part of Norway during 1998 and 1999
Int J Food Microbiol **10**: 193-200
- KARMALI M.A. (1989)
Infection by Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli*
Clin Microbiol Rev **2**: 15-38
- KAYSER F.H., BÖTTGER E.C. (2005)
Bakterielle Krankheitserreger
in: KAYSER F.H., VOLL M., BIENZ K.A., ECKERT J., ZUKERNAGEL R.M.
Medizinische Mikrobiologie: verstehen, lernen, nachschlagen
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland
- KESSLER C. (1995)
Non-radioaktive labelling and detection of nucleic acid probes
in: HAMES B.D., HIGGINS S.J.: Gene Probes 2
Oxford University Press, New York, USA: 253-267
- KIRII Y., DANBARKA H., KOMASE K., ARITA H., YOSHIKAWA M. (1987)
Detection of Enterotoxigenic *Escherichia coli* by Colony Hybridization with Biotinylated Enterotoxin Probes
J Clin Microbiol **25**: 1962-1965
- KÖHLER W., EGGER H.J., FLEISCHER B., MARRE R., PFISTER H., PULVERER G. (2001)
Medizinische Mikrobiologie
8. Auflage, Urban & Fischer Verlag, München - Jena, Deutschland

10. Literaturverzeichnis

- KONOWALCHUK J., SPIERS J.I., STAVRIC S. (1977)
Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*
Infect Immun **18**: 775-779
- KUHNERT P., DUBOSSON C.R., ROESCH M., HOMFELD E., DOHERR M.G.,
BLUM J.W. (2005)
Prevalence and risk-factor analysis of Shiga toxinogenic *Escherichia coli* in faecal
samples of organically and conventionally farmed dairy cattle
Vet Microbiol **109**: 37-45
- KUMAR H.S., KARUNASAFAR I., KARUNASAGAR I., TEIZOU T., SHIMA K.,
YAMASAKI S. (2004)
Characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from
seafood and beef
FEMS Microbiol Letters **233**: 173-178
- KWAGA J., IVERSEN J.O., MISRA V. (1992)
Detection of Pathogenic *Yersinia enterocolica* by Polymerase Chain Reaction and
Digoxigenin-Labeled Polynucleotide Probes
J Clin Microbiol **30**: 2268-2673
- LAZCKA O., DEL COMPO F.J., MUNOZ F.X. (2007)
Review: Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors
Biosens Bioelectron **22**: 1205-1217
- LEOTTA G.A., DEZA N., ORIGILA J., TOMA C., CHINEN I., MILIWEBSKY E.,
IYODA S., SOSA- ESTANI S., RIVAS M. (2006)
Detection and characterisation of Shiga toxin- producing *Escherichia coli* in captive
non- domestic animals
Vet Microbiol **118**: 151-157
- LYNN R.M., O'BRIEN S.J., TAYLOR C.M., ADAK G.K., CHART H., CHEASTY T.,
COJA J.E., GILLESPIE I.A., LOCKING M.E., REILLY W.J., SMITH H.R., WATERS
A., WILLSHAW G.A. (2005)
Childhood Hemolytic Uremic Syndrome, United Kingdom and Ireland
Emerg Infect Dis **11**: 590-596
- MANDRELL R.E. (2007)
Fruits and vegetables make you sick... what's going on?
Microbiology today **aug 07**: 112-115
- MAYRSHOFER F.X. (2005)
Zum Vorkommen von Shiga Toxin 1-Varianten beim Rind in Südbayern
Inaugural Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München
- MEICHTRI L., MILIWEBSKY E., GIOFFRÉ A., CHINEN I., BASCHKIER A.,
CHILLEMI G., GUTH B.E.E., MASANA M.O., CATALDI A., RODRÍGUEZ H.R.,
RIVAS M. (2004)
Shiga toxin- producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina:
prevalence and virulence properties
Int J Food Microbiol **96**: 189- 198

10. Literaturverzeichnis

MEINKOTH J., WAHL G. (1984)

Review: Hybridization of Nucleic Acids Immobilized on Solid Supports
Anal Biochem **138**: 267-284

MIKOSCH T. (2002)

Allgemeine Methoden: Markierung von Nucleinsäuren
in: SCHRIMPF G. (Hrsg.): Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von
Anleitungen für das molekularbiologische Labor
3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg – Berlin, Deutschland: 13-18

MORA A., BLANCO M., BLANCO J.E., DAHBI G., LÓPEZ C., JUSTEL P., ALONSO
M.P., ECHEITA A., BERNÁRDEZ M.I., GONZÁLEZ E.A., BLANCO J. (2007)

Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verocytotoxi)-producing
Escherichia coli isolated from minced beef in Lugo (Spain) from 1995 through 2003
BMC Microbiol **7**: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/7/13>

MÜLHARDT C. (2003)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)
in: Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland: 146-163

N.N. (2000)

DIG Application Manual for Filter Hybridization
Roche Applied Science

N.N. (2003)

Mikrobiologie in Lebensmitteln und Futtermitteln – Arbeitsvorschrift für die
Validierung alternativer Verfahren (ISO 15140:2003); Deutsche Fassung EN ISO
16140:2003

N.N. (2006)

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren §64 LFGB L07.18-1
Untersuchung von Lebensmitteln: Nachweis, Isolierung und Charakterisierung
Verotoxin-bildender *Escherichia coli* in Hackfleisch mittels PCR und DNA-
Hybridisierungstechnik

N.N. (2006a)

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren §64 LFGB L00.00-92
Untersuchung von Lebensmitteln: Nachweis von Verotoxin-bildenden *Escherichia*
(*E.*) *coli*-Stämmen (VTEC) in Lebensmitteln tierischer Herkunft

NATARO J.P., KAPER J.B. (1998)

Diarrheagenic *Escherichia coli*
Clin Microbiol Rev **11**:142-201

NEWLAND J.W., NEILL R.J. (1988)

DNA Probes for Shiga-Like Toxins I and II and for Toxin-Conveting Bacteriophages
J Clin Microbiol **26**: 1292-1297

NOVOTNA R., ALEXA P., HAMRIK J., MADANAT A., SMOLA J., CIZEK A. (2005)

Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from sheep
and goats in Jordan with evidence of multiresistant serotype O157:H7
Vet Med Czech **3**: 111-118

10. Literaturverzeichnis

O'BRIEN A., HOLMES R.K. (1987)

Shiga and Shiga- Like Toxins
Microbiol Rev **51**: 206- 220

O'BRIEN A.D., LAVECK G.D., THOMPSON M.R., FORMAL S.B. (1982)

Production of *Shigella dysenteriae* type I like cytotoxin by *Escherichia coli*
J Inf Dis **146**: 763-769

O'BRIEN A.D., NEWLAND J.W., MILLER S.F., HOLMES R.K., SMITH H.W.,
FORMAL S.B. (1984)

Shiga-like toxin converting phages from *E. coli* strains that cause hemorrhagic colitis
and infantile diarrhea
Science **226**: 694-696

OLSEN J.E. (2000)

DNA-based methods for detection of food-borne bacterial pathogens
Food Res **33**: 257-266

ORTH D., WÜRZNER R. (2006)

What makes an Enterohaemorrhagic *E. coli*?
Clin Inf Diseases **43**: 1168-1169

OSCROFT C. (2007)

Selection and Validation of Methods: Requirements for Accreditation to ISO/IEC
1705; An Overview

OTEIZA J.M., CHINEN I., MILIWEBSKY E., RIVAS M. (2006)

Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from
precooked sausages (morcillas)
Food Microbiol **23**: 283-288

PARRY S.M., SALMON R.L. (1998)

Sporadic STEC O157 Infection: Secondary Household Transmission in Wales
Emerg Infect Dis **4**: 657-661

PATON J.C., PATON A.W. (1998)

Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections
Clin Microbiol Rev **11**: 450-479

PERRET C. (1993)

The Molecular Principles of *in situ* Hybridization
in: MOREL C.: Hybridization Techniques for Electron Microscopy
CRC Press, Inc., Florida, USA: 13-44

PRADEL N., LIVRELLI V., DeCHAMPS C., PALOUX J.B., REYNAUD A., SCHEUTZ
F., SIROT J., JOLY B., FORESTIER C. (2000)

Prevalence and Characterization of Shiga Toxin- Producing *Escherichia coli* isolated
from Cattle, Food and Children during a one- year Prospective Study in France
J Clin Microbiol **38**: 1023- 1031

10. Literaturverzeichnis

PROHASKA S.N. (2009)

Entwicklung eines Kombinierten Verfahrens zum Nachweis von pathogenen *Yersinia enterocolica* in Schweinefleisch mittels Real-Time PCR Kolonie-DNA-Hybridisierung
Inaugural Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München

QUANTRELL R.J.O., NAYLOR S.W., ROE A.J., SPEARS K., GALLY D.L. (2004)
EHEC O157:H7 – getting to the bottom of the burger bug
Microbiol Today **31**: 126-128

RATNAM S., MARCH S.B., AHMED R., BEZANSON G.S., KASATIYA S. (1988)
Characterization of *Escherichia coli* Serotype O157:H7
J Clin Microbiol: 2006-2012

REED K.C., MANN D.A. (1985)
Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes
Nucleic Acids Res **13**: 7207-7221

REED K.C., MANN D.A. (1985)
Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes
Nuc Acid Res **13**: 7207-7221

REY J., SÁNCHEZ Z.S., BLANCO J.E., HERMOSO de MENDOZA J., HEMOSO de MENDOZA M., GARCIA A., GIL C., TEJERO N., RUBIO R., ALSONSO J.M. (2006)
Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain
Int J Food Microbiol **107**: 212-217

RILEY L.K., CAFFREY C.J. (1990)
Identification of Enterotoxigenic *Escherichia coli* by Colony Hybridization with Nonradioaktive Digoxigenin-labeled DNA Probes
J Clin Microbiol **28** (6): 1465-1468

RILEY L.W., TEMIS R.S., HELGERSON S.D. (1983)
Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype
N Engl J Med **308**: 681-685

ROLDÁN M.L., CHINEN I., OTERO J.L., MIKIWEBSKY E.S., ALFARO N., BURNS P., RIVAS M. (2007)
Isolation, characterization and typing of *Escherichia coli* O157:H/ strains from beef products and milk
Rev Argent Microbiol **39**: 113-119

SAMADPOUR M., BARBOUR M.W., NGUYEN T., CAO T.M., BUCK F., DEPAVIA G.A., MAZENGA E., YANG P., ALFI D., LOPES M., STOPFORTH J.D. (2006)
Incidence of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Echerichia coli* O157, Salmonella, and Listeria monocytogenes in retail fresh ground beef, sprouts and mushrooms
J Food Prot **69**: 441-443

10. Literaturverzeichnis

SAMADPOUR M., KUBLER M., BUCK F.C., DEPAVIA G.A., MAGZENGLIA E., STEWART J., YANG P., ALFI D. (2002)
Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and cattle feces from King County, Washington
J Food Prot **65**: 1322-1325

SAMADPOUR M., LISTON J., ONGERTH J.E., TARR P.I. (1990)
Evaluation of DNA Probes for Detection of Shiga-Like-Toxin-Producing *Escherichia coli* in Food and Calf Fecal Samples
Appl Environ Microbiol **56**: 1212-1215

SAMADPOUR M., ONGERTH J.E., LISTON J., TRAN N., NGUYEN D., WHITTAM T.S., WILSON R.A., TARR P.I. (1994)
Occurrence of Shiga-Like Toxin-Producing *Escherichia coli* in Retail Fresh Seafood, Beef, Lamb, Pork, and Poultry from Grocery Stores in Seattle, Washington
Appl Environ Microbiol **60**: 1038-1040

SCALETSKY I.C.A., FABBRICOTTI S.H., ARANDA K.R., MORAIS M.B., FAGUNDES-NETO U. (2002)
Comparison of DNA Hybridization and PCR Assay for Detection of Putative Pathogenic Enteroadherent *Escherichia coli*
J Clin Microbiol **40**: 1254-1258

SCHMIDT H., RÜSSMANN H., SCHWARZKOPF A., ALEKSIC S., HEESEMANN J., KARCH H. (1994)
Prevalence of Attaching and Effacing *Escherichia coli* in Stool Samples from Patients and Controls
Zbl Bakt **281**: 201-213

SELBITZ H.J. (2002)
Bakterielle Krankheiten der Tiere
in: ROLLE M., MAYER A.
Medizinische Mikrobiologie der Infektions- und Seuchenlehre
7. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, Deutschland: 417-588

SHANKS P.L. (1938)
An unusual condition affecting the digestive organs of pigs
Vet Rec **50**: 356-358

SJÖLING A., WIKLUND G., SAVARINO S.J., COHEN D.I., SVENNERHOLM A.-M. (2007)
Comparative Analyses of Phenotypic and Genotypic Methods for the Detection of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Toxins and Colonization Factors
J Clin Microbiol **45**: 3295-3301

SOMMERFELT H., KALLAND K.H., RAJ P., MOSELEY S.L., BHAN M.K., BJORVATN B. (1988)
Cloned Polynucleotide and Synthetic Oligonucleotide Probes Used in Colony Hybridization Are Equally Efficient in the Identification of Enterotoxigenic *E. coli*
J Clin Microbiol **26**: 2275-2278

10. Literaturverzeichnis

STEPHAN R., SCHUMACHER S., CORTI S., KRAUSE G., DAUSER J., BEUTIN L. (2008)

Prevalence and Characteristics of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* in Swiss Raw Milk Cheese Collected at Producer Level

J Dairy Sci **91**: 2561-2565

STRACHAN T.A., READ A.P. (2004)

Nucleic acid hybridization: principles and applications

in: Human Molecular Genetics 3

Garland Publishing, New York, USA: 155-180

STROCKBINE N.A., MARQUES L.R.M., NEWLAND J.W., SMITH H.W., HOLMES R.K., O'BRIEN A.D. (1986)

Two toxin converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenetically distinct toxins with similar biological activities

Infect Immun **53**: 135-140

SURZYCKI S. (2003)

DNA Fingerprinting: Multi-Locus Analysis

in: Human molecular biology laboratory manual

Blackwell Publishing, Malden, USA: 20-61

SUTHIENKUL O., BROWN E., SERIWATANA J., TIENHONGDEE S., SASTRAAHA S., ECHEVERRIA P. (1990)

Shiga-Like-Toxin-Producing *Escherichia coli* in Retail Meats and Cattle in Thailand

Appl Environ Microbiol **56**: 1135-1139

SWAMINATHAN B., FENG P. (1994)

Rapid Detection of food-borne pathogenic bacteria

Annu Rev Microbiol **48**: 401-426

SZABO R.A., TODD E.C.D., JEAN A. (1986)

Method to isolate *Escherichia coli* O157:H7 from food

J Food Prot **49**: 768-772

TARR P.I., GORDON C.A., CHANDLER W.L. (2005)

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uremic syndrome

Lancet **365**: 1073-1086

VALENTINE J.L., ARTHUR R.R., MOBLEY H.L.T., DICK J.D. (1991)

Detection of *Helicobacter pylori* by Using the Polymerase Chain Reaction

J Clin Microbiol **29**: 689-695

WALKER J., DOUGAN G. (1989)

DNA probes: A new role in diagnostic microbiology

J Appl Bacteriol **67**: 229-238

WANI S.A., PANDIT F., SAMANTA I., BHAT M.A., BUCHH A.S. (2004)

Molecular epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in India

Curr Sci **87**: 1345-1353

10. Literaturverzeichnis

WEAGANT, S., JAGOW, J.A., JINNEMAN, K.C., OMIECINSKI, C.J., KAYSNER, C.A.; HILL, W.E.
Development of Digoxigenin-Labeled PCR Amplicon Probes
for Use in the Detection and Identification of Enteropathogenic *Yersinia* and Shiga
Toxin-Producing *Escherichia Coli* from Foods
J Food Prot **62**:438-443

11. Tabellenverzeichnis

11. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: STEC-Prävalenzen Wiederkäuern und Schweinen	7
Tab. 2: Prävalenzen von STEC und <i>E. coli</i> O157:H7 in Lebensmittelproben	10
Tab. 3: Eigenschaften zur Unterscheidung von Stx (nach DELORME 2008)	11
Tab. 4: Virulenzfaktoren von STEC	14
Tab. 5: Eigenschaften von <i>E. coli</i> nach RATNAM et al. (1988)	19
Tab. 6: Nachweis von STEC mittels DNA-Kolonie-Hybridisierung aus Reinkultur und verschiedenen Proben.....	31
Tab. 7: STEC-Sonden-Markierung in der Literatur	32
Tab. 8: STEC Polynukleotid-Sonden aus der Literatur	33
Tab. 9: Prähybridisierungs- und Hybridisierungstemperaturen und -dauer in der Literatur	36
Tab. 10: Primersequenzen für den Nachweis von <i>stx1</i> und <i>stx2</i> (N.N. 2006).....	38
Tab. 11: Referenzstämme für die Hybridisierung von <i>stx</i>	40
Tab. 12: Validierungsparameter für qualitative und quantitative Methoden nach HÜBNER et al. (2002)	42
Tab. 13: Begriffsbestimmung der Validierungskriterien für qualitative und quantitative Methoden nach HÜBNER et al. (2002).....	44
Tab. 14: Zusammensetzung kommerzieller und selbst-hergestellter Lösungen für die DNA-Kolonie-Hybridisierung.....	48
Tab. 15: Gemeinsame Lösungen und Materialien für die DNA-Kolonie-Hybridisierung	49
Tab. 16: Ablauf der vier getesteten DNA-Extraktionsmethoden	51
Tab. 17: Pipettierschema der PCR zur Annealing-Temperatur-Optimierung.....	52
Tab. 18: Drei PCR-Protokolle zur Annealing-Temperatur-Optimierung	53
Tab. 19: Stufen des Temperatur-Gradienten (50-65°C)	53
Tab. 20: Stufen des Temperatur-Gradienten (50-60°C)	54
Tab. 21: Pipettierschema zur Optimierung der einzusetzenden Template-Menge ...	55
Tab. 22: PCR-Protokoll für die Ermittlung der optimalen Template-Menge	55
Tab. 23: Pipettierschema für die PCR zur Sonden-Markierung.....	56
Tab. 24: Bakterien-Stämme für den Exklusivitätstest	67
Tab. 25: Durchschnittlich gemessene DNA-Extraktionswerte.....	74

11. Tabellenverzeichnis

Tab. 26: Beurteilung der Effizienz der DNA-Kolonie-Hybridisierung mit drei verschiedenen Agars.....	82
Tab. 27: PCR- und Hybridisierungsergebnisse des Inklusivitätstests im Vergleich ..	84
Tab. 28: Ergebnisse des Inhibitionsversuchs	85
Tab. 29: Kolonienwachstum der für die Beimpfung verwendeten Verdünnungsstufen	87
Tab. 30: Kolonienwachstum aus der Voranreicherung und verdünnten Anreicherung auf ECD	89
Tab. 31: Kolonienwachstum, Hybridisierungs-Ergebnis und Indol-Aktivität der Platten der Voranreicherung.....	90
Tab. 32: Reagenzienkosten zur DNA-Kolonie-Hybridisierung	93
Tab. 33: Gesamtkosten der DNA-Kolonie-Hybridisierung	94
Tab. 34: Geräte und Materialien	110
Tab. 35: Verbrauchs-Materialien	111
Tab. 36: Hersteller-Kits	111
Tab. 37: sonstige Chemikalien und Reagenzien	112
Tab. 38: Ergebnisse der Messung der DNA-Extraktion	120
Tab. 39: Ergebnisse der Effizienz der DNA-Kolonie-Hybridisierung	121
Tab. 40: Kosten der Einzelkomponenten zur Preisberechnung.....	122
Tab. 41: Kosten der kommerziellen und selbst-hergestellten Gebrauchs-Lösungen für die DNA-Kolonie-Hybridisierung	123
Tab. 42: gleichbleibende Kosten der Gebrauchs-Lösungen für die DNA-Kolonie-Hybridisierung.....	124

12. Abbildungsverzeichnis

12. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schema zum Nachweis von STEC nach WANI et al. (2000)	18
Abb. 2: Ablaufschema der DNA-Kolonie-Hybridisierung.....	22
Abb. 3: Versuchsablauf zum Agar-Test	58
Abb. 4: Beispiel für die Übereinstimmung der Folienschablone und der gefärbten Membran	59
Abb. 5: Nylon-Membran auf einem bewachsenen Agar	59
Abb. 6: Abklatsch der Kolonien vom Agar auf die Membran.....	60
Abb. 7: Hybridisierungssofen.....	62
Abb. 8: Inkubation während der Färbereaktion im Dunkeln	64
Abb. 9: Bewertung der Signal-Intensität	65
Abb. 10: Ablaufschema des Inhibitionsversuchs	69
Abb. 11: Vorgehensweise zur Bestimmung der Nachweisgrenze	72
Abb. 12: x1-PCR-Ergebnis mit KS-Primen (3 verschiedene Protokolle, verschiedene Annealing-Temperaturen [+ °C]).....	76
Abb. 13: x2-PCR-Ergebnis mit LP-Primen (3 verschiedene Protokolle, verschiedene Annealing-Temperaturen [+ °C]).....	76
Abb. 14: x1- und x2-PCR-Ergebnis mit dem KS-Protokoll (verschiedene Annealing-Temperaturen [+°C]).....	77
Abb. 15: PCR-Ergebnisse beim Einsatz verschiedener Template-Mengen.....	78
Abb. 16: Ergebnisse der Sonden-Markierungs-PCR	79
Abb. 17: Beispiel <i>stx2</i> -positive Kolonien (Membran – Agar)	80
Abb. 18: Agar-Wachstum, Kolonie-Transfer und Signale auf der Membran auf drei verschiedenen Agars.....	81
Abb. 19: PCR-Ergebnisse der beimpften Proben	88

13. Danksagung

13. Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Stolle für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Des Weiteren geht mein Dank an Frau Dr. Fredriksson-Ahooma für die jederzeit freundliche Unterstützung und kompetente Betreuung.

Ein ganz besonderer Dank geht an Frau Dr. Stüber für den engagierten Einsatz und die unermüdliche Hilfe sowohl bei der praktischen Durchführung als auch bei der Korrektur der Arbeit, ihre kompetente Betreuung und ihre Bereitschaft, mir bei allen Fragestellungen behilflich zu sein.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei allen Instituts-Mitarbeitern, insbesondere Frau Dietz, Frau Groß und Frau Holzmann, für ihre freundliche Unterstützung und Motivation.

Allen bei pmi danke ich herzlich für die Möglichkeit zur flexiblen Gestaltung meiner Arbeitszeiten, die Unterstützung bei Computer-Fragen, das entgegengebrachte Verständnis und ein angenehmes Betriebsklima.

Frau Dr. Müller danke ich für die Hilfe bei Formalitäten und ihre aufbauenden Worte.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mir immer zur Seite gestanden und mich stets unterstützt hat. Meiner Schwester insbesondere Danke für die Korrektur der englischen Übersetzung sowie meinem Bruder für die Formatierungshilfe. Meinem Bobesch herzlichen Dank für das Korrekturlesen. Meinem Freund möchte ich danken, dass er es stets geschafft hat, mich aufs Neue zu motivieren. Choukran, lah yhafdek!