

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer

Angefertigt am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit,
Dienststelle Oberschleißheim
(Dr. U. Messelhäußer und Dr. U. Busch)

Vergleichende Differenzierung von *Clostridium* spp.
mittels biochemischer und molekularbiologischer Methoden
sowie MALDI-TOF Massenspektrometrie

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

von

Julia Susanne Ziegler
aus Erding

München 2013

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Nadja Herbach

Tag der Promotion: 09. Februar 2013

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	1
2 LITERATUR	2
2.1 Pathogene Clostridien - Taxonomie und Eigenschaften.....	2
2.1.1 Taxonomie.....	4
2.1.2 Allgemeine Eigenschaften	5
2.1.3 Biochemische Charakteristika	6
2.1.4 Pathogenitätsmechanismen	7
2.1.4.1 <i>Clostridium botulinum</i> -Neurotoxine (BoNT)	9
2.1.4.2 Enterotoxischer Wirkmechanismus bei <i>C. perfringens</i>	10
2.1.4.3 <i>C. perfringens</i> α-Toxin	12
2.1.4.4 Enterotoxischer Wirkmechanismus bei <i>C. difficile</i>	12
2.1.4.5 Histotoxischer Wirkmechanismus bei <i>C. novyi</i> und <i>C. haemolyticum</i> ..	13
2.1.4.6 Histotoxischer Wirkmechanismus bei <i>C. chauvoei</i> und <i>C. septicum</i> ...	14
2.2 Clostridiosen - Vorkommen und Bedeutung für Mensch und Tier	15
2.2.1 <i>C. perfringens</i>	15
2.2.2 <i>C. botulinum</i>	19
2.2.3 <i>C. difficile</i>	25
2.2.4 <i>C. chauvoei</i>	27
2.2.5 <i>C. septicum</i>	28
2.2.6 <i>C. novyi</i>	30
2.2.7 <i>C. haemolyticum</i>	31
2.3 Diagnostik der <i>Clostridium</i> spp.	33
2.3.1 Klassisch-kultureller Nachweis	33
2.3.2 Biochemische Identifizierung - miniaturisierte Testsysteme	34
2.3.3 Molekularbiologische Verfahren - Real-Time PCR	35
2.3.4 MALDI-TOF MS.....	37
3 MATERIAL UND METHODEN.....	39
3.1 Material.....	39
3.1.1 Bakterienstämme.....	39
3.1.2 Arbeitsmaterial.....	39
3.2 Methoden.....	40
3.2.1 Kultivierung der Clostridien-Stämme	40

3.2.1.1 Allgemeines Vorgehen	40
3.2.1.2 Anpassung der Flüssignährmedien	41
3.2.2 Biochemische Identifizierung	43
3.2.2.1 Allgemeines Vorgehen	43
3.2.2.2 Auswertung der biochemischen Untersuchung	44
3.2.3 Molekularbiologischer Nachweis mittels Real-Time PCR	45
3.2.3.1 DNA-Extraktion.....	45
3.2.3.2 Real-Time PCR - allgemeine Verfahren	45
3.2.3.3 Real-Time PCR zum Nachweis von <i>C. perfringens</i> nach Messelhäußer et al. (2007a)	47
3.2.3.4 Real-Time PCR zum Nachweis von <i>C. botulinum</i> (Messelhäußer et. al., 2007b und in-house validiertes Nachweisverfahren des LGL).....	52
3.2.3.5 Real-Time PCR zum Nachweis von <i>C. difficile</i> , <i>C. chauvoei</i> , <i>C. septicum</i> und <i>C. haemolyticum</i> (In-house validiertes Nachweisverfahren des LGL)	54
3.2.3.6 Real-Time PCR zum Nachweis von <i>C. novyi</i> (In-house validiertes Nachweisverfahren des LGL)	56
3.2.4 Identifizierung mittels MALDI-TOF MS	57
3.2.4.1 Vorbereitung.....	57
3.2.4.2 Probenaufbereitung	58
3.2.4.3 Messung am MALDI-TOF MS	59
3.2.4.4 Auswertung der Untersuchung mittels MALDI-TOF MS	59
4 ERGEBNISSE.....	61
4.1 Biochemische Identifizierung	61
4.1.1 Ergebnisse der Untersuchung von <i>C. perfringens</i>	61
4.1.2 Ergebnisse der Untersuchung von <i>C. botulinum</i>	61
4.1.3 Ergebnisse der Untersuchung von <i>C. difficile</i> und <i>C. septicum</i>	63
4.1.4 Ergebnisse der Untersuchung von <i>C. chauvoei</i> , <i>C. novyi</i> und <i>C. haemolyticum</i>	64
4.2 Molekularbiologischer Nachweis mittels Real-Time PCR	65
4.2.1 Ergebnisse der Untersuchung von <i>C. perfringens</i>	65
4.2.2 Ergebnisse der Untersuchung von <i>C. botulinum</i>	66
4.2.3 Ergebnisse der Untersuchung der übrigen <i>Clostridium</i> spp.	67
4.3 Identifizierung mittels MALDI-TOF MS	68

4.3.1 Ergebnisse der Untersuchung von <i>C. botulinum</i>	68
4.3.2 Ergebnisse der Untersuchung der übrigen <i>Clostridium</i> spp.	68
4.4 Gegenüberstellung der Identifizierungsergebnisse der Biochemie, der Real-Time PCR und der MALDI-TOF MS.....	69
4.4.1 Gegenüberstellung der Ergebnisse von <i>C. perfringens</i>	69
4.4.2 Gegenüberstellung der Ergebnisse von <i>C. botulinum</i>	70
4.4.3 Gegenüberstellung der Ergebnisse der untersuchten <i>Clostridium</i> spp....	71
5 DISKUSSION	72
5.1 Bewertung der einzelnen Untersuchungsverfahren.....	73
5.1.1 Problematik der Kultivierung bei einzelnen <i>Clostridium</i> spp.	73
5.1.2 Biochemische Identifizierung	74
5.1.3 Molekularbiologischer Nachweis mittels Real-Time PCR	76
5.1.4 Identifizierung mittels MALDI-TOF MS	78
5.2 Empfehlung im Hinblick auf den Einsatz in der Lebensmittelanalytik	81
5.3 Empfohlene Vorgehensweise bei einer Untersuchung auf <i>Clostridium</i> spp. in der Lebensmittelanalytik	83
6 ZUSAMMENFASSUNG	84
7 SUMMARY	86
8 LITERATURVERZEICHNIS	88
9 TABELLENVERZEICHNIS	102
10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	104
11 ANHANG.....	105
11.1 Nährmedien und Reagenzien zur Anzucht	105
11.2 Arbeitsmaterialien und Geräte	108
11.3 Übersichtstabellen und Abbildungen zu den Untersuchungen	113
11.4 Vorgehen bei einer Untersuchung auf <i>Clostridium</i> spp. in der Lebensmittelanalytik	122
12 DANKSAGUNG	126

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
Acc. Nr.	Accession-number
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
Ct	Threshold Cycle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
et al.	et alii
etc.	et cetera
G	Guanin
g	Gramm
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
h	Stunde
KbE	Koloniebildende Einheiten
kDa	Kilodalton
K ₂ HPO ₄	Di-Kaliumhydrogenphosphat
LFGB	Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch
mg	Milligramm
min.	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
NCTC	National Collection of Type Cultures
ng	Nanogramm
(NH ₄) ₂ SO ₄	Ammoniumsulfat
Nr.	Nummer

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	potentia hydrogenii
pUC	Plasmid University of California
rpm	Umdrehungen pro Minute
sec.	Sekunde
sog.	so genannte
T	Thymin
Tab.	Tabelle
z. B.	zum Beispiel

1 EINLEITUNG

Clostridium (C.) spp. sind bekannte Auslöser von Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen des Menschen und treten zudem als nosokomiale Infektionserreger und Verursacher von schwerwiegenden Tierseuchen in Erscheinung. Dennoch gibt es bisher nur wenige international genormte Nachweisverfahren für *Clostridium* spp., welche jedoch das Toxinbildungsvermögen dieser Bakterien weitestgehend unberücksichtigt lassen. Einzelne Staaten - unter anderem Deutschland - besitzen zwar in ihrer nationalen Gesetzgebung bzw. in Sammlungen von Untersuchungsverfahren bestimmte Vorgehensweisen für den Nachweis von Clostridien als Lebensmittelinfektions- und intoxicationserreger, jedoch sind diese streng auf eine bestimmte Lebensmittelgruppe bezogen und zum Großteil durch ältere Methoden charakterisiert. So basiert die mikrobiologische Untersuchung zur Identifizierung der beiden wichtigsten humanpathogenen *Clostridium* spp. im Lebensmittelbereich, *C. perfringens* und *C. botulinum*, meist noch immer auf den klassischen kulturellen Verfahren, in der Regel ergänzt durch eine biochemische Bestätigung der Isolate. Mittlerweile haben jedoch auch molekularbiologische Methoden, wie die Real-Time PCR, ihren Einzug in die Lebensmitteldiagnostik gehalten. Besonders im Bereich des Screenings auf An- oder Abwesenheit von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln oder für die Differenzierung und Feintypisierung von Isolaten hat sich der Einsatz der Real-Time PCR etabliert. Auch neuere analytische Verfahren, wie die MALDI-TOF Massenspektrometrie (MS), werden immer häufiger für die schnelle Identifizierung von bakteriellen Isolaten in der Lebensmittelanalytik herangezogen.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, zu untersuchen, ob im Bereich der Clostridien-Analytik und -Charakterisierung die biochemische Keimdifferenzierung durch neuere Verfahren, wie Real-Time PCR und MALDI-TOF MS, ergänzt oder abgelöst werden kann. Anschließend sollte anhand der erzielten Ergebnisse, unter Verwendung der einzelnen Untersuchungsverfahren, eine Empfehlung hinsichtlich des generellen Vorgehens bei einem Nachweis von *Clostridium* spp. im Lebensmittelbereich erarbeitet werden.

2 LITERATUR

2.1 Pathogene Clostridien - Taxonomie und Eigenschaften

Die Gattung *Clostridium* umfasst eine Vielzahl an anaeroben sporenbildenden Bakterien, welche in der Umwelt weit verbreitet sind (Hatheway, 1990; Rainey et al., 2009). Sie besiedeln neben Böden, Abwässern und Meeressedimenten unter anderem auch den Intestinaltrakt von gesunden Menschen und Tieren. Aufgrund dieses ubiquitären Vorkommens können sie leicht in Wunden, Lebensmittel und Futtermittel gelangen und treten somit neben ihrer Eigenschaft als Verderbserreger häufig auch als Verursacher von ernsthaften Erkrankungen bei Mensch und Tier auf (Hatheway, 1990; N.N., 2005). Für den Menschen sind dabei seit Ende des Zweiten Weltkrieges in aller Regel nicht mehr die lebensbedrohlichen clostridialen Infektionen von Bedeutung, sondern die eher mild verlaufenden Lebensmittelvergiftungen (Sterne und Batty, 1975).

Von den mehr als 203 Spezies, die derzeit zur Gattung *Clostridium* gerechnet werden, gelten etwa 20 Arten als pathogen bzw. werden oft im Zusammenhang mit Infektionen oder Erkrankungen bei Mensch und Tier beschrieben (Tab. 1) (Euzéby, 2012; Hatheway, 1990; Neumeister et al., 2009; Rainey et al., 2009). Ein Großteil dieser Clostridien - unter anderem alle, der in dieser Arbeit behandelten Spezies - produzieren dabei biologisch aktive Proteine, sog. Toxine, die für ihre Pathogenität verantwortlich sind (Hatheway, 1990). Durch sie werden Infektions- und Intoxikationskrankheiten ausgelöst, die nach pathogenetischen Gesichtspunkten sowie nach charakteristischen Symptomen in Gasödemerkrankungen, Enterotoxämien bzw. Enteritiden und Intoxikationen eingeteilt werden. Dabei können einzelne *Clostridium* spp. auch in mehreren dieser Kategorien auftreten (Sterne und Batty, 1975; Wells und Wilkins, 1996).

Tabelle 1: *Clostridium* spp. mit klinischer Bedeutung für Mensch und Tier (nach Hatheway, 1990; Neumeister et al., 2009)

<i>Clostridium</i> spp.	
<i>Clostridium baratii</i>	<i>Clostridium novyi</i> *
<i>Clostridium bifermentans</i>	<i>Clostridium perfringens</i> *
<i>Clostridium botulinum</i> *	<i>Clostridium ramosum</i>
<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Clostridium septicum</i> *
<i>Clostridium chauvoei</i> *	<i>Clostridium sordellii</i>
<i>Clostridium clostridioforme</i>	<i>Clostridium sphenoides</i>
<i>Clostridium difficile</i> *	<i>Clostridium spiroforme</i>
<i>Clostridium haemolyticum</i> *	<i>Clostridium subterminale</i>
<i>Clostridium histolyticum</i>	<i>Clostridium tertium</i>
<i>Clostridium limosum</i>	<i>Clostridium tetani</i>

* in dieser Arbeit behandelte *Clostridium* spp.

Obwohl als eindeutig lebensmittelassoziierte Erreger bisher lediglich *C. perfringens* und *C. botulinum* bestätigt sind (McLauchlin und Grant, 2007), wurden in dieser Arbeit auch andere human- und veterinärmedizinisch bedeutsame *Clostridium* spp. untersucht. Ein Grund hierfür war, ein möglichst breites Spektrum an Clostridien in die Diagnostik von lebensmittelbedingten Erkrankungen mit einzubeziehen. Des Weiteren ist es immer noch fraglich, ob tierpathogene *Clostridium* spp. nicht auch über Lebensmittel tierischen Ursprungs an den Menschen herangetragen werden können (Songer, 2010). Zumindest bei *C. difficile* wird mittlerweile aufgrund des Nachweises identischer Stammtypen bei Mensch und Tier sowie vereinzelt in Lebensmitteln auch ein gewisses zoonotisches Potenzial diskutiert (Gould und Limbago, 2010; Keessen et al., 2011; Weese, 2010). Im Folgenden werden Taxonomie und Eigenschaften der im Methodenvergleich untersuchten Clostridien ausführlicher dargestellt.

2.1.1 Taxonomie

In früherer Zeit hatte man die einzelnen Spezies der Gattung *Clostridium* anhand phänotypischer Merkmale wie Gelatinehydrolyse oder Glukosefermentation zu metabolischen Gruppen zusammengefasst und verglichen (Rainey et al., 2009). Neuere taxonomische Studien auf Basis der 16S rRNA-Gensequenzanalyse haben jedoch gezeigt, dass sich die Gattung *Clostridium* nicht nur phänotypisch, sondern vor allem phylogenetisch als sehr heterogen darstellt (Collins et al., 1994; Johnson und Francis, 1975; Lawson et al., 1993; Rainey et al., 2009). Im Rahmen dieser Gensequenz-Untersuchungen wurden die unterschiedlichen *Clostridium* spp. 19 verschiedenen rRNA-Homologie-Clustern zugeteilt, wobei die Spezies in Cluster I als Clostridien im eigentlichen Sinne (*Clostridium sensu stricto*) angesehen werden. Hierzu gehören alle in dieser Arbeit behandelten *Clostridium* spp., mit Ausnahme von *C. difficile*, welches von Collins et al. (1994) zum Cluster XI (Familie *Clostridiaceae*) gezählt wird. Die Untersuchungen zeigten neben der genetischen Heterogenität innerhalb der Gattung auch eine Bestätigung bereits phänotypisch festgestellter Verwandtschaften auf (Hatheway, 1990; Rainey et al., 2009). Als nahe verwandt erwiesen sich dabei unter anderem die Spezies *C. chauvoei* und *C. septicum* sowie die Stämme von *C. botulinum* Typ C und Typ D mit *C. novyi*, welches wiederum eine enge Verwandtschaft zu *C. haemolyticum* (ehemals *C. novyi* Typ D) zeigt (Collins et al., 1994; Kuhnert et al., 1996; Sasaki et al., 2002). Die sich aus der rRNA-Sequenzanalyse ergebenden phylogenetischen Stammbäume führten zudem zu zahlreichen Reklassifizierungen einer Vielzahl von *Clostridium* spp. (Collins et al., 1994; Rainey et al., 2009). Es wurde unter anderem vorgeschlagen, alle Stämme von *C. botulinum* Toxintyp G mit einigen Stämmen von *C. subterminale* und *C. hastiforme* zu der neuen Spezies *C. argentinense* zusammenzufassen (Suen et al., 1988). Nachdem jedoch die Spezies *C. botulinum* traditionell über die Produktion von Neurotoxinen definiert wird und diese Einteilung sich besonders im klinischen Bereich etabliert hat, wurde bisher keine offizielle Reklassifizierung vorgenommen (Rainey et al., 2009).

2.1.2 Allgemeine Eigenschaften

Die meisten *Clostridium* spp. sind obligat anaerob. Manche Stämme von *C. perfringens* und *C. botulinum* wachsen zudem unter mikroaerophilen Bedingungen (N.N., 2005; Neumeister et al., 2009). Auch *C. chauvoei* und *C. septicum* zeigen sich eher tolerant gegenüber einer gewissen Sauerstoffexposition (Hatheway, 1990). *C. novyi* Typ A und *C. haemolyticum* gehören dagegen zu den anspruchvollsten und sauerstoffempfindlichsten pathogenen Bakterien überhaupt und bedürfen daher für eine Anzucht frisch zubereiteter Medien und einer strikt anaeroben Atmosphäre (Hatheway, 1990; Health Protection Agency, 2008a). Für optimales Wachstum benötigen die meisten Clostridien einen pH-Wert von 6,5 - 7,0 und Temperaturen zwischen 30 °C und 37 °C (Rainey et al., 2009). Die saccharolytischen Stämme von *C. botulinum* Typ B, F und E zeigen fernerhin ein Wachstum bei Kühlschranktemperaturen bis 3 °C. Zudem wachsen vereinzelt Stämme von *C. perfringens* noch bei 6 °C (McLauchlin und Grant, 2007; Rainey et al., 2009).

Clostridien sind mit Ausnahme von *C. perfringens* bewegliche, gerade bis leicht gebogene Stäbchen. Die Motilität der beweglichen Clostridien wird dabei durch ihre peritrichen Begeißelung erreicht (Rainey et al., 2009). In der Bakterioskopie treten Clostridien einzeln oder in Paaren auf, wobei besonders *C. difficile* auch Ketten bestehend aus 2 bis 6 an ihren Enden verbundenen Zellen bildet und als eher zierliches Stäbchen gilt (von Eichel-Streiber und Braun, 2008). Dagegen wird *C. perfringens* zumeist als plumpes, kastenförmiges Bakterium beschrieben. *Clostridium* spp. färben sich in frühen Generationsstadien üblicherweise grampositiv an, während ältere Kulturen häufig gramnegativ erscheinen (Rainey et al., 2009). Dies gilt im Besonderen für *C. haemolyticum*, welches sich schon früh gramnegativ darstellt. Bei *C. chauvoei* und *C. septicum* ist die Gram-Färbung dagegen oft unregelmäßig (N.N., 2005; Rainey et al., 2009).

Ein besonderes Charakteristikum der Clostridien stellt ihre Fähigkeit zur Sporenbildung dar, welche je nach Spezies unterschiedlich ausgeprägt ist. Diese Sporenbildung macht die *Clostridium* spp. generell unempfindlich gegenüber Hitze, Austrocknung und chemischen Umwelteinflüssen, wohingegen die vegetativen Zellen häufig anfällig gegen starke Hitze und Gefriertemperaturen sind (Baumgart, 2011; Neumeister et al., 2009). Die Sporen der hier behandelten Clostridien sind in aller Regel oval geformt und liegen subterminal, sodass die Zellen an einem Ende aufgebläht wirken. Diese sog. Tennisschlägerform ist dabei typisch für mikroskopische Präparate von versporten *C. botulinum*-Kolonien (McLauchlin und Grant, 2007). Zum Teil findet man die Sporen jedoch auch zentral, wodurch besonders bei Präparaten von *C. chauvoei*, seltener bei *C. septicum*, zitronenförmige Bakterien zu sehen sind (Rainey et al., 2009; Sterne und Batty, 1975). Bei *C. perfringens* sind die eher zentral liegenden Sporen dagegen nur selten in mikroskopischen Präparaten zu finden, können jedoch mit Hilfe von Spezialmedien dargestellt werden (N.N., 2005).

2.1.3 Biochemische Charakteristika

Clostridium spp. unterscheiden sich wie die meisten Bakterien hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften voneinander und können somit anhand charakteristischer biochemischer Profile differenziert werden. Der größte Teil der Clostridien besitzt dabei ausgeprägte proteolytische und/oder saccharolytische Eigenschaften (Hall, 1922; Neumeister et al., 2009; Rainey et al., 2009). Bei *C. botulinum* erfolgte sogar aufgrund der unterschiedlichen Verteilung der proteolytischen Eigenschaften innerhalb der verschiedenen Toxintypen eine weitere Untergruppierung der Spezies. So enthält Gruppe I alle Stämme von *C. botulinum* Typ A und die proteolytischen Stämme von Typ B und Typ F. Diese zeigen eine nahe phänotypische und genetische Verwandtschaft zu einigen Stämmen der nicht-neurotoxinbildenden Spezies *Clostridium sporogenes* und können weder mittels metabolischen noch mit biochemischen Verfahren voneinander unterschieden werden (Collins et al., 1994; Hatheway, 1990; Rainey et al., 2009).

Gruppe II besteht dagegen aus *C. botulinum* Typ E und den nicht-proteolytischen (saccharolytischen) Stämmen von Typ B und Typ F sowie Gruppe III aus den Stämmen von *C. botulinum* Typ C und Typ D. Die vierte Gruppe stellen die Produzenten des Typ G Toxins dar (Rainey et al., 2009; Suen et al., 1988).

Neben der Fermentation einer Vielzahl von Kohlenhydraten (Tab. 8) sind die in dieser Arbeit behandelten *Clostridium* spp. insbesondere zur Gelatinehydrolyse (Nachweis der Proteaseaktivität) befähigt (Hall, 1922; Hatheway, 1990; Neumeister et al., 2009). Die Untersuchung auf das Vorhandensein des Enzyms Urease - welche häufig in miniaturisierten biochemischen Testsystemen wie dem Api® 20 A eingesetzt wird - dient der Unterscheidung zwischen den Spezies *C. bifermentans* (negativ) und *C. sordellii* (positiv) und fällt daher bei allen der im Methodenvergleich untersuchten Spezies negativ aus (Hatheway, 1990; Sterne und Batty, 1975). Zur generellen Unterscheidung der Clostridien von anderen sporenbildenden Bakterien, wie der Gattung *Bacillus*, wird die Katalasereaktion herangezogen. Im Gegensatz zu den *Bacillus* spp. reagieren Clostridien bei dieser Reaktion in aller Regel negativ. Es gibt jedoch einige wenige Stämme, die Spuren des Enzyms Katalase aufweisen (Rainey et al., 2009).

2.1.4 Pathogenitätsmechanismen

Die pathogenen Eigenschaften der hier untersuchten *Clostridium* spp. beruhen hauptsächlich auf der Bildung von Proteintoxinen (Exotoxinen), wobei sich jede Art durch ein charakteristisches Muster von Toxinfraktionen auszeichnet (Hatheway, 1990; Wells und Wilkins, 1996). Aufgrund der Antigenität dieser Toxine kann deren biologische Aktivität mittels geeigneter Antisera neutralisiert werden (Hatheway, 1990). Für die meisten der behandelten Spezies werden daher Toxovare definiert, welche gerade bei *C. botulinum* zur Einteilung in die bekannten Toxintypen dienen. In Tab. 2 wird eine Übersicht über die untersuchten *Clostridium* spp. und ihrer Toxine gezeigt. Im Folgenden wird auf die für die jeweiligen Erkrankungen und den Nachweis bedeutendsten Clostridien-Toxine näher eingegangen.

Tabelle 2: Pathogene Clostridien und ihre Toxine (nach Hatheway, 1990; Petit et al., 1999; Useh et al., 2003)

Spezies	Toxine	Molekulargewicht (kDa)	Biologische Aktivität/ Erkrankung
<i>C. botulinum</i>	Neurotoxin	150	Botulismus
	C ₂ (binär)		Permease
	Komponente I	50	ADP-Ribosylierung
	Komponente II	105	Bindung
	C ₃	25	ADP-Ribosylierung
<i>C. perfringens</i>	Haupttoxine		
	Alpha	43	letal, Phospholipase C/ Myonekrose
	Beta*	40	letal, nekrotisierend/ Enterotoxämie
	Epsilon	34	letal, Permease/ Enterotoxämie
	Iota (binär)		letal, dermonekrotisch/ Enterotoxämie
	Komponente a	48	ADP-Ribosylierung
	Komponente b	72	Bindung
	Andere		
	Enterotoxin	35	lebensmittelbedingter Durchfall
	Delta	42	Hämolysin
	Theta	51	sauerstoff-labiles Hämolysin, Cytolysin
	Kappa	80	Collagenase
	Lambda	-	Protease
	Mu	-	Hyaluronidase
	Nu	-	DNase
<i>C. difficile</i>	Neuraminidase	43-310	N-Acetylneuraminsäure Glykosidase
	Urease	-	Urease
	Toxin A	400-500	Enterotoxin/ CDAD
<i>C. novyi/ C. haemolyticum</i>	Toxin B	360-470	Cytotoxin/ CDAD
	CDT	43	ADP-Ribosylierung
	Alpha	260-280	letal
	Beta	32	Phospholipase C
	Gamma	30	Phospholipase C
<i>C. chauvoei/ C. septicum</i>	Delta	-	sauerstoff-labiles Hämolysin
	Epsilon	-	Lipase
	Alpha	27	letal, nekrotisierend
	Beta	45	DNase
	Gamma	-	Hyaluronidase
	Delta	-	sauerstoff-labiles Hämolysin
	Neuraminidase	-	N-Acetylneuraminsäure Glykosidase

* mittlerweile wurde das β -Toxin in β_1 und β_2 unterteilt (Petit et al., 1999); CDAD: *C. difficile*-assoziierte Durchfälle (von Eichel-Streiber und Braun, 2008)

2.1.4.1 *Clostridium botulinum*-Neurotoxine (BoNT)

Basierend auf den antigenen Eigenschaften ihrer Toxine werden die Stämme von *C. botulinum* in 7 Toxovare bzw. Toxintypen (A bis G) eingeteilt. *C. botulinum*-Neurotoxin (BoNT) Typ A ist dabei letaler als die Toxintypen B oder E und gilt als eines der potentesten biologischen Gifte überhaupt (Lamanna, 1959; Rhodehamel et al., 1992). Die Letalität für den Menschen wird bei BoNT A auf etwa 1 ng/kg Körpergewicht geschätzt (Gill, 1982). Die genetische Information für die Ausbildung eines bestimmten Toxintypen ist dabei bei den Stämmen von *C. botulinum* Typ A, B, E und F in aller Regel chromosomal, bei den Typen C und D auf einem Bakteriophagen und im Falle von *C. botulinum* Typ G auf einem Plasmid lokalisiert. Zusätzlich zu *C. botulinum* gibt es auch Stämme der nahe verwandten Spezies *C. butyricum* und *C. baratii*, welche *C. botulinum*-Neurotoxine vom Typ E und Typ F produzieren (Collins und East, 1998). Die 7 Toxintypen besitzen trotz der serologischen Unterschiede eine ganz ähnliche Wirkungsweise auf den betroffenen Wirt (Hatheway, 1990; Rhodehamel et al., 1992).

Das *C. botulinum*-Neurotoxin wird als inaktive Vorform (Progenitortoxin) gebildet und besteht auf molekularer Ebene aus einer schweren und einer leichten Polypeptidkette, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Collins und East, 1998; Oguma et al., 1995). Zunächst liegt das Toxin als einfache Polypeptidkette vor und wird erst über die Spaltung der schweren Kette mittels endogener (proteolytische Stämme) oder exogener (nicht-proteolytische Stämme, z. B. Trypsin) Proteasen in die aktive zweikettige Form überführt (Rhodehamel et al., 1992). Das aktivierte Neurotoxin bindet über seine schwere Kette neurospezifisch an Ganglioside und Glykoproteine der Plasmamembran cholinriger Nerven (Hatheway, 1990; Oguma et al., 1995). Anschließend kommt es zur rezeptorvermittelten Endozytose in die Nervenzelle und zu einer Translokation der leichten Kette im sauren Milieu des Endosoms durch Spaltung der Disulfidbrücken. Schließlich setzt eine irreversible Zerstörung der SNARE-Proteine des synaptischen Fusionskomplexes durch die leichte Kette (einer Zink-abhängigen Endopeptidase) ein und hemmt somit die Freisetzung des Neurotransmitters Acetylcholin (Collins und East, 1998). Es resultieren eine massive Störung des autonomen Nervensystems sowie eine generalisierte schlaffe Lähmung (Paralyse) (Wells und Wilkins, 1996).

Die Wiederaufnahme der synaptischen Funktion kann erst nach Abbau des Neurotoxins oder der Neubildung von Fusionskomplexen erfolgen (Böhnel und Gessler, 2005; Rhodehamel et al., 1992).

2.1.4.2 Enterotoxischer Wirkmechanismus bei *C. perfringens*

Die Spezies *C. perfringens* produziert neben einer Vielzahl von Toxinen (Tab. 2) die vier letal wirkenden Haupttoxine (Majortoxine) α , β , ϵ und ι , welche je nach Vorkommen die Einteilung der Spezies in die fünf Toxintypen/Toxovare A-E definieren (Tab. 3). Des Weiteren synthetisiert *C. perfringens* ein Enterotoxin, welches für lebensmittelbedingte und veterinärmedizinisch relevante gastrointestinalen Erkrankungen verantwortlich ist (Hatheway, 1990; Songer, 1996; Sparks et al., 2001). Das Enterotoxin wird größtenteils vom Toxintyp A gebildet, konnte jedoch auch bei anderen Stämmen von *C. perfringens* (Typ B-E) gefunden werden (Li et al., 2010). Bei Toxintyp E wurde lediglich die genetische Anlage für das Enterotoxin (*cpe*-Gen) nachgewiesen. Dabei handelte es sich jedoch um ein stilles *cpe*-Gen, welches nicht zur Ausprägung kommt (Billington et al., 1998; Petit et al., 1999). Das *cpe*-Gen kann dabei zum einen auf dem Bakterienchromosom lokalisiert sein, zum anderen sind auch plasmidmedierte Varianten des *cpe*-Gens (z. B. *IS1151-cpe* und *IS1470-like-cpe*) bekannt (Cornillot et al., 1995; Heikinheimo et al., 2006). Die Produktion des Enterotoxins erfolgt bei der Sporulation. Das Toxin wird schließlich während der Lyse der vegetativen Bakterienzelle freigesetzt (Songer, 1996). Die Aktivierung des Toxins erfolgt über die proteolytische Abspaltung 24 N-terminaler Aminosäuren (z. B. mittels Trypsin). Anschließend kann das Enterotoxin über spezifische Rezeptoren an die Oberfläche intestinaler Epithelzellen (Bürstensaummembran) binden und führt nach Aufnahme des Toxins in die Zellmembran zu vielfältigen Veränderungen der zellulären Mechanismen. Über Porenbildung, eine erhöhte Permeabilität und zytoskeletale Disintegration tritt eine zunehmende Zellschädigung mit Verlust an Zellflüssigkeit, Ionen und Molekülen ein. Dies führt schließlich zu Verkürzungen der Darmzotten und zu einer Desquamation des intestinalen Epithels, welches wiederum die Symptomatik einer Diarrhoe erzeugt (Hatheway, 1990; McDonel et al., 1978; Petit et al., 1999; Sherman et al., 1994; Songer, 1996).

Die Minortoxine (δ , λ , κ etc.) von *C. perfringens* unterstützen dabei die pathogene Wirkung der Haupttoxine und des Enterotoxins (Tab. 2), indem sie mittels ihrer hämolytischen und enzymatischen Fähigkeiten die Abwehr des Wirtsgewebes schwächen (Hatheway, 1990; Petit et al., 1999).

Tabelle 3: *C. perfringens* Toxintypen und Erkrankungsformen (nach Petit et al., 1999; Songer, 1996)

Toxin- typ	Haupttoxine	Genotypen	Humanmedizinisch bedeutsame Erkrankungen	Veterinärmedizinisch bedeutsame Erkrankungen
	α β ϵ I			
A	x	<i>cpa</i>	Gasgangrän (Myonekrose)	Durchfall (Fohlen, Ferkel, etc.)
		<i>cpa, cpe</i>	Gastroenteritis	Nekrotisierende Enteritis
		<i>cpa, cpb2, cpe</i>	(lebensmittelbedingt, antibiotikaassoziiert)	(Geflügel)
B	x x x	<i>cpa, cpb1, etx,</i> <i>(cpe)</i>		Dysenterie bei Lämmern, Hämorrhagische Enteritis bei Kälbern und Fohlen, Enterotoxämie bei Schafen
C	x x	<i>cpa, cpb1, (cpe)</i> <i>cpa, cpb2, (cpe)</i> <i>cpa, cpb1,</i> <i>cpb2, (cpe)</i>	Nekrotisierende Enteritis (Darmbrand)	Nekrotisierende Enteritis bei Ferkeln, Lämmern, Kälbern und Fohlen Enterotoxämie bei Schafen
D	x x	<i>cpa, etx, (cpe)</i>	Gastroenteritis	Enterotoxämie bei Lämmern, Schafen, Kälbern und Ziegen
E	x	x <i>cpa, iap, ibp,</i> <i>(cpe)</i> <i>cpa, iap</i>		Enterotoxämie bei Kälbern

cpa: α -Toxingen; *cpb1*: β_1 -Toxingen; *cpb2*: β_2 -Toxingen; *etx*: ϵ -Toxingen; *iap*: λ -Toxingen;
ibp: λ -Toxingen *cpe*: Enterotoxingen

2.1.4.3 *C. perfringens* α-Toxin

Das hämolytische, nekrotisierende α-Toxin wird von allen *C. perfringens*-Stämmen auf Basis des *cpa*-Gens exprimiert, aber besonders vom Toxintyp A in großen Mengen produziert. Es stellt neben der Beteiligung an einer Vielzahl von Durchfallerkrankungen bei Mensch und Tier (Tab. 3) den Hauptfaktor bei der Entstehung von Gasgangrän dar (Hatheway, 1990; Petit et al., 1999; Titball et al., 1999). Bei diesem Toxin handelt es sich um eine Phospholipase C (Lecithinase), welche über die Hydrolyse von Membran-phospholipiden Erythrozyten, Leukozyten, Muskelzellen und Endothelzellen schädigt und somit zur Lyse der betroffenen Zellen führt (Petit et al., 1999; Songer, 1996). Dies bewirkt nicht nur die im Rahmen des Gasgangräns offensichtliche Gewebsschädigung, sondern auch über eine Beeinträchtigung der myokardialen Funktion eine Hypotension und Bradykardie, was eine häufige und meist tödliche Begleiterscheinung dieser Erkrankung darstellt (Hatheway, 1990; Petit et al., 1999; Titball et al., 1999).

2.1.4.4 Enterotoxischer Wirkmechanismus bei *C. difficile*

Die toxinogenen Stämme von *C. difficile* produzieren zwei große Proteintoxine, Toxin A (Enterotoxin) und Toxin B (Zytotoxin), welche beide ausgeprägte Virulenzfaktoren darstellen. Die enterotoxische Aktivität von Toxin A wird dabei über einen inflammatorischen Prozess vermittelt, der in einer ausgedehnten Gewebeschädigung der Darmmukosa mündet (Lyerly et al., 1988). Durch die Infiltration von neutrophilen Granulozyten in das Ileum und die Freisetzung von Entzündungsmediatoren kommt es zu einer erhöhten Flüssigkeitssekretion, einer gesteigerten Membranpermeabilität und schließlich zu hämorrhagischen Nekrosen innerhalb des Darms. Zusätzlich führt die direkte zytotoxische Einwirkung beider Toxine über ihre Bindung an Enterozyten zu einer Destabilisierung des Zellzytoskeletts und damit zu einer Zellabrundung, was wiederum über eine Lockerung der „tight junctions“ zu einem Verlust der Barrierefunktion des Darmepithels führt (Ackermann und Kist, 2009; Hatheway, 1990; von Eichel-Streiber und Braun, 2008). Diese Toxineinwirkungen verursachen die charakteristischen Schleimhautveränderungen bestehend aus plaque-ähnlichen Läsionen bis hin zur Bildung von Pseudomembranen im Intestinaltrakt (Health Protection Agency, 2008b; Keessen et al., 2011).

2.1.4.5 Histotoxischer Wirkmechanismus bei *C. novyi* und *C. haemolyticum*

C. novyi und *C. haemolyticum* ähneln sich stark im Rahmen ihrer physiologischen und genetischen Eigenschaften und besitzen daher ein vergleichbares Repertoire an toxischen Substanzen (α-, β-Toxine u. a.) (Hatheway, 1990). Anhand der unterschiedlichen Verteilung dieser Toxine können die verschiedenen Typen von *C. novyi* (A, B und C) sowie *C. haemolyticum* voneinander unterschieden werden. *C. novyi* Typ A produziert ausschließlich α-Toxin, *C. haemolyticum* nur β-Toxin und *C. novyi* Typ B stellt beide Toxine her. Die Typ C-Stämme bilden keine Toxine und werden daher als apathogen eingestuft (Hatheway, 1990; Rainey et al., 2009). Die von den pathogenen Spezies verursachten Erkrankungen sind sehr unterschiedlich, betreffen aber vorwiegend den veterinärmedizinischen Bereich: *C. novyi* verursacht histotoxische Erkrankungen wie die nekrotisierende Hepatitis des Schafes (Typ B) oder das maligne Ödem (Typ A), kann jedoch ebenfalls an der Entwicklung eines Gasgangräns beim Menschen beteiligt sein (Hatheway, 1990; Kahn, 2010). Es besitzt für die letzteren beiden Erkrankungen das nekrotisierende α-Toxin als wichtigsten Pathogenitätsfaktor. Dieses Toxin gehört zusammen mit den Toxinen A und B von *C. difficile* zu den großen clostridialen Zytotoxinen mit Glykosyltransferaseaktivität. Über die Zerstörung zytoskeletaler Strukturen bewirkt das α-Toxin eine erhöhte Kapillarpermeabilität und somit die massive Ausbildung von Ödemen im Rahmen des Krankheitsgeschehens. *C. haemolyticum* gilt dagegen als der Erreger der bazillären Hämoglobinurie der Rinder mit primärer Beteiligung des hämolytisch und nekrotisierend wirkenden β-Toxins (Phospholipase C), welches mit dem von *C. novyi* Typ B produzierten Toxin serologisch identisch erscheint. Das β-Toxin von *C. haemolyticum* zerstört in erster Linie zirkulierende Erythrozyten und führt damit zu einer massiven Ausscheidung des Hämoglobins über den Urin des betroffenen Tieres. Gleichzeitig herrscht ein Blutverlust über den Darmtrakt aufgrund der Zerstörung des Kapillarendothels (Bette et al., 1989; Busch et al., 2000; Hatheway, 1990; Just und Gerhard, 2004).

2.1.4.6 Histotoxischer Wirkmechanismus bei *C. chauvoei* und *C. septicum*

C. chauvoei und *C. septicum* erscheinen ebenfalls physiologisch und phylogenetisch als sehr ähnliche Mikroorganismen und besitzen ein analoges Toxinspektrum. *C. chauvoei* und *C. septicum* produzieren beide ein tödliches, hämolytisch und nekrotisierend wirkendes α -Toxin, wobei die Toxintiter im Falle von *C. septicum* etwas höher sind. Bei *C. chauvoei* besitzt das α -Toxin zusätzlich eine gewisse chemotaktische Komponente, welche nach Infektion eines Wirts eine neutrophile Infiltration in das betroffene Gewebe mit anschließender Nekrose der Muskelzellen hervorruft. Das ebenfalls von beiden Spezies gebildete Enzym Neuraminidase spaltet Sialinsäuren im infizierten Gewebe und vereinfacht somit die Ausbreitung der Erkrankung (Hatheway, 1990; Useh et al., 2003).

2.2 Clostridiosen - Vorkommen und Bedeutung für Mensch und Tier

Pathogene Clostridien rufen in aller Regel zwei Kategorien von Erkrankungen bei Mensch und Tier hervor: Infektions- und Intoxikationskrankheiten. Zu ersterer Kategorie gehören unter anderem Gasödemerkrankungen sowie Enterotoxämien und Enteritiden, wobei eine einzelne *Clostridium* spp. an jeder dieser Erkrankungsformen beteiligt sein kann (Sterne und Batty, 1975). Die zweite Gruppe an Erkrankungen bilden die Neurotoxin-vermittelten Erkrankungen wie Tetanus und Botulismus (Hatheway, 1990). Manchen der genannten Erkrankungen kann ein eindeutiger Zusammenhang mit Lebensmitteln zugeschrieben werden, bei anderen wird er zum Teil vermutet (McLauchlin und Grant, 2007; Songer, 2010; Songer und Anderson, 2006). Im Folgenden werden die im Methodenvergleich untersuchten *Clostridium* spp. und ihre Erkrankungen hinsichtlich ihres Vorkommens und ihrer Bedeutung für Mensch und Tier dargestellt.

2.2.1 *C. perfringens*

C. perfringens gilt als einer der am weitesten in der Umwelt verbreiteten pathogenen Mikroorganismen überhaupt. Es ist daher nicht verwunderlich, dass dieses Bakterium auch als häufigste *Clostridium* spp. bei bakteriellen Infektionen des Menschen isoliert wird. Dies wird im Besonderen für den Toxintyp A angegeben, welcher sowohl in Böden und Sedimenten als auch in der Darmflora von gesunden Menschen und Tieren zu finden ist. Die anderen Toxintypen B bis E gelten im Gegensatz zu Toxintyp A eher als obligate Parasiten und können im Darmtrakt von Tieren und vereinzelt auch beim Menschen meist im Zusammenhang mit Erkrankungen nachgewiesen werden (Hatheway, 1990; McLauchlin und Grant, 2007).

Für den Menschen sind vor allem die *C. perfringens* Toxintypen A und C im Rahmen von lebensmittelassoziierten Erkrankungen von Bedeutung. Die Infektion mit *C. perfringens* gilt in der industrialisierten Welt als eine der häufigsten Ursachen für Lebensmittelvergiftungen (Japanese Society of Chemotherapy and The Japanese Association for Infectious Diseases, 2011b; McLauchlin und Grant, 2007).

In Deutschland wird hinter bis zu 10 % aller bakteriellen lebensmittelbedingten Erkrankungen *C. perfringens* als Erreger vermutet (Robert Koch-Institut, 2000a). Dabei bilden nur etwa 5 % aller *C. perfringens*-Stämme (überwiegend Typ A) das Enterotoxin (CPE), welches als auslösender Faktor der lebensmittelbedingten Erkrankung durch *C. perfringens* angesehen wird (Songer, 2010). Infektionsquellen sind meist unsachgemäß zubereitete Lebensmittel, besonders Fleisch, Fleischprodukte und Geflügel. Das Erhitzen eines solchen Lebensmittels ermöglicht den vorhandenen hitzeresistenten Sporen das Auskeimen. Eine anschließende mangelhafte Kühlung bedingt eine massive Vermehrung der vegetativen Zellen im Lebensmittel (N.N., 2005). Es wird von einer Erregerkonzentration von mindestens 10^6 Erreger pro Gramm Lebensmittel für die Auslösung einer Erkrankung ausgegangen (McLauchlin und Grant, 2007). Nach dem Verzehr des kontaminierten Lebensmittels kommt es zur Sporulation des Erregers innerhalb des Darmtrakts und dabei zur Bildung und Freisetzung von Enterotoxin. Die Inkubationszeit beträgt zwischen 8 und 24 h. Die Toxinwirkung verursacht schließlich Bauchkrämpfe, wässrigen Durchfall und Übelkeit, weniger häufig Erbrechen. In der Regel verläuft die Erkrankung kurz und selbstlimitierend innerhalb von 24 h. Todesfälle sind selten, können aber bei älteren oder geschwächten Patienten auftreten (McLauchlin und Grant, 2007; N.N., 2005). Andere, nicht-lebensmittelbedingte Erkrankungsformen, welche jedoch ebenfalls durch das Enterotoxin von *C. perfringens* hervorgerufen werden, wie die antibiotikaassoziierte Diarröh und die sporadische Diarröh, zeigen deutlich schwerere Verläufe und eine längere Dauer der Erkrankung (Borriello, 1995).

Die Diagnose einer durch *C. perfringens* bedingten Lebensmittelvergiftung wird anhand mehrerer zu erfüllender Kriterien gestellt: dem Nachweis des Erregers im Stuhl des Patienten mit Konzentrationen von mindestens 10^6 KbE/g, dem Enterotoxinnachweis in Stuhlproben von mindestens zwei Erkrankten oder dem Nachweis des Erregers im verdächtigen Lebensmittel ($>10^5$ KbE/g). Als Prophylaxemaßnahme sollte die Exposition des Menschen gegenüber dem Erreger im Lebensmittel über geeignete Methoden minimiert werden, wie z. B. durch ordnungsgemäße Kühlverfahren, erneutes Erhitzen des Lebensmittels vor dem Verzehr (>70 °C) sowie generelle Hygiene bei der Zubereitung (McLauchlin und Grant, 2007; N.N., 2005; Robert Koch-Institut, 2000a).

Eine weitere lebensmittelassoziierte Erkrankung - verursacht durch die vermehrte Aufnahme des β -Toxin-produzierenden *C. perfringens* Typ C - stellt die nekrotisierende Enteritis bzw. Jejunitis des Menschen dar, auch Darmbrand oder „pigbell“ genannt. Diese Erkrankung tritt nur unter speziellen prädisponierenden Faktoren auf und zeigt meist deutlich schwerere Verläufe sowie hohe Sterblichkeitsraten im Vergleich zur typischen lebensmittelbedingten *C. perfringens* Typ A-Infektion. Sie kommt nur sehr selten in den industrialisierten Ländern vor (McLauchlin und Grant, 2007; Wells und Wilkins, 1996).

C. perfringens Typ A ruft bei Menschen außerdem eine akute und häufig tödlich verlaufende Gasödemerkrankung, den Gasbrand oder das Gasgangrän hervor. Es handelt sich hierbei um eine Infektion der Haut und der Weichteile, welche nach exogener (Erde) oder endogener (Darmtrakt) Kontamination einer Wunde mit Clostridien oder mit ihren Sporen auftritt (Wells und Wilkins, 1996). Dies kann bei äußeren Verletzungen nach einem Unfall oder durch Fremdkörpereinwirkung, aber auch bei Operationen oder Ulzerationen und anderen schwerwiegenden Erkrankungen am Darmtrakt der Fall sein. Entscheidend für das Wachstum des Erregers ist hierbei immer die Unterbrechung des Blutflusses, welche zu einer verminderten Sauerstoffversorgung des Gewebes und damit zur Ausbildung lokaler anaerober Areale führt (Finegold et al., 1985; Wells und Wilkins, 1996). Prädisponierend können daher auch ein Diabetes mellitus oder andere Vorerkrankungen sein, welche zu einer Minderperfusion von bestimmten Gewebsregionen führen. Neben *C. perfringens* Typ A, welcher für etwa 80 % der Gasbrand-Erkrankungen verantwortlich ist, können auch Infektionen mit *C. novyi* und *C. septicum* eine solche Erkrankung auslösen (Wells und Wilkins, 1996). Die Inkubationszeit nach einer Infektion mit *C. perfringens* Typ A beträgt dabei 10 bis 48 h. Der klassische Gasbrand verläuft anschließend in aller Regel perakut. Das α -Toxin bewirkt lokale Gewebsnekrosen sowie eine Toxämie. Als Symptome zeigen sich daher Fieber, Blutdruckabfall, starke Schmerzen in den infizierten Bereichen und eine meist ausgeprägte Ödem- und Gasbildung mit oft faulem Geruch des betroffenen Gewebes (Finegold et al., 1985). Der Tod kann innerhalb weniger Stunden eintreten, vermittelt durch einen toxininduzierten Schock. Als Therapie sollten eine möglichst schnelle und radikale chirurgische Intervention sowie hochdosierte Antibiotikagaben erfolgen (Wells und Wilkins, 1996).

In der Veterinärmedizin ist *C. perfringens* vorwiegend als Erreger von Enterotoxämien und - zumeist nekrotisierenden - Enteritiden von Bedeutung. Die Toxintypen A, B, C, D und E rufen hier ein breites Spektrum an Darmerkrankungen hervor. Auslöser für eine Erkrankung ist dabei immer eine schlagartige und massive Vermehrung des Erregers im Darm des betroffenen Tieres und wird durch verschiedene Faktoren wie eine plötzliche Futterumstellung, Parasitenbefall, Stress oder auch durch chirurgische und antibiotische Behandlungen begünstigt (Kahn, 2010; Songer, 1996). Durch die anschließende Bildung und Freisetzung von Toxinen kommt es zu einer Zerstörung der Darmzotten und häufig zur Ausbildung von hämorrhagischen, nekrotisierenden Entzündungen der Darmschleimhaut. Besonders empfänglich gegenüber einer Infektion mit *C. perfringens* sind Wiederkäuer, aber auch Schweine, Pferde und Geflügel sind häufig betroffen. Dabei erkranken zumeist Jungtiere, welche häufig ohne vorherige klinische Symptome tot aufgefunden werden (Kahn, 2010). Neben einigen vorwiegend Schafe betreffenden Krankheitsbildern wie Lämmerdysenterie (Typ B), Struck beim älteren Schaf (Typ C) und der Breinierenkrankheit (Typ D), kommen Enterotoxämien bei einer Vielzahl von Tieren wie Kälbern, Fohlen, Rindern, Pferden, Schafen, Ziegen und Hasen vor (Tab. 3). Meist unter Beteiligung der *C. perfringens* Typen B und C, vereinzelt auch durch Typ A. Von Bedeutung ist außerdem die nekrotisierende Enteritis der Saugferkel (Typ C), der Hunde (Typ A) und der Hühnervögel (Typ A und C). *C. perfringens* Typ E gilt dagegen als eher seltener Erreger, z. B. von Enterotoxämien bei Lämmern, Kälbern und Hasen. Bei an Durchfall erkrankten Schweinen und Fällen von Colitis X bei Pferden konnte auch das *C. perfringens*-Enterotoxin isoliert werden (Songer, 1996; Songer, 2010). Es wurde zudem ein Zusammenhang zwischen dem Nachweis von Enterotoxin und nosokomialer Enteropathien bei Hunden festgestellt (Songer, 2010). Im Fall von durch *C. perfringens* verursachten Enteritiden und Enterotoxämien reicht eine reine Speziesdiagnose zum Erregernachweis nicht aus, da dieser Keim regelmäßig als Bestandteil der Darmflora von Tieren nachgewiesen werden kann. Daher ist ein Toxinnachweis mittels ELISA oder Zellkultur bzw. der Gen-Nachweis mittels PCR aus dem Darminhalt eines erkrankten Tieres oder aus einer Kultur erforderlich. Bei einer Infektion mit *C. perfringens* kann eine Therapie mit unterstützenden Maßnahmen und Antibiotika erfolgen, von größter Bedeutung ist jedoch eine prophylaktische Impfung (z. B. Sauen während des letzten Drittels der Trächtigkeit) (Hatheway, 1990; Kahn, 2010; Songer, 1996; Songer, 2010).

2.2.2 *C. botulinum*

C. botulinum kommt ubiquitär im Erdboden sowie See- und Meeressedimenten vor, die jeweilige Anzahl der Keime und die Toxintypen variieren jedoch stark. In den USA, Südamerika und China dominieren die Stämme vom *C. botulinum* Typ A, in Europa vorwiegend Typ B. *C. botulinum* Typ E kann dagegen weltweit in Süßwasserregionen und Meeressedimenten nachgewiesen werden. Die Typen C und D werden regelmäßig in wärmen Regionen aus Kot und Kadavern von Säugern und Vögeln isoliert. Aufgrund der weiten Verbreitung von *C. botulinum* können diese Keime und ihre Sporen leicht in Lebensmittel und Futtermittel gelangen. Besonders, wenn sie in unsachgemäß konservierten Gemüse- und Fleischprodukten sowie traditionellen Fischzubereitungen vorhanden sind, können die toxinbildenden Erreger lebensmittelbedingte Erkrankungen hervorrufen (Hatheway, 1990; McLauchlin und Grant, 2007; N.N., 2005; Rhodehamel et al., 1992).

In erster Linie gelten die *C. botulinum* Typen A, B, E und F als humanpathogen, da die Typen C und D bisher fast ausschließlich als Verursacher von Tiererkrankungen in Erscheinung getreten sind (McLauchlin und Grant, 2007). Dagegen wurde *C. botulinum* Typ G zwar in Autopsieproben nachgewiesen, konnte aber bisher weder bei Menschen noch bei Tieren mit einer definitiven Erkrankung in Verbindung gebracht werden (Sonnabend et al., 1981; Sonnabend et al., 1985). Eine Vergiftung mit dem *C. botulinum*-Neurotoxin (BoNT) aller Typen ruft die seltene, dafür weltweit bei Mensch und Tier vorkommende und häufig schwer verlaufende Erkrankung „Botulismus“ hervor (Lindström und Korkeala, 2006; McLauchlin und Grant, 2007; N.N., 2005). Tab. 4 stellt eine Auflistung der von Botulismus betroffenen Spezies und der relevanten Infektionsquellen in Verbindung mit den *C. botulinum* Toxintypen dar.

Tabelle 4: Auflistung der *C. botulinum* Typen, der von ihnen betroffenen Spezies und Infektionsquellen (nach N.N., 2005)

Toxintyp	betroffene Spezies	Infektionsquelle
A	Menschen (Lebensmittelintoxikation, Säuglings- und Wundbotulismus)	selbst eingemachtes Gemüse, Früchte und Fleischprodukte und Fisch
	Hühner	Küchenabfälle
B	Menschen (Lebensmittelintoxikation, Säuglings- und Wundbotulismus)	zubereitetes Fleisch (besonders Schwein), Rinder, Pferde
C	Wassergeflügel	Futter, Aufnahme toxinverseuchter Kadaver von Wirbellosen
	Rinder	Futter oder Weide verseucht mit infiziertem Geflügelmist, versehentliche Aufnahme von Tierkadavern mit dem Futter
	Pferde	
	Nerze	Fütterung mit rohem Fleisch, Innereien und Schlachtabfällen
D	Rinder	Aas
E	Menschen (Lebensmittelintoxikation, Säuglings- und Wundbotulismus)	traditionell verarbeitete Meeressäuger und Fisch
F	Menschen (Lebensmittelintoxikation, Säuglings- und Wundbotulismus)	hausgemachte Leberpastete
G	unbekannt	unbekannt

Der Botulismus des Menschen wurde schon im frühen 19. Jahrhundert als eine lebensmittelbedingte Erkrankung beschrieben, kann aber generell in drei verschiedene Formen eingeteilt werden. Es führt zum einen die Aufnahme von präformiertem Toxin in einem mit *C. botulinum* kontaminierten Lebensmittel zu einer Erkrankung (Intoxikation). Zum anderen kann eine Toxinbildung auch erst im Darm nach vorhergehender Kolonisierung mit *C. botulinum* einsetzen und nach Absorption der Neurotoxine zu einer Erkrankung führen (Toxikoinfektion).

Die häufigste Form dieser Art von Botulismus stellt der Säuglingsbotulismus dar, welcher im Gegensatz zu den USA in Deutschland eher selten vorkommt (Centers for Disease Control, 2008a, 2008b; Robert Koch-Institut, 2012). Schließlich kann eine Vermehrung und Toxinbildung des Erregers auch in vorgeschädigtem Gewebe bei Unfallverletzungen, Kieferabszessen oder im Rahmen von Drogenkonsum erfolgen. Diese Form wird als Wundbotulismus bezeichnet und stellt heutzutage die seltenste Erscheinung des Botulismus dar (Lindström und Korkeala, 2006; McLauchlin und Grant, 2007; N.N., 2005).

Bei Wundbotulismus erfolgt der Eintrag von *C. botulinum* (vor allem Typ A und B) über eine äußere Verletzung durch Unfälle oder auch infizierte Injektionsnadeln bei Drogenabhängigen, was anschließend zu einer lokalen Vermehrung und Toxinbildung des Erregers im ischämischen, anaeroben Milieu des geschädigten Gewebes führt. Die Inkubationszeit bis zum Ausbrechen erster Symptome kann mehrere Tage betragen. Die Letalitätsrate liegt hier im Vergleich zu den anderen Erkrankungsformen am höchsten, bei etwa 15 % (Lindström und Korkeala, 2006; Robert Koch-Institut, 2004).

An der lebensmittelbedingten Intoxikation mit *C. botulinum*-Neurotoxin sind sowohl die Stämme der *C. botulinum* Gruppe I, als auch die Stämme der Gruppe II beteiligt, wobei *C. botulinum* Typ F am seltensten bei Erkrankungen isoliert wurde. Die Sporen der Gruppe I zeichnen sich durch eine besonders hohe Hitzeresistenz aus und sind daher überwiegend Auslöser von Erkrankungen in Verbindung mit konservierten und hausgemachten Gemüse- und Fleischprodukten. Die Sporen der Gruppe II sind etwas weniger hitzeresistent und kommen bevorzugt in pasteurisierten und unerhitzten Lebensmitteln sowie in verarbeitetem Fischprodukten vor. Besonders häufig tritt *C. botulinum* Typ E als Erreger in traditionell zubereiteten Fischprodukten oder nach dem Verzehr von Meeressäugern auf, gehäuft in Regionen Alaskas, Nordeuropas und Japan (Japanese Society of Chemotherapy and The Japanese Association for Infectious Diseases, 2011a; Lindström und Korkeala, 2006; Peck, 2004; Rhodehamel et al., 1992).

Der Säuglingsbotulismus resultiert aus einer Besiedelung des Intestinaltrakts von Säuglingen (unter 1 Jahr) mit *C. botulinum* und der anschließenden Absorption des im Darm gebildeten Neurotoxins. Kinder unter einem Jahr besitzen noch keine stabile normale Darmflora, sodass die aufgenommenen Sporen nicht inaktiviert werden, sondern auskeimen können.

Der Säuglingsbotulismus wird überwiegend durch die *C. botulinum* Typen A und B verursacht und stellt die häufigste Form des Botulismus in den USA dar (Centers for Disease Control, 2008b; Robert Koch-Institut, 1998). Die Überschneidung in der Altersgruppe hat zu der Vermutung geführt, dass Säuglingsbotulismus eine der Ursachen für den plötzlichen Kindstod darstellen könnte. Bisher wurde diese Theorie jedoch noch nicht bewiesen (Böhnel et al., 2001). Auch bei Erwachsenen bzw. bei älteren Kindern kommt eine intestinale Kolonisierung durch *C. botulinum* mit anschließender Toxinbildung vor, dies ist jedoch sehr selten. Prädisponierend wirken hierfür eine Immunsuppression in Verbindung mit chirurgischen Behandlungen am Darmtrakt, langanhaltenden Antibiotikagaben oder anderweitigen Eingriffen in die mikrobielle Flora des Darms (McCroskey und Hatheway, 1988). Als Infektionsquellen für den Säuglingsbotulismus wurden Honig, Milchpulver und Staub berichtet. Häufig konnte jedoch kein Zusammenhang mit verdächtigen Lebensmitteln gefunden werden (Hatheway, 1990; Lindström und Korkeala, 2006; McLauchlin und Grant, 2007).

Die Inkubationszeit des lebensmittelbedingten Botulismus beträgt 12 bis 72 h. Das gebildete Neurotoxin wird im Dünndarm über die Darmschranke in das Lymphsystem aufgenommen und hämatogen verbreitet. Es bindet anschließend an Rezeptoren der peripheren Nervenendigungen und verhindert über die Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung schließlich eine weitere Erregung der motorischen Endplatte. Dieses resultiert in einer fortschreitenden Paralyse motorischer Nerven und des autonomen Systems und führt schließlich in schweren Fällen unbehandelt zum Tod durch Atemlähmung. Die Symptome variieren generell je nach absorbiertener Toxinmenge von asymptomatisch bis lebensbedrohlich. Es zeigt sich bei allen Formen des Botulismus eine progressive absteigende schlaffe Lähmung der Muskulatur, Sehstörungen, Ptosis, Schluck- und Kaustörungen, Schwäche im Nacken und den Gliedmaßen sowie schließlich respiratorische und kardiovaskuläre Dysfunktionen. Es tritt kein Fieber auf. Bei lebensmittelbedingtem Botulismus erscheinen zusätzlich noch Übelkeit und Erbrechen sowie abdominale Schmerzen. Der Säuglingsbotulismus zeigt sich häufig zunächst durch Schwäche, Lethargie und Verstopfung. Die Symptome können Tage bis zu mehrere Monate lang anhalten (Lindström und Korkeala, 2006; McLauchlin und Grant, 2007; Rhodehamel et al., 1992).

Bei einem Verdacht auf Botulismus sind eine rasche Diagnose und ein frühzeitiger Therapiebeginn essenziell für das Überleben des Patienten. Eine Diagnosestellung basiert zunächst auf dem klinischen Bild der Erkrankung in Verbindung mit dem eventuellen vorberichtlichen Verzehr eines verdächtigen Lebensmittels (epidemiologischer Zusammenhang). Anschließend kann dieser Verdacht mittels eines Neurotoxinnachweises aus Serum- oder Stuhlproben des Patienten oder aus dem verdächtigen Lebensmittel und/ oder der Isolierung von *C. botulinum* aus dem Stuhl bestätigt werden. Nach wie vor gilt der Maus-Bioassay als Goldstandard für den Toxinnachweis, mittlerweile sind jedoch auch immunologische Methoden und PCR-basierte Verfahren in der Erprobung. Für die Vorbeugung von lebensmittelbedingtem Botulismus ist es essenziell, die Ausgangskeimzahl an *C. botulinum* innerhalb eines gefährdeten Lebensmittels auf nahezu null zu reduzieren. Dies kann durch die Eliminierung von Sporen (Erhitzen auf über 90 bzw. 121 °C), eine Toxinaktivierung (Erhitzen auf 80 °C für 10 min.) oder durch die Zusammensetzung des Lebensmittels hinsichtlich einer schlechteren Wachstumsumgebung für vegetative Zellen (pH-Wert, Wasseraktivität, Salzgehalt) unterstützt werden (Hatheway, 1990; Japanese Society of Chemotherapy and The Japanese Association for Infectious Diseases, 2011a; Lindström und Korkeala, 2006; McLauchlin und Grant, 2007; N.N., 2005; Rhodehamel et al., 1992; Robert Koch-Institut, 2004). In Deutschland ist der Botulismus des Menschen nach § 6 Infektionsschutzgesetz meldepflichtig (IfSG, 2000).

In der Veterinärmedizin sind vorwiegend die *C. botulinum* Typen C und D von Bedeutung, wobei bei den meisten Tierarten Typ C nachgewiesen wird. Dies gilt insbesondere für Enten, Hühner, Nerze, Rinder und Pferde. Für *C. botulinum* Typ D zeigen sich dagegen vornehmlich Rinder empfänglich. In Südafrika können in enzootischen Regionen nahezu ganze Herden von der Erkrankung betroffen sein. Übliche Quellen für eine Intoxikation mit dem *C. botulinum*-Neurotoxin (BoNT) bei Tieren stellen verwesende Tierkörper dar, welche direkt aufgenommen werden oder passiv in das Futter (z. B. Heu oder Silage) gelangen, oder auch sich zersetzendes pflanzliches Material. Es handelt sich also überwiegend um eine futtermittelbedingte Erkrankung (Böhnel und Gessler, 2003; Kahn, 2010).

Die Häufigkeit einer Botulismus-Erkrankung ist bei Rindern und Pferden relativ gering, bei Hühnervögeln etwas höher bis hin zu sehr hoch bei Wassergeflügel. Hunde, Katzen und Schweine sind dagegen vergleichsweise resistent gegenüber oral aufgenommenem BoNT. Neben der klassischen oralen Intoxikation mit präformiertem Neurotoxin wird auch beim Tier von einer toxikoinfektiösen Form des Botulismus berichtet. Hier kommt es im lebenden Tier zur Bildung des Toxins, meist aufgrund prädisponierender Vorerkrankungen wie Ulzerationen und Nekrosen des Gastrointestinaltrakts, Nabelabszessen oder auch durch äußere Wunden. Erkrankungen, welche mit dieser Art des Botulismus in Verbindung gebracht werden, stellen das „shaker foal syndrome“ der Pferde (entspricht dem Wundbotulismus des Menschen) dar, sowie „grass sickness“ bei Pferden und „viszeraler Botulismus“ beim Rind, welche beide durch ein chronisches Erscheinungsbild mit eher unspezifischen Symptomen gekennzeichnet sind (Böhnel und Gessler, 2003; Kahn, 2010; Newton et al., 2010). Die Symptome des klassischen Botulismus beim Tier entsprechen denen des Menschen: die voranschreitenden schlaffen Lähmungen äußern sich meist durch Festliegen, Schluck- und Kaustörungen durch Dysphagie und vermehrten Speichelfluss. Die Erkrankung mündet in aller Regel im Tod des Tieres durch Atemlähmung oder Lähmung der Herzaktivität.

Eine Verdachtsdiagnose auf Botulismus kann anhand des klinischen Bildes und dem Ausschluss anderer Erkrankungen, welche zu motorischen Lähmungen führen, gestellt werden. Die Bestätigung der Diagnose durch einen Toxinnachweis im Kot, Serum oder Gewebe (toxikoinfektiöse Form) erkrankter Tiere oder im Futtermittel gestaltet sich relativ schwierig. Negative Ergebnisse im Maus-Bioassay sind häufig unzuverlässig. Als wichtigste prophylaktische Maßnahmen gilt die Überwachung der Futtermittelqualität. Verdorbenes Heu und Silage sowie insbesondere Tierkadaver müssen rechtzeitig entsorgt und ein Kontakt mit dem Futtermittel vermieden werden. In Südafrika und Australien wurden Impfungen mit Typ C und Typ D Toxoiden bereits erfolgreich bei Rindern eingesetzt (Böhnel und Gessler, 2003; Kahn, 2010).

2.2.3 *C. difficile*

C. difficile wurde 1935 ursprünglich als Bestandteil der Darmflora gesunder Säuglinge entdeckt. Erst in den 1970er Jahren mit der Einführung einer neuen Antibiotikaklasse (Clindamycin) konnte man *C. difficile* als Erreger der antibiotika-assoziierten pseudomembranösen Kolitis beim Menschen ausmachen (von Eichel-Streiber und Braun, 2008). Seither haben die Fälle von *C. difficile*-assoziierten Erkrankungen stetig zugenommen und erreichten weltweit Anfang des neuen Jahrtausends einen Höhepunkt aufgrund des Auftretens neuer hochvirulenter Stämme. Infolgedessen wurde in Deutschland 2007 die Meldepflicht für schwer verlaufende Erkrankungen einer *C. difficile*-Infektion (CDI) beim Menschen eingeführt (Borgmann et al., 2008; Heinlen und Ballard, 2010; Robert Koch-Institut, 2007; von Eichel-Streiber und Braun, 2008).

Die Spezies *C. difficile* kann in niedrigen Konzentrationen sowohl in Erde, Sand und Meeressedimenten, als auch im Kot von Pferden, Eseln, Kamelen sowie von Hunden, Katzen und domestizierten Vögeln gefunden werden (Gould und Limbago, 2010; Songer, 1996). Auch bei gesunden Menschen kann *C. difficile* vereinzelt aus dem Stuhl isoliert werden, im Fall von Neugeborenen sogar bei bis zu 70 %, ohne dass sich eine Erkrankung entwickelt (Heinlen und Ballard, 2010; Kachrimanidou und Malisiovas, 2011). Die Aufnahme der vegetativen Zellen oder Sporen von *C. difficile* findet bei Mensch und Tier oral statt. Aufgrund des dort herrschenden anaeroben Milieus siedelt sich *C. difficile* anschließend im Bereich des Dickdarms an. Für die Manifestation einer Erkrankung sind jedoch bestimmte prädisponierende Faktoren notwendig, die eine Toxinbildung des fakultativ pathogenen Erregers begünstigen. Erst eine Veränderung der normalen Darmflora durch Antibiotikatherapie, invasive gastrointestinale Eingriffe oder eine veränderte Ernährung (Futterumstellung) ermöglichen *C. difficile* ein übermäßiges Wachstum und die Toxinbildung im Darmtrakt. Die ausgelösten Symptome variieren dabei stark in Abhängigkeit von Alter, Immunstatus und Vorerkrankungen des Patienten von wässrigem Durchfall und abdominalen Schmerzen bis hin zu Blut und Fibrin Beimengungen im Stuhl (Kot) sowie massiver Dehydratation und septikämischem Schock mit Todesfolge (Heinlen und Ballard, 2010; Kachrimanidou und Malisiovas, 2011).

Bei der *C. difficile*-Infektion des Menschen handelt es sich überwiegend um nosokomiale Infektionen der älteren Bevölkerung (> 65 Jahre), in den letzten Jahren wurden jedoch auch vermehrt Fälle von Erkrankungen ohne Zusammenhang mit einem Krankenhausaufenthalt bei etwas jüngeren Personen bekannt, die so genannten „community-associated“ *C. difficile*-Infektionen (Borgmann et al., 2008; Heinlen und Ballard, 2010). Diese Fälle haben dabei häufig vorberichtlich weder Antibiotika noch eine chirurgische Therapie erhalten, so dass der Ursprung der Infektion noch ungeklärt ist. Man vermutet jedoch gerade hier einen Zusammenhang mit Lebensmitteln als Infektionsquelle, da *C. difficile* auch immer wieder in Fleisch- und Geflügelprodukten (v. a. Hackfleisch) im Einzelhandel nachgewiesen wurde (Gould und Limbago, 2010; Weese, 2010). Eine *C. difficile*-Infektion kann sich beim Menschen in unterschiedlichen Formen äußern: von subklinischen Erscheinungen und einer milden Form, dem *C. difficile*-assoziierten Durchfall bis hin zu der lebensbedrohlichen pseudomembranösen Kolitis mit den typischen plaqueähnlichen Läsionen der Darmschleimhaut (Heinlen und Ballard, 2010; Kachrimanidou und Malisiovas, 2011).

C. difficile-Infektionen sind mittlerweile auch bei Tieren als häufige Ursache von Durchfallerkrankungen bekannt. Der Keim konnte bei Fällen von nekrotisierender Enterokolitis der Fohlen, als Auslöser der akuten post-antibiotischen Kolitis erwachsener Pferde, bei chronischen Durchfallerkrankungen von Hunden sowie bei Diarrhöen von Schweinen, Kälbern und Hamstern nachgewiesen werden. In einigen Studien wurde *C. difficile* sogar als eine der häufigsten Ursachen von Durchfällen bei neugeborenen Ferkeln identifiziert. Es wurde außerdem ein Zusammenhang zwischen Infektionen mit *C. difficile* und *C. perfringens* und der akuten, häufig post-operativ auftretenden Erkrankung „Colitis X“ bei Pferden festgestellt (Kahn, 2010; Keessen et al., 2011; Songer, 1996; Songer, 2010; Songer und Anderson, 2006; Songer et al., 2009; Weese, 2010).

Die Diagnose erfolgt über einen Toxinnachweis (Toxin A und/oder Toxin B) aus Stuhl- bzw. Kotproben des Patienten mittels Zellkulturen, ELISA oder aber anhand des Nachweises der Toxingene mittels PCR. Zusätzlich kann für eine spätere Typisierung des Stammes eine kulturelle Anzucht des Erregers sinnvoll sein. Prophylaktisch ist es wichtig, besonders im Klinikbereich die Hygienemaßnahmen zu verbessern, indem man unter anderem sporizide Substanzen zur Desinfektion von Händen und Gerätschaften beim Einsatz am Patienten verwendet. Wenn möglich, sollte auch der generelle Einsatz von Antibiotika kritisch hinterfragt werden und falls eine Anwendung nötig sein sollte, Antibiotikaklassen zu wählen, welche ein geringeres Risiko einer Erkrankung beinhalten. Ein Impfstoff für Menschen befindet sich noch in der Entwicklungsphase (Heinlen und Ballard, 2010; Kachrimanidou und Malisiovas, 2011; Keessen et al., 2011; Songer, 2010; von Eichel-Streiber und Braun, 2008).

2.2.4 *C. chauvoei*

Die Infektion mit *C. chauvoei* ruft eine akute, fieberhafte Gasödemerkrankung bei Rindern und Schafen hervor, den Rauschbrand. Diese Erkrankung kommt weltweit vor und gehört aufgrund ihres seuchenhaften Verlaufs zu den anzeigepflichtigen Tierseuchen in Deutschland (N.N., 2011). *C. chauvoei* kann aus dem Gastrointestinaltrakt von gesunden Tieren isoliert werden, sein Hauptreservoir stellt jedoch der Erdboden dar. Obwohl in der Erde keine Vermehrung des Erregers stattfindet, können Sporen dort jahrelang infektiös bleiben, was in kontaminierten Weideregionen zu immer wiederkehrenden Krankheitsausbrüchen führt. Bei Rindern handelt es sich bei Rauschbrand um eine Erkrankung mit endogenem Ursprung, im Gegensatz zum Rauschbrand des Schafes sind keine äußerlichen Wunden feststellbar. Meist sind die gesündesten und wohlgenährtesten Rinder innerhalb einer Herde betroffen, mit einem Alter zwischen 6 und 24 Monaten. Die *C. chauvoei*-Sporen werden zunächst oral häufig über das Weiden auf kontaminierten Flächen in den Verdauungstrakt aufgenommen. Der Erreger gelangt anschließend über die Darmschranke in die Blutzirkulation und wird vorwiegend in die gut durchbluteten, großen Muskelpartien der Vorder- und Hintergliedmaßen transportiert, welche sich aufgrund ihrer exponierten Lage häufiger kleine Quetschungen mit folgender Ischämie des Gewebes zuziehen können.

Das so vorgeschädigte Gewebe bietet ausreichende Bedingungen für eine Vermehrung und Toxinbildung des Erregers. Die Toxinwirkung bedingt lokale Muskelnekrosen sowie großflächige Gewebeschäden. Dagegen erfolgt bei Schafen die Infektion mit *C. chauvoei* in den meisten Fällen exogen über Kontamination von Kastrationswunden, Geburtsverletzungen, Scherwunden oder beim Impfen. Meist treten die Symptome plötzlich auf: Lahmheit, Fieber, schwere Allgemeinstörungen und Gasödeme der großen Skelettmuskeln mit Knistern (Rauschen) bei Palpation. Manche Rinder werden ohne vorherige Anzeichen tot auf der Weide aufgefunden. Der Verlauf ist perakut oder akut mit dem Verenden innerhalb der ersten Stunden und Tage der Erkrankung. Zum Ausschluss anderer Clostridien mit ähnlichen Krankheitsbildern, insbesondere *C. septicum*, sollte ein Immunfluoreszenztest mit Nachweis des Erregers aus dem betroffenen Gewebe erfolgen. Eine Therapie mit hochdosierten Antibiotika ist möglich, jedoch wenig Erfolg versprechend. In gefährdeten Gebieten wird eine Vakzination mit Clostridien-Kombinationsimpfstoffen empfohlen (Groseth et al., 2011; Harwood et al., 2007; Kahn, 2010; Rainey et al., 2009; Sojka et al., 1992; Sterne und Batty, 1975).

2.2.5 *C. septicum*

C. septicum ist zum einen der Erreger des Pararauschbrandes (malignes Ödem), einer typischen Gasödemerkrankung bei verschiedenen Haussäugetieren, und zum anderen des Labmagenpararauschbrandes, einer hämorrhagisch-nekrotisierenden Labmagenentzündung der Schafe. Der Erreger ist weltweit sowohl in der Erde, als auch im Darmtrakt von Tieren und Menschen zu finden, benötigt jedoch stets eine Vorschädigung von Gewebe (anaerobes Milieu), um seine pathogene Wirkung zu entfalten (Kahn, 2010; Songer, 1996).

Bei Pararauschbrand handelt es sich um eine akut und häufig tödlich verlaufende Wundinfektion mit Gasödembildung, welche bei Rindern, Pferden, Schafen, Ziegen und Schweinen vorkommt. Es können neben *C. septicum* auch andere Gasödem-Erreger wie *C. perfringens*, *C. novyi* und *C. chauvoei* beteiligt sein.

Der Eintrag des Erregers erfolgt z. B. über die Kontamination von Wunden bei der Kastration, von Geburtsverletzungen (Geburtspararauschbrand) oder auch durch mangelnde Hygiene bei der Impfung. Erkrankte Tiere zeigen schwere Allgemeinstörungen und Fieber sowie rasch zunehmende subkutane und intramuskuläre Schwellungen und eine generalisierte Neigung zur Ödembildung. Eine Ansammlung von Gas wie beim klassischen Rauschbrand ist eher selten. Der Tod tritt innerhalb der ersten ein bis zwei Tage nach Auftreten der ersten Symptome ein (Kahn, 2010). Der Pararauschbrand stellt eine weltweit vorkommende Tierseuche dar, wobei ein ähnliches Krankheitsbild - ebenfalls durch *C. septicum* hervorgerufen - auch beim Menschen existiert. Neben einer klassischen Gasödemkrankung infolge von äußeren Verletzungen, wie bei Kriegswunden oder durch Unfälle, tritt *C. septicum* beim Menschen selten auch als Erreger eines spontanen atraumatischen Gasgangräns auf. Hierbei handelt es sich vermutlich um eine endogene Infektion mit *C. septicum*, vermittelt über eine vorausgehende Schädigung des Darmtrakts, z. B. durch Karzinome, Infarzierungen, Darmverschlingungen und andere Grundleiden (Dylewski et al., 2007; Dylewski und Luterman, 2010; Mirza et al., 2009; Smith-Slatas et al., 2006). Über eine vergleichbare Erkrankung wurde mittlerweile auch beim Geflügel (aviäres malignes Ödem) berichtet (Neumann et al., 2010).

Der Labmagenpararauschbrand („braxy“) stellt eine ebenso akute und septikämisch verlaufende Erkrankung mit hochgradiger Entzündung des Labmagens dar, welche besonders Lämmer und junge Schafe bis zu einem Alter von 2 Jahren betrifft. Diese Erkrankung tritt vorwiegend im Norden von Europa im Zusammenhang mit der Aufnahme von gefrorenem oder verschmutztem Futter als krankheitsinduzierendes Agens auf. Die Bestätigung eines klinischen Verdachts kann mittels Immunfluoreszenztest aus Gewebsproben erfolgen. Dabei ist der Nachweis von *C. septicum* in einem Gewebe, das mehr als 24 h nach dem Tod entnommen wurde für eine Diagnose als nicht mehr relevant anzusehen, da es sich ebenso um eine postmortal eintretende Kontamination aus dem Darmtrakt handeln kann. Eine frühzeitige Therapie mit hochdosierten Breitspektrumantibiotika oder Penicillin kann hilfreich sein. Als Prophylaxe kann in enzootischen Regionen eine Vakzination mit einem Kombinationsimpfstoff erfolgen (Kahn, 2010; Songer, 1996; Sterne und Batty, 1975).

2.2.6 *C. novyi*

C. novyi ist sowohl im Erdboden, als auch häufig im Darmtrakt von herbivoren Tieren vorhanden. Aufgrund der unterschiedlichen Ausstattung mit Toxinen, rufen die beiden pathogenen Typen des *C. novyi*, Typ A und Typ B, zwei völlig verschiedene Erkrankungsformen hervor (Kahn, 2010; Majumdar et al., 2004; Rainey et al., 2009; Sterne und Batty, 1975).

C. novyi Typ A ist an verschiedenen Gasödemerkrankungen beteiligt. So gilt es zusammen mit *C. perfringens* und *C. septicum* als ein weiterer Erreger des Gasbrandes beim Menschen (Majumdar et al., 2004; Wells und Wilkins, 1996). Neben post-operativen Wundinfektionen durch *C. novyi* Typ A wurde in den letzten Jahren auch über Fälle von Gasödemerkrankungen bei Drogenabhängigen berichtet, welche nach subkutaner oder intramuskulärer Injektion eines mit *C. novyi*-Sporen verunreinigten Drogen-Lösungsmittelgemisches auftraten. Generell gilt jedoch heutzutage eine Infektion mit *C. novyi* Typ A beim Menschen als eher selten (McGuigan und Roworth, 2002; McGuigan et al., 2002; Robert Koch-Institut, 2000b). In der Veterinärmedizin verursacht *C. novyi* Typ A unter anderem die Erkrankung „big head“, eine akut verlaufende Wundinfektion bei jungen Schafböcken mit Kampfverletzungen als Eintrittspforte für den Erreger. Klinisch äußert sich „big head“ in einer starken ödematischen Schwellung des Kopfes und des Nackens, jedoch fehlt hier eine Gasbildung. Ein ähnliches Bild kann sich auch bei anderen Säugern und bei Vögeln zeigen. Es wurde außerdem ein Zusammenhang mit plötzlichen Todesfällen bei Schweinen und Rindern im Rahmen des „sudden death syndrome“ vermutet, konnte aber bisher nicht bestätigt werden (Kahn, 2010; Sterne und Batty, 1975).

C. novyi Typ B ist der Erreger der nekrotisierenden Hepatitis, einer weltweit vorkommenden, enzootischen Erkrankung, die vorwiegend bei wohlgenährten Schafen auftritt. Nach der oralen Aufnahme des Erregers oder dessen Sporen über miterregerhaltigem Kot kontaminierte Weideflächen, erfolgt eine Ansiedlung des Keims in der Leber. Leberegel-Larven (*Fasciola hepatica*) oder andere Parasiten der Leber dienen dabei als Initiatoren für eine Vermehrung und Toxinbildung von *C. novyi* Typ B aufgrund der Ausbildung ischämischer Läsionen und damit anaerober Areale innerhalb des Organs.

Der Tod tritt innerhalb weniger Stunden nach Ausbruch der Erkrankung ein, ohne dass das Tier wesentliche Symptome zeigt. Pathologisch zeigen sich grau-gelbe Nekroseherde in der Leber mit Parasitenlarven im Zentrum des veränderten Gewebes. Häufig zeigt sich auch blau-schwärzliche subkutane Verfärbungen aufgrund venöser Stauungen und Gefäßrupturen. Eine Diagnose kann anhand der Leberpathologie erfolgen, die Therapie ist jedoch aussichtslos. Als Prophylaxe werden in enzootischen Regionen eine Schneckenreduktion (als Reservoir für Leberegel), Antiparasitika und eine Vakzination mittels Kombinationsimpfstoff empfohlen (Kahn, 2010; Sterne und Batty, 1975).

2.2.7 *C. haemolyticum*

C. haemolyticum wurde ursprünglich als *C. novyi* Typ D bezeichnet und zeigt nach wie vor eine nahe Verwandtschaft zur Spezies *C. novyi*, besonders zu Typ B-Stämmen (Collins et al., 1994; Sterne und Batty, 1975). Daher ähneln sich Pathologie und der Hauptangriffsort (Kupffer-Zellen der Leber) der beiden Erreger stark. *C. haemolyticum* ist der Erreger der bazillären Hämoglobinurie, einer akut verlaufenden, enzootischen Erkrankung der Wiederkäuer, vorwiegend der Rinder.

Diese Erkrankung konzentriert sich auf subtropische Regionen Nord- und Südamerikas, Asien und Australien, kommt aber auch in Europa (Irland) vor. Man findet *C. haemolyticum* im Erdboden und Gastrointestinaltrakt von Rindern sowie in Kadavern von infizierten Tieren. Zudem kann der Erreger aus der Leber von gesunden Tieren isoliert werden. Nach der oralen Aufnahme siedeln sich die Sporen in der Leber des betroffenen Tieres an. Das Auskeimen, die Vermehrung und Toxinbildung des Erregers sind dabei von einer Vorschädigung der Leber mit Ausbildung eines lokalen anaeroben Milieus abhängig. Diese Schädigung wird in den meisten Fällen wie bei der nekrotisierenden Hepatitis durch einen Leberegel-Befall hervorgerufen, kann aber auch im Rahmen einer nitratreichen Ernährung oder iatrogen durch versehentliche Leberpunktion erfolgen. Das β -Toxin bewirkt schließlich eine intravaskuläre Hämolyse mit deren Folgeerscheinungen: Fieber, Ikterus, hämolytische Anämie, Hämoglobinurie und lokale Leberinfarkte. Zusätzlich können Dyspnoe, Durchfall und abdominale Schmerzen das klinische Bild prägen.

Die Erkrankung verläuft meist akut. Es können aber auch einzelne Rinder tot aufgefunden werden, ohne je klinische Zeichen entwickelt zu haben. Die Letalität liegt unbehandelt bei etwa 95 %. Eine Verdachtsdiagnose kann anhand des klinischen und labordiagnostischen Bildes erstellt werden. Für die Bestätigung der Diagnose sind eine Isolierung des Erregers aus dem vom Infarkt betroffenem Lebergewebe und ein Immunfluoreszenztest hilfreich. In gefährdeten Gebieten kann eine Vakzination mit Clostridien-Kombinationsimpfstoffen durchgeführt werden (Ahourai et al., 1990; Kahn, 2010; Shinozuka et al., 2011; Sterne und Batty, 1975; Takagi et al., 2009; Vine et al., 2006).

2.3 Diagnostik der *Clostridium* spp.

2.3.1 Klassisch-kultureller Nachweis

Die Anzucht von *Clostridium* spp. kann sowohl auf festen Nährmedien als auch in Flüssignährmedien erfolgen. Flüssigen Nährmedien müssen häufig komplexe Nährstoffe (z. B. Peptone) und geeignete reduzierende Elemente wie Gewebe-Partikel aus Leber, Herz oder Hirn und für die Bereitstellung von Sulfhydrylgruppen zum Schutz vor Oxidation und Entwicklung von inhibitorischen Substanzen (Cystein, Natriumthioglycolat) zugesetzt werden (Sterne und Batty, 1975). Als Flüssigmedien zur Anreicherung von *Clostridium* spp. werden derzeit unter anderem die Leberbouillon nach Tarozzi und das TPGY-Medium eingesetzt (Lindström und Korkeala, 2006; N.N., 2011). Neben einer Anzucht und Anreicherung der Keime im Flüssigmedium ist die Anzucht auf festen Nährböden für eine weitere Isolierung und Identifizierung der Erreger essenziell (Hall, 1922; N.N., 2011). Bei der Entwicklung geeigneter fester Nährmedien für die Anzucht von anaeroben Bakterien stellten sich vor allem zwei grundlegende Anforderungen heraus: die Verwendung von frisch hergestellten Nährmedien auf Grundlage des Blutagars und die Anreicherung mit Nährstoffen (Hanson und Martin, 1976). Zum Einsatz kommen hierbei Cystein oder Natriumthioglycolat als reduzierendes Agens und steriles Blut, Serum, Eigelb oder Lecithin als Grundlage für einen Nährboden. Nach einer anaeroben Bebrütungsdauer von in der Regel mindestens 48 h wachsen die anaeroben Keime in ausreichender Anzahl und typischer Koloniemorphologie, um eine weitere Identifizierung zu ermöglichen. Es müssen jedoch zuvor Reinkulturen angezüchtet werden. Für bestimmte *Clostridium* spp., wie *C. difficile*, sind entsprechende Selektivnährböden vorhanden, welche eine Reinzucht vereinfachen sollen (Hall, 1922; Health Protection Agency, 2008a; Sterne und Batty, 1975). Die Temperatur bei Inkubation der Clostridien ist abhängig von deren Wachstumsoptima, wird aber üblicherweise zwischen 35 °C und 37 °C angesetzt (Health Protection Agency, 2008a).

Die Identifizierung der *Clostridium* spp. erfolgt bei einem klassischen Nachweis über morphologische Kriterien, wie dem Erscheinungsbild der Kolonie, der Überprüfung auf anaerobes Wachstum sowie die Zellmorphologie und Sporenlagerung des Bakteriums im Grampräparat (Health Protection Agency, 2008a; N.N., 2011). Zusätzliche Hinweise können einem sensiblen Untersucher auch der Geruch einer bebrüteten Kultur beim Öffnen des Anaerobiertopfes geben (Hall, 1922; Sterne und Batty, 1975).

2.3.2 Biochemische Identifizierung - miniaturisierte Testsysteme

Nach der erfolgreichen Anzucht und Isolierung eines Erregers in Einzelkultur besteht bei einer Vielzahl von Bakterien die Möglichkeit, diese aufgrund ihrer unterschiedlichen metabolischen Aktivität und Enzymausstattung biochemisch differenzieren zu können. Hierzu werden bei Clostridien die isolierten Kolonien klassischerweise zunächst auf einen Eigelb- und Laktosehaltigen Nährboden ausgestrichen, um Lecithinase-, Lipasebildung oder Laktosespaltung anhand von Färbung und Hofbildung um die Kolonien darstellen zu können. Weitere klassische biochemische Tests bezüglich einer Identifizierung von *Clostridium* spp. stellen die Gelatineverflüssigung, Nitratreduktion und Ureaseproduktion dar (Health Protection Agency, 2008a; N.N., 2011; Sterne und Batty, 1975; Willis und Hobbs, 1959). Mittlerweile werden jedoch eine ganze Reihe kommerzieller Testsysteme für die biochemische Identifizierung von Bakterien angeboten. Neben dem hier verwendeten API® 20 A (BioMérieux, Frankreich) sind noch vier weitere Identifizierungssysteme für anaerobe Keime erhältlich. Das Prinzip dieser miniaturisierten biochemischen Testreihen basiert auf der Erstellung biochemischer Profile anhand einer vorgegebenen Kombination geeigneter Tests. In vielen Fällen wird dadurch eine taxonomische Einordnung der untersuchten Keime ermöglicht (Neumeister et al., 2009).

2.3.3 Molekularbiologische Verfahren - Real-Time PCR

In den letzten beiden Jahrzehnten hat sich die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aufgrund ihrer vielfältigen Einsatzmöglichkeiten zu einer der wichtigsten und am häufigsten angewendeten Methoden in der molekularbiologischen Diagnostik entwickelt. Die wichtigsten Vorteile der PCR stellen ihre Schnelligkeit und Spezifität sowie ihre Sensitivität dar, die es erlaubt, Organismen und insbesondere deren Pathogenitätsgene nachzuweisen, welche mit kulturellen Verfahren kaum oder gar nicht ermittelt werden können (Busch, 2010; Maurer, 2011; McKillip und Drake, 2004).

Die PCR ermöglicht unter Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase eine selektive Vervielfältigung einer spezifischen durch Oligonukleotid-Primer flankierten DNA-Sequenz. Das Prinzip der DNA-Amplifikation beruht dabei auf einer raschen Abfolge von sich wiederholenden Temperaturzyklen, wobei jeder Zyklus in drei Reaktionsphasen gegliedert ist: die Denaturierung der doppelsträngigen (ds) DNA in Einzelstränge bei 95 °C, das Annealing der Primer an die komplementäre EinzelstrangDNA bei niedrigeren Temperaturen (45-55 °C) und schließlich die Elongationphase bei 72 °C, in welcher die DNA-Synthese durch die Polymerase beginnend am 3'-Ende der Primer vonstatten geht. Unter optimalen Reaktionsbedingungen wird so in jedem Zyklus eine Verdopplung der zu amplifizierenden Sequenz erreicht, was es schließlich möglich macht, auch sehr geringe Ausgangskonzentrationen an DNA nachzuweisen. Die Durchführung der PCR erfolgt in so genannten Thermocyclern, welche den zyklischen Temperaturverlauf der Reaktion gewährleisten. Für die Detektion der amplifizierten DNA müssen bei der klassischen PCR jedoch weitere Verfahren wie Agarose- oder Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Southern Blotting oder Sequenzierung angewendet werden (Busch, 2010; Maurer, 2011; Neumaier et al., 1998).

Im Gegensatz dazu wird bei der Real-Time PCR durch eine parallel zur DNA-Amplifikation durchgeführte Fluoreszenzmessung die Detektion der PCR-Produkte in Echtzeit erreicht. Die Fluoreszenz kann dabei entweder durch in die ds DNA interkalierende Farbstoffe oder durch Sequenz-spezifische Hybridisierungssonden erzeugt werden.

Die Verwendung DNA-bindender Farbstoffe wie Ethidiumbromid oder SYBR-Green ermöglicht eine Sequenz-unabhängige Detektion der entstandenen PCR-Produkte. Diese interkalierenden Farbstoffe senden erst nach Einlagerung in die ds DNA ein Fluoreszenzsignal aus. Eine weitere Methode stellen mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Oligonukleotid-Sonden dar. Diese binden spezifisch an eine durch Primer flankierte DNA-Sequenz und lösen in der Regel auf Basis des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) eine detektierbare Fluoreszenzemission aus. Das Prinzip der FRET-Sonden beruht auf einem über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen erfolgenden, strahlungsfreien Energietransfer zwischen zwei Molekülen. Das fluorophore Donor-Molekül absorbiert ein Photon und gibt die Energie an einen in räumlicher Nähe befindlichen Akzeptor ab. Der Akzeptor kann dabei entweder ein fluoreszenzlösches Molekül (Quencher) sein, der selbst nicht fluoresziert. Dies ist bei Hydrolysesonden (TaqMan-Sonden) und den so genannten Molecular Beacons der Fall. Oder der Akzeptor stellt ein weiteres fluorophores Molekül dar, welches Licht auf einer anderen Wellenlänge emittiert, wie bei Hybridisierungssonden. Die Effizienz des Energietransfers ist dabei von der Entfernung zwischen Donor und Akzeptor abhängig (Clegg, 1995; Maurer, 2011; McKillip und Drake, 2004; Wittwer et al., 1997). Die Real-Time PCR bietet ebenfalls die Möglichkeit des Nachweises mehrerer spezifischer DNA-Sequenzen über die Durchführung einer Multiplex-PCR. Zur Markierung der Sonden werden dabei unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe mit klar differenzierbaren Emissionspektra verwendet, wodurch eine eindeutige Identifikation mehrerer PCR-Produkte in einer Reaktion ermöglicht wird (Maurer, 2011; McKillip und Drake, 2004).

Die Auswertung der Real-Time PCR erfolgt schließlich über eine spezielle Software (z. B. MxPro, Agilent Technologies, USA), welche die Intensität der Fluoreszenz misst, die nach jedem ablaufenden Reaktionszyklus vom Amplifikat ausgesandt wird. Die Zunahme der Fluoreszenz korreliert dabei mit der Zunahme der amplifizierten DNA, was Rückschlüsse auf die ursprünglich in der Probe vorhandene Menge an zu detektierender DNA erlaubt. Entscheidend hierfür ist die Überschreitung eines vorgegebenen Schwellenwertes in der Fluoreszenzmessung (Ct-Wert) ab einem bestimmten Amplifikationszyklus. Je früher dieser Schwellenwert erreicht wird, desto höher ist die Anzahl an Ziel-DNA zu Beginn der Reaktion. Somit stellt sich die Real-Time PCR im Gegensatz zur klassischen PCR auch als quantitative Nachweismethode dar (Busch, 2010).

2.3.4 MALDI-TOF MS

Die Identifikation von Mikroorganismen mittels matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) stellt in der mikrobiellen Diagnostik einen neuen Ansatz dar. Dieses Verfahren ermöglicht über die Bestimmung der Molekülmasse von Analyten (Proteinen) die schnelle Identifizierung von Mikroorganismen (Mellmann et al., 2009; Pavlovic et al., 2011).

Für die Durchführung einer Untersuchung werden auf festen Nährmedien vorkultivierte bakterielle Einzelkolonien auf eine markierte Analysenposition der MALDI-TOF MS Probenplatte (Target) überführt. Dieses kann direkt (Schmierpräparation), als „on-target“ Extraktion oder nach einer vorhergehenden Extraktion des Bakterienmaterials mittels Ethanol erfolgen. Ein vorgeschalteter Extraktionschritt wird besonders für Sporenbildner und andere grampositive Erreger empfohlen. In der Regel reicht für eine Analyse eine Erregerkonzentration von etwa 10^5 - 10^6 Keimen aus (Bizzini et al., 2010; Welker und Moore, 2011). Der auf das Target aufgetragene Analyt wird nach dem Eintrocknen mit einer speziellen kristallisierenden Matrixlösung überschichtet. Die Matrixlösung besteht aus einer Mixtur aus Wasser, Acetonitril und einer starken Säure wie Trifluoressigsäure, welche zu der kristallisierenden Matrixgrundlage - üblicherweise 2,5-Dihydroxybenzoësäure (DHB) oder α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure (HCCA) - gegeben wird. Die MALDI-TOF MS nutzt die Eigenschaft dieser kleinen organischen Verbindungen (DHB oder HCCA), bei einer Anregung durch den Laser schonend in die Gasphase überzugehen und zu ionisieren. Um daher auch eine ausreichende Ionisierung der Probe zu erreichen, wird diese mit einem bis zu 10.000-fachen Überschuss an Matrix vermischt (Mellmann et al., 2009; Pavlovic et al., 2011; Welker und Moore, 2011). Nach Einschleusung des präparierten Targets wird im MALDI-TOF Massenspektrometer ein Hochvakuum erzeugt und die Matrix mit den ihr eingelagerten bakteriellen Proteinen unter Laserbeschuss explosionsartig verdampft, wobei die zu untersuchenden Proteine mitgerissen und dabei ionisiert werden. Die entstandenen Ionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und trennen sich dann entsprechend ihrer Ladung und Masse in einem Flugrohr entlang einer feldfreien Driftstrecke auf. Die Flugzeit (time-of-flight) der Proteine kann dabei exakt bestimmt werden.

Sie wird sowohl durch die Masse der im elektrischen Feld beschleunigten Analyten, als auch durch deren Ionisierungsgrad beeinflusst (Masse-zu-Ladung Verhältnis m/z). Auf diese Weise lassen sich die unterschiedlichen Massen der einzelnen Analyten bestimmen und zu einem Gesamtspektrum zusammenfassen. Es hat sich dabei für die Differenzierung von Mikroorganismen ein Messbereich von 2 bis 20 kDa etabliert. Die größte Fraktion der sich in diesem Messbereich befindenden Biomoleküle bilden dabei die ribosomalen Proteine. Deren Spektren mit ihren charakteristischen Massenspitzen (peaks) sind idealerweise repräsentativ für die jeweilige Bakterienart und stellen als massenspektrometrischer Fingerabdruck (Fingerprint) die Grundlage für eine Speziesdifferenzierung mittels MALDI-TOF MS dar. Zu beachten gilt jedoch, dass möglichst frische Bakterienkulturen verwendet werden, da bei zunehmendem Alter der Kulturen oder bei Lagerung im Kühlschrank die ribosomalen Proteine der Bakterien degradiert werden. Dieses kann zu schwächeren Spektren und damit zu schlechteren Differenzierungsergebnissen führen (Mellmann et al., 2009; Welker und Moore, 2011). Die aufgenommenen Spektren (Fingerprints) werden automatisch über eine entsprechende zum System gehörende Software (z. B. BioTyperTM, Bruker Daltonics, USA) mit den Referenzspektren der Herstellerdatenbank abgeglichen. Dabei werden die Differenzierungsergebnisse mit einem Zahlenwert für die Validität der Untersuchung (score value) angegeben, um die Verlässlichkeit der Spezieszuordnung zu dokumentieren. Mit modernen Instrumenten kann die MALDI-TOF MS Messung einer einzelnen Probe innerhalb von wenigen Sekunden, eine Charge von 100 Proben in weniger als einer Stunde erfolgen (Mellmann et al., 2009; Welker und Moore, 2011). Essenziell für eine sichere und reproduzierbare Identifizierung von mikrobiologischen Isolaten ist eine zuverlässige und umfassende Referenzdatenbank, in der die Speziesprofile - in der Regel mindestens 10 Profile pro Art - von allen für eine Untersuchung relevanten Bakterien hinterlegt sind (Mellmann et al., 2009; Welker und Moore, 2011).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Clostridien-Stämme wurden aus der Stammsammlung des LGL bezogen und sind entsprechend bestätigt (Tab. 5). Eine detaillierte Auflistung der Stammbezeichnungen und des Erregerursprungs befindet sich in Tab. 25 (Anhang 11.3).

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme

<i>Clostridium</i> spp.	Anzahl der verwendeten Stämme	Ursprung
<i>C. perfringens</i>	64	Stammsammlung des LGL
	2	Feldisolate
<i>C. botulinum</i>	34	Stammsammlung des LGL
<i>C. difficile</i>	6	Stammsammlung des LGL
<i>C. chauvoei</i>	3	Stammsammlung des LGL
<i>C. septicum</i>	7	Stammsammlung des LGL
<i>C. novyi</i>	1	Stammsammlung des LGL
<i>C. haemolyticum</i>	1	Stammsammlung des LGL

3.1.2 Arbeitsmaterial

Die verwendeten Nährmedien, Testsysteme, Chemikalien und Geräte sowie weitere Hilfsmittel sind im Anhang unter 11.1 und 11.2 aufgeführt.

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung der Clostridien-Stämme

3.2.1.1 Allgemeines Vorgehen

Die Bakterienstämme wurden im Rahmen der Stammsammlung des LGL bei -82 °C in Cryobank Cryoröhrchen (MAST DIAGNOSTICA GmbH, England) gelagert.

Zur Reaktivierung und Anreicherung der Keime wurden durchschnittlich zwei (bei *C. haemolyticum* vier) Kügelchen des Stammhaltungssystems in 9 ml TPGY-Bouillon überführt und je nach *Clostridium* spp. bei 30 °C bzw. 37 °C anaerob bebrütet (Tab. 6). Dabei variierte die Bebrütungsdauer zwischen 1-4 Tagen. Bei *C. chauvoei* und *C. haemolyticum* wurde aufgrund des langsamen Wachstums eine Bebrütung für mindestens sieben Tage angesetzt.

Tabelle 6: Bebrütung der *Clostridium* spp.

<i>Clostridium</i> spp.	Temperatur	Bebrütungsdauer (Tage)
<i>C. perfringens</i>	37 °C	1
<i>C. botulinum</i>	30 °C	2
<i>C. difficile</i>	37 °C	4
<i>C. novyi</i>	37 °C	4
<i>C. septicum</i>	37 °C	4
<i>C. chauvoei</i>	37 °C	7
<i>C. haemolyticum</i>	37 °C	7

Nach erfolgreicher Bebrütung (Eintrübung des Flüssigmediums) wurden die Anreicherungen auf Blutagar und je nach Spezies auch auf entsprechende Selektivnährböden (Tab. 7) ausgestrichen und wiederum nach obigem Schema anaerob bebrütet.

Tabelle 7: Selektivmedien zur Anzucht von *Clostridium* spp.

Selektivmedium	<i>Clostridium</i> spp.
Eigelb-Laktose-Agar	<i>C. perfringens</i>
<i>C. difficile</i> -Agar mit 7 % Schafblut	<i>C. difficile</i>
Schaedler-Agar mit 5 % Schafblut (SCS)	<i>C. novyi</i> , <i>C. septicum</i> , <i>C. chauvoei</i> und <i>C. haemolyticum</i>

Die gewachsenen Kolonien wurden schließlich optisch auf ihre Reinheit überprüft und das arttypische Wachstum (Tab. 26, Anhang 11.3) beurteilt.

3.2.1.2 Anpassung der Flüssignährmedien

Für die Anzucht von *C. difficile* erfolgte eine Modifizierung der TPGY-Anreicherung mittels Antibiotika- und Taurocholat-Zusatzes, da hier ein Zusatz von Wachstumsförderern und Inhibitoren der Begleitflora generell empfohlen wird (Health Protection Agency, 2008a; Rainey et al., 2009).

Bei den *C. botulinum* Typ C-Stämmen konnte durch die unter 3.2.1.1 beschriebene Vorgehensweise der Bebrütung kein ausreichendes Wachstum bzw. eine nur sehr schwache Trübung des Flüssigmediums erzielt werden. Daher wurde eine 2-phäische Sporenanreicherung (Modified Anellis Broth) verwendet, um *C. botulinum* Typ C zur Sporenproduktion anzuregen und über die Sporen erneut vegetative Formen anzuzüchten. Dazu wurde 1 ml der bereits nach obigem Schema bebrüteten Anreicherung in die oben liegende flüssige Phase der modifizierten Sporenanreicherung überführt und bei 30 °C unter anaeroben Verhältnissen bebrütet.

Bereits nach zweitägiger Bebrütung konnte ein Erfolg der Sporenanreicherung anhand einer Phasenverschiebung (= Wechsel der zuvor unten gelegenen festen Phase nach oben) abgelesen werden. Nun wurde jeweils 1 ml der erfolgreich bebrüteten Sporenanreicherung in zwei TPGY-Bouillons überführt, wobei eine der beiden Bouillons anschließend für 15 min. auf 60 °C erhitzt wurde. Es erfolgte eine mindestens zweitägige anaerobe Bebrütung bei 30 °C.

Auch *C. chauvoei* ließ sich zum Teil nicht mittels des üblichen Bebrütungs-Verfahrens anzüchten. Die Anreicherung trübte zwar ein, aber es konnten anschließend keine Kolonien auf festen Nährmedien angezogen werden. Deshalb wurde vermutet, dass bereits in der Flüssiganreicherung eine Versporung einsetzte. Um diese Sporen zu aktivieren wurde 1 ml der bebrüteten Anreicherung in 90 ml TPGY-Bouillon überführt und 15 min. bei 60 °C im Wasserbad erhitzt. Anschließend wurde die Anreicherung 7 Tage bebrütet und auf Blutagar ausgestrichen.

3.2.2 Biochemische Identifizierung

Die biochemische Bestätigung der Clostridien-Stämme erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen Testsystem API® 20 A (BioMérieux, Frankreich). Es wurde bei der Durchführung nach Anweisung des Herstellers vorgegangen.

Obwohl für die Spezies *C. chauvoei*, *C. novyi* und *C. haemolyticum* keine spezifischen Referenzwerte in der Herstellerdatenbank vorlagen, sondern nur eine allgemeine Bewertung des biochemischen Profils mit „*Clostridium* spp.“ möglich war, wurden diese ebenfalls mit dem Api® 20 A untersucht.

3.2.2.1 Allgemeines Vorgehen

Für die Identifizierung des jeweiligen Keims wurden alle auf der entsprechenden Blutplatte gewachsenen Kolonien mittels eines sterilen Tupfers abgenommen und in das API® 20 A Medium überführt. Um eine ausreichende Trübung (\geq McFarland Standard 3 = $9,0 \times 10^8$ KbE/ml) zu erreichen, mussten bei einigen Stämmen von *C. botulinum*, *C. difficile*, *C. haemolyticum* und *C. chauvoei* mehrere bebrütete Blutplatten zur Gewinnung von Kolonien herangezogen werden. Anschließend wurden die Teststreifen beimpft und bei 37 °C anaerob bebrütet. Mit dem restlichen API® 20 A Medium wurden gleichzeitig eine weitere Blutplatte beimpft und die nach anaerober Bebrütung gewachsenen Kolonien für Gramfärbung und Katalasereaktion genutzt. Zudem konnte somit die Reinheit des verwendeten Testmediums und der Stämme nochmals überprüft werden. Die Auswertung der Streifen konnte bei *C. perfringens* bereits nach 24 h anaerober Bebrütung erfolgen, bei allen anderen Stämmen war dies aufgrund des langsameren Wachstums erst nach 48 h möglich (Gresser et al., 1984). Die Auswertung der Teststreifen erfolgte bei *C. botulinum* ebenfalls nach 48 h anaerober Bebrütung, da dies wie bereits durch Lindström et al. (1999) festgestellt eindeutigere Ergebnisse beim Ablesen einer eventuell erfolgten Gelatinehydrolyse lieferte.

3.2.2.2 Auswertung der biochemischen Untersuchung

Nach Ablauf der Bebrütungsdauer wurden die unterschiedlich erfolgten biochemischen Reaktionen anhand von Farbumschlägen abgelesen und unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Katalasereaktion und der Gramfärbung ein numerischer Code erstellt. Dieser wurde anschließend elektronisch mit der Herstellerdatenbank abgeglichen und so eine taxonomische Bewertung generiert. Folgende biochemische Reaktionen wurden mittels des Api® 20 A-Systems untersucht und dienten zur Erstellung der numerischen Codes:

Tabelle 8: Biochemische Reaktionen des Api® 20 A (BioMérieux, Frankreich)

Biochemische Reaktion/ Enzym	Bezeichnung Api® 20 A
Indol-Bildung	IND
Urease	URE
Glukose (Säurebildung)	GLU
Mannit (Säurebildung)	MAN
Laktose (Säurebildung)	LAC
Saccharose (Säurebildung)	SAC
Maltose (Säurebildung)	MAL
Salicin (Säurebildung)	SAL
Xylose (Säurebildung)	XYL
Arabinose (Säurebildung)	ARA
Gelatine-Hydrolyse	GEL
Äsculin-Hydrolyse	ESC
Glyzerin (Säurebildung)	GLY
Cellobiose (Säurebildung)	CEL
Mannose (Säurebildung)	MNE
Melezitose (Säurebildung)	MLZ
Raffinose (Säurebildung)	RAF
Sorbit (Säurebildung)	SOR
Rhamnose (Säurebildung)	RHA
Trehalose (Säurebildung)	TRE
Katalase	CAT

3.2.3 Molekularbiologischer Nachweis mittels Real-Time PCR

3.2.3.1 DNA-Extraktion

Als Standardverfahren zur DNA-Extraktion wurde eine thermische Lyse der Bakterienzelle vorgenommen. Je nach Größe der Einzelkolonien wurde hierfür etwas Koloniematerial (max. eine ganze Einzelkolonie) von einer Blutplatte abgenommen und in 300 µl 0,1 x TE Puffer suspendiert. Die Suspension wurde bei 95 °C 15 min lang in einem Thermomixer bei einer Mischfrequenz von 700 rpm/min. erhitzt und anschließend 1 min. bei 14000 x g abzentrifugiert. Von dem erhaltenen Überstand wurden 5 µl als Template für die Real-Time PCR verwendet.

Einige Stämme von *C. botulinum* (insbesondere vom Typ C) und ein Stamm von *C. chauvoei* ließen sich nicht auf festen Nährböden anzüchten, obwohl die entsprechenden Anreicherungen ausreichend eingetrübt waren. Zur Kontrolle, ob sich die betreffenden Keime in der Anreicherung befanden, wurde hier ein DNA-Extraktionsverfahren für Anreicherungen angewandt. Dazu wurden 1 ml der bebrüteten Anreicherung 5 min. bei 14000 x g abzentrifugiert und das entstandene Pellet mit 500 µl 0,1 x TE Puffer resuspendiert. Anschließend unter Zugabe von 30 µl Lysozym bei 37 °C 30 min. im Thermomixer (Mischfrequenz siehe oben) erhitzt. Nach diesem Schritt erfolgte die DNA-Aufreinigung mittels des Extraktionsautomaten Maxwell®16 (Promega, USA). Die erhaltene DNA wurde wiederum als Template für die Real-Time PCR eingesetzt.

3.2.3.2 Real-Time PCR - allgemeine Verfahren

Um inhibitorische Effekte bei der extrahierten DNA ausschließen zu können, wurde im jeweils ersten Real-Time PCR-Lauf einer Probe eine interne Amplifikationskontrolle (IAC), basierend auf dem pUC 19-System, verwendet (Tab. 9). Nach Bestätigung eines nicht vorhandenen Hemmungseffektes, konnte bei weiteren Läufen mit der gleichen Probe auf eine IAC verzichtet werden. Zusätzlich wurden zur Sicherstellung eines fehlerfreien Ansatzes bei jedem Lauf eine Positiv-Kontrolle (extrahierte Clostridien-DNA) und eine Negativkontrolle (DNase freies Wasser) mitgeführt und stets in Doppelbestimmung gearbeitet.

Tabelle 9: Primer- und Sondensequenzen für die Interne Amplifikationskontrolle

Bezeichnung	Sequenz (5` - 3`)	Gensequenz (Acc. Nr.)
pUC 19 IAC fw	TGT GAA ATA CCG CAC AGA TG (20 bp)	
pUC 19 IAC re	AGC TGG CGT AAT AGC GAA G (19 bp)	L09137
pUC 19 IAC S (ROX)	GAG AAA ATA CCG CAT CAG GC (20 bp)	

fw = forward primer; re = reverse primer; S = Sonde; Kanal: ROX = 6-Carboxy-X-Rhodamine

Des Weiteren wurden alle Real-Time PCR-Systeme mit einem Two-Step Temperatur-Zeit-Profil durchgeführt (Tab. 10) und stets TaqMan-Sonden verwendet.

Tabelle 10: Two-Step Temperatur-Zeit-Profil

Prozess	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min.
	45 Zyklen	
Denaturierungsschritt	95 °C	15 sec.
Anlagerung und Synthese	55 °C	60 sec.

Nach Zusammenfügen aller Komponenten wurden die Proben in Doppelbestimmung in eine 96-Wellplatte pipettiert und in den Real-Time Cycler Mx3000P oder Mx3005P (Agilent Technologies, USA) verbracht. Die Aufnahme und das Auslesen der Fluoreszenzsignale erfolgten durch die gerätespezifische Software.

Das Ergebnis wurde als positiv angesehen, wenn das Fluoreszenzsignal der Probe einen Ct-Wert von < 35 aufwies. Über einem Ct-Wert von 35 wurde die Probe als negativ bewertet.

3.2.3.3 Real-Time PCR zum Nachweis von *C. perfringens* nach Messelhäußer et al. (2007a)

Zunächst wurde ein Triplex-PCR-System zum Nachweis der *C. perfringens*-Toxingene *cpe* und *cpe* angewandt. Dies dient zum einen der Identifizierung auf Speziesebene über das speziespezifische α -Toxin (*cpe*-Gen), zum anderen dem Nachweis des Lebensmittelinfektions-auslösenden Enterotoxin-Gens (*cpe*-Gen). Anschließend wurden zwei Duplex-PCR-Systeme zum Nachweis der *C. perfringens*-Toxingene *cpb1*, *cpb2*, *etx* und *iap* durchgeführt, um eine Typisierung des Erregers in die Toxintypen A bis E zu ermöglichen (Tab. 3).

Bei einem positiven Ergebnis der *cpe*-Testung wurden anschließend zur weiteren Differenzierung des Gens ein Duplex-PCR-System zum Nachweis der Genotypen *chromosomal* und *IS1470-like-cpe* sowie eine einfache Real-Time PCR zum Nachweis von *IS1151-cpe* eingesetzt.

In Tab. 11 sind die Sequenzen der Primer und Sonden für den Nachweis der *C. perfringens*-Toxingene *cpe*, *cpb1*, *cpb2*, *etx* und *iap* aufgeführt. Die Sequenzen der Primer und Sonden für die Differenzierung des *cpe*-Gens in die Genotypen *chromosomal*, *IS1470-like-cpe* und *IS1151-cpe* werden in Tab. 12 gezeigt.

Tabelle 11: Primer- und Sondensequenzen für den Nachweis der *C. perfringens*-Toxingene

Bezeichnung	Sequenz (5` - 3`)	Gensequenz (Acc. Nr.)
CPRF cpa fw	GCT AAT GTT ACT GCC GTT GA (20 bp)	DQ184176
CPRF cpa re	CCT CAT TAG TTT TGC AAC C (19 bp)	
CPRF cpa S	GCG CAG GAC ATG TTA AGT TTG (21 bp)	
(FAM)		
CPRF cpe fw	GAA ATC CTT GAT TTA GCT GCT G (22 bp)	X81849
CPRF cpe re	TGA GTT AGA AGA ACG CCA ATC A (22 bp)	
CPRF cpe S	GAT GCA TTA AAC TCA AAT CCA GC (23 bp)	
(HEX)		
CPRF ext fw	AGC TTT TCC TAG GGA TGG TTA (21 bp)	M95206
CPRF etx re	AAC TGC ACT ATA ATT TCC TTT TCC (24 bp)	
CPRF etx S	AAG AGT GAT TTA AAT GAA GAT GG (23 bp)	
(FAM)		
CPRF iap fw	CGT GGA GGA TAT ACC GCA AT (20 bp)	X73562
CPRF iap re	GGT GTG AGC TTT AAT GCG TTT (21 bp)	
CPRF iap S	TGG TCC TTT AAA TAA TCC TAA TCC A (25 bp)	
(HEX)		
CPRF cpb1 fw	TCA ATT GAA AGC GAA TAT GCT G (22 bp)	X83275
CPRF cpb1 re	CTG TAA ATT TTG TAT CCC ATG AAG C (25 bp)	
CPRF cpb1 S	GAA TAT GTC CAA CCT GAT TTT TCT (24 bp)	
(HEX)		
CPRF cpb2 fw	TTT AAA TAT GAT CCT AAC C (19 bp)	AY730632
CPRF cpb2 re	GCA CCA TTC ATA AAT TCA GT (20 bp)	
CPRF cpb2 S	TGA AAT ACT TAA TTC ACA AAA GA (23 bp)	
(FAM)		

fw = forward primer; re = reverse primer; S = Sonde; Kanäle: ATTO = N-Hydroxysuccinimidyl-(NHS)-Ester; Cy5 = Cyanin-5; FAM = 6-Carboxyfluorescein; HEX = Hexachloro-6-carboxyfluorescein

Tabelle 12: Primer- und Sondensequenzen für den Nachweis der *cpe*-Genotypen

Bezeichnung	Sequenz (5` - 3`)	Gensequenz (Acc. Nr.)
CPRF cpe_	TGA AAA CCG TGA AGA ATT TGG (21 bp)	
chrom fw		
CPRF cpe_	CCT AGT TTT ACG CTC GAC AAG TG (23 bp)	
chrom re		GQ225715
CPRF cpe_	TGG GAA ATA GAC TGT GTA TTA GGT GA (26 bp)	
chrom S		
(FAM)		
CPRF cpe_	CAA AGG AGC TAG ATC GAT CAA TAA (24 bp)	
IS1470-like fw		
CPRF cpe_	TCG CCA ATG TCA GCA AGA TA (20 bp)	
IS1470-like re		AB236336
CPRF cpe_	CAA ATT AGC CAA GGA AAG CA (20 bp)	
IS1470-like S		
(HEX)		
CPRF cpe_	GAA ACT AGT TGT GAT AAT GGA GCT G (25 bp)	
IS1151 fw		
CPRF cpe_	CAA AAT TCA TTC AAA GAC AAG GAA (24 bp)	
IS1151 re		AF511071.2
CPRF cpe_	ATC GGA GCC ATA GAA CAC GT (20 bp)	
IS1151 S		
(FAM)		

fw = forward primer; re = reverse primer; S = Sonde; Kanäle: FAM = 6-Carboxyfluorescein; HEX = Hexachloro-6-carboxyfluorescein

In Tab. 13 bis 15 sind die Komponenten für die Real-Time PCR-Ansätze aufgeführt. Zunächst erfolgte der Nachweis des *cpa*- und *cpe*-Gens in Kombination mit der Internen Amplifikationskontrolle (IAC) mittels des Triplex-PCR-Systems. Anschließend wurden die Toxingene *etx* und *iap* sowie die Toxingene *cpb1* und *cpb2* jeweils mittels eines Duplex-PCR-Systems nachgewiesen.

Die bei positivem Ergebnis erfolgte *cpe*-Gen-Differenzierung wurde mittels eines Duplex-PCR-Systems und einer einfachen Real-Time PCR durchgeführt.

Tabelle 13: Komponenten für einen Triplex-PCR-Ansatz inkl. IAC

Reagenz	Konzentration (im Ansatz)	Menge pro Ansatz [µl]
Brilliant Multiplex QMastermix		12,5
Primer, jeweils	300 nM	0,75
Sonden, jeweils	200 nM	0,5
Aqua dest.		0,5
IAC (pUC 19 Plasmid, Konzentration 1 fg)		1,0
DNA-Template		5,0
gesamt		25,0

Tabelle 14: Komponenten für eine Duplex-PCR ohne IAC

Reagenz	Konzentration (im Ansatz)	Menge pro Ansatz [µl]
Brilliant Multiplex QMastermix		12,5
Primer, jeweils	500 nM	1,25
Sonden, jeweils	200 nM	0,5
Aqua dest.		1,5
DNA-Template		5,0
gesamt		25,0

Tabelle 15: Komponenten für eine Single-PCR ohne IAC

Reagenz	Konzentration (im Ansatz)	Menge pro Ansatz [μl]
Brilliant Multiplex QMastermix		12,5
Primer, jeweils	500 nM	1,25
Sonden, jeweils	200 nM	0,5
Aqua dest.		4,5
DNA-Template		5,0
gesamt		25,0

3.2.3.4 Real-Time PCR zum Nachweis von *C. botulinum* (Messelhäußer et. al., 2007b und in-house validiertes Nachweisverfahren des LGL)

Es wurden ein Pentaplex-PCR-System zum Nachweis der BoNT-Gene *boNT A*, *boNT B*, *boNT E*, und *boNT F* und ein Duplex-PCR-System zum Nachweis der BoNT-Gene *boNT C* und *boNT D* angewandt.

In Tab. 16 und 17 sind die Sequenzen der Primer und Sonden für den Nachweis der *C. botulinum*-Toxingene aufgeführt.

Tabelle 16: Primer- und Sondensequenzen für den Nachweis von *boNT A*, *B*, *E* und *F*

Bezeichnung	Sequenz (5` - 3`)	Gensequenz (Acc. Nr.)
CBOT A fw	TCT TAC GCG AAA TGG TTA TGG (21 bp)	
CBOT A re	TGC CTG CAC CTA AAA GAG GA (20 bp)	X52066
CBOT A S (HEX)	TGG TTT TGA GGA GTC ACT TGA A (22 bp)	
CBOT B fw	GGA GAA GTG GAG CGX AAA A (19 bp)	
CBOT B re	TTC CCT TGA TGC AAA ATG AT (20 bp)	X71343
CBOT B S (FAM)	CCT GGG CCA GTT TTA AAT GA (20 bp)	
CBOT E fw	TCA GCA CCT GGA CTT TCA GA (20 bp)	
CBOT E re	CAT GTT GTT CTA TAT CAC TTG TTC CA (26 bp)	X62089
CBOT E S (CY5)	TCC AAA ATG ATG CTT ATA TAC CAA AA (26 bp)	
CBOT F fw	ATA CGG GGC TAG GGG AGT TA (20 bp)	
CBOT F re	AAA TCC TGA CCT CCA AAG GTT (21 bp)	X81714
CBOT F S (ATTO)	CCG AAA AAC CCA TAA GGC TA (20 bp)	

fw = forward primer; re = reverse primer; S = Sonde; Kanäle: ATTO = N-Hydroxysuccinimidyl-(NHS)-Ester; Cy5 = Cyanin-5; FAM = 6-Carboxyfluorescein; HEX = Hexachloro-6-carboxyfluorescein; X = gemischte Basen (A, G)

Tabelle 17: Primer- und Sondensequenzen für den Nachweis von *boNT C* und *D*

Bezeichnung	Sequenz (5` - 3`)	Gensequenz (Acc. Nr.)
CBOT C fw	GGC ACA AGA AGG ATT TGG TG (20 bp)	
CBOT C re	TTG GAT CCA TGC AAA ATT CA (20 bp)	D49440
CBOT C S (FAM)	TGC AAC TAA TAA TGT AGG AGA GGG (24 bp)	
CBOT D fw	TGG TTC ACC TTT TAT GGG AGA (21 bp)	
CBOT D re	CCA ACT ACC ATT TTC AAA CTT TTC (24 bp)	D38442
CBOT D S (HEX)	CGC CTG AAG ATA CAT TTG ATT TT (23 bp)	

fw = forward primer; re = reverse primer; S = Sonde; Kanäle: FAM = 6-Carboxyfluorescein; HEX = Hexachloro-6-carboxyfluorescein

In Tab. 18 sind die Komponenten für den Pentaplex-PCR-Ansatz aufgeführt, mit dessen Hilfe die Gene *boNT A*, *B*, *E* und *F* in Kombination mit der Internen Amplifikationskontrolle (IAC) nachgewiesen wurden. Anschließend wurde ein Duplex-PCR-Systems (siehe *C. perfringens*) für den Nachweis der Gene *boNT C* und *D* angewendet.

Tabelle 18: Komponenten für eine Pentaplex-PCR inkl. IAC

Reagenz	Konzentration (im Ansatz)	Menge pro Ansatz [μl]
Brilliant Multiplex QMastermix		12,5
Primer, jeweils		0,7
Sonden, jeweils		0,25
IAC (pUC 19 Plasmid, Konzentration 1 fg)		1,0
DNA-Template		5,0
gesamt		25,0

3.2.3.5 Real-Time PCR zum Nachweis von *C. difficile*, *C. chauvoei*, *C. septicum* und *C. haemolyticum* (In-house validiertes Nachweisverfahren des LGL)

Es wurde ein Pentaplex-PCR-System zum Nachweis der *Clostridium* spp. angewandt.

In Tab. 19 sind die Sequenzen der Primer und Sonden für den Nachweis der diversen speziespezifischen Clostridien-Gene (*tpi* = Topoisomerase, *fli* = Flagellingen) aufgeführt.

Tabelle 19: Primer- und Sondensequenzen für den Nachweis von *C. difficile*, *C. chauvoei*, *C. septicum* und *C. haemolyticum*

Bezeichnung	Sequenz (5` - 3`)	Gensequenz (Acc. Nr.)
Cdif_tpi_fw	GAA GCT ACT AAG GGT ACA AAT ATA AAG (27 bp)	
Cdif_tpi_re	TGA ATG TCC TAT TAC AAC ATA GTC CA (26 bp)	AY700149
Cdif_tpi_S (CY5)	GGA GCA TTT ACA GGA GAA GTT TCA (24 bp)	
Cchau_fli_fw	CGT TAA ACG CAC ACA GAA ATA TG (23 bp)	
Cchau_fli_re	TGC TAG TCC TGC AGC ATC AT (20 bp)	D89073
Cchau_fli_S (FAM)	TGG GAA ACA TTG CTA CAG CA (20 bp)	
Csepticum_fw	GTA AAA CTG AGT CTA AAT TAT CAA AAA C (28 bp)	
Csepticum_re	TAC TTT AAA TGA TGT TTT TAC TCC TA (26 bp)	FJ212777
Csepticum_S (ATTO)	ACA GAT AAC TTT AAA TTT GGA GAA AAA (27 bp)	
Chaem_fli_fw	TGA CGG AGC CTA TGG AGT TT (20 bp)	
Chaem_fli_re	TTT CCA CTT TCT CCA TCA CCT T (22 bp)	AB058939
Chaem_fli_S (HEX)	GCA TCT GTC ACT CCT AAA ACT GG (23 bp)	

fw = forward primer; re = reverse primer; S = Sonde; Kanäle: ATTO = N-Hydroxysuccinimidyl-(NHS)-Ester; Cy5 = Cyanin-5; FAM = 6-Carboxyfluorescein; HEX = Hexachloro-6-carboxyfluorescein

In Tab. 20 sind die Komponenten für den Pentaplex-PCR-Ansatz aufgeführt, mit dessen Hilfe die Gene von *C. difficile*, *C. chauvoei*, *C. septicum* und *C. haemolyticum* in Kombination mit der Internen Amplifikationskontrolle (IAC) nachgewiesen wurden.

Tabelle 20: Komponenten für den Pentaplex-PCR-Ansatz zum Nachweis der *Clostridium* spp. inkl. IAC

Reagenz	Konzentration (im Ansatz)	Menge pro Ansatz [µl]
Brilliant Multiplex QMastermix		12,5
Primer, jeweils		0,7
Sonden, jeweils		0,25
IAC (pUC 19 Plasmid, Konzentration 1 fg)		1,0
DNA-Template		5,0
gesamt		25,0

3.2.3.6 Real-Time PCR zum Nachweis von *C. novyi* (In-house validiertes Nachweisverfahren des LGL)

Es wurde ein Triplex-PCR-System zum Nachweis der speziespezifischen Phospholipase C und des *C. novyi* α-Toxingens angewandt.

In Tab. 21 sind die Sequenzen der Primer und Sonden für den Nachweis der *C. novyi*-Gene aufgeführt.

Tabelle 21: Primer- und Sondensequenzen für den Nachweis der *C. novyi*-Gene

Bezeichnung	Sequenz (5` - 3`)	Gensequenz (Acc. Nr.)
CLN phC fw	GAT TCC TGG TCA AAA GAG TAT T (22 bp)	
CLN phC re	AAA GCG TGA CTT GCT GAA TAA (21 bp)	D32125
CLN phC S (FAM)	GGT TGG GCA AAA CAA GCT AA (20 bp)	
CLN alpha fw	ATG GAC AAA GAT GGG GTC AA (20 bp)	
CLN alpha re	CCA CCT AAT ACT CGC CAA CC (20 bp)	Z48636
CLN alpha S (HEX)	TGG ATG GCT ACA CTT AAA TGG A (22 bp)	

fw = forward primer; re = reverse primer; S = Sonde; Kanäle: FAM = 6-Carboxyfluorescein; HEX = Hexachloro-6-carboxyfluorescein

Der Triplex-PCR-Ansatz wurde nach dem in Tab. 13 unter bei *C. perfringens* gezeigtem Protokoll durchgeführt.

3.2.4 Identifizierung mittels MALDI-TOF MS

Bei der Identifizierung der *Clostridium* spp. mittels MALDI-TOF MS wurde nach Anweisung des Herstellers (Bruker Daltonics, USA) vorgegangen.

3.2.4.1 Vorbereitung

Die zur Analyse mittels MALDI-TOF MS bestimmten Clostridien-Stämme wurden frisch auf Blutagar angezüchtet. Die Kulturen von *C. difficile* wurden zudem vom entsprechenden Selektivnährboden (CDC, BD Diagnostics, Heidelberg) gewonnen. Zum Teil wurden langsam wachsende Kulturen nach Stabilisierung mittels 75 % Ethanol (siehe 2.4.2.1 Ethanol-Ameisensäureextraktion) bei -20 °C eingefroren und konnten so für eine Analyse am MALDI-TOF Massenspektrometer gesammelt werden.

Als Lösungsmittel wurde eine Mischung aus 50 % (vol/vol) Acetonitril und 2,5 % Trifluoressigsäure (vol/vol) hergestellt (Tab. 22).

Tabelle 22: Zusammensetzung des organischen Lösungsmittel-Gemisches (OS)

Komponente	Volumen (µl)
Acetonitril	500
Aqua dest.	475
Trifluoressigsäure	25
gesamt	500

250 µl des organischen Lösungsmittelgemisches (siehe 2.4.1.2) wurden zu einer Einheit der portionierten α-Cyano-4-hydroxyzimtsäure (HCCA)-Matrix à 2,5 mg gegeben und durch Vortexen gelöst.

50 µl des organischen Lösungsmittelgemisches wurden zum vorgelegten Pellet des bakteriellen Test-Standards BTS pipettiert und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gelöst. Anschließend wurde die Lösung ca. 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie erneut gemischt und in Aliquots à 5 µl bei -20 °C gelagert wurde. Für eine Messung wurde schließlich 1 µl des BTS an zentraler Position (meist Targetposition D6 oder D7) auf das verwendete Target aufgetragen.

3.2.4.2 Probenaufbereitung

Unabhängig von der Art der Probenaufbereitung wurde bei jeder Messung eines Targets ein BTS mitgeführt.

Als Standard-Extraktionsverfahren wurde die Ethanol-Ameisensäureextraktion angewandt. Dabei wurden für jeden Clostridien-Stamm 300 µl Aqua dest. in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube vorgelegt. Mit einer Impföse wurde anschließend eine Kolonie, bei sehr kleinen Kolonien auch mehrere (bis volle Impföse), von der frischen Kulturplatte abgenommen und sorgfältig durch Hineinreiben, Vortexen oder Auf- und Abpipettieren in 300 µl Aqua dest. suspendiert. Zu 300 µl Zellsuspension wurden 900 µl Ethanol_{abs} gegeben und ebenfalls sorgfältig durch Vortexen oder Auf- und Abpipettieren gemischt.

Die so hergestellte Bakteriensuspension wurde nun bei -20 °C eingefroren und bis zu zwei Wochen gelagert bzw. sofort weiter extrahiert.

Zur Extraktion der Proteine wurde die Suspension bei maximaler Drehzahl (13400 x g) für 2 min. zentrifugiert und danach der Überstand abgegossen. Nach einem weiteren zweiminütigen Zentrifugationsschritt wurde das restliche Ethanol abpipettiert und das Pellet mittels einer Vakuumzentrifuge (1400 rpm) 10 min. bei 30 °C vollständig getrocknet. Dem Pellet wurden je nach Größe 1-50 µl, durchschnittlich 30 µl 70 %ige Ameisensäure zugesetzt und sorgfältig gemischt. Dann erfolgte die Zugabe der gleichen Menge Acetonitril und ein erneutes sorgfältiges Mischen. Die Bakteriensuspension wurde anschließend bei maximaler Drehzahl 2 min. zentrifugiert.

Zur Analyse wurde ca. 1 µl vom klaren Überstand der Bakteriensuspension in Doppelbestimmung auf das Target pipettiert und bei Raumtemperatur getrocknet. Direkt im Anschluss wurde der getrocknete Extrakt mit 1 µl Matrix-Lösung überschichtet und wiederum bei Raumtemperatur getrocknet. Nach dem vollständigen Trocknen und Kristallisieren der Matrix-Lösung wurde das Target in den MALDI-TOF Microflex LT (Bruker Daltonics, USA) eingeschleust.

Falls nach einer ersten Messung unter Verwendung der Ethanol-Ameisensäure-Extraktion zunächst keine Speziesidentifikation möglich war, wurde ein erneuter Versuch mit der on-target Extraktion durchgeführt. Dazu wurde eine frische Bakterienkolonie mittels einer Pipettenspitze aufgenommen und auf ein Well des Stahltargets gestrichen. Nach kurzem Antrocknen wurde das Material direkt mit 1 µl 70 % (vol/vol) Ameisensäure überschichtet und diese wiederum nach dem Eintrocknen mit 1 µl der HCCA-Matrixlösung überschichtet. Nach dem vollständigen Trocknen und Kristallisieren der Matrix-Lösung wurde das Target in den MALDI-TOF Microflex LT eingeschleust.

3.2.4.3 Messung am MALDI-TOF MS

Die Proben wurden analog ihrer Targetposition in eine Excel-Tabelle eingetragen und in das Programm Biotyper 2,0 (Bruker Daltonics, USA) übertragen. Nach Einschleusen des Targets in den MALDI-TOF Microflex LT erfolgte zunächst die Kalibrierung des BTS. Anschließend wurde die Messung der Probenspektren durch das Programm Biotyper Automation (Bruker Daltonics, USA) ausgeführt.

3.2.4.4 Auswertung der Untersuchung mittels MALDI-TOF MS

Als Referenzdatenbanken wurden die MALDI Biotyper Datenbank (3740 Einträge, Bruker Daltonics, USA), die MALDI S3 Datenbank (SR-Taxonomie, Bruker Daltonics, USA) und die LGL-interne Referenzdatenbank herangezogen. Der Abgleich der Probenspektren mit den Referenzspektren erfolgte automatisch über das Programm BioTyper Automation. Dabei wurden die aufgenommenen Spektren nach dem in Tab. 23 gezeigten Schema des Herstellers bewertet und aufgelistet.

Tabelle 23: Bewertung der Ergebnisse der MALDI-TOF MS

Logarithmischer score value	Bewertung	Angabe
> 2,0	sichere Speziesidentifikation	Spezies identifiziert
1,7 bis 2,0	sichere Genusidentifikation	Genus identifiziert
< 1,7	kein signifikantes Ergebnis, keine Identifizierung möglich	keine zuverlässige Identifikation / not reliable identification (NRI)

Als erfolgreiche Identifizierung auf Speziesebene wurde eine Messung mit einem score value von über 2,0 gewertet. Es sollte sich hierbei ein Unterschied von mindestens 0,1 im score value zwischen verschiedenen in der Ergebnistabelle aufgelisteten Spezies abzeichnen, da die Artidentifizierung ansonsten als unsicher eingestuft wurde und nur die Angabe der Gattung erfolgte.

Bei Ergebnissen mit einem score value von weniger als 1,7 wurde die Methode zum Einen unter Verwendung einer größeren Menge an Bakterienmaterial wiederholt, zum Anderen als Vergleichsmethode eine on-target Extraktion durchgeführt. Erst nach erneuter Messung mit einem score value von unter 1,7 wurde die Probe als nicht-identifizierbar gewertet bzw. mit der Bezeichnung „keine zuverlässige Identifikation / NRI“ eingestuft.

4 ERGEBNISSE

4.1 Biochemische Identifizierung

Die biochemische Differenzierung der verschiedenen *Clostridium* spp. erfolgte mittels des Testsystems Api[®] 20 A (BioMérieux, Frankreich). Nach Ablauf der Bebrütungsdauer wurden die unterschiedlich erfolgten biochemischen Reaktionen ausgewertet und ein biochemisches Profil erstellt.

Die eindeutige Interpretation der Fermentationsreaktionen des Api[®] 20 A gestaltete sich dabei gelegentlich schwierig, da die Indikatoren nach Reduktion durch den Keim häufig Mischfarben wie grünbraun aufwiesen. Durch die Zugabe des BCP-Reagenz konnte jedoch die eindeutige Bewertung der Reaktionen vereinfacht werden.

4.1.1 Ergebnisse der Untersuchung von *C. perfringens*

Das Ablesen der Testreaktionen von *C. perfringens* war bereits nach 24 h anaerober Bebrütung bei 37 °C möglich. 62 (93 %) der 66 untersuchten Stämme konnten dabei mittels des Api[®] 20 A erfolgreich identifiziert werden (Abb.1). Von diesen erhielten 43 Stämme sogar die Bewertung „ausgezeichnete Identifizierung“ mit 99,9 % Übereinstimmung zu der Spezies *C. perfringens*. Zwei Stämme (3 %) konnten auf Gattungsebene als *Clostridium* spp. erkannt werden. Bei zwei weiteren Stämmen war aufgrund von starken Abweichungen zum *C. perfringens*-Referenzprofil keine eindeutige Identifizierung mittels des Api[®] 20 A möglich. Einer dieser Stämme wurde mit einem „unzulässiges Profil“ bewertet, da die Reaktionen MAN, XYL, ARA, SOR und RHA im Gegensatz zum Referenzprofil positiv ausfielen. Bei dem anderen Stamm konnte aufgrund von Abweichungen bei den Reaktionen MAL, MNE, RAF und TRE lediglich ein zweifelhaftes biochemisches Profil erstellt werden.

4.1.2 Ergebnisse der Untersuchung von *C. botulinum*

Die Auswertung der Api[®] 20 A-Teststreifen erfolgte bei *C. botulinum* stets nach 48 h anaerober Bebrütung bei 37 °C. 14 (41 %) der 34 untersuchten Stämme konnten mittels des Api[®] 20 A vorläufig als *C. botulinum* bzw. als das nahe verwandte *C. sporogenes* identifiziert werden (Abb. 2).

Zur weiteren Differenzierung der beiden Spezies werden laut der Ergebnistabelle des Herstellers (BioMérieux, Frankreich) weitere Untersuchungen wie Stärkehydrolyse und Milchreaktion empfohlen. 13 Stämme (38 %) konnten aufgrund des biochemischen Profils als *Clostridium spp.* erkannt werden. Zwei Stämme wurden aufgrund einer einzelnen Abweichung vom *C. botulinum*-Referenzprofil (SAL+) lediglich mit „zweifelhaftes Profil“ bewertet. Bei vier weiteren Stämmen (12 %) konnte aufgrund verschiedener abweichender Reaktionen und der anschließenden Bewertung mit „unzulässiges Profil“ ebenfalls keine eindeutige Identifizierung erfolgen. Ein einzelner Stamm wurde als *C. baratii* identifiziert, da hier folgende Reaktionen vom *C. botulinum*-Referenzprofil abwichen: SAC+, SAL+, GEL-, ESC+, GLY+, CEL+, MNE+, SOR+.

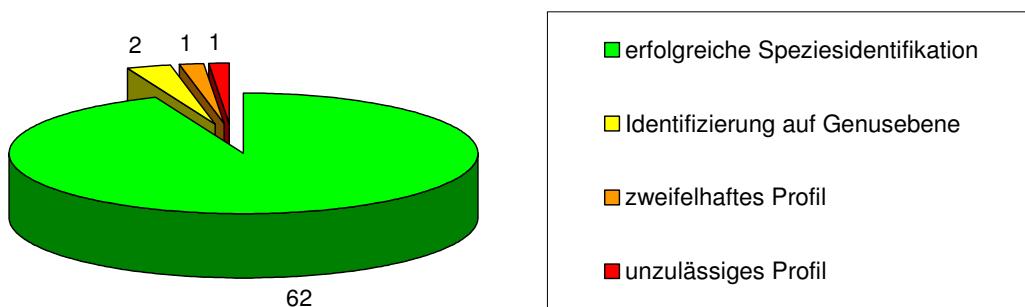


Abbildung 1: Ergebnisse der biochemischen Untersuchung von *C. perfringens*

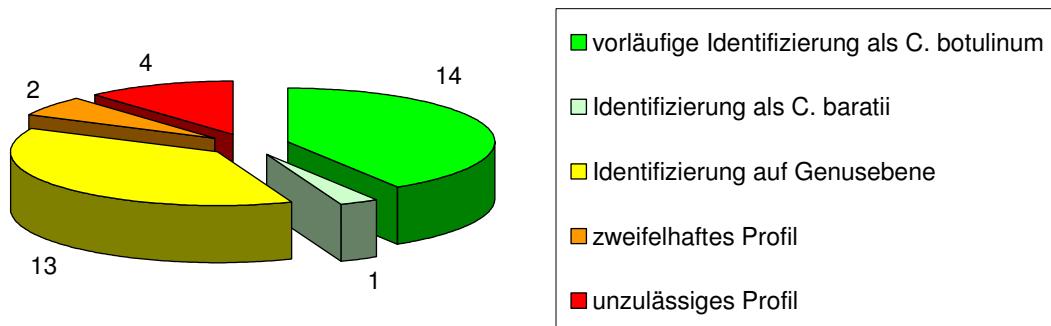


Abbildung 2: Ergebnisse der biochemischen Untersuchung von *C. botulinum*

4.1.3 Ergebnisse der Untersuchung von *C. difficile* und *C. septicum*

Auch die Teststreifen von *C. difficile* und *C. septicum* wurden aufgrund des langsameren Wachstums erst nach 48 h anaerober Bebrütung bei 37 °C ausgewertet. Es konnten zwei (33 %) der sechs getesteten *C. difficile*-Stämme erfolgreich identifiziert werden, vier Stämme wurden auf Genusebene als *Clostridium* spp. erkannt (Abb. 3). Bei *C. septicum* konnten drei (43 %) der sieben untersuchten Stämme richtig identifiziert werden, wobei zwei von diesen die Bewertung „ausgezeichnete Identifizierung“ mit 99,9 % Übereinstimmung zu der Spezies *C. septicum* erhielten (Abb. 4). Ein Stamm von *C. septicum* wurde als *C. beijerincki/ butyricum* identifiziert, da die Reaktionen SAC und ARA vom *C. septicum*-Referenzprofil abwichen. Zwei weitere Stämme wurden auf Genusebene als *Clostridium* spp. erkannt. Ein Stamm konnte aufgrund von Abweichungen der Reaktionen SAL, CEL und MNE lediglich mit „zweifelhaftes Profil“ bewertet werden.

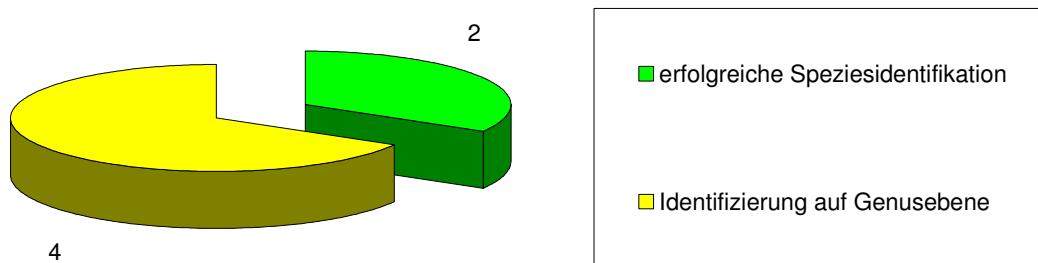


Abbildung 3: Ergebnisse der biochemischen Untersuchung von *C. difficile*

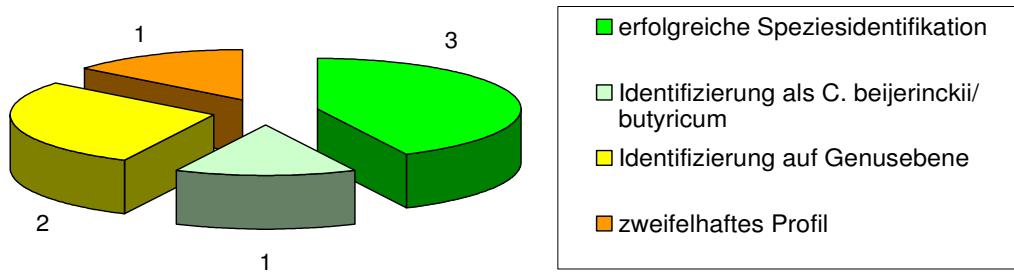


Abbildung 4: Ergebnisse der biochemischen Untersuchung von *C. septicum*

4.1.4 Ergebnisse der Untersuchung von *C. chauvoei*, *C. novyi* und *C. haemolyticum*

Für die Clostridien *C. chauvoei* (drei Stämme), *C. novyi* (ein Stamm) und *C. haemolyticum* (ein Stamm) sind in der Api® 20 A-Vergleichsdatenbank keine Bewertungen hinterlegt.

C. novyi und *C. haemolyticum* sowie ein Stamm von *C. chauvoei* konnten jedoch erfolgreich auf Genusebene als *Clostridium* spp. erkannt werden. Die Auswertung der Testsysteme erfolgte hierbei stets nach 48 h anaerober Bebrütung bei 37 °C. Ein weiterer Stamm von *C. chauvoei* wurde vorläufig als *C. botulinum/sporogenes* identifiziert, wobei nur ein Reaktionsergebnis (MAL+) einer erfolgreichen Identifizierung auf Genusebene als *Clostridium* spp. entgegenstand. Der letzte Stamm von *C. chauvoei* zeigte ein sehr reaktionsreiches Profil, welches sich lediglich in der positiven Reaktion von SAL und CEL von dem eigentlichen biochemischen Profil von *C. chauvoei* unterschied (Hatheway, 1990; Rainey et al., 2009). Der Stamm konnte bei einem Vergleich mit der Herstellerdatenbank jedoch nur mit „zweifelhaftes Profil“ bewertet werden.

4.2 Molekularbiologischer Nachweis mittels Real-Time PCR

Je nach *Clostridium* spp. wurden entweder die unterschiedlichen Toxingene der betreffenden Spezies oder lediglich die arttypischen Gene untersucht.

4.2.1 Ergebnisse der Untersuchung von *C. perfringens*

Alle (100 %) der 66 untersuchten *C. perfringens*-Stämme wurden *cpa*-Gen-positiv getestet und konnten somit erfolgreich auf Speziesebene identifiziert werden.

25 Stämme (38 %) besaßen zudem das *cpe*-Gen. Es wurden weiterhin alle Stämme von *C. perfringens* auf das Vorhandensein der Gene *cpb1*, *cpb2*, *etx* und *iap* untersucht und lediglich die 25 *cpe*-positiven Stämme weiterdifferenziert. Die Untersuchung der Genotypen *cpb1*, *cpb2*, *etx* und *iap* sowie die weitere Differenzierung des *cpe*-Gens ergaben folgende Verteilung:

Tabelle 24: Ergebnisse des Nachweises der *C. perfringens*-Toxingene

Genotyp	Anzahl positiver Stämme
<i>cpb1</i>	0
<i>cpb2</i>	19
<i>etx</i>	14
<i>iap</i>	1
<i>cpe</i> -Genotyp	Anzahl positiver Stämme
<i>chrom</i>	23
<i>IS1470-like-cpe</i>	3
<i>IS1151-cpe</i>	0

Anschließend konnten die getesteten *C. perfringens*-Stämme anhand der ermittelten spezifischen Toxingenkombinationen (Tab. 3) den fünf unterschiedlichen *C. perfringens*-Toxintypen zugeordnet werden (Abb. 5).

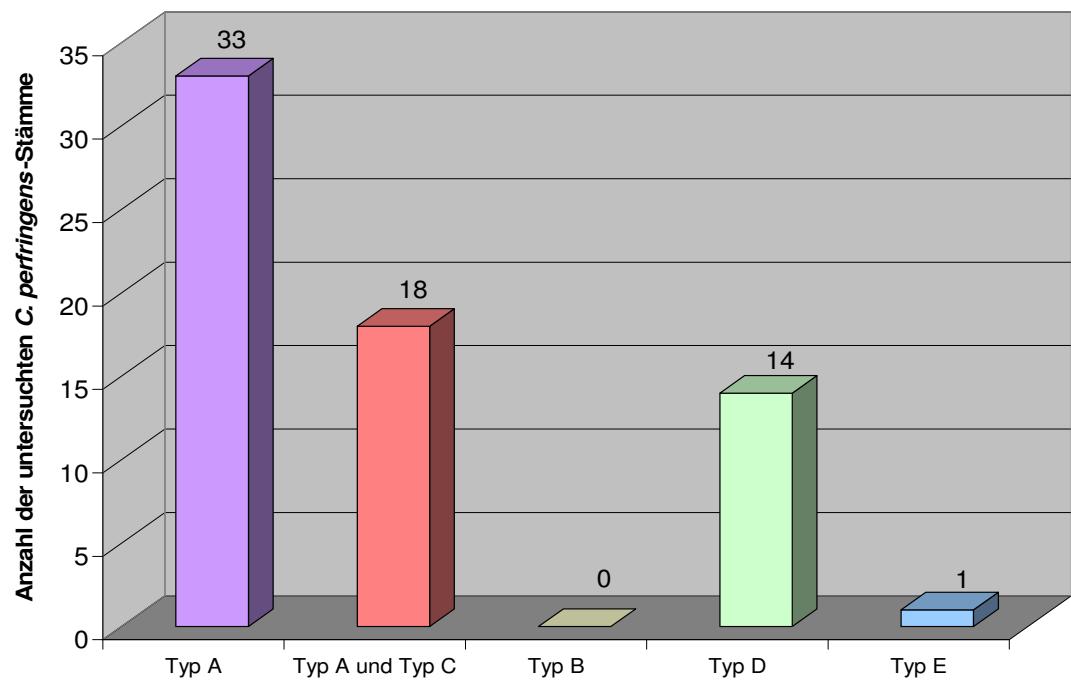


Abbildung 5: Verteilung der Toxintypen innerhalb der untersuchten *C. perfringens*-Stämme

4.2.2 Ergebnisse der Untersuchung von *C. botulinum*

Es wurden 34 *C. botulinum*-Stämme auf das Vorhandensein der BoNT-Gene *boNT A*, *boNT B*, *boNT E* und *boNT F* sowie *boNT C* und *boNT D* untersucht (Abb. 6). Dabei konnten sechs *C. botulinum*-Stämme (18 %) keinem der getesteten Typen zugeordnet werden.

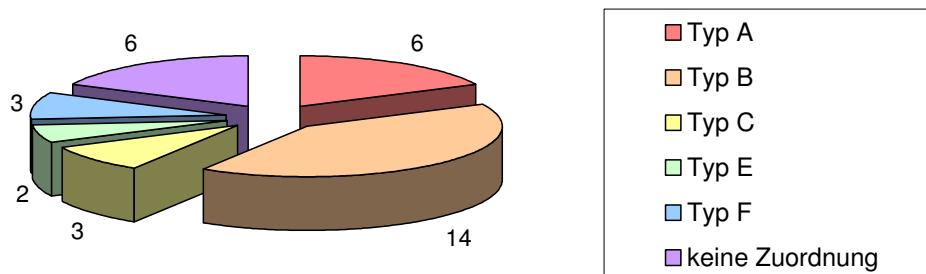


Abbildung 6: Verteilung der BoNT-Gene innerhalb der untersuchten *C. botulinum*-Stämme

4.2.3 Ergebnisse der Untersuchung der übrigen *Clostridium* spp.

Bei den übrigen *Clostridium* spp. erfolgte eine Speziesdiagnose anhand der Untersuchung auf arttypische Gene, wie das Topoisomerase-, Flagelin- und Phospholipase C-Gen. Außerdem erfolgte eine Untersuchung auf das α -Toxingen von *C. novyi*. Die korrekte Identifizierung mittels Real-Time PCR gelang bei jedem Stamm von *C. difficile*, *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi* und *C. haemolyticum*. Bei *C. novyi* konnte zusätzlich das untersuchte α -Toxingen nachgewiesen werden.

4.3 Identifizierung mittels MALDI-TOF MS

Der Abgleich der Probenspektren mit den Referenzspektren der verwendeten Datenbanken erfolgte automatisch über das Programm BioTyper Automation (Bruker Daltonics, USA).

4.3.1 Ergebnisse der Untersuchung von *C. botulinum*

Von den 34 untersuchten Stämmen konnten 24 (71 %) mit einem score value von > 2,0 erfolgreich auf Speziesebene als *C. botulinum* identifiziert werden (Abb. 7). Ein einzelner Stamm wurde auf Genusebene als *C. botulinum* identifiziert. Neun Stämme (26 %) von *C. botulinum* konnten im Rahmen eines score value von unter 1,7 (NRI) nicht zuverlässig identifiziert werden.

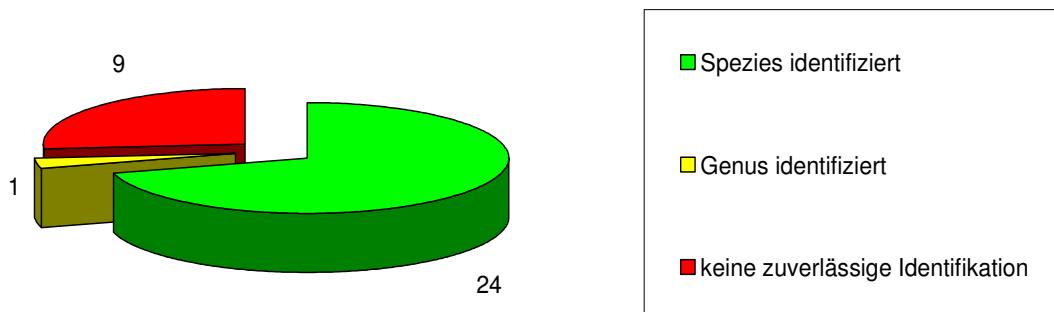


Abbildung 7: Verteilung der untersuchten *C. botulinum*-Stämme

Bei bestimmten Stämmen von *C. botulinum* wurde in der Auflistung der übereinstimmenden Spezies auch *C. sporogenes* genannt, allerdings mit einem um 0,1 niedrigerem score value als bei der Identifizierung als *C. botulinum*. Bei drei Stämmen handelte es sich um proteolytische *C. botulinum* der Gruppe I. Der Status der übrigen Stämme war nicht bekannt.

4.3.2 Ergebnisse der Untersuchung der übrigen *Clostridium* spp.

Die MALDI-TOF MS Messung erbrachte bei den übrigen *Clostridium* spp. ausschließlich score values von über 2,0. Alle Stämme der Spezies *C. perfringens*, *C. difficile*, *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi* und *C. haemolyticum* konnten daher erfolgreich auf Speziesebene identifiziert werden.

4.4 Gegenüberstellung der Identifizierungsergebnisse der Biochemie, der Real-Time PCR und der MALDI-TOF MS

4.4.1 Gegenüberstellung der Ergebnisse von *C. perfringens*

In einer vergleichenden Darstellung (Abb. 8) werden die Identifizierungsergebnisse von *C. perfringens* innerhalb der drei angewandten Nachweismethoden gezeigt. Es erfolgte hierbei eine Einteilung der untersuchten Stämme in die Bewertungen „erfolgreiche Speziesidentifikation“ und „keine eindeutige Speziesidentifikation möglich“.

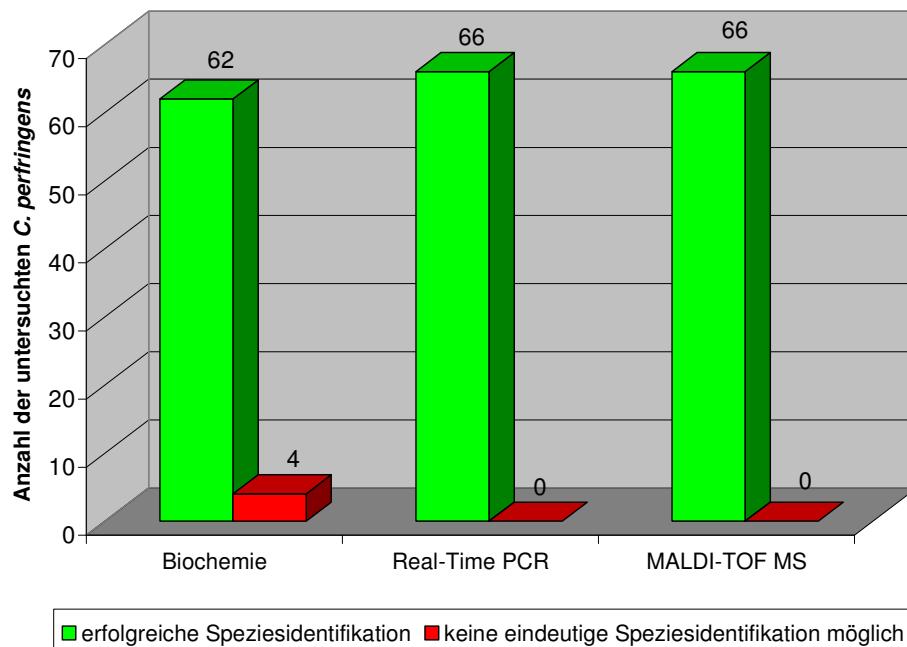


Abbildung 8: Ergebnisse von *C. perfringens* im Methodenvergleich

Somit konnten 93 % der 66 untersuchten *C. perfringens*-Stämme mittels des Api[®] 20 A erfolgreich auf Speziesebene identifiziert werden sowie jeweils zu 100 % mittels der Real-Time PCR und der MALDI-TOF MS.

4.4.2 Gegenüberstellung der Ergebnisse von *C. botulinum*

In Abb. 9 werden die Identifizierungsergebnisse von *C. botulinum* innerhalb der drei angewandten Methoden gezeigt. Es erfolgte hierbei die Einteilung der untersuchten Stämme in die Bewertungen „erfolgreiche Speziesidentifikation“, „keine eindeutige Speziesidentifikation möglich“ und „nicht gewertet“.

Bei *C. botulinum* wurde die „vorläufige Identifizierung als Clostridium botulinum/sporogenes“ durch den Api® 20 A (BioMérieux, Frankreich) als bestmögliche Bewertung innerhalb des biochemischen Nachweises eingestuft und daher zur Gruppe „erfolgreiche Speziesidentifikation“ gezählt.

Da das Real-Time PCR Protokoll von *C. botulinum* lediglich die Untersuchung auf das Vorhandensein der BoNT-Gene ermöglichte und somit bei Nichtvorhandensein der Gene auch keine Speziesdiagnose lieferte, wurden die sechs betreffenden *C. botulinum*-Stämme nicht gewertet.

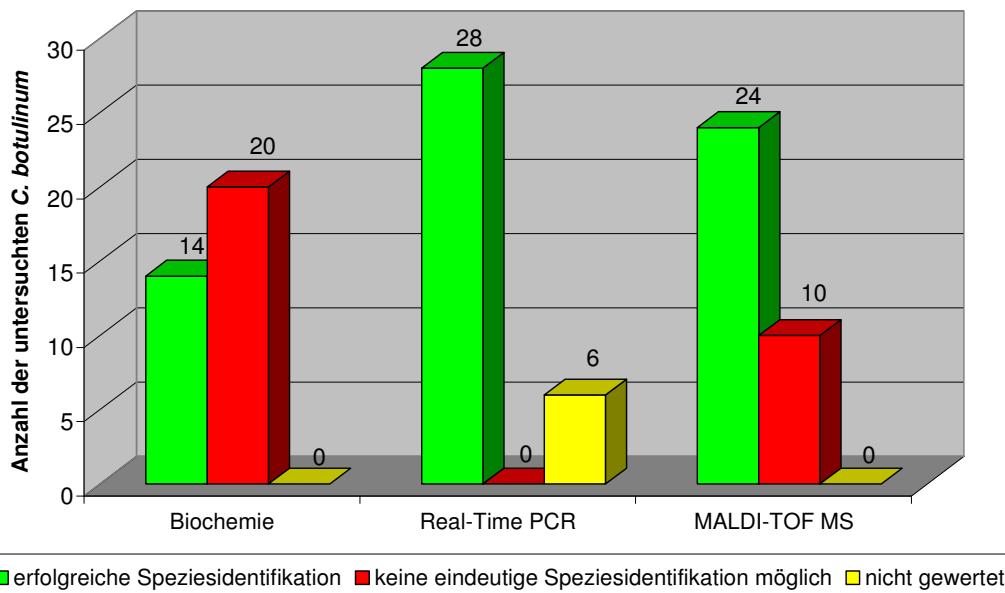


Abbildung 9: Ergebnisse von *C. botulinum* im Methodenvergleich

Somit konnten 41 % der 34 untersuchten *C. botulinum*-Stämme mittels des Api® 20 A erfolgreich auf Speziesebene identifiziert werden. Es wurden außerdem 82 % der Stämme mittels der Real-Time PCR und 71 % mittels der MALDI-TOF MS erfolgreich identifiziert.

4.4.3 Gegenüberstellung der Ergebnisse der untersuchten *Clostridium* spp.

Zur vergleichenden Darstellung wurden die Identifizierungsergebnisse aller untersuchten Clostridien-Stämme innerhalb der jeweiligen Nachweismethode zusammengefasst und jeweils untergliedert (Abb. 10). Es erfolgte die Einteilung in „erfolgreiche Speziesidentifikation“, „keine eindeutige Speziesidentifikation möglich“ und „nicht gewertet“.

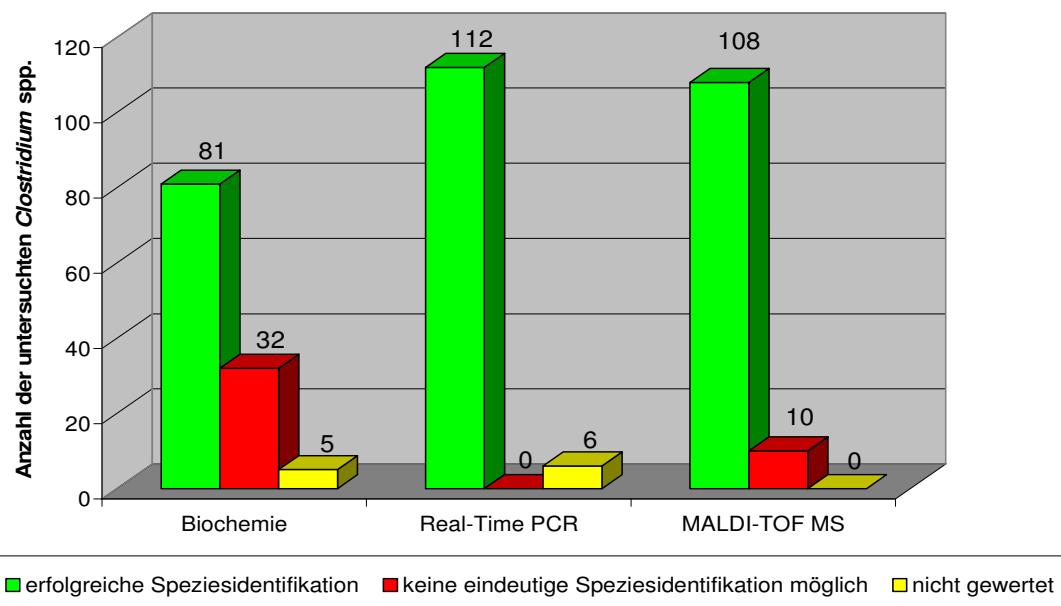


Abbildung 10: Ergebnisse der *Clostridium* spp. im Methodenvergleich

Die Bewertung „keine eindeutige Speziesidentifikation möglich“ enthält alle Ergebnisse, die schlechter als die jeweilige erfolgreiche Speziesidentifikation waren. Darunter fallen auch die erfolgreiche Genusidentifikation und wahrscheinliche Speziesidentifikation sowie die Identifizierung als fremde *Clostridium* spp. Da in der Herstellerdatenbank des biochemischen Testsystems Api® 20 A (BioMérieux, Frankreich) keine Referenzwerte für die *Clostridium* spp. *C. chauvoei*, *C. novyi* und *C. haemolyticum* erfasst waren, konnten diese Ergebnisse nicht gewertet werden. Eine detaillierte Darstellung aller Untersuchungsergebnisse im Methodenvergleich befindet sich im Anhang in den Tab. 27 bis 29.

5 DISKUSSION

Viele Arten der Gattung *Clostridium* sind in der Umwelt weit verbreitet. Sie besiedeln neben dem Erdboden und Meeressedimenten auch den Darmtrakt von gesunden Menschen und Tieren und können somit leicht in Wunden, Lebensmittel und Futtermittel gelangen. Die etwa 20 Clostridien-Arten, welche pathogen oder zumindest im Zusammenhang mit Infektionen bei Mensch und Tier beobachtet worden sind, produzieren in der Regel hochpotente Toxine und lösen sowohl Infektions- als auch Intoxikationskrankheiten aus.

Obwohl mittlerweile auch neuere analytische Verfahren, wie Real-Time PCR und MALDI-TOF MS, ihren Einzug in die Lebensmitteldiagnostik gehalten haben, basiert die mikrobiologische Untersuchung zur Identifizierung der beiden wichtigsten *Clostridium* spp. in diesem Bereich, *C. perfringens* und *C. botulinum*, meist noch immer auf den klassischen kulturellen Verfahren gemäß der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (N.N., 1988, 2006).

Ein Ziel dieser Arbeit war es deshalb, zu untersuchen, ob im Bereich der Clostridien-Analytik die häufig den kulturellen Nachweis ergänzende biochemische Keimdifferenzierung mittlerweile durch neuere analytische Verfahren, wie Real-Time PCR und MALDI-TOF MS, abgelöst werden kann. Des Weiteren sollte eine Empfehlung hinsichtlich des generellen Vorgehens bei einem Nachweis von *Clostridium* spp. im Lebensmittelbereich erarbeitet werden. Obwohl als eindeutige lebensmittelassoziierte Erreger bisher lediglich *C. perfringens* und *C. botulinum* bestätigt sind (McLauchlin und Grant, 2007), wurden in dieser Arbeit auch andere human- und veterinärmedizinisch bedeutsame *Clostridium* spp. aufgrund ihres zoonotischen Potenzials untersucht.

5.1 Bewertung der einzelnen Untersuchungsverfahren

5.1.1 Problematik der Kultivierung bei einzelnen *Clostridium* spp.

Eine biochemische Differenzierung sowie die Untersuchung mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie setzt eine erfolgreiche Kultivierung und Reinzucht des Erregers voraus. Um auf die verschiedenen Bedürfnisse der untersuchten *Clostridium* spp. entsprechend einzugehen, wurde daher bei einzelnen Spezies bzw. Stämmen eine Anpassung der Flüssigmedien vorgenommen.

So erfolgte für eine möglichst selektive Anreicherung von *C. difficile* eine Modifizierung der Ausgangsmediums (TPGY-Medium) mittels eines Antibiotika-Zusatzes und der Zugabe von Taurocholat zur Förderung des Keimwachstums. Diese hausintern entwickelte *C. difficile*-Anreicherung basiert auf verschiedenen Publikationen über Anforderungen an eine gezielte Anzucht des Erregers (Buchanan, 1984; O'Farrell et al., 1984; Sorg und Sonenshein, 2008). Bei den Stämmen von *C. botulinum* Typ C erfolgte ebenfalls eine Anpassung der Vorgehensweise bei der Anzucht, da mittels der für die Anreicherung und Kultivierung der übrigen *C. botulinum* Typen verwendeten Verfahren kein ausreichendes Wachstum erzielt werden konnte. Es wurde daher eine 2-phäische Sporenanreicherung nach Anellis et al. (1972) sowie Gaze und Brown (1988) eingesetzt, um *C. botulinum* Typ C zur Sporenpproduktion anzuregen und über die Sporen erneut vegetative Formen anzuzüchten. Auch *C. chauvoei* ließ sich nicht immer mittels des üblichen Bebrütungs-Verfahrens kultivieren. Aufgrund der Vermutung, dass bereits in der Flüssigreicherung eine Versporung des Erregers eingesetzt hatte, wurde die bebrütete Anreicherung eines Stammes 15 min. bei 60 °C erhitzt und somit ein Auskeimen der Sporen provoziert. Diese Vorgehensweise für eine Hitze-Aktivierung versporener *Clostridium* spp. mittels Temperaturen zwischen 60 °C und 80 °C wurde bereits in der Methodensammlung des FLI (N.N., 2011) und bei anderen Autoren (Duncan und Strong, 1968; Lindström und Korkeala, 2006) beschrieben.

5.1.2 Biochemische Identifizierung

Die biochemische Bestätigung der Clostridien-Stämme erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen API® 20 A der Firma BioMérieux. Nach erfolgter Bebrütung der Testsysteme wurden diese hinsichtlich des Auftretens von Farbumschlägen untersucht. Falls keinerlei biochemische Reaktion erkennbar war, wurde der Test stets einmal wiederholt, was die erneute Anzucht der Keime und einen damit verbundenen weiteren Zeit- und Materialaufwand bedeutete. Zudem gestaltete sich die eindeutige Interpretation der Reaktionen des API® 20 A gelegentlich - v. a. bei *C. botulinum* - schwierig, da die Indikatorröhren häufig Mischfarben aufwiesen. Dies wurde jedoch bereits von anderen Autoren beobachtet (Gulletta et al., 1985; Summanen und Jousimies-Somer, 1988).

Obwohl bei der biochemischen Untersuchung von *C. botulinum* lediglich eine vorläufige Identifizierung auf Speziesebene und keine Unterscheidung zu dem nahe verwandten *C. sporogenes* erfolgen konnte, stellte dies dennoch das bestmöglich zu erreichende Ergebnis dar und wurde in den Methodenvergleich miteinbezogen. Es wurden schließlich 81 (69 %) der untersuchten Stämme, somit 72 % der im Vergleich gewerteten *Clostridium* spp. auf Artenebene richtig identifiziert. Fernerhin konnten 24 (20 %) bzw. 21 (18 %) Stämme auf Gattungsebene identifiziert werden. Insgesamt war für 13 (11 %) der getesteten Clostridien keine Identifizierung möglich.

In früheren Berichten über den Einsatz kommerzieller biochemischer Testsysteme zum Nachweis der *Clostridium* spp. variierten die Ergebnisse einer erfolgreichen Speziesidentifikation stark zwischen Werten von 54 % bis 96 % (Lindström und Korkeala, 2006). Getestet wurden unter anderem *C. botulinum*-Stämme der Gruppen I und II im Vergleich zu der nahe verwandten Spezies *C. sporogenes* (Lindström et al., 1999), *C. difficile*, *C. perfringens*, *C. novyi* und *C. septicum* (Appelbaum et al., 1983; Gresser et al., 1984; Gulletta et al., 1985; Niculescu et al., 1985) sowie verschiedene *Clostridium* spp. bei Hanson et al. (1979) und Karachewski et al. (1985) sowie Summanen und Jousimies-Somer (1988). Da in diesen Publikationen zumeist der Einsatz des API® 20 A zur Identifizierung verschiedener Anaerobier untersucht wurde, sind nicht immer prozentuale Angaben zu den Identifizierungsergebnissen der untersuchten *Clostridium* spp. vorhanden.

Bei Summanen und Jousimies-Somer (1988) wurde jedoch eine erfolgreiche Speziesidentifikation von 62 % für die 63 untersuchten Clostridien-Isolate angegeben. In der Arbeit von Niculescu et al. (1985) konnten 66 % der 162 untersuchten Clostridien-Isolate (aus insgesamt 20 Spezies) erfolgreich auf Speziesebene identifiziert werden, wobei alle der zehn untersuchten *C. perfringens*-Isolate und das einzige *C. septicum*-Isolat erfolgreich identifiziert wurden. Bei Appelbaum et al. (1983) wurden immerhin 82 % der 17 *C. perfringens*-Isolate auf Speziesebene identifiziert, bei Gresser et al. (1984) 95 % der 37 untersuchten *C. difficile*-Isolate. In der Publikation von Lindström et al. (1999) ergab sich eine erfolgreiche Speziesidentifikation von 78 % für proteolytische Stämme von *C. botulinum* bzw. *C. sporogenes*, wohingegen keiner der untersuchten nicht-proteolytischen Stämme von *C. botulinum* identifiziert werden konnte. Letzteres Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gänzlich bestätigt werden, da zumindest einer der neun nicht-proteolytischen *C. botulinum*-Stämme vorläufig als *C. botulinum* identifiziert werden konnte.

Die biochemische Untersuchung mittels des Api[®] 20 A Testsystems lieferte schließlich für die Differenzierung von *Clostridium* spp. im Vergleich zu den anderen beiden Methoden ein etwas schlechteres Identifizierungsergebnis. Im Bezug auf frühere Untersuchungen konnte aber dennoch ein verhältnismäßig gutes Ergebnis erzielt werden (siehe oben). Hierbei fielen vor allem die sehr guten Identifizierungsergebnisse der überwiegend getesteten Spezies *C. perfringens* und der Ausschluss von allein drei der sieben untersuchten Spezies - *C. chauvoei*, *C. novyi* und *C. haemolyticum* - bei der vergleichenden Bewertung ins Gewicht. Auch dadurch, dass bei *C. botulinum* die vorläufige Identifizierung als Speziesdiagnose bewertet wurde, ist das Ergebnis der biochemischen Differenzierung aufgewertet worden. Die einwandfreie Identifizierung von *C. botulinum* allein aufgrund der biochemischen Eigenschaften war jedoch nicht möglich. Auch die verschiedenen Stämme innerhalb der einzelnen Gruppen von *C. botulinum* können auf diese Weise nicht unterschieden werden. Auf diesen Sachverhalt haben jedoch bereits die Untersuchungen von Lindström et al. (1999) hingewiesen.

Eindeutige Nachteile dieser diagnostischen Methode stellen die Notwendigkeit der Reinzucht und zum Teil auch der Vordifferenzierung des Erregermaterials dar, die relativ langen Inkubationszeiten der Testsysteme - je nach Spezies 24 bis 48 h -, die Variabilität einzelner Stoffwechsel-eigenschaften und die hohen laufenden Materialkosten. Es hat sich außerdem in dieser und in anderen Studien (Appelbaum et al., 1983; Hanson et al., 1979; Karachewski et al., 1985) gezeigt, dass geschultes Personal und besonders die Erfahrung im Bereich der Auswertung der Testsysteme essenziell sind, um positive und negative Reaktionen eindeutig beurteilen zu können.

5.1.3 Molekularbiologischer Nachweis mittels Real-Time PCR

Die molekularbiologische Differenzierung der einzelnen *Clostridium* spp. wurde mittels LGL-interner Real-Time PCR-Verfahren (Messelhäußer et al., 2007a) mit Thermocyclern der Firma Stratagene/Agilent Technologies durchgeführt. Je nach *Clostridium* spp. wurden entweder die unterschiedlichen Toxingene der betreffenden Spezies oder die arttypischen Gene untersucht. Bei der Differenzierung in die *C. botulinum* Toxintypen gelang lediglich bei sechs der 34 untersuchten Stämme keine Zuordnung zu den sieben BoNT-Typen. Diese konnten somit nicht identifiziert werden. Da es sich hierbei jedoch um bestätigte *C. botulinum*-Stämme handelte, liegt die Ursache der negativen Ergebnisse vermutlich in einem Verlust der plasmidcodierten Toxingene aufgrund der wiederholten Anzucht und Kultivierung der Keime. Dies wurde bereits bei Satterfield et al. (2010) im Rahmen einer Quadruplex-Real-Time PCR zur Untersuchung der *C. botulinum* Toxingene A, B, E und F beschrieben und basiert auf neueren Erkenntnissen im Bezug auf eine Plasmidcodierung verschiedener BoNT-Gene (Marshall et al., 2010; Skarin und Segerman, 2011; Umeda et al., 2012). Bei den übrigen *Clostridium* spp. gelang eine Identifizierung mittels Real-Time PCR bei jedem Stamm. So konnten insgesamt 112 Stämme (95 %) der untersuchten *Clostridium* spp. auf Speziesebene korrekt identifiziert werden. Es wurde daher bei dieser Methode das vergleichsweise beste Differenzierungsergebnis erreicht.

In anderen Arbeiten über Real-Time PCR-Verfahren zum Nachweis einzelner *Clostridium* spp. wurde bereits von ähnlich guten Identifizierungsergebnissen berichtet. Nennenswert wären hierbei Publikationen über den Einsatz der Real-Time PCR zum Nachweis von *C. difficile* im Bereich der humanmedizinischen Routinediagnostik (Barbut et al., 2011; Houser et al., 2010; Knetsch et al., 2011; Wroblewski et al., 2009; Zidaric et al., 2011), als Screeningverfahren in der Lebensmittelanalytik auf *C. botulinum* (Akbulut et al., 2004; Kirchner et al., 2010; Messelhäußer et al., 2007b; Satterfield et al., 2010) und *C. perfringens* (Chon et al., 2012; Grant et al., 2008; Messelhäußer et al., 2007a) sowie für einen kombinierten Nachweis von *C. chauvoei* und *C. septicum* in der veterinärmedizinischen Diagnostik (Halm et al., 2010; Lange et al., 2010).

Einen generellen Nachteil der PCR - besonders im Bereich der Lebensmittelanalytik - stellt allerdings das Unvermögen dar, zwischen lebenden und toten oder subletal geschädigten Zellen zu unterscheiden. Gerade die toten, nicht mehr vermehrungsfähigen Zellen haben für die lebensmittelrechtliche Beurteilung im Hinblick auf eine möglicherweise vorliegende Gesundheitsgefahr des Verbrauchers keinerlei Bedeutung (Busch, 2010). Indem eine Anreicherung des Lebensmittels der PCR-Analyse vorgeschaltet wird, ist es jedoch möglich, die Detektion lebender Zellen zu verbessern. Des Weiteren tritt bei der Analyse von Toxingenen die Problematik auf, dass hierbei lediglich die genetische Anlage und nicht die tatsächliche Expression des Gens und damit Toxinproduktion untersucht werden. Daher ist auch weiterhin noch ein Nachweis des Toxinbildungsvermögens mittels des Maus-Bioassay oder immunologischer Verfahren nötig.

5.1.4 Identifizierung mittels MALDI-TOF MS

Für die MALDI-TOF MS-basierte Analyse der *Clostridium* spp. wurde das Microflex LT System der Firma Bruker Daltonics (USA) eingesetzt. Basierend auf den Aussagen von Bizzini et al. (2010) und Pavlovic et al. (2011) wurde für die Aufbereitung der grampositiven, sporenbildenden Clostridien standardmäßig eine Ethanol-Ameisensäureextraktion angewandt, um eine bessere Spektrenqualität und höhere Score-Werte zu erreichen.

Als für eine Untersuchung mittels MALDI-TOF MS problematisch stellten sich einige Stämme von *C. botulinum* heraus. Aufgrund der phänotypischen und genotypischen Heterogenität dieser Spezies muss eine Referenzdatenbank entsprechend viele Vergleichsstämme der jeweiligen metabolisch sehr unterschiedlichen Gruppen I-IV von *C. botulinum* enthalten. Da aber die Vergleichsdatenbanken zum Zeitpunkt der Messungen noch nicht ausreichend Referenzspektren für *C. botulinum* Stämme aufwiesen, konnten 29 % der getesteten Stämme lediglich auf Genusebene oder gar nicht identifiziert werden. Auffällig war dabei, dass es sich bei allein sieben der neun nicht-identifizierbaren Stämme um nicht-proteolytische *C. botulinum* Typen (Typ B und Typ E) handelte. Die Untersuchungsergebnisse bestimmter Stämme von *C. botulinum* haben außerdem gezeigt, dass sich auch innerhalb der MALDI-TOF MS die nahe Verwandtschaft der Spezies *C. botulinum* - besonders zu Gruppe I Isolaten - und *C. sporogenes* (in Form von nah beieinander liegenden score values) äußert, eine Differenzierung zwischen beiden Spezies jedoch möglich ist. Da bisher noch keine Arbeiten zu diesen Themen veröffentlicht wurden, besteht hier noch weiterer Forschungsbedarf.

Die MALDI-TOF MS erzielte nach der Real-Time PCR das beste Identifizierungsergebnis in dieser Arbeit. Ihre Schwäche bei der Identifizierung der Spezies *C. botulinum* basierte hauptsächlich auf der geringen Anzahl an Referenzspektren in der MALDI Biotyper™ Datenbank (Bruker Daltonics, USA) mit in der Regel weniger als 10 Einträgen pro Spezies. Nach Seng et al. (2009) korreliert die zuverlässige Identifizierung mit einem Minimum von 10 Datenbankeinträgen pro Spezies.

Es konnten dennoch insgesamt 108 Stämme (91 %) der untersuchten *Clostridium* spp. auf Arrebene und ein Stamm (1 %) auf Gattungsebene richtig identifiziert werden. Für neun Clostridien-Stämme (8 %) - ausschließlich Stämme von *C. botulinum* - war keine Identifizierung mittels MALDI-TOF MS möglich.

Frühere Arbeiten, in welchen einzelne *Clostridium* spp. mittels MALDI-TOF MS untersucht wurden, erzielten meist gleichermaßen gute Identifizierungsergebnisse. Dabei wurde bei einer Untersuchung mittels eines von Bruker Daltonics (USA) entwickelten Massenspektrometers vorwiegend das auch in dieser Arbeit verwendete Bewertungsschema - eine erfolgreiche Speziesidentifikation ab einem score value von $\geq 2,0$ - angewandt. Bei Bizzini et al. (2010) konnten somit unter anderem die *Clostridium* spp. *C. perfringens* und *C. difficile* mit einer Erfolgsquote von 100 % identifiziert werden. In einer weiteren Publikation über die Eignung des MALDI-TOF MS zur mikrobiellen Routinediagnostik (Seng et al., 2009) wurde *C. perfringens* erfolgreich auf Speziesebene identifiziert. Seng et al. (2009) verwendete jedoch ein geringfügig modifiziertes Bewertungsschema, bei dem bereits ab einem score value von $\geq 1,9$ eine Identifizierung auf Speziesebene erfolgte. Eine andere Studie beschäftigte sich mit dem Nachweis anaerober Bakterienspezies, unter anderem von *C. perfringens*, *C. difficile* und *C. septicum* im Vergleich mit zwei verschiedenen MALDI-TOF MS-Systemen (Veloo et al., 2011a). Die korrekte Identifizierung auf Speziesebene erfolgte bei nahezu allen Stämmen zu 100 %. Lediglich der einzige getestete Stamm von *C. septicum* konnte mittels eines der beiden MALDI-TOF MS-Systeme (AXIMA; Fa. Shimadzu Corporation, Japan) nicht identifiziert werden. Veloo et al. (2011a) verwendete bei der Untersuchung mittels des Microflex LT (Bruker Daltonics, USA) wiederum das auch in dieser Arbeit angewandte Bewertungsschema. Des Weiteren wurde in einer Publikation von Reil et al. (2011) ein gezielter Nachweis der verschiedenen Ribotypen von *C. difficile* mittels MALDI-TOF MS untersucht. Hierbei war zwar eine korrekte Speziesidentifikation möglich, die Unterteilung in die einzelnen Ribotypen war jedoch nicht zufriedenstellend durchführbar. Die wohl umfassendste Publikation bezüglich des Clostridien-Nachweises mittels MALDI-TOF MS stellt bisher die Arbeit von Grosse-Herrenthey et al. (2008) dar.

Im Rahmen der Untersuchung von 31 verschiedenen *Clostridium* spp. mittels des Microflex LT (Bruker Daltonics, USA) wurde festgestellt, dass sich für jede Spezies charakteristische Spektrenmuster ermitteln lassen, welche über Untersuchungen mit Feldisolaten bestätigt werden konnten. Es wurde somit erstmalig das Potenzial der MALDI-TOF MS für die Identifizierung von Clostridien-Stämmen aufgezeigt.

Wie bereits von Bizzini et al. (2010) und Seng et al. (2009) berichtet, hat die MALDI-TOF MS generell das Potenzial, in der Routinediagnostik die klassischen biochemischen Nachweismethoden abzulösen, da sie wesentliche Vorteile besitzt: deutlich kürzere Analysenzeiten von zum Teil nur wenigen Minuten, einfache Bedienung sowie Automatisierbarkeit und hohe Präzision. Im Gegensatz zur biochemischen Identifizierung ist es zudem unerheblich, welche Art von Kulturmedium (Standard- oder Selektivnährboden) für die Anzucht verwendet wird. Es sollte dennoch im Bereich der Erregeranzucht möglichst standardisiert gearbeitet werden, um eine Sporulation der Kultur zu verhindern. Essenziell für eine sichere und reproduzierbare Identifizierung der *Clostridium* spp. ist die Verbesserung der Referenzdatenbank für die Gattung *Clostridium*. Dies haben auch Studien über eine Nutzung der MALDI-TOF MS vornehmlich im Bereich der Routineanalytik anaerober Bakterien gezeigt (Veloo et al., 2011a; Veloo et al., 2011b). Ein Ausbau der Datenbank besonders hinsichtlich der Spezies *C. botulinum* (v. a. der nicht-proteolytischen Stämme) ist am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit geplant.

5.2 Empfehlung im Hinblick auf den Einsatz in der Lebensmittelanalytik

Im Bereich der Lebensmittelhygiene ist die rein mikrobiologische Untersuchung auf die beiden wichtigsten clostridialen Lebensmittelinfektions- und intoxikationserreger, *C. perfringens* und *C. botulinum* nur von geringem Wert, da beide Erreger hauptsächlich über ihre Toxinwirkung definiert werden. Ein vermehrtes Vorkommen von *C. perfringens* im Lebensmittel stellt z. B. lediglich einen Hinweis auf eine mangelnde Prozesshygiene, aber noch keine direkte Gesundheitsschädlichkeit dar (Messelhäußer et al., 2007a; Messelhäußer et al., 2007b). Hier ist der Nachweis des Toxingens (*cpe*), das letztlich für die Enterotoxinbildung im Darm verantwortlich ist, durchaus sinnvoll (Messelhäußer et al., 2007a). Auch bei *C. botulinum* muss stets das Toxinbildungsvermögen der isolierten Stämme nachgewiesen werden, um einen eindeutigen Zusammenhang zwischen einer Erkrankung und dem Bakterium herstellen zu können (N.N., 1988). Als erster Schritt kann hierzu mittlerweile die Real-Time PCR mit der Detektion der BoNT-Gene dienen. Damit wird der Einsatz des teuren, zeit- und arbeitsaufwendigen Maus-Bioassays auf konkrete Verdachtsfälle beschränkt, was auch aus ethischer Sicht als erstrebenswert anzusehen ist.

In der Human- und Veterinärmedizin hat sich inzwischen die Real-Time PCR für die zuverlässige Diagnose von Rauschbrand (*C. chauvoei*) und malignem Ödem (*C. septicum*) als Routineverfahren etabliert (Lange et al., 2010). Auch bei dem Nachweis von *C. difficile*-Infektionen ist die Real-Time PCR in der klinischen Diagnostik auf dem Vormarsch, da schneller, spezifischer und sensitiver als die bisherigen Goldstandards Zytotoxizitätstest und die neueren Enzymimmunoassays (Barbut et al., 2011; Knetsch et al., 2011).

Die in dieser Arbeit verwendeten in-house-validierten Real-Time PCR-Verfahren besitzen eine hohe Spezifität und Sensitivität und ermöglichen eine deutliche Zeitersparnis gegenüber einer klassischen mikrobiologischen Untersuchung auf *Clostridium* spp.. Für die Diagnostik im Bereich der Lebensmittelhygiene kann daher eine Ergänzung der klassischen kulturellen Verfahren durch die Real-Time PCR als Screeningverfahren empfohlen werden.

Insbesondere aus Gründen der Zeit- und Materialersparnis sowie der Einfachheit der Anwendung kann außerdem ein Ersatz der biochemischen Nachweismethoden durch die MALDI-TOF MS befürwortet werden. Mit dem Ausbau der Referenzdatenbanken besitzt diese Methode ein großes Potenzial, als Identifizierungsmethode biochemische Verfahren mehr und mehr zu ersetzen (Bizzini et al., 2010; Mellmann et al., 2009). An einer Möglichkeit zur Differenzierung zwischen den verschiedenen Toxintypen von *C. botulinum* sollte jedoch weiterhin gearbeitet werden. Bei kleineren Laboren ist aus Kostengründen (derzeit hoher Anschaffungspreis für MALDI-TOF MS) nach wie vor der Einsatz von biochemischen Testsystemen sinnvoll. Da besonders für eine Identifizierung des wichtigsten und am häufigsten unter den anaeroben Sporenbildnern vorkommenden Lebensmittelerregers *C. perfringens* die biochemischen Testverfahren sehr gut abschneiden. Für die Differenzierung von *C. botulinum*-Isolaten kann jedoch die Ergänzung der kulturellen und biochemischen Diagnostik zumindest mit einem PCR-Verfahren empfohlen werden.

5.3 Empfohlene Vorgehensweise bei einer Untersuchung auf *Clostridium* spp. in der Lebensmittelanalytik

Unter Berücksichtigung der im Methodenvergleich erzielten Ergebnisse wurde schließlich eine Empfehlung hinsichtlich des generellen Vorgehens bei einem Nachweis von *Clostridium* spp. im Lebensmittelbereich erarbeitet.

Da die klassische mikrobiologische Anzucht von Clostridien aufgrund von lebensmittelrechtlichen Beurteilungen auch weiterhin unverzichtbar ist, empfiehlt es sich, die neueren analytischen Verfahren zunächst ergänzend einzusetzen. Es sollten daher bei einem Nachweis von Clostridien nach wie vor die klassischen Methoden wie Koloniezählverfahren oder Maus-Bioassay durchgeführt werden, parallel dazu können jedoch als Screeningverfahren die Real-Time PCR und als Bestätigungsreaktionen die biochemische Keimdifferenzierung oder die MALDI-TOF MS eingesetzt werden. Eine detaillierte Beschreibung der Untersuchungswege bei einem Nachweis von *C. perfringens*, *C. botulinum* und anderen *Clostridium* spp. befindet sich im Anhang unter 11.4.

Mit der in dieser Arbeit empfohlenen Vorgehensweise und den beschriebenen Methoden dürfte zukünftig ein schneller und zuverlässiger Nachweis von potentiell humanpathogenen *Clostridium* spp. in der routinemäßigen Lebensmitteldiagnostik möglich sein.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Clostridium (C.) spp. sind bekannte Auslöser von Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen des Menschen und treten zudem als nosokomiale Infektionserreger und Verursacher von schwerwiegenden Tierseuchen in Erscheinung. Dennoch gibt es bisher nur wenige international genormte Nachweisverfahren für *Clostridium* spp., welche jedoch das Toxinbildungsvermögen dieser Bakterien weitestgehend unberücksichtigt lassen.

In der Lebensmittelanalytik basiert die mikrobiologische Untersuchung zur Identifizierung der beiden wichtigsten *Clostridium* spp. im Lebensmittelbereich, *C. perfringens* und *C. botulinum* noch immer auf den klassischen kulturellen Verfahren gem. der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, in der Regel ergänzt durch eine biochemische Bestätigung der Isolate. Mittlerweile haben jedoch auch molekularbiologische Methoden, wie Real-Time PCR, ihren Einzug in die Lebensmitteldiagnostik gehalten, wurden aber bisher im Bereich der Clostridien-Diagnostik noch in keine offizielle Methodensammlung aufgenommen. Neuere analytische Verfahren, wie die MALDI-TOF Massenspektrometrie (MS), welche sich bereits in der humanmedizinischen Diagnostik von Krankheitserregern etabliert hat, werden aufgrund der schnellen Analyseergebnisse auch zur Identifizierung von Lebensmittelerregern immer häufiger herangezogen.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, zu untersuchen, ob im Bereich der Clostridien-Analytik die biochemische Keimdifferenzierung durch neuere Verfahren, wie Real-Time PCR und MALDI-TOF MS, abgelöst werden kann. Zu diesem Zweck wurden am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit 118 potentiell humanpathogene *Clostridium* spp. Isolate mittels der oben genannten Verfahren vergleichend untersucht.

Es zeigte sich, dass die in dieser Arbeit verwendeten Real-Time PCR-Verfahren die besten Ergebnisse für den Nachweis von *Clostridium* spp. lieferten. Diese werden daher als Screeningverfahren im Bereich der Lebensmittelanalytik empfohlen.

Auch die Untersuchung mittels der MALDI-TOF MS erzielte sehr gute Identifizierungsergebnisse für die *Clostridium* spp. Es kann daher - insbesondere aus Gründen der Zeit- und Materialersparnis sowie aufgrund des weiteren Entwicklungspotenzials der Methode - ein Ersatz der biochemischen Nachweisverfahren wie des Api® 20 A (BioMérieux, Frankreich) durch die MALDI-TOF MS für die Diagnostik von *Clostridium* spp. befürwortet werden. Die klassische mikrobiologische Anzucht von Clostridien bleibt dennoch aufgrund von lebensmittelrechtlichen Beurteilungen weiterhin unverzichtbar. Anhand der erzielten Ergebnisse unter Verwendung der einzelnen Untersuchungsverfahren wurde schließlich eine Empfehlung hinsichtlich des generellen Vorgehens bei einem Nachweis von *Clostridium* spp. im Lebensmittelbereich erarbeitet.

7 SUMMARY

Comparative differentiation of *Clostridium* spp. with biochemical and molecular methods and MALDI-TOF mass spectrometry

Clostridium (C.) spp. are a known cause for foodborne infections and intoxications of humans and even appear as nosocomial pathogens as well as causative agents of serious animal diseases. Nevertheless, internationally there are only a few standard methods for the detection of *Clostridium* spp. which in particular leave the ability of these bacteria to produce toxins unconsidered.

In food analysis the microbiological testing for the identification of the two most important *Clostridium* spp. in the food industry, *C. perfringens* and *C. botulinum*, is still based on classical culture methods according to Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, usually added by a biochemical confirmation of the isolates. Meanwhile, even molecular biological methods such as real-time PCR found their way into food analysis, but they have not been included in any official collection of methods in the field of clostridial diagnosis so far. Modern analytical techniques such as MALDI-TOF mass spectrometry (MS), which has become already established in the human medical diagnosis of pathogens, are more and more often used for the identification of foodborne pathogens because of the rapid test results.

The aim of this study was therefore to examine whether the classical biochemical differentiation methods in relation to clostridial analysis can be replaced by newer molecular biological techniques such as real-time PCR and by MALDI-TOF MS. For this purpose, 118 potentially pathogenic *Clostridium* spp. isolates were compared at the Bavarian Health and Food Safety Authority using the above mentioned methods.

It became apparent that the used real-time PCR methods delivered the best results for the detection of *Clostridium* spp. and are therefore recommended as a screening procedure in the field of food analysis. The examination with the help of MALDI-TOF MS also achieved very good results for the identification of *Clostridium* spp.

Referring to this time and material saving measure as well as to the high potential for development of this method, the biochemical detection methods such as Api® 20 A (BioMérieux, France) should be replaced by MALDI-TOF MS for the diagnosis of *Clostridium* spp. Nevertheless, the classical culture methods for Clostridia are indispensable due to food regulatory complaints. On the basis of the obtained results by using the various test methods, a recommendation concerning the general approach to the detection of *Clostridium* spp. in the food industry has been elaborated.

8 LITERATURVERZEICHNIS

ACKERMANN, G.; KIST, M. (2009): *Clostridium difficile* - Aktueller Stand, Teil II: Virulenzfaktoren, Antibiotikaresistenz, Typisierungsmethoden. *Der Mikrobiologe*, **19** (1), 9-20.

AHOURAI, P.; ARDEHALI, M.; EZZI, A.; GHOLAMI, M. R.; MOOSAVI, M. (1990): Bovine bacillary hemoglobinuria (*Clostridium haemolyticum*) in Iran. *J Vet Diagn Invest*, **2** (2), 143-144.

AKBULUT, D.; GRANT, K. A.; MCLAUCHLIN, J. (2004): Development and application of Real-Time PCR assays to detect fragments of the *Clostridium botulinum* types A, B, and E neurotoxin genes for investigation of human foodborne and infant botulism. *Foodborne Pathog Dis*, **1** (4), 247-257.

ANELLIS, A.; BERKOWITZ, D.; KEMPER, D.; ROWLEY, D. B. (1972): Production of types A and B spores of *Clostridium botulinum* by the biphasic method: effect on spore population, radiation resistance, and toxigenicity. *Appl Microbiol*, **23** (4), 734-739.

APPELBAUM, P. C.; KAUFMANN, C. S.; KEIFER, J. C.; VENBRUX, H. J. (1983): Comparison of three methods for anaerobe identification. *J Clin Microbiol*, **18** (3), 614-621.

BARBUT, F.; MONOT, M.; ROUSSEAU, A.; CAVELOT, S.; SIMON, T.; BURGHOFFER, B.; LALANDE, V.; TANKOVIC, J.; PETIT, J. C.; DUPUY, B.; ECKERT, C. (2011): Rapid diagnosis of *Clostridium difficile* infection by multiplex real-time PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **30** (10), 1279-1285.

BAUMGART, J. (Hrsg.) (2011): Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln (Bd. 1), Hamburg, Behr.

BETTE, P.; FREVERT, J.; MAULER, F.; SUTTORP, N.; HABERMANN, E. (1989): Pharmacological and biochemical studies of cytotoxicity of *Clostridium novyi* type A alpha-toxin. *Infect Immun*, **57** (8), 2507-2513.

BILLINGTON, S. J.; WIECKOWSKI, E. U.; SARKER, M. R.; BUESCHEL, D.; SONGER, J. G.; MCCLANE, B. A. (1998): *Clostridium perfringens* type E animal enteritis isolates with highly conserved, silent enterotoxin gene sequences. *Infect Immun*, **66** (9), 4531-4536.

BIZZINI, A.; DURUSSEL, C.; BILLE, J.; GREUB, G.; PROD'HOM, G. (2010): Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol*, **48** (5), 1549-1554.

BÖHNERL, H.; BEHRENS, S.; LOCH, P.; LUBE, K.; GESSLER, F. (2001): Is there a link between infant botulism and sudden infant death? Bacteriological results obtained in central Germany. *Eur J Pediatr*, **160** (10), 623-628.

BÖHNERL, H.; GESSLER, F. (2003): Diagnosis of botulism since 1995. Report of test results. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, **116** (7-8), 269-273.

BÖHNERL, H.; GESSLER, F. (2005): Botulinum toxins - cause of botulism and systemic diseases? *Vet Res Commun*, **29** (4), 313-345.

BORGmann, S.; KIST, M.; JAKOBIAK, T.; REIL, M.; SCHOLZ, E.; VON EICHEL-STREIBER, C.; GRUBER, H.; BRAZIER, J. S.; SCHULTE, B. (2008): Increased number of *Clostridium difficile* infections and prevalence of *Clostridium difficile* PCR ribotype 001 in southern Germany. *Euro Surveill*, **13** (49), 1-5.

BORRIELLO, S. P. (1995): Clostridial Disease of the Gut. *Clin Inf Dis*, **20** (Supplement 2), 242-250.

BUCHANAN, A. G. (1984): Selective enrichment broth culture for detection of *Clostridium difficile* and associated cytotoxin. *J Clin Microbiol*, **20** (1), 74-76.

BUSCH, C.; SCHOMIG, K.; HOFMANN, F.; AKTORIES, K. (2000): Characterization of the catalytic domain of *Clostridium novyi* alpha-toxin. *Infect Immun*, **68** (11), 6378-6383.

BUSCH, U. (2010): Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik, Berlin, Springer.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL: Botulism (Foodborne): Number of reported cases, by year - United States, 1988-2008.

http://www.cdc.gov/osels/ph_surveillance/nndss/annsum/2008/08graphs.htm: letztes Update am 29.12.2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL: Botulism (Infant): Number of reported cases, by year - United States, 1988-2008.

http://www.cdc.gov/osels/ph_surveillance/nndss/annsum/2008/08graphs.htm: letztes Update am 29.12.2011.

CHON, J. W.; PARK, J. S.; HYEON, J. Y.; PARK, C.; SONG, K. Y.; HONG, K. W.; HWANG, I. G.; KWAK, H. S.; SEO, K. H. (2012): Development of Real-Time PCR for the Detection of *Clostridium perfringens* in Meats and Vegetables. *J Microbiol Biotechnol*, **22** (4), 530-534.

CLEGG, R. M. (1995): Fluorescence resonance energy transfer. *Curr Opin Biotechnol*, **6** (1), 103-110.

COLLINS, M. D.; EAST, A. K. (1998): Phylogeny and taxonomy of the food-borne pathogen *Clostridium botulinum* and its neurotoxins. *J Appl Microbiol*, **84** (1), 5-17.

COLLINS, M. D.; LAWSON, P. A.; WILLEMS, A.; CORDOBA, J. J.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.; GARCIA, P.; CAI, J.; HIPPE, H.; FARROW, J. A. (1994): The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int J Syst Bacteriol*, **44** (4), 812-826.

CORNILLOT, E.; SAINT-JOANIS, B.; DAUBE, G.; KATAYAMA, S.; GRANUM, P. E.; CANARD, B.; COLE, S. T. (1995): The enterotoxin gene (cpe) of *Clostridium perfringens* can be chromosomal or plasmid-borne. *Mol Microbiol*, **15** (4), 639-647.

DUNCAN, C. L.; STRONG, D. H. (1968): Improved medium for sporulation of *Clostridium perfringens*. *Appl Microbiol*, **16** (1), 82-89.

DYLEWSKI, J.; DRUMMOND, R.; ROWEN, J. (2007): A case of *Clostridium septicum* spontaneous gas gangrene. *CJEM*, **9** (2), 133-135.

DYLEWSKI, J.; LUTERMAN, L. (2010): Septic arthritis and *Clostridium septicum*: a clue to colon cancer. *CMAJ*, **182** (13), 1446-1447.

EUZÉBY, J. P.: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Clostridium*. <http://www.bacterio.cict.fr>: letztes Update am 08.09.2012.

FINEGOLD, S. M.; GEORGE, W. L.; MULLIGAN, M. E. (1985): Anaerobic infections. Part II. *Dis Mon*, **31** (11), 1-97.

GAZE, J. E.; BROWN, K. L. (1988): The heat resistance of spores of *Clostridium botulinum* 213B over the temperature range 120 to 140 °C. *Int J Food Sci Tech*, **23** (4), 373-378.

GILL, D. M. (1982): Bacterial toxins: a table of lethal amounts. *Microbiol Rev*, **46** (1), 86-94.

GOULD, L. H.; LIMBAGO, B. (2010): *Clostridium difficile* in food and domestic animals: a new foodborne pathogen? *Clin Infect Dis*, **51** (5), 577-582.

GRANT, K. A.; KENYON, S.; NWAFOR, I.; PLOWMAN, J.; OHAI, C.; HALFORD-MAW, R.; PECK, M. W.; MCLAUCHLIN, J. (2008): The identification and characterization of *Clostridium perfringens* by real-time PCR, location of enterotoxin gene, and heat resistance. *Foodborne Pathog Dis*, **5** (5), 629-639.

GRESSER, M. E.; SHANHOLTZER, C. J.; GERDING, D. N.; GARRETT, C. R.; PETERSON, L. R. (1984): Evaluation of the 24-h API 20A anaerobe system for identification of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*, **19** (6), 915-916.

GROSETH, P. K.; ERSDAL, C.; BJELLAND, A. M.; STOKSTAD, M. (2011): Large outbreak of blackleg in housed cattle. *Vet Rec*, **169** (13), 339.

GROSSE-HERRENTHEY, A.; MAIER, T.; GESSLER, F.; SCHAUMANN, R.; BÖHNE, H.; KOSTRZEWKA, M.; KRUGER, M. (2008): Challenging the problem of clostridial identification with matrix-assisted laser desorption and ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Anaerobe*, **14** (4), 242-249.

GULLETTA, E.; AMATO, G.; NANI, E.; COVELLI, I. (1985): Comparison of two systems for identification of anaerobic bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **4** (3), 282-285.

HALL, I. C. (1922): Differentiation and Identification of the Sporulating Anaerobes. *J Infect Dis*, **30** (5), 445-504.

HALM, A.; WAGNER, M.; KOFER, J.; HEIN, I. (2010): Novel real-time PCR assay for simultaneous detection and differentiation of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum* in clostridial myonecrosis. *J Clin Microbiol*, **48** (4), 1093-1098.

HANSON, C. W.; CASSORLA, R.; MARTIN, W. J. (1979): API and Minitek systems in identification of clinical isolates of anaerobic gram-negative bacilli and *Clostridium* species. *J Clin Microbiol*, **10** (1), 14-18.

HANSON, C. W.; MARTIN, W. J. (1976): Evaluation of enrichment, storage, and age of blood agar medium in relation to its ability to support growth of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol*, **4** (5), 394-399.

HARWOOD, D. G.; HIGGINS, R. J.; AGGETT, D. J. (2007): Outbreak of intestinal and lingual *Clostridium chauvoei* infection in two-year-old Friesian heifers. *Vet Rec*, **161** (9), 307-308.

HATHEWAY, C. L. (1990): Toxigenic clostridia. *Clin Microbiol Rev*, **3** (1), 66-98.

HEALTH PROTECTION AGENCY (2008a): Identification of *Clostridium* species. *National Standard Method, BSOP ID 8* (3).

HEALTH PROTECTION AGENCY (2008b): Processing of feaces for *Clostridium difficile*. *National Standard Method, BSOP 10* (1.3).

HEIKINHEIMO, A.; LINDSTRÖM, M.; GRANUM, P. E.; KORKEALA, H. (2006): Humans as reservoir for enterotoxin gene-carrying *Clostridium perfringens* type A. *Emerg Infect Dis*, **12** (11), 1724-1729.

HEINLEN, L.; BALLARD, J. D. (2010): *Clostridium difficile* infection. *Am J Med Sci*, **340** (3), 247-252.

HOUSER, B. A.; HATTEL, A. L.; JAYARAO, B. M. (2010): Real-time multiplex polymerase chain reaction assay for rapid detection of *Clostridium difficile* toxin-encoding strains. *Foodborne Pathog Dis*, **7** (6), 719-726.

JAPANESE SOCIETY OF CHEMOTHERAPY AND THE JAPANESE ASSOCIATION FOR INFECTIOUS DISEASES (2011a): Chapter 2-12-3. Anaerobic infections (individual fields): botulism. *J Infect Chemother*, **17** (0), 123-124.

JAPANESE SOCIETY OF CHEMOTHERAPY AND THE JAPANESE ASSOCIATION FOR INFECTIOUS DISEASES (2011b): Chapter 2-12-6. Anaerobic infections (individual fields): food poisoning due to *Clostridium perfringens*. *J Infect Chemother*, **17** (0), 135-136.

JOHNSON, J. L.; FRANCIS, B. S. (1975): Taxonomy of the Clostridia: ribosomal ribonucleic acid homologies among the species. *J Gen Microbiol*, **88** (2), 229-244.

JUST, I.; GERHARD, R. (2004): Large clostridial cytotoxins. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **152**, 23-47.

KACHRIMANIDOU, M.; MALISIOVAS, N. (2011): *Clostridium difficile* infection: a comprehensive review. *Crit Rev Microbiol*, **37** (3), 178-187.

KAHN, C. M. (Hrsg.) (2010): The Merck Veterinary Manual (10th ed.), MERCK & CO., INC., Whitehouse Station, N.J.

KARACHEWSKI, N. O.; BUSCH, E. L.; WELLS, C. L. (1985): Comparison of PRAS II, RapID ANA, and API 20A systems for identification of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol*, **21** (1), 122-126.

KEESSEN, E. C.; GAASTRA, W.; LIPMAN, L. J. (2011): *Clostridium difficile* infection in humans and animals, differences and similarities. *Vet Microbiol*, **153** (3-4), 205-217.

KIRCHNER, S.; KRAMER, K. M.; SCHULZE, M.; PAULY, D.; JACOB, D.; GESSLER, F.; NITSCHE, A.; DORNER, B. G.; DORNER, M. B. (2010): Pentaplexed quantitative real-time PCR assay for the simultaneous detection and quantification of botulinum neurotoxin-producing clostridia in food and clinical samples. *Appl Environ Microbiol*, **76** (13), 4387-4395.

KNETSCH, C. W.; BAKKER, D.; DE BOER, R. F.; SANDERS, I.; HOF, S.; KOOISTRA-SMID, A. M.; CORVER, J.; EASTWOOD, K.; WILCOX, M. H.; KUIJPER, E. J. (2011): Comparison of real-time PCR techniques to cytotoxigenic culture methods for diagnosing *Clostridium difficile* infection. *J Clin Microbiol*, **49** (1), 227-231.

KUHNERT, P.; CAPAUL, S. E.; NICOLET, J.; FREY, J. (1996): Phylogenetic positions of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum* based on 16S rRNA gene sequences. *Int J Syst Bacteriol*, **46** (4), 1174-1176.

LAMANNA, C. (1959): The most poisonous poison. *Science*, **130** (3378), 763-772.

LANGE, M.; NEUBAUER, H.; SEYBOLDT, C. (2010): Development and validation of a multiplex real-time PCR for detection of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum*. *Mol Cell Probes*, **24** (4), 204-210.

LAWSON, P. A.; LLOP-PEREZ, P.; HUTSON, R. A.; HIPPE, H.; COLLINS, M. D. (1993): Towards a phylogeny of the clostridia based on 16S rRNA sequences. *FEMS Microbiol Lett*, **113** (1), 87-92.

LI, J.; MIYAMOTO, K.; SAYEED, S.; MCCLANE, B. A. (2010): Organization of the cpe locus in CPE-positive *Clostridium perfringens* type C and D isolates. *PLoS One*, **5** (6), e10932.

LINDSTRÖM, M.; KORKEALA, H. (2006): Laboratory diagnostics of botulism. *Clin Microbiol Rev*, **19** (2), 298-314.

LINDSTRÖM, M. K.; JANKOLA, H. M.; HIELM, S.; HYYTIA, E. K.; KORKEALA, H. J. (1999): Identification of *Clostridium botulinum* with API 20 A, Rapid ID 32 A and RapID ANA II. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **24** (3), 267-274.

LYERLY, D. M.; KRIVAN, H. C.; WILKINS, T. D. (1988): *Clostridium difficile*: its disease and toxins. *Clin Microbiol Rev*, **1** (1), 1-18.

MAJUMDAR, S.; WOODCOCK, S.; CHEESBROUGH, J. (2004): Severe sepsis following wound infection by an unusual organism - *Clostridium novyi*. *Int J Clin Pract*, **58** (9), 892-893.

MARSHALL, K. M.; BRADSHAW, M.; JOHNSON, E. A. (2010): Conjugative botulinum neurotoxin-encoding plasmids in *Clostridium botulinum*. *PLoS One*, **5** (6), e11087.

MAURER, J. J. (2011): Rapid detection and limitations of molecular techniques. *Annu Rev Food Sci Technol*, **2**, 259-279.

MCCROSKEY, L. M.; HATHEWAY, C. L. (1988): Laboratory findings in four cases of adult botulism suggest colonization of the intestinal tract. *J Clin Microbiol*, **26** (5), 1052-1054.

MCDONEL, J. L.; CHANG, L. W.; POUNDS, J. G.; DUNCAN, C. L. (1978): The effects of *Clostridium perfringens* enterotoxin on rat and rabbit ileum: an electron microscopic study. *Lab Invest*, **39** (3), 210-218.

MCGUIGAN, C.; ROWORTH, M. (2002): *Clostridium novyi* type A infection: a sporadic fatal case. *Scand J Infect Dis*, **34** (3), 209-211.

MCGUIGAN, C. C.; PENRICE, G. M.; GRUER, L.; AHMED, S.; GOLDBERG, D.; BLACK, M.; SALMON, J. E.; HOOD, J. (2002): Lethal outbreak of infection with *Clostridium novyi* type A and other spore-forming organisms in Scottish injecting drug users. *J Med Microbiol*, **51** (11), 971-977.

MCKILLIP, J. L.; DRAKE, M. (2004): Real-time nucleic acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food. *J Food Prot*, **67** (4), 823-832.

MCLAUCHLIN, J.; GRANT, K. A. (2007): *Clostridium botulinum* and *Clostridium perfringens*. In: Simjee S. (Hrsg.), Infectious Disease: Foodborne Diseases, *Humana Press Inc.*, Totowa, 41-78.

MELLMANN, A.; SCHWEPPE, C. H.; MÜTHING, J. (2009): Speziesidentifikation von Mikroorganismen mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie in der Medizinischen Mikrobiologie. *Mikrobiologie*, **19. Jg.**, 117-123.

MESSELHÄÜBER, U.; ZUCKER, R.; ELMER-ENGLHARD, D.; BUSCH, U.; HÖRMANSDORFER, S.; PUDICH, U.; HÖLLER, C. (2007a): Nachweis und Charakterisierung von *Clostridium perfringens* mittels real-time-PCR. *J Verbr Lebensm*, **2**, 194-197.

MESSELHÄÜBER, U.; ZUCKER, R.; ZIEGLER, H.; ELMER-ENGLHARD, D.; KLEIH, W.; HÖLLER, C.; BUSCH, U. (2007b): Nachweis von *Clostridium botulinum* Typ A, B, E und F mittels real-time-PCR. *J Verbr Lebensm*, **2**, 198–201.

MIRZA, N. N.; MCCLOUD, J. M.; CHEETHAM, M. J. (2009): *Clostridium septicum* sepsis and colorectal cancer - a reminder. *World J Surg Oncol*, **7**, 73.

N.N. (1988): Untersuchung von Lebensmitteln. Nachweis von *Clostridium botulinum* und Botulinum-Toxin in Fleisch und Fleischerzeugnissen (L06.00-26). In: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG.

N.N. (2000): Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz - IfSG) vom 20. Juli 2000. Zuletzt geändert durch Art. 1 G v. 28.7.2011. *Bundesgesetzblatt I*, 1045.

N.N. (2005): Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on a request from the Commission related to *Clostridium* spp. in foodstuffs. *The EFSA Journal*, **199**, 1-65.

N.N. (2006): Untersuchung von Lebensmitteln. Horizontales Verfahren zur Zählung von *Clostridium perfringens* in Lebensmitteln - Koloniezählverfahren (L00.00-57). In: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB.

N.N. (2011): 42. Rauschbrand. In: Friedrich-Löffler-Institut (Hrsg.), Amtliche Sammlung von Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Untersuchungsmaterial tierischen Ursprungs für anzeigepflichtige Tierseuchen - Methodensammlung, 313 - 320.

NEUMAIER, M.; BRAUN, A.; WAGENER, C. (1998): Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics. *Clin Chem*, **44** (1), 12-26.

NEUMANN, A. P.; DUNHAM, S. M.; REHBERGER, T. G.; SIRAGUSA, G. R. (2010): Quantitative real-time PCR assay for *Clostridium septicum* in poultry gangrenous dermatitis associated samples. *Mol Cell Probes*, **24** (4), 211-218.

NEUMEISTER, B.; GEISS, H.; BRAUN, R.; KIMMIG, P. (2009): Mikrobiologische Diagnostik. Bakteriologie - Mykologie - Virologie - Parasitologie (2., vollst. überarb. Aufl.), Stuttgart, Thieme.

NEWTON, J. R.; WYLIE, C. E.; PROUDMAN, C. J.; MCGORUM, B. C.; POXTON, I. R. (2010): Equine grass sickness: are we any nearer to answers on cause and prevention after a century of research? *Equine Vet J*, **42** (6), 477-481.

NICULESCU, E. R.; KOTENHOFF, G.; MALOTTKE, R. (1985): Beitrag zur Differenzierung von Clostridien - [Differentiation of clostridia]. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*, **259** (3), 307-316.

O'FARRELL, S.; WILKS, M.; NASH, J. Q.; TABAQCHALI, S. (1984): A selective enrichment broth for the isolation of *Clostridium difficile*. *J Clin Pathol*, **37** (1), 98-99.

OGUMA, K.; FUJINAGA, Y.; INOUE, K. (1995): Structure and function of *Clostridium botulinum* toxins. *Microbiol Immunol*, **39** (3), 161-168.

PAVLOVIC, M.; KONRAD, R.; HUBER, I.; BUSCH, U. (2011): Einsatz von MALDI-TOF-MS in der Lebensmittelanalytik. *Deut Lebensm-Rundsch*, 9-16.

PECK, M. W. (2004): The good, the bad and the ugly - *Clostridium botulinum* neurotoxins. *Microbiologist*, 26-30.

PETIT, L.; GIBERT, M.; POPOFF, M. (1999): *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol*, **7** (3), 104-110.

RAINEY, F. A.; HOLLEN, B. J.; SMALL, A. (2009): Genus I. *Clostridium*. In: P. De Vos; G. M. Garrity; D. Jones; N. R. Krieg; W. Ludwig; F. A. Rainey; K.-H. Schleifer; W. Whitman (Hrsg.): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Edition, *Springer*, 738-814.

REIL, M.; ERHARD, M.; KUIJPER, E. J.; KIST, M.; ZAISS, H.; WITTE, W.; GRUBER, H.; BORGGMANN, S. (2011): Recognition of *Clostridium difficile* PCR-ribotypes 001, 027 and 126/078 using an extended MALDI-TOF MS system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **30** (11), 1431-1436.

RHODEHAMEL, E. J.; REDDY, N. R.; PIERSON, M. D. (1992): Botulism: the causative agent and its control in foods. *Food Control*, **3** (3), 125-143.

ROBERT KOCH-INSTITUT (1998): Säuglingsbotulismus - selten, aber gefährlich. *Epidemiologisches Bulletin*, **37**, 261-263.

ROBERT KOCH-INSTITUT (2000a): Gastroenteritis-Ausbruch verursacht durch *Clostridium perfringens*. *Epidemiologisches Bulletin*, **18**, 145-146.

ROBERT KOCH-INSTITUT (2000b): Schwere Erkrankungsfälle unter i.v. Drogenabhängigen - Update, *Clostridium novyi* als wahrscheinlicher Erreger ermittelt. *Epidemiologisches Bulletin*, **25**, 202.

ROBERT KOCH-INSTITUT (2004): Wundbotulismus - ein Fallbericht. *Epidemiologisches Bulletin*, **43**, 371.

ROBERT KOCH-INSTITUT (2007): Schwer verlaufende Infektionen mit *Clostridium difficile*: Zur Meldepflicht. *Epidemiologisches Bulletin*, **46**, 424-425.

ROBERT KOCH-INSTITUT (2012): Übermittelte Botulismus-Fälle nach Altersgruppe, Deutschland, Fälle entsprechend der Referenzdefinition des RKI. *SurvStat*, <http://www3.rki.de/SurvStat>, Datenstand: 28.03.2012.

SASAKI, Y.; KOJIMA, A.; AOKI, H.; OGIKUBO, Y.; TAKIKAWA, N.; TAMURA, Y. (2002): Phylogenetic analysis and PCR detection of *Clostridium chauvoei*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novyi* types A and B, and *Clostridium septicum* based on the flagellin gene. *Vet Microbiol*, **86** (3), 257-267.

SATTERFIELD, B. A.; STEWART, A. F.; LEW, C. S.; PICKETT, D. O.; COHEN, M. N.; MOORE, E. A.; LUEDTKE, P. F.; O'NEILL, K. L.; ROBISON, R. A. (2010): A quadruplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of the *Clostridium botulinum* toxin genes A, B, E and F. *J Med Microbiol*, **59** (1), 55-64.

SENG, P.; DRANCOURT, M.; GOURIET, F.; LA SCOLA, B.; FOURNIER, P. E.; ROLAIN, J. M.; RAOULT, D. (2009): Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis*, **49** (4), 543-551.

SHERMAN, S.; KLEIN, E.; MCCLANE, B. A. (1994): *Clostridium perfringens* type A enterotoxin induces tissue damage and fluid accumulation in rabbit ileum. *J Diarrhoeal Dis Res*, **12** (3), 200-207.

SHINOZUKA, Y.; YAMATO, O.; HOSSAIN, M. A.; HIGAKI, T.; ISHIKAWA, I.; ICHIBA, S.; TAKAGI, M. (2011): Bacillary hemoglobinuria in Japanese black cattle in Hiroshima, Japan: a case study. *J Vet Med Sci*, **73** (2), 255-258.

SKARIN, H.; SEGERMAN, B. (2011): Horizontal gene transfer of toxin genes in *Clostridium botulinum*: Involvement of mobile elements and plasmids. *Mob Genet Elements*, **1** (3), 213-215.

SMITH-SLATAS, C. L.; BOURQUE, M.; SALAZAR, J. C. (2006): *Clostridium septicum* infections in children: a case report and review of the literature. *Pediatrics*, **117** (4), e796-805.

SOJKA, J. E.; BOWERSOCK, T. L.; PARKER, J. E.; BLEVINS, W. G.; IRIGOYEN, L. (1992): *Clostridium chauvoei* myositis infection in a neonatal calf. *J Vet Diagn Invest*, **4** (2), 201-203.

- SONGER, J. G. (1996): Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin Microbiol Rev*, **9** (2), 216-234.
- SONGER, J. G. (2010): Clostridia as agents of zoonotic disease. *Vet Microbiol*, **140** (3-4), 399-404.
- SONGER, J. G.; ANDERSON, M. A. (2006): *Clostridium difficile*: an important pathogen of food animals. *Anaerobe*, **12** (1), 1-4.
- SONGER, J. G.; TRINH, H. T.; DIAL, S. M.; BRAZIER, J. S.; GLOCK, R. D. (2009): Equine colitis X associated with infection by *Clostridium difficile* NAP1/027. *J Vet Diagn Invest*, **21** (3), 377-380.
- SONNABEND, O.; SONNABEND, W.; HEINZLE, R.; SIGRIST, T.; DIRNHOFER, R.; KRECH, U. (1981): Isolation of *Clostridium botulinum* type G and identification of type G botulinal toxin in humans: report of five sudden unexpected deaths. *J Infect Dis*, **143** (1), 22-27.
- SONNABEND, O. A.; SONNABEND, W. F.; KRECH, U.; MOLZ, G.; SIGRIST, T. (1985): Continuous microbiological and pathological study of 70 sudden and unexpected infant deaths: toxigenic intestinal *Clostridium botulinum* infection in 9 cases of sudden infant death syndrome. *Lancet*, **1** (8423), 237-241.
- SORG, J. A.; SONENSHEIN, A. L. (2008): Bile salts and glycine as cogerminants for *Clostridium difficile* spores. *J Bacteriol*, **190** (7), 2505-2512.
- SPARKS, S. G.; CARMAN, R. J.; SARKER, M. R.; MCCLANE, B. A. (2001): Genotyping of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with antibiotic-associated diarrhea and food poisoning in North America. *J Clin Microbiol*, **39** (3), 883-888.
- STERNE, M.; BATTY, I. (1975): Pathogenic clostridia, London, Butterworths.
- SUEN, J. C.; HATHEWAY, C. L.; STEIGERWALT, A. G.; BRENNER, D. J. (1988): *Clostridium argentinense* sp. nov.: A Genetically Homogeneous Group Composed of All Strains of *Clostridium botulinum* Toxin Type G and Some Nontoxigenic Strains Previously Identified as *Clostridium subterminale* or *Clostridium hastiforme*. *Int J Syst Bacteriol*, **38** (4), 375-381.

SUMMANEN, P.; JOUSIMIES-SOMER, H. (1988): Comparative evaluation of RapID ANA and API 20A for identification of anaerobic bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **7** (6), 771-775.

TAKAGI, M.; YAMATO, O.; SASAKI, Y.; MUKAI, S.; FUSHIMI, Y.; YOSHIDA, T.; MIZUKAMI, K.; SHOUBUDANI, T.; AMIMOTO, K.; CHUMA, T.; SHAHADA, F.; ENDO, Y.; DEGUCHI, E. (2009): Successful treatment of bacillary hemoglobinuria in Japanese Black cows. *J Vet Med Sci*, **71** (8), 1105-1108.

TITBALL, R. W.; NAYLOR, C. E.; BASAK, A. K. (1999): The *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *Anaerobe*, **5** (2), 51-64.

UMEDA, K.; SETO, Y.; KOHDA, T.; MUKAMOTO, M.; KOZAKI, S. (2012): The stability of toxigenicity in proteolytic *Clostridium botulinum* type B upon serial passage. *Microbiol Immunol*, **56** (5), 338-341.

USEH, N. M.; NOK, A. J.; ESIEVO, K. A. (2003): Pathogenesis and pathology of blackleg in ruminants: the role of toxins and neuraminidase. A short review. *Vet Q*, **25** (4), 155-159.

VELOO, A. C.; KNOESTER, M.; DEGENER, J. E.; KUIJPER, E. J. (2011a): Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry methods for the identification of clinically relevant anaerobic bacteria. *Clin Microbiol Infect*, **17** (10), 1501-1506.

VELOO, A. C.; WELLING, G. W.; DEGENER, J. E. (2011b): The identification of anaerobic bacteria using MALDI-TOF MS. *Anaerobe*, **17** (4), 211-212.

VINE, N.; FAYERS, J.; HARWOOD, D. (2006): Bacillary haemoglobinuria in dairy cows. *Vet Rec*, **159** (5), 160.

VON EICHEL-STREIBER, C.; BRAUN, V. (2008): Das difficile *Clostridium* / The difficile *Clostridium*. *LaboratoriumsMedizin*, **32** (4), 219.

WEESE, J. S. (2010): *Clostridium difficile* in food--innocent bystander or serious threat? *Clin Microbiol Infect*, **16** (1), 3-10.

WELKER, M.; MOORE, E. R. (2011): Applications of whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Syst Appl Microbiol*, **34** (1), 2-11.

WELLS, C. L.; WILKINS, T. D. (1996): Clostridia: Sporeforming Anaerobic Bacilli. In: S. Baron (Hrsg.), *Medical Microbiology*, Galveston (TX).

WILLIS, A. T.; HOBBS, G. (1959): Some new media for the isolation and identification of Clostridia. *J Pathol Bacteriol*, **77** (2), 511-521.

WITTWER, C. T.; HERRMANN, M. G.; MOSS, A. A.; RASMUSSEN, R. P. (1997): Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, **22** (1), 130-131, 134-138.

WROBLEWSKI, D.; HANNETT, G. E.; BOPP, D. J.; DUMYATI, G. K.; HALSE, T. A.; DUMAS, N. B.; MUSSER, K. A. (2009): Rapid molecular characterization of *Clostridium difficile* and assessment of populations of *C. difficile* in stool specimens. *J Clin Microbiol*, **47** (7), 2142-2148.

ZIDARIC, V.; KEVORKIJAN, B. K.; ORESIC, N.; JANEZIC, S.; RUPNIK, M. (2011): Comparison of two commercial molecular tests for the detection of *Clostridium difficile* in the routine diagnostic laboratory. *J Med Microbiol*, **60** (8), 1131-1136.

9 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: <i>Clostridium</i> spp. mit klinischer Bedeutung für Mensch und Tier (nach Hatheway, 1990; Neumeister et al., 2009).....	3
Tabelle 2: Pathogene Clostridien und ihre Toxine (nach Hatheway, 1990; Petit et al., 1999; Useh et al., 2003).....	8
Tabelle 3: <i>C. perfringens</i> Toxintypen und Erkrankungsformen (nach Petit et al., 1999; Songer, 1996)	11
Tabelle 4: Auflistung der <i>C. botulinum</i> Typen, der von ihnen betroffenen Spezies und Infektionsquellen (nach N.N., 2005).....	20
Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme.....	39
Tabelle 6: Bebrütung der <i>Clostridium</i> spp.	40
Tabelle 7: Selektivmedien zur Anzucht von <i>Clostridium</i> spp.	41
Tabelle 8: Biochemische Reaktionen des Api [®] 20 A (BioMérieux, Frankreich)	44
Tabelle 9: Primer- und Sondensequenzen für die Interne Amplifikationskontrolle..	46
Tabelle 10: Two-Step Temperatur-Zeit-Profil	46
Tabelle 11: Primer- und Sondensequenzen für den Nachweis der <i>C. perfringens</i> -Toxingene	48
Tabelle 12: Primer- und Sondensequenzen für den Nachweis der <i>cpe</i> -Genotypen .	49
Tabelle 13: Komponenten für einen Triplex-PCR-Ansatz inkl. IAC.....	50
Tabelle 14: Komponenten für eine Duplex-PCR ohne IAC.....	50
Tabelle 15: Komponenten für eine Single-PCR ohne IAC	51
Tabelle 16: Primer- und Sondensequenzen für den Nachweis von <i>boNT A, B, E</i> und <i>F</i>	52
Tabelle 17: Primer- und Sondensequenzen für den Nachweis von <i>boNT C</i> und <i>D</i> ..	53
Tabelle 18: Komponenten für eine Pentaplex-PCR inkl. IAC.....	53
Tabelle 19: Primer- und Sondensequenzen für den Nachweis von <i>C. difficile</i> , <i>C. chauvoei</i> , <i>C. septicum</i> und <i>C. haemolyticum</i>	54
Tabelle 20: Komponenten für den Pentaplex-PCR-Ansatz zum Nachweis der <i>Clostridium</i> spp. inkl. IAC.....	55
Tabelle 21: Primer- und Sondensequenzen für den Nachweis der <i>C. novyi</i> -Gene...	56
Tabelle 22: Zusammensetzung des organischen Lösungsmittel-Gemisches (OS)...	57
Tabelle 23: Bewertung der Ergebnisse der MALDI-TOF MS	60

Tabelle 24: Ergebnisse des Nachweises der <i>C. perfringens</i> -Toxingene	65
Tabelle 25: Clostridienstämme der Stammsammlung des LGL Oberschleißheim..	113
Tabelle 26: Koloniemorphologie der <i>Clostridium</i> spp. auf Blutagar (nach Hatheway, 1990; Health Protection Agency, 2008a; Rainey et al., 2009).....	117
Tabelle 27: Methodenvergleich - Ergebnisse der Untersuchung: <i>C. perfringens</i>	118
Tabelle 28: Methodenvergleich - Ergebnisse der Untersuchung: <i>C. botulinum</i>	120
Tabelle 29: Methodenvergleich - Ergebnisse der Untersuchung der übrigen <i>Clostridium</i> spp.	121

10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Ergebnisse der biochemischen Untersuchung von <i>C. perfringens</i> ...	62
Abbildung 2:	Ergebnisse der biochemischen Untersuchung von <i>C. botulinum</i>	62
Abbildung 3:	Ergebnisse der biochemischen Untersuchung von <i>C. difficile</i>	63
Abbildung 4:	Ergebnisse der biochemischen Untersuchung von <i>C. septicum</i>	63
Abbildung 5:	Verteilung der Toxintypen innerhalb der untersuchten <i>C. perfringens</i> -Stämme	66
Abbildung 6:	Verteilung der BoNT-Gene innerhalb der untersuchten <i>C. botulinum</i> -Stämme.....	66
Abbildung 7:	Verteilung der untersuchten <i>C. botulinum</i> -Stämme	68
Abbildung 8:	Ergebnisse von <i>C. perfringens</i> im Methodenvergleich	69
Abbildung 9:	Ergebnisse von <i>C. botulinum</i> im Methodenvergleich.....	70
Abbildung 10:	Ergebnisse der <i>Clostridium</i> spp. im Methodenvergleich.....	71
Abbildung 11:	Ablaufschema der Untersuchung auf <i>C. perfringens</i>	123
Abbildung 12:	Ablaufschema der Untersuchung auf <i>C. botulinum</i>	124

11 ANHANG

11.1 Nährmedien und Reagenzien zur Anzucht

11.1.1 Flüssige Medien

TPGY-Bouillon (eigene Herstellung) - Zusammenstellung für 4 Liter:

Pepton aus Casein	200,0	g
Pepton aus Fleisch	20,0	g
Hefeextrakt	80,0	g
Glukose	16,0	g
Natriumthioglycolat	4,0	g
Wasser, deionisiert	4000	ml
pH 7,0		

Clostridium difficile-Anreicherung (eigene Herstellung) - Zusammenstellung für 1

Röhrchen:

TPGY-Bouillon	9,0	ml
Taurocholsäure Natriumsalz	1,0	g
C.D.M.N. Selective Supplement,	36,0	µl

Art. SR0173 (Oxoid), Zusammensetzung:

Cysteine hydrochloride	250,0	mg
Moxalactam	16,0	mg
Norfloxacin	6,0	mg

Modified Anellis Broth (eigene Herstellung) - Zusammensetzung:

Feste Phase

5,0	%	Tryptose	25,0	g
0,5	%	Pepton	2,5	g
3,0	%	Agar	15,0	g
0,1	%	Hefeextrakt	0,5	g
0,125	%	K ₂ HPO ₄	0,625	g
			A.d. ad	500,0 ml
pH	7,5			

Flüssige Phase

0,1	%	Hefeextrakt	0,25	g
2,0	%	$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	5,0	g
0,0001	%	Thiamin-Hydrochlorid	0,25	μg
		A.d. ad	250,0	ml

11.1.2 Feste Medien

Blutagar-Blood agar base, Art. CM 0055 (Oxoid, Wesel) - Zusammensetzung:

'Lab-Lemco' Puder	10,0	g
Pepton, neutralisiert	10,0	g
Natriumchlorid	5,0	g
Agar	15,0	g
pH 7,3 \pm 0,2		

Eigelb-Laktose-Agar, Art. 183e (heipha DIAGNOSTIKA, Eppelheim) -

Zusammensetzung:

Spezialpepton	23,0	g
Stärke	1,0	g
Natriumchlorid	5,0	g
Laktose	10,0	g
Bromkresolpurpur	50,0	mg
Eigelbsuspension	50,0	ml
Agar	16,0	g
pH 7,5 \pm 0,2		

Der Nährboden ist undurchsichtig und violett gefärbt.

***Clostridium difficile*-Agar mit 7 % Schafblut**, Art. 254406 (BD Diagnostics, Heidelberg) - Zusammensetzung* pro 1 Liter destilliertem Wasser:

Peptisch abgebautes Tiergewebe	32,0	g
Fructose	6,0	g
Kaliumdihydrogenphosphat	1,0	g
Dinatriumphosphat	5,0	g
Natriumchlorid	2,0	g
Magnesiumsulfat	0,1	g
Cycloserin	0,5	g
Cefoxitin	0,016	g
Agar	20,0	g
Schafblut, defibriniert	7	%
pH 7,2 ± 0,3		

*Nach Bedarf abgestimmt und/oder ergänzt auf die geforderten Testkriterien.

Schaedler-Agar mit 5 % Schafblut (SCS), Art. 43279 (BioMérieux, Frankreich)

11.2 Arbeitsmaterialien und Geräte

11.2.1 Allgemeine Materialien

Pipetten

eppendorf Reference 10 µl, Art. 4910 000.085	(eppendorf, Hamburg)
eppendorf Reference 100 µl, Art. 4910 000.042	(eppendorf, Hamburg)
eppendorf Reference 1000 µl, Art. 4910 000.069	(eppendorf, Hamburg)

Pipettenspitzen

ep Dualfilter T.I.P.S. PCR clean, Art. 0030 077.512, 10 µl	(eppendorf, Hamburg)
ep Dualfilter T.I.P.S. PCR clean, Art. 0030 077.547, 100 µl	(eppendorf, Hamburg)
ep Dualfilter T.I.P.S. PCR clean, Art. 0030 077.571, 1000 µl	(eppendorf, Hamburg)

Reaktionsgefäß

eppendorf safe-lock-tubes 1,5 ml, Art. 0030 120.086	(eppendorf, Hamburg)
eppendorf safe-lock-tubes, 2 ml, 1000 St., Art. 0030 121.686	(eppendorf, Hamburg)

Handschuhe (Meditrade, Kiefersfelden)

Gentle Skin grip, puderfrei - unsteril, Size S, REF 1221 GRIP-S

11.2.2 Kulturelle Verfahren

Stammhaltungssystem zur Langzeitlagerung von Mikroorganismen

Cryobank Cryoröhrchen, Art. 710-0219	(MAST Diagnostica, Reinfeld)
Cryo-Gloves Wrist	(Tempshield Inc., USA)
Styropor-Transportbox für Cryoröhrchen	

Anaerobe Anzucht

Anaerobentopf 2,5 l-Volumen, Art. 1.16387.0001	(Merck, Darmstadt)
Anaerocult A mini, Art. 1.01611.0001	(Merck, Darmstadt)
Anaerocult P, Art. 1.13807.0001	(Merck, Darmstadt)

Anaeroclip, Art. 1.14226.0001	(Merck, Darmstadt)
Anaerotest Anaerobiose-Indikator, Art. 1.15112.0001	(Merck, Darmstadt)
Anaerobiertopf AnaeroJar 2.5 litre, Art. AG0025A	(Oxoid, Wesel)
Anaerobiertopf AnaeroJar 3.5 litre, Art. HP0011A	(Oxoid, Wesel)
AnaeroGen 2.5 litre, Art. AN0025A	(Oxoid, Wesel)
AnaeroGen 3.5 litre, Art. AN0035A	(Oxoid, Wesel)
AnaeroGen Compact W-Zip, AN0010W	(Oxoid, Wesel)

Geräte

Brutschrank, 37 °C ± 1 °C	(Memmert, Schwabach)
Brutschrank, 30 °C ± 1 °C	(Memmert, Schwabach)
Kühlgefrierkombination	(Liebherr, Schweiz)
Bunsenbrenner Fireboy	(TECNOMARA, Schweiz)
Glaspipetten 10 ml	
Pipettierhilfe Pipet Help	(Accumax, Indien)
Reagenzglasröhrchen mit Metallkappen, ca. Ø 16 mm Länge 160 mm	
Impfösen aus Edelstahldraht	
Mikroskop	(Leica, Wetzlar)

11.2.3 Biochemischer Nachweis**Testsystem**

API 20 A, Art. 20300	(BioMérieux, Frankreich)
----------------------	--------------------------

Reagenzien

EHR, Art. 70520	(BioMérieux, Frankreich)
BCP, Art. 70510	(BioMérieux, Frankreich)
Paraffinöl, Art. 70100	(BioMérieux, Frankreich)
ID color Catalase (ID-ASE), Art. 55561	(BioMérieux, Frankreich)
Gramfärbemittel	

Geräte

UV-Analysenlampe MinUVIS	(DESAGA-Sarstedt, Wiesloch)
--------------------------	-----------------------------

Verbrauchsmaterialien

api® PSIpettes, steril in Einzelverpackung, Art. 70250	(BioMérieux, Frankreich)
Pasteurplastpipetten bis 2,5 ml, unsteril	(VWR, Ismaning)
Sterile Applikatoren	(Böttger, Bodenmais)
Objektträger 76 x 26 mm	(MENZEL-GLÄSER, Braunschweig)

Software

apiweb™	(BioMérieux, Frankreich)
---------	--------------------------

11.2.4 Real-Time PCR**Reagenzien**

0,1x TE Puffer, Zusammensetzung:

DEPC-Treated Water, Art. AM9915G	9 ml	(Ambion, USA)
Tris-EDTA Buffer, 100x Concentrate	1 ml	(SIGMA, Schweiz)
Lysozyme - from chicken egg white, activity: \geq 40000 units/mg protein		(SIGMA, Schweiz)
DEPC-Treated Water, Art. AM9915G		(Ambion, USA)
Brilliant Multiplex QMastermix, Art. 600553		(Agilent Technologies, USA)

Primer und Sonden, Sequenzen siehe unter Methoden

Primer und Sonden	(MWG, Ebersberg)
pUC19-Plasmid	(Fermentas, St. Leon-Rot)

Geräte

Thermocycler Mx3000P QPCR System	(Agilent Technologies, USA)
Thermocycler Mx3005P QPCR System	(Agilent Technologies, USA)
Thermocycler Mx3005P hellgrau QPCR System	(Agilent Technologies, USA)
Thermomixer comfort	(eppendorf, Hamburg)
Tischzentrifuge Mini Spin	(eppendorf, Hamburg)
Centrifuge 5417R und Centrifuge 5430	(eppendorf, Hamburg)

Pipettierhilfe Multipette plus, Art. 4981 000.019	(eppendorf, Hamburg)
Pipettierautomat epMotion 5070	(eppendorf, Hamburg)
Maxwell® 16 Extraktionsautomat	(Promega, USA)
Vortex Mixer - Lab dancer	(VWR, Ismaning)
Vortex Mixer - Vortex Genie 2	(Scientific Industries, USA)
Airstream® Polymerase Chain Reaction	(ESCO Global, Singapur)
Cabinet	
Kühlschrank	(Siemens, Berlin)

Materialien

MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate	(Applied Biosystems, USA)
MicroAmp Optical adhesive film	(Applied Biosystems, USA)
PCR Sealers, Microseal 'B' Film	(BIO-RAD, USA)
Biopur® Safe-Lock tubes 1,5 ml, einzeln verpackt, Art. 0030 121.589	(eppendorf, Hamburg)
Biopur® Safe-Lock tubes 2,0 ml, einzeln verpackt, Art. 0030 121.597	(eppendorf, Hamburg)
Safe-lock tubes 0,5 ml, mix, Art. 0030 121.708	(eppendorf, Hamburg)
epT.I.P.S. Motion Pipettenspitzen: mit Filter, PCR clean, steril 50 µl	(eppendorf, Hamburg)
Combitips plus 0,2 ml, Art. 0030 069.218	(eppendorf, Hamburg)

Software

MxPro ET QPCR Software	(Agilent Technologies, USA)
------------------------	-----------------------------

11.2.5 MALDI-TOF MS

Reagenzien

Aqua dest. - DEPC treated Water	(SIGMA, Schweiz)
α-Cyano-4-hydroxyzimtsäure (α-HCCA), portion. 10 x 2,5 mg, Art. 255344	(Bruker Daltonics, USA)
Ethanol, 99,8 % reinst (F; R11; S7-16), Art. 5054.1	(Carl Roth, Karlsruhe)

Acetonitril >99,9 % (F; Xn; R11-20/21/22-36; S16-36/37), Art. AE00.1	(Carl Roth, Karlsruhe)
Ameisensäure, 70 % (vol/vol), herzustellen aus Ameisensäure, 100 % (C; R35; S23-26-45)	(Carl Roth, Karlsruhe)
Trifluoressigsäure >99,9 % (vol/vol), (C; R20-35-52/53; S9-26-27-28-45-61), Art. P088.1	(Carl Roth, Karlsruhe)

Geräte

MALDI-TOF Massenspektrometer: Microflex LT	(Bruker Daltonics, USA)
Centrifuge 5424	(eppendorf, Hamburg)
Concentrator plus, Vakuumzentrifuge	(eppendorf, Hamburg)
Vortex Mixer	

Materialien

MSP 96 target polished steel, microScout Target, Part No. 224989	(Bruker Daltonics, USA)
MSP 96 target ground steel, microScout Target, Part No. 224990	(Bruker Daltonics, USA)
Bakterienstandard: Escherichia coli DH5alpha, Art. 255343	(Bruker Daltonics, USA)
Impföse Flexibel, Art. 612-2498	(VWR, Ismaning)
Cryoboxen	(NEOLAB®, Berlin)

Software

flexControl 3.0	(Bruker Daltonics, USA)
Maldi Biotyper 2.0	(Bruker Daltonics, USA)

Referenzdatenbanken

MALDI Biotyper Datenbank (3740 Einträge)	(Bruker Daltonics, USA)
MALDI SR-Taxonomie	(Bruker Daltonics, USA)
LGL-interne Datenbank	

11.3 Übersichtstabellen und Abbildungen zu den Untersuchungen

Tabelle 25: Clostridien-Stämme der Stammsammlung des LGL Oberschleißheim

<i>Clostridium</i> spp. (Nr.)	Bezeichnung	Stammbank-Nr.	Ursprung
<i>C. perfringens</i>			
(1)	E 728	1	Stuhl
(2)	E 729	2	Stuhl
(3)	E 730	3	Stuhl
(4)	E 732	4	Stuhl
(5)	E 90	5	Stuhl
(6)	4-574/12	6	
(7)	11 B 30 mit Hämolyse	7	Hackfleisch
(8)	11 B 30 ohne Hämolyse	8	Hackfleisch
(9)	11 B 56	9	Hackfleisch
(10)	945 – 8/97	10	Hackfleisch
(11)	2943	11	Kuchen
(12)	175 - 8/97	12	Hackfleisch
(13)	195 – 8/97	13	Hackfleisch
(14)	So 1117	14	Rind
(15)	So 144	15	Schaf
(16)	L 443/05	16	Putengeschnetzeltes
(17)	So 2253/1	17	Schaf
(18)	So 2253/2	18	Schaf
(19)	11 1331	20	Hackfleisch
(20)	So 195	21	Rind
(21)	HF 2110-2	22	Hackfleisch
(22)	HF 1659	23	Hackfleisch
(23)	176 – 8/97	24	Hackfleisch
(24)	HF 2109	25	Hackfleisch
(25)	So 173 a	26	Rind
(26)	So 210 a	27	Ziege
(27)	G 315	28	Rohmilchkäse
(28)	G 316	29	Rohmilchkäse
(29)	66 Silke	30	Wild
(30)	51.4 Fasan	31	Wild
(31)	PS 981/07	32	Salat
(32)	PS 3302/07	33	Salat
(33)	PS 3938/07	34	Salat

Fortsetzung **Tabelle 25**

<i>Clostridium</i> spp. (Nr.)	Bezeichnung	Stammbank-Nr.	Ursprung
<i>C. perfringens</i>			
(34)	PS 8150/07	35	Rucola Salat
(35)	9166/07-G407	36	Schafsdärme
(36)	PS10950/07	37	Rucola Salat
(37)	21439/07-G1144	38	Steinpilzravioli
(38)	20625/07-L562/3	39	Hühnerfrikassee
(39)	21638/07-L574	40	Pilze
(40)	PS 3570/08	41	Sojakeime frisch
(41)	6465/08	42	Isolat 3426/4
(42)	6466/08	43	Isolat 3426/6
(43)	S 726	44	Schaf
(44)	6682/1	45	Chili con carne
(45)	6682/2	46	Chili con carne
(46)	6682/3	47	Chili con carne
(47)	6682/4	48	Chili con carne
(48)	68215-002	49	Mufflon Organe
(49)	10-0029262-001-01_L92	50	Gemüseeintopf
(50)	10-0029262-001-01_L93	51	Gemüseeintopf
(51)	10-0058087-1	52	Kartoffelgratin
(52)	10-0058087-2	53	Kartoffelgratin
(53)	10-0059950	54	Brennnesseltee
(54)	10-70711/4	55	Stuhl
(55)	10-70639	56	
(56)	F436	57	Mozzarella
(57)	10-164126-1	57	
(58)	11-2294	58	
(59)	11-18210	59	
(60)	11-30379-03	60	
(61)	11-44702	61	Schaf
(62)	ZL 116434 etx	63	
(63)	11-0100825-001-01	65	Ziege
(64)	3820	66	Ziege
(65)	C1063	Feldstamm	Mastitis
(66)	C1064	Feldstamm	Mastitis

Fortsetzung **Tabelle 25**

<i>Clostridium</i> spp. (Nr.)	Bezeichnung	Stammbank-Nr.	Ursprung
<i>C. botulinum</i>			
(1)	REB 1718	1	FLI Nat. Referenzlabor
(2)	REB 1955 (kleine Kolonien)	2	FLI Nat. Referenzlabor
(3)	REB 1955 (große Kolonien)	3	FLI Nat. Referenzlabor
(4)	E 2622	4	Universität Gießen
(5)	H 1_Hob. (1983)	5	Universität Gießen
(6)	H 2_Hadlock (1983) graue Kolonien	6	Universität Gießen
(7)	H 2_Hadlock (1983) glatte Kolonien	7	Universität Gießen
(8)	H 3_Nevin-57 (1982) graue Kolonien	8	Universität Gießen
(9)	H 3_Nevin-57 (1982) glatte Kolonien	9	Universität Gießen
(10)	H 5_Hadlock (1983)	10	Universität Gießen
(11)	H 6_CMM 4/12 (1977)	11	Universität Gießen
(12)	H 7_ATCC 17851	12	Universität Gießen
(13)	C 83_NCTC 7272	13	Universität Gießen
(14)	C 156_ATCC 25765	14	Universität Gießen
(15)	C 160	15	Universität Gießen
(16)	C. Bot. 6 HA	16	Universität Gießen
(17)	C. Bot. 7a HA	17	Universität Gießen
(18)	C. Bot. 7b HA	18	Universität Gießen
(19)	C. Bot. 11 HA	19	Universität Gießen
(20)	C. Bot. B	20	Universität Gießen
(21)	L50/14	21	Oliven
(22)	L50/17	22	türkische Cola
(23)	L61/2	23	Abstrich Schale
(24)	L100/2	24	roher Schinken
(25)	L100/13	25	roher Schinken
(26)	L 100/15	26	roher Schinken
(27)	2.516	27	TU München
(28)	2.518	28	TU München
(29)	2.357	29	TU München
(30)	2.358	30	TU München
(31)	2.359	31	TU München
(32)	PG 10-0034848-001-01	32	Geflügelfleisch

Fortsetzung **Tabelle 25**

<i>Clostridium</i> spp. (Nr.)	Bezeichnung	Stammbank-Nr.	Ursprung
<i>C. botulinum</i>			
(33)	PG 10-0046900-001-01	33	Geflügelfleisch
(34)	PG 10-0046900-001-02	34	Geflügelfleisch
<i>C. difficile</i>			
(1)	DSM 12056	14	
(2)	DSM 12057	15	
(3)	DSM 1296	16	
(4)	ZL Schweinedarm	17	Schweinedarm
(5)	120422/10 Med.	18	Humanisolat
(6)	G-Gr.2-K	19	Rinderkot
<i>C. chauvoei</i>			
(1)	DSM 7528	13	
(2)	Cl. chauvoei K1	26	Impfstamm
(3)	Stamm Judenburg 40 Mee 3	27	Impfstamm
<i>C. septicum</i>			
(1)	DSM 7534	11	
(2)	Para R 947	20	Impfstamm
(3)	Para R 1134	21	Impfstamm
(4)	Para R 1152	22	Impfstamm
(5)	Para R 1773	23	Impfstamm
(6)	Para R 1791	24	Impfstamm
(7)	Para R "K" Schaf 3	25	Impfstamm
<i>C. novyi</i>	DSM 14992	10	
<i>C. hämolyticum</i>	DSM 5565	7	

Tabelle 26: Koloniemorphologie der *Clostridium* spp. auf Blutagar (nach Hatheway, 1990; Health Protection Agency, 2008a; Rainey et al., 2009)

<i>Clostridium</i> spp.	Koloniemorphologie auf Blutagar
<i>C. botulinum</i> Gruppe I	Ø 2-6 mm; rund mit z. T. unregelmäßig begrenztem Saum, leicht erhabenes, abgegrenztes Zentrum, flache Peripherie; grau-weißlich durchscheinend; körnige Oberfläche; β-Hämolyse (vollständige Hämolyse)
<i>C. botulinum</i> übrige Toxintypen	Ø 1-10 mm; flacher, rauer und schwärmender als <i>C. botulinum</i> Gruppe I; β-Hämolyse
<i>C. chauvoei</i>	Ø 0,5-3 mm; rund, leicht konvex bis erhaben (oft kraterförmig), gezackte Ränder; matt-grau; β-Hämolyse
<i>C. difficile</i>	Ø 2-5 mm; rund mit gelegentlich wurzelartigem Randsaum, flach oder leicht konvex; grau-weißlich opak; matte bis glänzende Oberfläche; charakteristischer Geruch nach p-Kresol (Pferdestall) *fluoresziert grün-gelb unter UV-Licht (auf Brucella Blutagar)
<i>C. haemolyticum</i>	Ø 1-3 mm; rundlich, konvex mit leicht welligem Saum, durchscheinend; raue, matt-gräuliche Oberfläche; unvollständige Hämolyse
<i>C. novyi</i> Typ A	Ø 3-8 mm; rundlich bis ellipsoid, kuppelförmig (ältere Kulturen flach), unregelmäßig begrenzt (wellig, gelappt oder wurzelartig); blau-grau durchscheinend, matte Oberfläche; auch als sich ausbreitender Film auf dem gesamten Nährboden; β-Hämolyse * <i>C. novyi</i> Typ B sehr variabel im Erscheinungsbild
<i>C. perfringens</i>	Ø 2-5 mm; rund, kuppelförmig aufgewölbt; grau bis grau-gelblich durchscheinend; glänzende Oberfläche; Doppelzonenhämolyse (= klare Hämolysezone unmittelbar um die Kolonie, umgeben von unvollständiger Hämolyse) *Eigelb-Agar: Lecithinasereaktion (α -Toxin) in Form einer weißen opaken Aufhellung um die Kolonien
<i>C. septicum</i>	Ø 4-8 mm; rund, leicht konvex bis erhaben, wurzelartige Ränder; matt-grau; wächst häufig als feiner, verzweigter Film auf der gesamten Oberfläche des Nährbodens (Schwärmverhalten); β-Hämolyse

* Besonderheit

Tabelle 27: Methodenvergleich - Ergebnisse der Untersuchung von *C. perfringens*

<i>Clostridium</i> spp. (Nr.)	Kommentar apiweb™	Score Value	Real-time PCR
<i>C. perfringens</i>			
(1)	gute Identifizierung	2.44	positiv
(2)	gute Identifizierung	2.533	positiv
(3)	gute Identifizierung	2.543	positiv
(4)	gute Identifizierung	2.502	positiv
(5)	ausgezeichnete Identifizierung	2.589	positiv
(6)	ausgezeichnete Identifizierung	2.499	positiv
(7)	ausgezeichnete Identifizierung	2.567	positiv
(8)	sehr gute Identifizierung	2.594	positiv
(9)	ausgezeichnete Identifizierung	2.608	positiv
(10)	gute Identifizierung	2.275	positiv
(11)	ausgezeichnete Identifizierung	2.477	positiv
(12)	gute Identifizierung auf Genusebene	2.358	positiv
(13)	gute Identifizierung auf Genusebene	2.373	positiv
(14)	unzulässiges Profil	2.622	positiv
(15)	ausgezeichnete Identifizierung	2.56	positiv
(16)	ausgezeichnete Identifizierung	2.518	positiv
(17)	sehr gute Identifizierung	2.547	positiv
(18)	ausgezeichnete Identifizierung	2.625	positiv
(19)	ausgezeichnete Identifizierung	2.533	positiv
(20)	ausgezeichnete Identifizierung	2.637	positiv
(21)	ausgezeichnete Identifizierung	2.529	positiv
(22)	ausgezeichnete Identifizierung	2.686	positiv
(23)	sehr gute Identifizierung	2.538	positiv
(24)	sehr gute Identifizierung	2.614	positiv
(25)	ausgezeichnete Identifizierung	2.648	positiv
(26)	ausgezeichnete Identifizierung	2.488	positiv
(27)	ausgezeichnete Identifizierung	2.451	positiv
(28)	ausgezeichnete Identifizierung	2.28	positiv
(29)	ausgezeichnete Identifizierung	2.609	positiv
(30)	ausgezeichnete Identifizierung	2.656	positiv
(31)	ausgezeichnete Identifizierung	2.558	positiv
(32)	ausgezeichnete Identifizierung	2.518	positiv
(33)	ausgezeichnete Identifizierung	2.25	positiv
(34)	ausgezeichnete Identifizierung	2.027	positiv
(35)	ausgezeichnete Identifizierung	2.226	positiv
(36)	ausgezeichnete Identifizierung	2.144	positiv
(37)	ausgezeichnete Identifizierung	2.434	positiv

Fortsetzung **Tabelle 27**

<i>Clostridium</i> spp. (Nr.)	Kommentar apiweb™	Score Value	Real-time PCR
<i>C. perfringens</i>			
(38)	ausgezeichnete Identifizierung	2.477	positiv
(39)	ausgezeichnete Identifizierung	2.245	positiv
(40)	ausgezeichnete Identifizierung	2.534	positiv
(41)	ausgezeichnete Identifizierung	2.28	positiv
(42)	gute Identifizierung	2.281	positiv
(43)	ausgezeichnete Identifizierung	2.413	positiv
(44)	ausgezeichnete Identifizierung	2.573	positiv
(45)	ausgezeichnete Identifizierung	2.051	positiv
(46)	akzeptierbare Identifizierung	2.028	positiv
(47)	ausgezeichnete Identifizierung	2.45	positiv
(48)	ausgezeichnete Identifizierung	2.29	positiv
(49)	gute Identifizierung	2.466	positiv
(50)	ausgezeichnete Identifizierung	2.369	positiv
(51)	akzeptierbare Identifizierung	2.305	positiv
(52)	akzeptierbare Identifizierung	2.513	positiv
(53)	sehr gute Identifizierung	2.195	positiv
(54)	ausgezeichnete Identifizierung	2.281	positiv
(55)	gute Identifizierung	2.092	positiv
(56)	gute Identifizierung	2.356	positiv
(57)	ausgezeichnete Identifizierung	2.524	positiv
(58)	ausgezeichnete Identifizierung	2.028	positiv
(59)	zweifelhaftes Profil	2.001	positiv
(60)	ausgezeichnete Identifizierung	2.269	positiv
(61)	ausgezeichnete Identifizierung	2.512	positiv
(62)	gute Identifizierung	2.639	positiv
(63)	gute Identifizierung	2.526	positiv
(64)	ausgezeichnete Identifizierung	2.613	positiv
(65)	ausgezeichnete Identifizierung	2.597	positiv
(66)	ausgezeichnete Identifizierung	2.598	positiv

Tabelle 28: Methodenvergleich - Ergebnisse der Untersuchung von *C. botulinum*

<i>Clostridium</i> spp. (Nr.)	Kommentar apiweb™	Score Value	Real-time PCR
<i>C. botulinum</i>			
(1)	unzulässiges Profil	1.345	positiv
(2)	zweifelhaftes Profil	2.183	positiv
(3)	vorläufige Identifizierung	2.152	positiv
(4)	Identifizierung unakzeptierbar	1.342	positiv
(5)	vorläufige Identifizierung	2.55	positiv
(6)	vorläufige Identifizierung	2.414	negativ
(7)	vorläufige Identifizierung	2.489	positiv
(8)	vorläufige Identifizierung	2.475	negativ
(9)	vorläufige Identifizierung	2.438	positiv
(10)	sehr gute Identifizierung auf Genusebene	2.439	positiv
(11)	sehr gute Identifizierung auf Genusebene	2.473	positiv
(12)	vorläufige Identifizierung	2.077	negativ
(13)	sehr gute Identifizierung auf Genusebene	2.407	positiv
(14)	sehr gute Identifizierung: <i>C. baratii</i>	1.425	positiv
(15)	gute Identifizierung auf Genusebene	1.594	positiv
(16)	vorläufige Identifizierung	2.406	negativ
(17)	Identifizierung unakzeptierbar	2.49	positiv
(18)	vorläufige Identifizierung	2.472	positiv
(19)	vorläufige Identifizierung	2.509	negativ
(20)	vorläufige Identifizierung	2.473	positiv
(21)	Identifizierung unakzeptierbar	2.337	positiv
(22)	zweifelhaftes Profil	2.348	positiv
(23)	vorläufige Identifizierung	2.296	positiv
(24)	gute Identifizierung auf Genusebene	1.444	positiv
(25)	gute Identifizierung auf Genusebene	1.394	positiv
(26)	gute Identifizierung auf Genusebene	1.539	positiv
(27)	sehr gute Identifizierung auf Genusebene	2.623	positiv
(28)	gute Identifizierung auf Genusebene	1.489	positiv
(29)	vorläufige Identifizierung	2.517	positiv
(30)	vorläufige Identifizierung	2.562	positiv
(31)	sehr gute Identifizierung auf Genusebene	2.434	negativ
(32)	gute Identifizierung auf Genusebene	1.703	positiv
(33)	gute Identifizierung auf Genusebene	1.632	positiv
(34)	sehr gute Identifizierung auf Genusebene	2.177	positiv

Tabelle 29: Methodenvergleich - Ergebnisse der Untersuchung der übrigen *Clostridium* spp.

<i>Clostridium</i> spp. (Nr.)	Kommentar apiweb™	Score Value	Real-time PCR
<i>C. difficile</i>			
(1)	gute Identifizierung auf Genusebene	2.322	positiv
(2)	gute Identifizierung auf Genusebene	2.436	positiv
(3)	gute Identifizierung	2.367	positiv
(4)	gute Identifizierung auf Genusebene	2.504	positiv
(5)	gute Identifizierung	2.286	positiv
(6)	gute Identifizierung auf Genusebene	2.416	positiv
<i>C. chauvoei</i>			
(1)	vorläufige Identifizierung: C. botulinum/sporogenes	2.371	positiv
(2)	zweifelhaftes Profil	2.224	positiv
(3)	gute Identifizierung auf Genusebene	2.435	positiv
<i>C. septicum</i>			
(1)	ausgezeichnete Identifizierung	2.461	positiv
(2)	ausgezeichnete Identifizierung	2.29	positiv
(3)	zweifelhaftes Profil	2.286	positiv
(4)	sehr gute Identifizierung auf Genusebene	2.277	positiv
(5)	gute Identifizierung: C. beijerinckii/butyricum	2.449	positiv
(6)	sehr gute Identifizierung	2.35	positiv
(7)	ausgezeichnete Identifizierung auf Genusebene	2.316	positiv
<i>C. novyi</i>	gute Identifizierung auf Genusebene	2.218	positiv
<i>C. hämolyticum</i>	gute Identifizierung auf Genusebene	2.078	positiv

11.4 Vorgehen bei einer Untersuchung auf *Clostridium* spp. in der Lebensmittelanalytik

11.4.1 Untersuchung auf *C. perfringens*

11.4.1.1 Routinediagnostik im Lebensmittelbereich

Zunächst wird ein klassisches Koloniezählverfahren zur Keimzahlbestimmung von *C. perfringens* in Lebensmittelproben gemäß § 64 LFGB durchgeführt. Hierzu sollte ein geeignetes Selektivmedium wie z. B. Eigelb-Laktose-Agar verwendet werden. Nach Auswertung der bei 37 °C 24 h anaerob bebrüteten Platten wird anschließend zum Nachweis von *C. perfringens* und dessen Toxingene eine Real-Time PCR von verdächtigen Kulturen durchgeführt. Bei einem positiven PCR-Befund kann nach erfolgreicher Subkultivierung und Reinzucht des Erregers eine Bestätigung der Kulturen mittels MALDI-TOF MS oder in kleineren Laboratorien mittels biochemischer Testsysteme erfolgen. Dies dient zudem einer weiteren Bestätigung der Lebensfähigkeit des Erregers.

11.4.1.2 Diagnostik bei einem Ausbruchsgeschehen

Zunächst wird etwas Probenmaterial in eine unselektive Flüssiganreicherung (z. B. TPGY- oder Kochfleisch Medium) überführt und unter anaeroben Verhältnissen bei 37 °C 24 h bebrütet. Die Anreicherung soll dazu dienen, die Anzahl an lebenden Zellen in einer vorbehandelten (z. B. tiefgekühlten) Probe im Verhältnis zu toten oder subletal geschädigten Zellen zu erhöhen. Außerdem kann somit die Zielzellzahl generell auf ein detektierbares Maß angehoben werden und eventuell verspornte Keime werden reaktiviert (Lindström und Korkeala, 2006). Es folgt eine Untersuchung auf potentiell Enterotoxin-bildende *C. perfringens*-Stämme (*cpe*-Gen-positiv) mittels Real-Time PCR nach DNA-Extraktion aus der Anreicherungsbouillon. Gleichzeitig sollte ein Ausstrich der Anreicherung auf festen Nährmedien wie Blutagar oder Eigelb-Laktose-Agar erfolgen und dieser anaerob bei 37 °C 24 h bebrütet werden. Nach erfolgreicher Bebrütung wird erneut eine Real-Time PCR von verdächtigen Kolonien im Hinblick auf das Vorhandensein des *cpe*-Gens durchgeführt. Ein *cpe*-Gen-positiver PCR-Befund gilt schließlich als Grund für eine lebensmittelrechtliche Beanstandung.

Die Kolonien mit positivem PCR-Ergebnis werden wiederum mittels MALDI-TOF MS oder biochemischen Testsystemen bestätigt. Abb. 11 zeigt den schematisierten Ablauf einer Untersuchung auf *C. perfringens* im Hinblick auf die Routinediagnostik und im Falle eines Ausbruchsgeschehens.

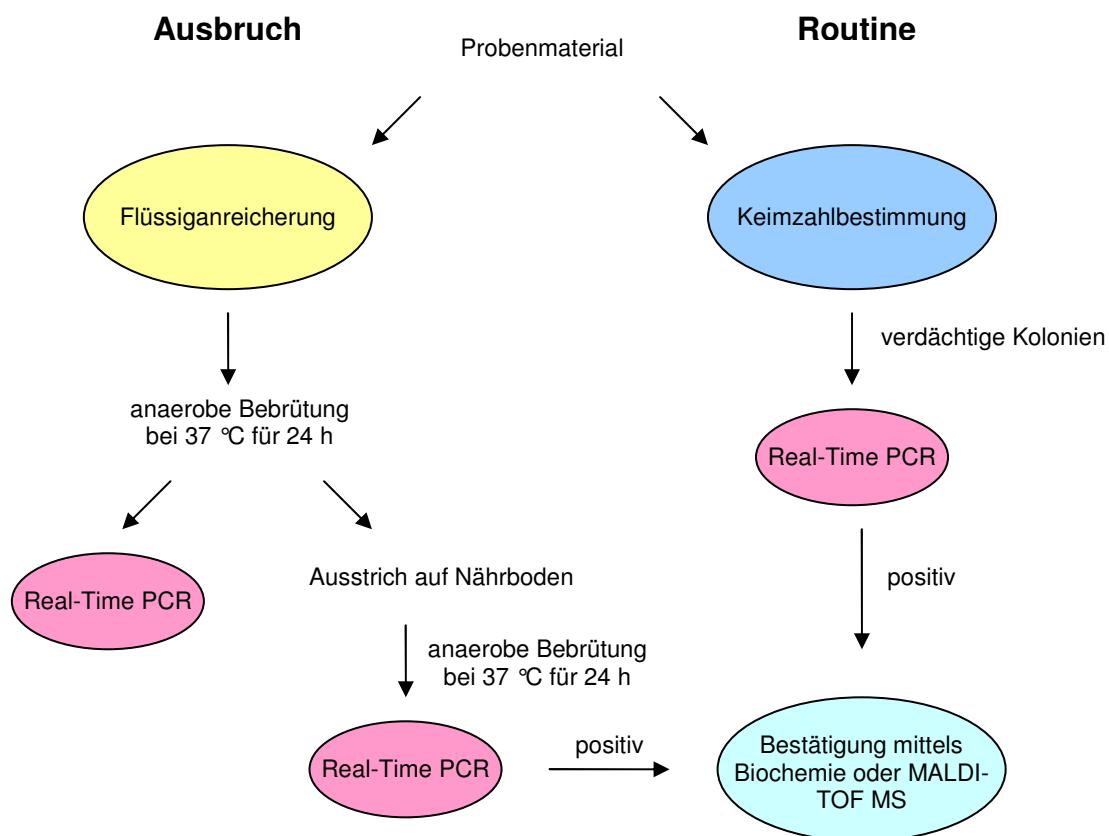


Abbildung 11: Ablaufschema der Untersuchung auf *C. perfringens*

11.4.2 Untersuchung auf *C. botulinum*

Es erfolgt zunächst die Anreicherung von Probenmaterial mittels eines unselektiven Flüssigmediums (z. B. TPGY- oder Kochfleisch Medium) und die anaerobe Bebrütung bei 30 °C während 48 h. Obwohl bei dieser Temperatur die proteolytischen Stämme von *C. botulinum* nicht optimal wachsen, wird eine Bebrütung bei 30 °C doch als Mittelwert für ein ausreichend hohes Wachstum aller Stämme angesehen (Lindström und Korkeala, 2006). Anschließend wird die Anreicherungsbouillon nach DNA-Extraktion mittels Real-Time PCR auf das Vorhandensein von BoNT-Genen überprüft.

In der Regel sollte hierbei eine Untersuchung auf die vier für die Humanmedizin bedeutendsten Toxintypen A, B, E und F ausreichen. Parallel zur PCR wird ein Ausstrich der Anreicherung auf festen Nährmedien wie Blutagar oder Eigelb-Laktose-Agar angefertigt und dieser 48 h anaerob bei 30 °C bebrütet. Nach erfolgreicher Bebrütung wird erneut eine Real-Time PCR von verdächtigen Kolonien im Hinblick auf das Vorhandensein der BoNT-Gene durchgeführt. Kolonien mit positivem PCR-Ergebnis können mittels MALDI-TOF MS oder mit biochemischen Testsystemen bestätigt werden. Gegebenenfalls empfiehlt es sich, das Toxinbildungsvermögen BoNT-Gen-positiv getesteter Keime mittels Maus-Bioassay nachzuweisen. Allerdings gilt allein ein Zusammenhang zwischen BoNT-Gen-positiven *C. botulinum*-Stämmen im Lebensmittel und gleichzeitig vorhandenen Erregern im Stuhl des Patienten - oder lediglich die Ausbildung charakteristischer Symptome beim Patienten - schon als lebensmittelrechtlich beanstandbar. In Abb. 12 wird der schematisierte Ablauf einer Untersuchung auf *C. botulinum* dargestellt.

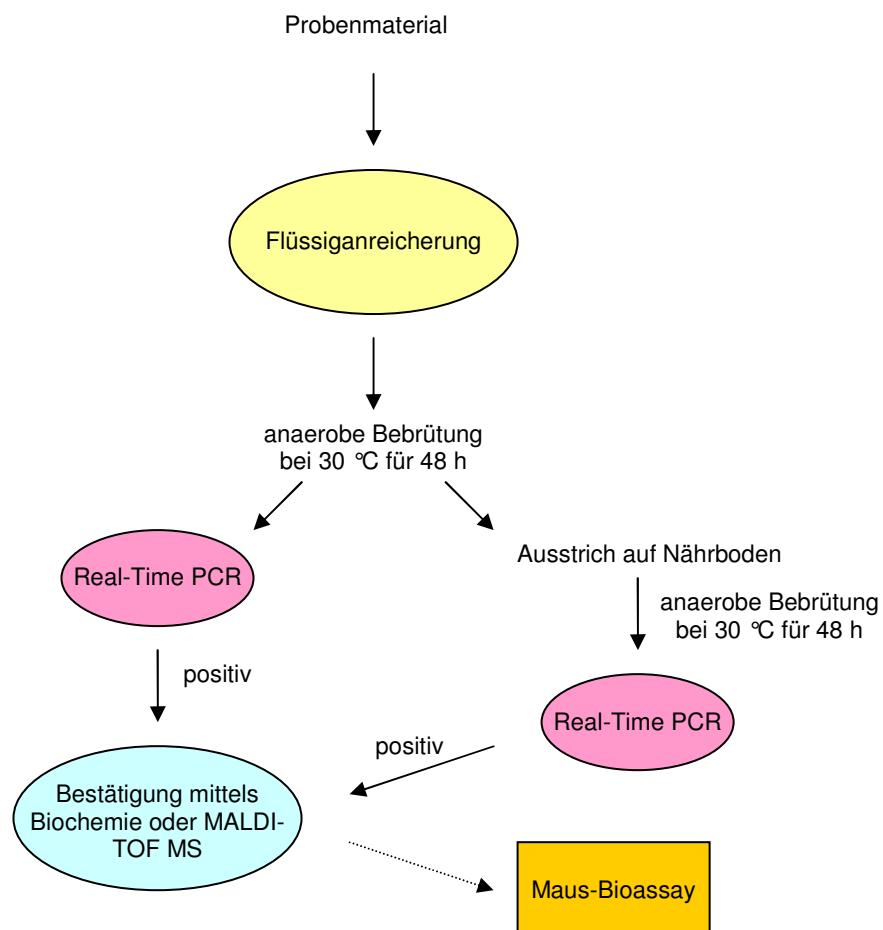


Abbildung 12: Ablaufschema der Untersuchung auf *C. botulinum*

11.4.3 Untersuchung auf *Clostridium* spp. im Lebensmittel

Nach einer Anreicherung (Medien siehe oben) von Probenmaterial unter anaeroben Verhältnissen bei 37 °C erfolgt eine Untersuchung mittels Real-Time PCR hinsichtlich speziesspezifischer Gene. Die Bebrütungsdauer richtet sich dabei nach der jeweils verdächtigten *Clostridium* spp., sollte aber mindestens 4 Tage betragen. Zusätzlich wird ein Ausstrich der Anreicherung auf festen Nährmedien wie Blutagar oder entsprechenden Selektivmedien (*Clostridium difficile*-Agar, SCS-Agar) angefertigt und anaerob bei 37 °C bebrütet. Nach erfolgreicher Bebrütung wird erneut eine Real-Time PCR von verdächtigen Kolonien durchgeführt. Die Kolonien mit positivem PCR-Ergebnis werden schließlich subkultiviert und nach erfolgreicher Reinzucht mittels MALDI-TOF MS oder biochemischen Testsystemen bestätigt.

12 DANKSAGUNG

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. E. Märtlbauer für die Vermittlung und Übernahme des Themas meiner Dissertation.

Herrn Dr. U. Busch danke ich sehr herzlich für die freundliche Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für die sorgfältige Korrekturlesung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. U. Messelhäußer für die überaus herzliche sowie stets fachkundige Betreuung und Durchsicht meiner Arbeit.

Bei Frau R. Zucker, Frau N. Hanifi und Frau D. Thäringen bedanke ich mich ganz herzlich für die jederzeit gewährte fachliche wie menschliche Beratung und Unterstützung sowie für die hervorragende Einarbeitung in die mikro- und molekularbiologischen Techniken. Mein besonderer Dank gilt außerdem Frau Dr. I. Huber für die fachkundige Beratung und Durchsicht der Arbeit sowie Frau K. Grünwald, Frau M. Maggipinto und Frau C. Wudy für die hervorragende Einarbeitung in das Gebiet der MALDI-TOF MS.

Ebenso danke ich hierbei allen Mitarbeitern des Lebensmittellabors und der Abteilung F&E, die durch ihre Hilfsbereitschaft und das ausgezeichnete Arbeitsklima zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuletzt danke ich meiner Familie von ganzem Herzen für die liebevolle Unterstützung und die Förderung in allen Lebenslagen. Ohne meinen Mann, meine Eltern und Elisabeth wären Studium und Promotion mit Kind nicht möglich gewesen.