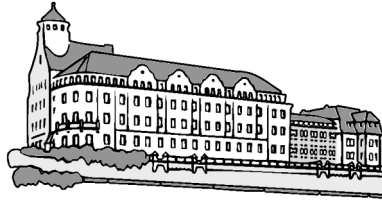


UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem Bernhard-Nocht-Institut

Hamburg

Vorstandsvorsitzender: Prof. Dr. med. Horstmann



BERNHARD-NOCHT-INSTITUT
FÜR TROPENMEDIZIN

Entwicklung einer Real-Time Multiplex PCR zum Nachweis von *Salmonella*, *Shigella* und *Yersinia* Spezies sowie *Campylobacter jejuni* im Stuhl

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Dorothea Wiemer

aus München

Hamburg, 2010

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 11.11.2010**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. med Egbert Tannich

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. med Martin Aepfelbacher

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. med. Rolf Horstmann

Meiner Mutter im Andenken

INHALTSVERZEICHNIS

1	BEDEUTUNG DER INFEKTIÖSEN GASTROENTERITIS	7
1.1	Relevante bakterielle Durchfallserreger	9
1.1.1	<i>Shigella spp.</i>	9
1.1.2	Enteritische <i>Salmonella spp.</i>	11
1.1.3	Humanpathogene <i>Campylobacter spp.</i>	13
1.1.4	<i>Yersinia enterocolitica</i> und <i>pseudotuberculosis</i>	16
1.2	Moderne diagnostische Methoden	19
1.2.1	Prinzip der PCR (Polymerase Chain Reaction)	20
1.2.2	Probenvorbereitung	22
1.2.3	DNA-Extraktion	23
1.2.4	Untersuchungsansatz	23
1.2.5	Real-Time PCR	24
1.2.6	Multiplex PCR	28
1.2.7	Real-Time Multiplex PCR	28
1.3	PCR in der Diagnostik enteropathogener Bakterien	29
1.3.1	PCR für <i>Shigella spp.</i>	29
1.3.2	PCR für enteritische <i>Salmonella spp.</i>	30
1.3.3	PCR für humanpathogene <i>Campylobacter spp.</i>	32
1.3.4	PCR für enteropathogene <i>Yersinia spp.</i>	32
1.3.5	Ausblick	33
2	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	34
3	METHODEN	35
3.1	Allgemeiner Versuchsaufbau	35
3.2	Primer-Design	36
3.3	Gewinnung von Material zur DNA-Extraktion aus Bakterienkulturen	39
3.4	DNA-Extraktion aus Bakterienkulturen	39
3.5	Positivproben	40
3.6	Reaktionsansätze zur Optimierung der Primer- und Magnesiumkonzentrationen	40
3.6.1	Standardansatz	41
3.6.2	Funktion und Einstellung des Thermocyclers	41

3.7	Herstellung der Bakterienverdünnungen für die Prüfung der Nachweisgrenze	43
3.8	Gewinnung von DNA-Templates aus den Bakterienverdünnungen	44
3.9	Gewinnung von DNA-Templates aus beimpften Stühlen und Stuhlproben von Patienten	45
3.10	Herkunft der klinischen Proben zur Testung mit konventionellen mikrobiologischen Untersuchungen und PCR	46
4	ERGEBNISSE	47
4.1	Ermittlung der optimalen PCR-Bedingungen	47
4.1.1	Vergleich unterschiedlicher Primerkonzentrationen	47
4.1.2	Optimierung der Temperatur Protokolle	50
4.1.3	Weitere Einstellungen	51
4.2	Protokoll der Real-Time Multiplex PCR zum Nachweis enteropathogener Keime im Stuhl auf RotorGene 6000	53
4.3	Semiquantifizierung	55
4.4	Robustheit	56
4.5	Sensitivitätsprüfung	58
4.6	Spezifitätsprüfung	61
4.7	Klinische Prüfung	64
4.7.1	Beschreibung der Probenkollektive	64
4.7.2	Ergebnisse der Real-Time Multiplex PCR bei Proben aus klinischem Routinebetrieb im Vergleich mit der mikrobiologischen Standarddiagnostik	66
4.7.3	Ergebnisse der Real-Time Multiplex PCR bei Proben von Reiserückkehrern im Vergleich mit der mikrobiologischen Standarddiagnostik	69
4.7.4	Gesamtergebnis	71
5	DISKUSSION	73
5.1	Stellenwert der PCR in der Diagnostik enteropathogener Bakterien	73
5.2	Bisherige Untersuchungen	73
5.3	Analytische Empfindlichkeit der neuen Real-Time Multiplex PCR	75
5.4	Spezifität der neuen Real-Time Multiplex PCR	75

5.4.1	Spezifität für <i>Campylobacter jejuni</i> und <i>Campylobacter</i> spp.	75
5.4.2	Spezifität für <i>Shigella</i> spp.	76
5.4.3	Spezifität für <i>Salmonella</i> spp.	77
5.4.4	Spezifität für <i>Yersinia</i> spp.	77
5.5	Klinische Sensitivität der neuen Real-Time Multiplex PCR	78
5.6	Ergebnisse in den einzelnen Untersuchungsgruppen	80
5.7	Vergleich mit der konventionellen mikrobiologischen Diagnostik	81
5.8	Vorteile der Real-Time Multiplex PCR	82
5.9	Einsatzmöglichkeiten	84
5.10	Schlussfolgerung	85
6	ZUSAMMENFASSUNG	86
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	87
8	LITERATUR	89
9	MATERIAL	105
9.1	Bezugsquellen	106
9.1.1	Labormaterial	106
9.1.2	Hersteller von Thermocyclern	106
9.2	Tabellen	107
9.3	Abbildungsverzeichnis	114
9.4	Tabellenverzeichnis	115
10	DANKSAGUNG	117
11	LEBENS LAUF	118
12	EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG	119

1 Bedeutung der infektiösen Gastroenteritis

Gastroenteritis ist ein häufiges Problem, das mehr als drei Viertel der Weltbevölkerung betrifft. Jeder Mensch weltweit kann statistisch bis zu zwölfmal pro Jahr an Durchfall erkranken; betroffen sind davon vor allem die Kinder unter 5 Jahren (Guerrant et al. 1990). Für Erwachsene wird die Erkrankungshäufigkeit in den USA bei 0,1 bis 3,5 Episoden angegeben (Roy et al 2006). 2008 verstarben 1.7 Millionen Menschen an den Folgen einer Diarrhö, vorwiegend wieder Kinder unter 5 Jahren in Entwicklungsländern. Somit gehen 2,9 % der Gesamtsterblichkeit weltweit auf eine infektiöse Enteritis zurück (WHO 2008). Aber auch in entwickelten Ländern spielt die Enteritis eine nicht unerhebliche Rolle (Mead et al. 1999, Allos et al 2004, Pawlowski et al 2009). In den USA sterben 1500 Menschen pro Jahr infolge einer Diarrhö und es werden etwa 46 000 Patienten zur Behandlung einer Enteritis und ihrer Folgen ins Krankenhaus eingewiesen (Allos et al 2004).

Die Ursachen sind vielfältig, häufig handelt es sich um Infektionen. Etwa 80 % der Erkrankungen sind Nahrungsmittel assoziiert (Mead et al. 1999). Der Grund wird in den entwickelten Ländern in den veränderten Essgewohnheiten der Menschen gesehen. Es wird vermehrt auswärts gegessen, z. B. in Kantinen, in denen Essen in großen Mengen und möglichst billig produziert wird. Auch Nahrungsmittelimporte von Obst und Gemüse aus den Entwicklungsländern spielen vermutlich eine Rolle (DuPont 2009). In den Entwicklungsländern ist es vor allem die Armut und die damit verbundene Überbevölkerung, Hygienemängel und ein niedriger Bildungsstand, die zur hohen Morbidität und Mortalität durch Diarrhö führen (Oni 1996, Pawlowski et al. 2009, Cairncross et al. 2010).

Als Ursache einer infektiösen Gastroenteritis kommen in erster Linie Viren, dann Bakterien und schliesslich die Gruppe der Protozoen und Helminthen in Frage. Schätzungsweise die Hälfte aller Gastroenteritiden weltweit werden durch Noroviren verursacht (Glass et al. 2000), während Kinder unter 5 Jahren vorwiegend an Rotaviren erkranken (Widdowson et al. 2005). Diese tragen bei den Kindern, insbesondere in den Entwicklungsländern, erheblich zur Mortalität bei. Somit sind Viren die führenden Verursacher von Gastroenteritiden (Musher und Musher 2004).

Unter den Protozoen sind *Giardia* und *Cryptosporidium* weltweit die häufigsten Erreger (Karanis et al. 2002). Obwohl Darmparasiten und Würmer vorwiegend in den

Entwicklungsländern bei schlechten hygienischen Bedingungen und Überbevölkerung der Lebensräume eine Rolle spielen, verursachen gerade *Giardia* und *Cryptosporidium* auch in Industrieländern immer wieder Ausbrüche (Pawlowski et al. 2009).

Die zweithäufigsten Enteritiserreger sind Bakterien. In Deutschland wurde im Jahr 2009 die Meldeliste bakterieller Durchfallserreger von *Campylobacter spp.* mit 57 006 Erkrankungen angeführt, gefolgt von Salmonellen mit 28 919 Erkrankungen, dann darmpathogene *E. coli* (5623 Erkrankungen), Yersinien (3373 Erkrankungen), EHEC (775 Erkrankungen) und Shigellen mit 574 Erkrankungen (RKI 2009).

Meistens sind infektiöse Enteritiden selbstlimitierend und erfordern nur eine symptomatische Behandlung (Thielman und Guerrant 2004). Ein Erregernachweis ist dabei entbehrlich (Rohner et al 1997). Treten aber gehäuft Erkrankungen auf oder kommt es zu Epidemien, insbesondere in Gemeinschaftseinrichtungen, Heimen, Kasernen oder auf Schiffen, ist es zwingend erforderlich, den Erreger und damit die mögliche Infektionsquelle zu identifizieren, um eine weitere Ausbreitung aufzuhalten. Außerdem kann je nach Erreger über eine eventuell doch erforderliche antibiotische Behandlung und Isolationsmaßnahmen entschieden werden. Hierzu liegen auch entsprechende Regelungen durch das Infektionsschutzgesetz vor (Regelungen für die Bekämpfung übertragbarer Krankheiten nach Abschnitt 6 §§33-36, Abschnitt 8 §42 sowie §§70 u. 71 IfSG).

Die klassische Diagnostik der bakteriellen Erreger aus Stuhlproben ist seit langem etabliert. In den Basisprogrammen der mikrobiologischen Institute in Deutschland wird in der Regel beim Erwachsenen nach Salmonellen, Shigellen, *Campylobacter spp.* und Yersinien gesucht. Bei Kleinkindern wird die Untersuchung um pathogene *E. coli* erweitert. Das zu untersuchende Erregerspektrum orientiert sich an der Meldepflicht nach § 7 IfSG. Bis ein Ergebnis vorliegt, vergehen im Allgemeinen mindestens 48 Stunden, weitere Subspezifizierungen der Erreger benötigen oft noch mehr Zeit (Tschäpe et al. 2009). Nicht immer ist das Ergebnis zuverlässig, da es viele Fehlerquellen im diagnostischen Verfahren gibt (Sachse 2004, Mackay 2004)). Oft ist kein Erreger nachweisbar, da einige Arten besondere Anforderungen an Transport und Anzuchtbedingungen stellen.

1.1 Relevante bakterielle Durchfallserreger

Im Folgenden werden die vier vorherrschenden bakteriellen Durchfallserreger bei Erwachsenen in Deutschland vorgestellt.

1.1.1 *Shigella* spp.

1.1.1.1 Taxonomie und Eigenschaften

Shigellen sind gramnegative, unbewegliche, säureresistente Bakterien mit einer Generationszeit von 30 min. Shigellen und enteroinvasive *E. coli* (EIEC) unterscheiden sich nur durch einige wenige Stoffwechseleigenschaften (Jin et al. 2002). Shigellen werden nach biochemischen Merkmalen und spezifischen O-Antigenen in folgende Serogruppen unterteilt:

- Gruppe A: *Shigella dysenteriae*
- Gruppe B: *Shigella flexneri*
- Gruppe C: *Shigella boydii*
- Gruppe D: *Shigella sonnei*

Alle Shigellen besitzen ein aus Lipopolysacchariden bestehendes Endotoxin, das zur entzündlichen Reizung der Darmschleimhaut beiträgt (Greisman und Hornick 1972). Nur *Shigella dysenteriae* Typ 1 bildet zusätzlich ein Exotoxin, das Shiga-Toxin 1, das zu schweren toxischen Krankheitsbildern führen kann (RKI 2001). Sie besitzen alle das Lipopolysaccharid O-Antigen und sind Cytochromoxidase negativ. Typisch ist die Unfähigkeit, Saccharose, Laktose oder Xylose abzubauen. Alle, bis auf *S. dysenteriae*, sind Katalase positiv (Heesemann 2001).

1.1.1.2 Krankheitsbild und Pathogenese

Der Mensch ist das einzige Reservoir für Shigellen. Die Übertragung erfolgt fäkal – oral entweder direkt von Mensch zu Mensch oder durch kontaminiertes Trinkwasser und Lebensmittel. Fliegen können als mechanische Vektoren dienen. Bereits 10-200 Shigellen lösen eine Infektion aus. Die Inkubationszeit beträgt 12-96 Stunden. Ansteckungsfähigkeit besteht bis zu 4 Wochen nach der akuten Erkrankung, Dauerausscheider sind sehr selten (RKI 2001).

Shigellen haben wie Salmonellen und Yersinien die Fähigkeit, durch die M-Zellen des Darmepithels hindurch in die Peyer'schen Plaques zu gelangen. Dort werden sie von

Makrophagen aufgenommen. Diese können die Shigellen aber nicht eliminieren, stattdessen bewirken die Bakterien den programmierten Zelltod (Apoptose) der Makrophagen. Wieder freigesetzt, dringen die Erreger in die Darmepithelzellen ein, vermehren sich darin und infizieren benachbarte Zellen. Dabei werden die Tight Junctions zwischen den Zellen zerstört.

Um sich weiter auszubreiten, benutzen die Erreger zelleigene Aktinfilamente. Die Zerstörung der Tight Junctions und die massiv von den infizierten Zellen ausgeschütteten Zytokine führen zum Krankheitsbild mit schleimig, blutigen Diarrhöen und Entzündung der Darmschleimhaut, vor allem im Dickdarm. Es kommt zu einer zunehmenden Dehydratation, die tödlich sein kann. Andererseits werden durch die Entzündungsreaktion neutrophile Granulozyten angelockt, die im Gegensatz zu den Gewebsmakrophagen in der Lage sind, die Shigellen zu eliminieren und so die Erkrankung limitieren (Zychlinsky und Raupach 2003).

Die Fähigkeit, in eukaryote Zellen einzudringen, die Abwehrmechanismen zu überleben und sich sogar in den Zellen zu vermehren, wird den Shigellen durch ein 220 kbp großes Virulenzplasmid ermöglicht, das für die hierzu benötigten Gene kodiert (Sansonetti et al. 1982). Es enthält unter anderem die Information für das Typ-III-Protein-Sekretions/Translokationssystem, für Effektorproteine zur Zellinvasion (Ipa), zur intrazellulären Ausbreitung (Ics) und zur Apoptoseinduktion (Caspase 1-Aktivierung durch IpaB) sowie zur IL1- β -Freisetzung. Ohne dieses Plasmid sind Shigellen nicht virulent (Wei et al. 2003). Der ipaH-Genlocus auf diesem Plasmid kommt sowohl bei allen Shigellen als auch bei EIEC vor und ist spezifisch für diese Bakterien (Buysse 1995).

1.1.1.3 Epidemiologie

Shigellenruhr ist eine der häufigsten Ursachen für Diarrhöen bei Kindern in Entwicklungsländern (Kotloff et al. 1999). Die WHO gab an, dass vor 10 Jahren 69 % aller Diarrhöepisoden (11,53 Millionen) bei Kindern unter 5 Jahren auf Shigellen zurückzuführen waren (WHO 1999). Die Erkrankung tritt vermehrt in den warmen Monaten auf. In Deutschland waren 2001 71 % aller Infektionen im Ausland erworben, in erster Linie in Ägypten, der Türkei, Tunesien, Indien, Marokko und der Dominikanischen Republik (Hellenbrand 2003).

Die einzelnen Serogruppen können bestimmten Regionen zugeordnet werden. So ist *S. boydii* vor allem auf dem indischen Subkontinent vertreten, während *S. sonnei* eher in den Industrienationen zu Erkrankungen führt. In allen anderen Entwicklungsländern weltweit findet man vorwiegend *S. flexneri* (Kotloff et al 1999). *S. dysenteriae* Serovar 1 mit dem zytotoxischen Shiga-Toxin (Stx) tritt relativ selten auf, verursacht dann aber häufig Epidemien, die besonders in ärmeren Ländern viele Todesfälle verursachen (Sansone 2001).

1.1.1.4 Nachweis

Zum Nachweis von Shigellen sind spezielle Transportmedien für den Stuhl erforderlich, wie gepufferte Glycerinlösung oder Cary-Blair Transportmedium. Ohne diese werden Shigellen im Stuhl rasch durch metabolische Ansäuerung oder die Begleitflora geschädigt, so dass die Anzucht nicht mehr gelingt (Dutta et al. 2001). Nach Anreicherung in Selenit-Bouillon erfolgt die Kultur auf McConkey, SS-Agar oder XLD-Agar. Die biochemische und serologische Differenzierung kann nach einer Anzuchtzeit bei 37°C über 18–24 Stunden erfolgen (Heesemann 2001).

1.1.2 Enteritische *Salmonella* spp.

1.1.2.1 Taxonomie und Eigenschaften

Salmonellen sind 0,7-1,5 x 2-5 µm große, gramnegative, gerade, fakultativ anaerobe Stäbchen. Sie sind bis auf das Serovar Gallinarum-Pullorum beweglich und peritrich begeißelt. Salmonellen sind nicht in der Lage, Lactose zu verstoffwechseln (Heesemann 2001).

Die Taxonomie der Salmonellen ist uneinheitlich und hat eine mehrfache Neuordnung erfahren. Man unterscheidet *Salmonella enterica* (*S. enterica* ssp. *enterica* Serovar Enteritidis) mit 6 Subspezies von *S. bongori*. Anhand der Oberflächen (O-) und Geißel (H-) Antigene können die Einzelspezies noch in bis zu 1500 Serovare unterteilt werden. Insgesamt wurden mehr als 2400 Serovare beschrieben (Tindall et al. 2005).

Im klinischen Zusammenhang ist die Unterteilung in „typhöse Salmonellen“ (*S. typhi*, *S. paratyphi*) als Erreger von Typhus und Paratyphus und „enteritische Salmonellen“ als Verursacher der Salmonellenenteritis gebräuchlich (Heesemann 2001).

1.1.2.2 Krankheitsbild und Pathogenese

Im Gegensatz zu typhösen Salmonellen, die vor allem Menschen und einige wenige Primaten infizieren, werden enteritische Salmonellen bei einem breiten Wirtsspektrum gefunden (Heesemann 2001). Reservoir stellen Rinder, Schweine und Geflügel, aber auch Reptilien, Vögel und andere Tiere, einschließlich Heimtiere, dar.

Die Übertragung erfolgt durch Kontamination. In 0,01-0,1 % der Fälle sind Hühnereier bereits im Eileiter bei der Eischalenbildung infiziert (de Buck et al. 2004). Die Inkubationszeit beträgt zwischen 6 und 72 Stunden, abhängig von der Menge der aufgenommenen Bakterien. Meist sind 10^4 bis 10^6 Erreger für eine klinisch manifeste Infektion erforderlich. Werden geringere Keimmengen aufgenommen, kann es symptomarme oder symptomlose Verläufe geben. Die Symptome setzen plötzlich ein und dauern meist nur wenige Stunden oder Tage (Heesemann 2001).

Die Keimausscheidung hält im Mittel 3-6 Wochen an, eine Dauerausscheidung über mehr als 6 Monate ist selten. Eine antibiotische Behandlung wird außer bei schweren Verläufen nicht empfohlen, da sie die Dauer der Bakterienausscheidung verlängert. Die Letalität der Erkrankung ist mit 0,1 % gering (RKI 2002).

Die Invasion der gastrointestinalen Schleimhaut durch Salmonellen wird durch die Funktion von Virulenzgenen vermittelt, die auf den sogenannten Salmonella-Pathogenitätsinseln (SPI 1 bis SPI 5) lokalisiert sind (Hansen-Wester und Hensel 2001). Mit Hilfe ihrer polaren Fimbrien binden die Bakterien an die M-Zellen des unteren Dünndarms und bewirken durch das auf der Pathogenitätsinsel SPI 1 lokalisierte Typ-III-Sekretionssystem die Aufnahme in die Zellen. In einer Vakuole wandern sie durch die Zelle hindurch und werden dann von Makrophagen und anderen Zellen aufgenommen.

Dabei lösen sie eine Entzündungsreaktion mit vermehrter Chloridsekretion der Darmschleimhaut und Einwanderung von Neutrophilen aus. Dies führt zu wässrigen Stühlen, die im Verlauf der Erkrankung blutig werden können. Typische Gastroenteritissymptome, wie Übelkeit, Erbrechen und Bauchschmerzen sind meist auch vorhanden, Fieber ist nicht obligat.

Mit Hilfe eines zweiten auf SPI 2 kodierten Typ-III-Sekretionssystems können Salmonellen, außer *S. bongori*, in den Makrophagen überleben und sich vermehren. Aus ihnen setzen sie sich ebenso wie die Shigellen durch Apoptose frei und

vermehren sich dann auch extrazellulär. Dann können die systemische Verbreitung und die sekundäre Besiedelung anderer Organe, wie Leber und Milz stattfinden (Heesemann 2001).

1.1.2.3 Epidemiologie

Salmonelleninfektionen sind lebensmittelbedingte Erkrankungen und kommen weltweit vor. Eine direkte Übertragung von einem Salmonellen tragenden Tier auf den Menschen ist für Heimtiere beschrieben worden (Weber und Schwarzkopf 2002). Infektionen können entweder sporadisch, als Familienerkrankungen oder als Epidemien auftreten. Die Erreger überleben in der Umwelt oder auf verschiedenen Lebensmitteln für Monate. Sie vermehren sich mit einer sehr kurzen Generationszeit bei Temperaturen von 6–47°C. Einfrieren tötet sie nicht ab. In Deutschland werden *S. enteritidis* und *S. typhimurium* am häufigsten als Verursacher einer enteritischen Salmonellose erfasst (RKI 2009).

1.1.2.4 Nachweis

Salmonellen kultiviert man direkt auf Selektivmedien wie SS-, MacConkey- und XLD-Agar bei 37°C. Sie sind als Kolonien mit schwarzem Zentrum auf SS- oder XLD-Agar oft schon nach 24 Stunden zu erkennen. Sie werden dann isoliert, zur weiteren Subspezifizierung angezüchtet oder direkt nach dem Kauffman-White-Schema serotypisiert. Für Proben, die mit großer Wahrscheinlichkeit wenige Keime enthalten, sollte eine Anreicherung in Flüssigmedien erfolgen (Heesemann 2001).

1.1.3 Humanpathogene *Campylobacter spp.*

1.1.3.1 Taxonomie und Eigenschaften

Campylobacter gehört nicht zur Familie der *Enterobacteriaceae*, wie Shigellen, Salmonellen und Yersinien, sondern bildet eine eigene Gattung in der Familie der *Campylobacteraceae*. *Campylobacter* sind schlanke, gebogene bis spiralgewundene, gramnegative, nicht sporenbildende Stäbchen.

Sie sind etwa 0,2 bis 0,5 µm breit und 0,5 bis 5 µm lang. Sie tragen uni- oder bipolar eine Geißel und zeigen eine lebhaft, korkenzieherartige Beweglichkeit. In älteren Kulturen können sie kokkoid degenerieren. Sie wachsen nur mikroaerophil, d.h. in Gegenwart von etwa 5 % Sauerstoff. Aerobe oder anaerobe Umgebungen behindern ihr Wachstum. Sie sind Oxidase und Katalase positiv, im Gegensatz zu den anderen

Enterobacteriaceae. Kohlenhydrate werden weder fermentiert noch oxidiert. Aminosäuren und Zwischenprodukte des Tricarbonsäurezyklus dienen als Energiequelle. Die Atmung kann durch die Reduktion von Nitrat erfolgen. Man zählt daher *Campylobacter* zu den sogenannten Nitratatmern (Vogt et al. 2005).

Die Nomenklatur der *Campylobacter* und ihrer Verwandten hat in den letzten Jahren mehrfache Überarbeitungen erfahren (Vandamme 2000). Man unterscheidet mehr als 16 Spezies und 6 Subspezies (On 2001). Zu den humanpathogenen Arten gehören *C. jejuni* mit seinen Subspezies *jejuni* und *doylei*, *C. coli*, *C. fetus* und Subspezies *fetus*, *C. lari*, *C. upsalensis*, *C. hyointestinalis*, *C. sputorum* und *C. concisus* (Moore et al. 2005). *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* und *C. upsalensis* werden zu den sogenannten thermophilen *Campylobacter* Arten gezählt, die ihr Wachstumsoptimum bei 42°C haben.

1.1.3.2 Krankheitsbild und Pathogenese

Bei Tieren, wie Rind, Schaf und Schwein, verursacht eine Infektion mit *Campylobacter spp.* enterale und fetale Manifestationen, die zum Abort führen können. Schlachtvieh und Geflügel sind die wichtigste Erregerquelle für den Menschen. Die Übertragung erfolgt durch Lebensmittel, aber auch durch Oberflächenwasser. Eine Dosis von etwa 500 Keimen reicht für eine klinisch manifeste Erkrankung aus (RKI 2007).

Nach der oralen Aufnahme und Passage durch den Magen vermehren sich die *Campylobacter* in der Galleflüssigkeit und im oberen Dünndarm. Von dort befallen sie gleichermaßen Jejunum, Ileum und Colon. Sie binden zunächst an den Mukus oder die intestinalen Zellen. Dies erfolgt über Adhäsine CadF (*Campylobacter* adhesion to fibronectin), Lipoprotein JlpA, das bifunktionale Protein Peb1 und den Autotransporter CapA (Vogt et al. 2005).

Es kommt entweder zu einer asymptomatischen Besiedelung oder zu Durchfallssymptomen. Relativ typisch ist ein Prodromalstadium mit starken Kopf- und Gliederschmerzen und sogar Meningismus vor Einsetzen der Diarrhoe. Auf Grund ihrer Beweglichkeit, der schraubenförmigen Gestalt und durch Chemotaxis können die *Campylobacter* die Schleimschicht durchdringen und in die darunter liegenden Zellen eindringen. *Campylobacter* besitzen kein Typ-III-Sekretionssystem wie Salmonellen, Yersinien und Shigellen. Vielmehr scheinen die Flagellen und von ihnen

sezernierte Proteine eine wesentliche Rolle bei der Invasion in die Darmepithelzelle zu spielen. Nach der Invasion befinden sich die *Campylobacter* in sogenannten CCV (Campylobacter containing vacuoles) und können überleben, indem sie die Fusion mit Lysosomen verhindern. Von der Darmepithelzelle aus ist eine Durchdringung der Lamina propria durch Transzytose und eine nachfolgende systemische Infektion möglich (Niefnecker 2009).

Für *Campylobacter jejuni* und *C. coli* sind außerdem Zytotoxine (cytolethal distending toxin, CDT) beschrieben, die ebenfalls zur Durchfallsymptomatik beitragen (Kist 2001).

Aufgrund einer Kreuzreaktion der gegen die Epitope des LPS-Kernoligosaccharids induzierten Antikörper mit den Gangliosiden (z.B. 6M1) im zentralen und peripheren Nervensystem, kann es als Folgeerkrankungen zum Guillan-Barré Syndrom kommen. Allerdings ist der genaue Pathomechanismus noch nicht vollständig geklärt (Vogt et al. 2005).

1.1.3.3 Epidemiologie

Campylobacter ist eine der weltweit häufigsten Ursachen der bakteriellen Enteritis (Zilbauer et al. 2008). In Deutschland gibt es mittlerweile mehr Diarrhöen durch *Campylobacter* als durch Salmonellen (RKI 2007). Besonders oft treten die Erkrankungen in ländlichen Gebieten und während der warmen Jahreszeit auf (Kist 2001). Betroffen sind vor allem Kinder unter 6 Jahren und junge Erwachsene zwischen 18 und 35 Jahren (RKI 2007).

C. jejuni ist mit mehr als 80 % der am meisten nachgewiesene Enteritiserreger, gefolgt von *C. coli* mit etwa 10 %. Die Erfassung präziser Zahlen wird durch die aufwändige Speziesdiagnostik, die oft nicht durchgeführt wird oder ungenau ist, erschwert (RKI 2007). *C. upsalensis*, *C. lari* und *C. hyointestinalis* verursachen nur in Einzelfällen Diarrhöen, die meist sehr milde verlaufen. *C. fetus* ist als Sepsis- und Meningitiserreger bei Neugeborenen, Säuglingen und Immungeschwächten beschrieben worden (Hu und Kopecko 2003). *C. sputorum* verursacht Abszesse, *C. concisus* eine Periodontitis (Logan et al. 2001).

Die Erreger sind relativ empfindlich gegen Austrocknen, extreme pH-Werte und Temperaturen über 25°C. In der Kälte hingegen, z.B. im Kühlschrank, überleben sie je nach Temperatur bis zu mehrere Monate, ebenso in Feuchtigkeit (Vogt et al. 2005).

Thermophile *Campylobacter spp.* können unter schwierigen Umgebungsbedingungen einen besonderen Zustand einnehmen, in dem sie lebensfähig aber nicht kultivierbar sind. Dieses viable-but-non-culturable-Stadium existiert auch bei anderen humanpathogenen Erregern wie z.B. *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Vibrio cholerae* und *Legionella pneumophila* (Tholozan et al. 1999). Einige Autoren beschreiben diese Form als eine Art Schutzzustand, bei dem sich die Keime in einem Ruhestadium befinden und später, unter besseren Bedingungen, wieder wachsen können. Andere Verfasser bezeichnen dieses Stadium als eine degenerative Form des beginnenden Zelltodes. Die Bakterien bleiben in diesem Zustand aber infektiös (Kasimir 2005).

1.1.3.4 Nachweis

Die mikrobiologische Diagnostik erfolgt auf blut- oder charcoalhaltigen Selektivnährböden. Zur Unterdrückung von Begleitflora werden den Nährböden Antibiotika in verschiedenen Kombinationen zugesetzt. Die Bebrütung dauert mindestens 48 Stunden und muss unter mikroaerophilen Bedingungen bei 37°C oder 42°C stattfinden. Eine vorläufige Identifizierung kann bereits mikroskopisch im Phasenkontrastmikroskop stattfinden. Danach folgt die Differenzierung der Spezies durch ihre biochemischen Eigenschaften oder serologisch. Merkmale sind unter anderem die positive Katalase und Oxidasereaktion, die Fähigkeit zur Hippurat-Hydrolyse oder die unterschiedliche Nalidixinsäureresistenz (Kist 2001, Vogt et al. 2005).

1.1.4 *Yersinia enterocolitica* und *pseudotuberculosis*

1.1.4.1 Taxonomie und Eigenschaften

Yersinien sind gramnegative, fakultativ anaerobe, psychrophile Stäbchen. Sie liegen bei 25°C als kokkoide und bei 37°C als stäbchenförmige, pleomorphe, kapsellose, Kurzstäbchen vor. Die enteropathogenen Yersinien sind mono- oder peritrich begeißelt und beweglich. Sie sind Oxidase negativ und Katalase positiv. Biochemisch sind sie charakterisiert durch die Ureasebildung und ihre Fähigkeit, Nitrat zu Nitrit zu reduzieren. Man unterscheidet 10 Arten, die bei verschiedenen Tieren vorkommen. Die taxonomische Einordnung der 11. Art, *Y. ruckerii*, die fischpathogen ist, ist noch nicht endgültig entschieden. Humanpathogen sind *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica* (Hartmann 2007).

1.1.4.2 Krankheitsbild und Pathogenese

Die Infektion des Menschen mit *Yersinia enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* manifestiert sich nicht nur in einer Gastroenteritis, sondern kann ein recht buntes klinisches Bild mit Fieber, mesenterialer Lymphadenitis und terminaler Ileitis zeigen (Bockemühl und Roggentin 2004). Yersinien scheinen eine hohe Affinität zu lymphatischem Gewebe zu haben. Pharyngitis mit Myalgien und Fieber sind ebenfalls als Erkrankungsform beschrieben worden (Tacket et al. 1983). Es ist denkbar, dass der Rachenring ebenfalls eine Eintrittspforte darstellt, oder dass die Yersinien zunächst an den Tonsillen adhären, proliferieren und dann durch Verschlucken in den Magen-Darm Trakt gelangen. Alter, Abwehrzustand, Histokompatibilitätstyp (HLA-System) und Geschlecht des Patienten beeinflussen den Krankheitsverlauf. Beide Arten der enteropathogenen Yersinien können generalisieren und zu septischen Bildern mit Organabszessen in Leber und Milz, Endokarditis, Hepatitis, Osteomyelitis, etc. führen (Bottone 1997). Bei Immunsupprimierten, Patienten mit hämolytischer Anämie oder Dialyse-Patienten während Desferrioxamintherapie kann dies sogar ohne vorherige Enteritissymptomatik geschehen. Die Fähigkeit der Yersinien, Eisen aufzunehmen und zu verarbeiten, scheint dabei für die Pathogenität eine wichtige Rolle zu spielen (Heesemann 1993).

Die minimale Infektionsdosis ist nicht sicher bekannt, man geht von mehr als 10^4 Keimen aus. Sie ist wahrscheinlich sehr stark vom Zustand des zellulären Immunsystems abhängig. Kinder, ältere Menschen, Immunsupprimierte und Menschen mit Eisen-Überschuss erkranken schon durch geringere Keimmengen. Die Inkubationszeit ist mit 3–7 Tagen relativ lang (Bockemühl und Roggentin 2004).

Die Pathogenese der enteropathogenen Yersinien ist mit der der anderen *Enterobacteriaceae* vergleichbar. Allerdings sind sie von vornherein in der Lage, sich extrazellulär zu vermehren, während Salmonellen und Shigellen vorwiegend intrazellulär replizieren. Nach der oralen Aufnahme penetrieren sie im Dünndarm über die M-Zellen der Mukosa in den subepithelialen Spalt zu den Peyer'schen Plaques und vermehren sich dort. Von dort aus breiten sie sich über die mesenterialen Lymphknoten in Leber und Milz aus (Heesemann 2001).

Die Bakterien besitzen ein 70–75 kbp großes Virulenzplasmid (Portnoy und Falkow 1981), das für ein Typ-III-Sekretionssystem und die Yops (Yersinia outer proteins) kodiert. Nur Bakterien, die dieses Virulenzplasmid haben, sind auch pathogen. Mit Hilfe des Typ-III-Sekretionssystems werden die Yops in die Makrophagen der Peyer´schen Plaques injiziert. Sie verändern die Abwehrfunktion, verhindern die Phagozytose (Aepfelbacher et al. 1999) und können eine Apoptose induzieren (Bruckner et al. 2005).

Außerdem befindet sich auf dem Virulenzplasmid auch das YadA (Yersinia adhesin A), das die Adhärenz an diverse Epithel- und Immunzellen vermittelt (Heeseman et al 1990, Bottone 1997).

Chromosomal kodiert sind das die Invasion vermittelnde Protein Invasin, das sezernierte hitzestabile Enterotoxin Yst, das in der äußeren Membran verankerte fibrilläre Protein MyfA (mucoïd Yersinia factor A) und das Membranprotein Ail (attachment invasion locus) (Iriarte und Cornelis 1995, Bottone 1997).

Ail wurde bisher nur bei humanpathogenen Stämmen nachgewiesen (Miller et al. 1989). Es vermittelt unabhängig vom Invasin die Anheftung und das Eindringen in die eukaryontische Zelle (Miller und Falkow 1988) und ist neben YadA an der Resistenz gegen das Komplementsystem beteiligt. Für die Pathogenität der Yersinien ist es aber nicht essentiell (Pepe et al. 1995).

1.1.4.3 Epidemiologie

Die enteropathogenen Yersinien sind weltweit in den gemäßigten und subtropischen Zonen verbreitet. In den tropischen Regionen Afrikas und Südostasiens wurden sie bislang nur selten nachgewiesen (Bockemühl und Roggentin 2004).

Yersinia enterocolitica und *Yersinia pseudotuberculosis* finden sich vor allem im Darm von Säugetieren. Sie werden mit dem Stuhl ausgeschieden und gelangen so auch auch in den Boden oder ins Wasser. Schweine sind ein wichtiges Reservoir für die humanpathogenen Serotypen O:3 und O:9 von *Yersinia enterocolitica* (Fredriksson-Ahomaa et al. 2006 b). Bei ihnen finden sich die Erreger nicht nur in den Faeces; auch der Pharynx ist stark besiedelt (Weber und Lembke 1981). Die Infektion des Menschen erfolgt mit großer Wahrscheinlichkeit durch den Verzehr von nicht ausreichend erhitzten tierischen Lebensmitteln aus Schweinefleisch. Sekundär kann es durch kontaminierte Lebensmittel und Wasser zu Infektionen kommen.

Allerdings ist wohl nicht jedes Lebensmittel als Überträgermedium geeignet (Tauxe et al. 1987).

Yersinia pseudotuberculosis infiziert in erster Linie Tiere (Kleintiere, Geflügel, Zootiere und Stubenvögel). Die Übertragung auf den Menschen erfolgt hier durch den direkten Kontakt mit den Tieren oder ebenfalls durch Kontamination von Lebensmitteln (Bockemühl und Roggentin 2004). Es gibt außerdem Berichte über die Übertragung von Yersinien durch Blutkonserven (Jacobs et al. 1989) und durch Schmierinfektionen von Mensch zu Mensch (Bottone 1997).

Insgesamt sind die Yersinien sehr umweltstabil und vermehren sich auf Grund ihrer Psychrophilie auch bei Temperaturen zwischen 0– 4°C (Bockemühl und Roggentin 2004). Sie reichern sich also auch bei Kühlung auf kontaminierten Lebensmitteln an.

1.1.4.4 Nachweis

Enteropathogene Yersinien werden bei 25–30°C auf selektivmedien, wie Mac-Conkey Agar oder CIN Agar angezüchtet. Die Bebrütung dauert zwischen 24 und 48 Stunden. Danach kann die biochemische Differenzierung mit der „Bunten Reihe“ durchgeführt werden. Sind wenige Organismen in der Probe zu erwarten, kann eine Kälteanreicherung bei 4°C in 0,15 M PBS (pH 7,4) erfolgen. Es handelt sich dabei um eine selektive Anreicherungsmethode, da sich bei dieser Temperatur nur noch die Yersinien vermehren können, nicht aber die Begleitflora. Das Verfahren kann bis zu drei Wochen dauern (Heesemann 2001, Hartmann 2007).

1.2 Moderne diagnostische Methoden

Der Nachweis von Durchfallserregern, sei es bakteriell, viral oder parasitär, wurde bislang durch Mikroskopie, einschliesslich der Elektronenmikroskopie, Kultur und verschiedene immunologische, antigenbasierte Verfahren, wie Immunfluoreszenz oder ELISA geführt (Pawlowski et al. 2009). Die Entwicklungen in der Molekularbiologie haben mit der Erfindung der Polymerase Ketten Reaktion (PCR) neue Möglichkeiten eröffnet. Die PCR-Technik wurde in dieser Arbeit zum Nachweis bakterieller Enteritiserreger angewendet und wird im folgenden Abschnitt detailliert beschrieben.

1.2.1 Prinzip der PCR (Polymerase Chain Reaction)

Die Technik der PCR ist seit über 20 Jahren bekannt. Erstmals wurde die Idee einer Vervielfältigung von DNA durch flankierende Primer und einer Polymerase 1971 veröffentlicht (Kleppe et al. 1971), aber erst der Arbeitsgruppe um Kary Banks Mullis (Saiki et al. 1985), der dafür 1993 den Nobelpreis in Chemie erhielt, gelang zwischen 1983 und 1987 die Etablierung dieser Methode. Die Einführung der hitzestabilen TaqPolymerase (Saiki et al. 1988) vereinfachte die Technik erheblich und sie wurde durch die Einführung von Thermocyclern weitestgehend automatisiert. 1992 gelang mit der Entwicklung der Real-Time PCR ein weiterer Schritt zur Etablierung dieser Methode als Basismethode in der molekularbiologischen Diagnostik.

Die PCR ermöglicht die Erkennung bestimmter Gensequenzen im untersuchten Material. Mit Hilfe einer aus Bakterien gewonnenen Polymerase und extern zugefügten DNA-Bausteinen (Oligonukleotide) werden Schritte der natürlichen DNA-Replikation, wie Separierung der DNA in Einzelstränge und Replikation des komplementären Stranges, nachgeahmt. Im Gegensatz zu lebenden Organismen kann der PCR-Prozess nur kurze DNA-Abschnitte bis zu ca. 10 kbp (10.000 Basenpaare) kopieren. Die amplifizierte Kopien können anschließend durch unterschiedliche Methoden detektiert werden (Baumforth et al. 1999)

Zunächst muss die DNA aus dem zu untersuchenden Material extrahiert werden. Dazu stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Grundsätzlich wird das Ausgangsmaterial mechanisch zerstört, dann die Zellen lysiert und schließlich die DNA bzw. RNA durch Beseitigung von Proteinen und anderen Verunreinigungen aus dem Gemisch gewonnen. Durch Erwärmen auf 94 – 96°C werden dann für die PCR die Wasserstoffbrückenbindungen der so gewonnenen DNA gesprengt. Sie teilt sich in zwei Einzelstränge (Schmelzen/Denaturierung). An diese lagern sich im zweiten Schritt der Primerhybridisierung (Annealing) kurze, synthetisch hergestellte Oligonukleotidsequenzen (Primer) an, die spezifisch den gesuchten Genabschnitt flankieren. Die Höhe der Temperatur, bei der dieser Reaktionsschritt erfolgt, ist von der Länge der Primer und ihrem Guanin/Cytosin Gehalt abhängig. Sie liegt meist zwischen 55–65°C und somit 2–3 Grad unter dem Schmelzpunkt der Primer. In diesem Versuchsabschnitt kann durch Temperaturvariation (sog. Touch-down), d.h. eine stufenweise Absenkung der Reaktionstemperatur während des Annealing-

Vorganges, ein besseres Ergebnis erzielt und die Bildung unspezifischer Produkte vermieden werden. Die Primer dienen der hitzestabilen DNA-Polymerase als Startpunkt für die nun folgende Verlängerung der Fragmente mit DNA-Bausteinen, die dem Reaktionsgemisch beigegeben wurden (Extension).

Die Reaktionstemperatur richtet sich hier nach der für die Polymerase optimalen Temperatur und liegt zwischen 68–72°C. Die Extension wird durch erneutes Erhitzen und Schmelzen der DNA unterbrochen. Danach beginnt der Zyklus von Annealing, Extension und Denaturierung von Neuem (Baumforth et al. 1999). Die Menge der spezifischen nachzuweisenden DNA Fragmente nimmt während der Zyklen exponentiell zu. Etwa nach 30–40 Zyklen sind ein Großteil aller zugefügten DNA-Bausteine und Primer verbraucht. Die Amplifikate können nun in der Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennt und durch Anfärbung mit dem DNA-Farbstoff Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar gemacht werden. In der Real-Time PCR wird durch Anlagerung einer markierten Sonde ein Fluoreszenzsignal erzeugt und nach jedem Elongationsschritt detektiert (Holzapfel und Wickert 2007).

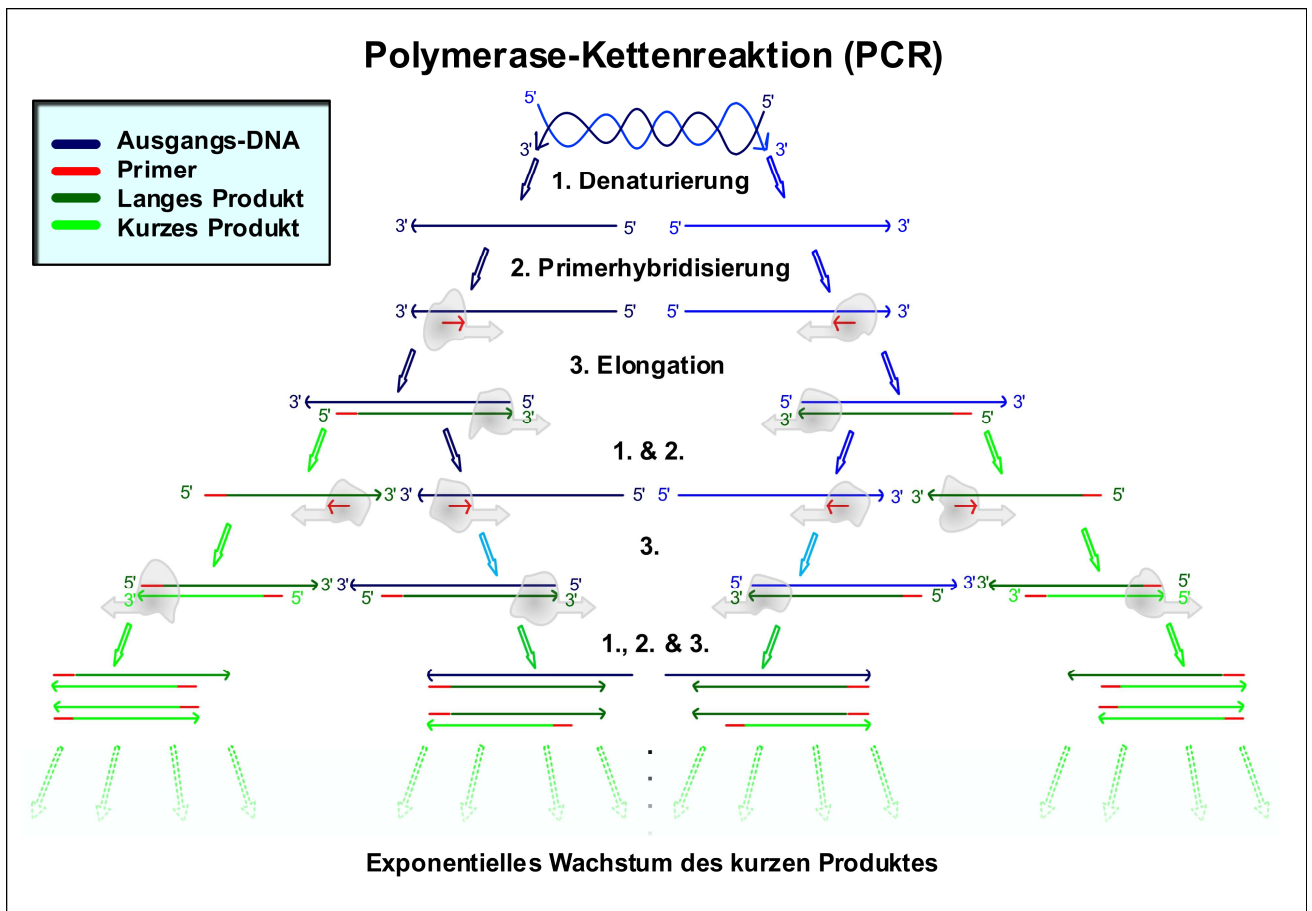


Abbildung 1: Schematische Darstellung der PCR (Grafik: W. Wiemer)

1.2.2 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung ist im Wesentlichen vom Probentyp und von der Menge der zu extrahierenden Ziel-Nukleinsäure abhängig (Rådström et al. 2004). Es kann erforderlich werden die Zielorganismen oder Zellen vor der Isolation des Erbgutes anzureichern, um so überhaupt verwertbare Resultate in der PCR zu erzielen. Dafür kommen für Zellen physiologische Methoden, also die Vermehrung in Kultur, und verschiedene physikalische Methoden in Frage. Dazu gehören Zentrifugation, Filtration oder Verdünnungstechniken. Häufig reichert man die Zielzellen an, indem man sie mit speziellen Substanzen gemeinsam zentrifugiert und die Zellen sich dann gemäß ihrer Dichte, oder auch Größe, Hydrophobie oder Oberflächenladung, in den Phasen des Gemisches sammeln (Pertoft 2000, Wolffs et al. 2005). Auch mit magnetischen Partikeln, die mit spezifischen Antikörpern ummantelt sind, können gezielt und spezifisch Zellen aus einem Gemisch isoliert und damit konzentriert werden (Olsvik et al. 1994).

Je nach Art des Materials, aus dem die Probe gewonnen wird, sind unterschiedliche Inhibitoren der PCR zu erwarten. PCR-Inhibitoren interferieren entweder mit der Polymerase oder mit der DNA. Sie können aus dem Probenmaterial selbst stammen oder gelangen während der DNA-Präparation in die Probe und verhindern eine erfolgreiche Amplifikation. Eine Übersicht über häufige Inhibitoren der PCR findet sich in Tabelle 28 im Anhang.

Auch Nukleasen können die PCR-Reaktion stören. RNasen und DNasen sind Enzyme, die in allen lebenden Zellen vorkommen und DNA und RNA in kleinere Fragmente hydrolisieren. Sie kommen z.B. im Schweiß, Haut und Haaren vor und können leicht durch einfachen Kontakt in den PCR-Ansatz eingebracht werden. Sie spalten dort die Nukleinsäuren und die PCR ist nicht mehr auswertbar. Durch die Verwendung von Handschuhen, Schutzkitteln, Hauben und ausgewiesenen DNase und RNase freiem Labormaterial kann dieses Risiko minimiert werden. Kommerzielle DNA-Extraktionskits enthalten Zusätze, die sowohl Inhibitoren als auch Nukleasen eliminieren sollen (Pingoud und Urbanke 1997, Mülhard 2006).

1.2.3 DNA-Extraktion

Aus den möglichen Probenmaterialien, wie menschliches, tierisches oder pflanzliches Gewebe, Blut und Körperflüssigkeiten aller Art, Erde, Trägermaterialien u.v.a.m. muss die DNA herausgelöst werden. (Mülhardt 2006).

Tabelle 1: DNA Extraktion – Einzelne Schritte

Vorgang	Methode		
Lyse der Zellen	mechanisch	enzymatisch	durch Detergentien
Reinigung der DNA von Proteinen, Zelltrümmern	Dichtegradientenzentrifugation, Anionenaustauschersäulen, silikabasierte Systeme (siehe Tabelle 30 – Anhang)		
Konzentration und Gewinnung der DNA	Fällung	Filterung	Zentrifugation

1.2.4 Untersuchungsansatz

Der Untersuchungsansatz einer PCR besteht aus:

- Proben-DNA, die den zu vervielfältigenden Abschnitt enthält (Template)
- Zwei Primer, um Anfang und Ende des zu vervielfältigenden Abschnitts festzulegen
- DNA-Polymerase, um den festgelegten Abschnitt zu kopieren
- Nukleotiden, die als Bausteine für den von der DNA-Polymerase synthetisierten DNA-Strang dienen
- Pufferlösungen, die eine für die DNA-Polymerase geeignete chemische Umgebung sicherstellen

Als Template kann jegliche DNA verwendet werden, die bei verschiedenen Methoden auch durch Restriktion und Ligation zuvor modifiziert wird. Möchte man eine PCR mit RNA durchführen, wie das beim Nachweis verschiedener Viren erforderlich ist, so muss die RNA zuerst durch Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden, bevor sie eingesetzt werden kann (Baumforth et al 1999). Die Nachweisgrenze eines

PCR-Systems liegt zwischen 1 pg und 500 ng reiner DNA. In der Regel werden 2-5 µl des Templates in den Versuch eingesetzt (Rolfs et al. 1992).

Die Primer sind Oligonucleotide mit einer Länge von 20–30 Basen. Sie binden an eine spezifische, komplementäre Strecke der Proben-DNA und dienen der Polymerase, die am 3' Ende des Primers bindet, als Startpunkt für die DNA-Synthese. Zu jedem Ansatz gehören ein sogenannter Forward- und ein Backward-Primer. Primer-Sequenzen werden mit einer speziellen Software entworfen und dann nach dieser Vorlage im Labor synthetisiert (Baumforth et al. 1999). Von der Qualität der Primer hängt die Spezifität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit der PCR grundlegend ab.

Um den gewünschten Genabschnitt zu amplifizieren benötigt man die DNA abhängigen Polymerasen. Dies sind Enzyme, welche die Neusynthese von DNA aus Desoxyribonukleotiden komplementär zu einer DNA-Vorlage bewirken. 1988 ermöglichte die Einführung der Taq-Polymerase die Automatisierung der PCR in Thermocyclern (Tindall et al. 1988, Saiki et al. 1988). Mittlerweile werden verschiedene, ursprünglich aus Bakterien gewonnene, jetzt gentechnisch hergestellte, Polymerasen eingesetzt, deren typische Eigenschaften die Entwicklung hochspezialisierter Assays zu lassen. Eine Übersicht findet sich in Tabelle 29 im Anhang.

1.2.5 Real-Time PCR

Die klassische PCR wurde 1992 zur Real-Time PCR weiter entwickelt (Higuchi et al. 1992), die heute vor allem zur Genotypisierung, zur Quantifizierung von Nukleinsäuren und in der Diagnostik eingesetzt wird (Kubista et al. 2006).

Bei diesem Verfahren werden die Amplifikate direkt im Untersuchungsansatz nachgewiesen. Die anschließende Gelelektrophorese entfällt. So kann zwar die Größe des Amplifikates nicht bestimmt werden, aber unspezifische Amplifikate ergeben kein falsch positives Ergebnis. Die gesamte Reaktion kann in einem geschlossenen Gefäß durchgeführt werden und eine mögliche Kontamination der Umgebung und somit eine Verfälschung der Versuchsergebnisse durch beim Öffnen frei werdende DNA-Fragmente wird so vermieden (Bustin und Müller 2005).

Durch die Zugabe eines Fluorophors zum PCR-Ansatz wird es möglich das PCR-Produkt unmittelbar nachzuweisen und auch zu quantifizieren. Die messbare Fluoreszenz entsteht entweder durch interkalierende Farbstoffe oder durch Anwendung spezieller Sonden (Dorak 2006).

1.2.5.1 Farbstoffbasierte Nachweise

Interkalierende Farbstoffe, wie z.B. Ethidiumbromid, lagern sich im Abstand von 10 Basen in Nukleinsäuren ein und können dann durch ultraviolettes Licht angeregt werden (Le Pecq und Paoletti 1966). Die Intensität der Emission nimmt durch die Bindung an die DNA um das fünfzig- bis hundertfache zu. Ethidiumbromid wird vor allem in der Gelelektrophorese verwendet.

Eine Weiterentwicklung stellt der Farbstoff SYBR Green dar. Dieses asymmetrische Cyanid lagert sich in die kleine Furche doppelsträngiger DNA ein. Der gebundene Farbstoff fluoresziert dort nach Anregung 1000-mal stärker als der ungebundene Farbstoff. Die Fluoreszenz wird nach jedem Elongationsschritt gemessen. Vorteilhaft ist der Umstand, dass für diese Methode keine zusätzlich markierten Sonden synthetisiert werden müssen. Problematisch ist die geringere Spezifität der Farbstoffe, da sie sich nicht nur an die Ziel-DNA anlagern, sondern auch an alle unspezifischen PCR-Produkte oder Primer Dimere (Kubista et al. 2006).

Die Schmelzkurvenanalyse kann diesen Nachteil ausgleichen. Dabei wird die amplifizierte DNA schrittweise von z.B. 50°C auf 95 °C erhitzt und setzt dabei abhängig von der Fragmentlänge den Fluoreszenzfarbstoff frei. Die Gesamtfluoreszenz der Probe nimmt dadurch ab. Die doppelsträngige DNA des nachzuweisenden PCR-Produktes hat einen höheren Schmelzpunkt als unspezifische Primerdimere und kann somit von diesen unterschieden werden. Die Höhe des Peaks der Schmelzkurve erlaubt eine Aussage über die Menge der amplifizierten DNA (Kubista et al. 2006). Im Prinzip stellt diese Art der PCR eine Weiterentwicklung der ursprünglichen PCR mit Verzicht auf die Gelelektrophorese dar (Espy et al. 2006).

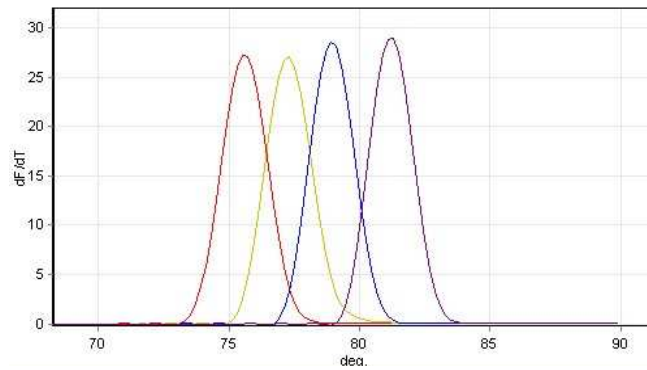


Abbildung 2: Typische Schmelzkurven von SYBRGreen® – hier Nachweis von 4 verschiedenen Plasmodien-Arten

1.2.5.2 Sondenbasierte Nachweise

Dazu benötigt man Oligonucleotidfragmente, sogenannte Sonden, die mit Molekülen markiert werden, die bei erfolgreicher Amplifikation nach Anregung Licht emittieren. Fluorophore (Reporter) sind Stoffe, die durch Aufnahme von Energie (z.B. Photon) angeregt werden, sehr kurz (Nanosekunden) in diesem Zustand verweilen und dann unter Aussendung, z.B. von Licht, wieder deaktivieren (Mackay et al. 2004).

Eine Tabelle mit gebräuchlichen Fluorophoren mit ihren Exzitations- und Emissionsspektren findet sich unter Tabelle 31

Quencher verhindern den Übergang des Fluorophors in den angeregten Zustand oder führen es strahlungslos wieder in den Grundzustand zurück. Dazu muss der Quencher räumlich nahe am Fluorophor sein, d.h. etwa 6–10 Nucleotide entfernt (Stryer und Haugland 1967). Ein sehr gebräuchlicher Quencher ist TAMRA, ein Fluoreszenzquencher. Außerdem gibt es nicht fluoreszierende, wie DABCYL. Am häufigsten werden mittlerweile wegen ihres günstigen Auslöschungsspektrums BHQ (black hole Quencher) genutzt (Didenko 2001).

Für die Real-Time PCR muss die Fluoreszenz solange unterdrückt werden, bis der nachzuweisende Genomabschnitt erkannt und repliziert worden ist. Es gibt verschiedene Typen von Sonden (Reporter/Quencher-Kombinationen), mit denen dies erreicht werden kann. Im Folgenden werden zwei häufig genutzte Sondentypen vorgestellt. Es gibt aber noch weitere Varianten auf dem Markt (Lee et al. 2009).

1.2.5.2.1 Hybridisierungssonden (FRET-Sonden)

Hier benötigt man zwei sequenzspezifische Sonden, die jeweils am 3'-bzw. 5'-Ende einen Fluoreszenzfarbstoff (z.B. Fluorescein, LC Red 640[®]) tragen (Bernard et al. 1999, Cardullo et al. 1988). Werden beide Sonden durch Bindung an die Zielsequenz in räumliche Nähe gebracht, so kann Energie von einem Farbstoff (Donor) auf den anderen (Akzeptor) übertragen werden und eine Fluoreszenzemission wird nachweisbar. Das Phänomen wird FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) genannt (Förster 1948).

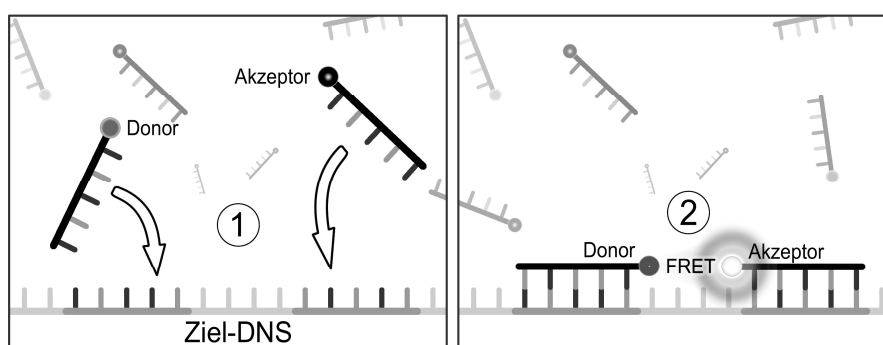


Abbildung 3: Funktionsprinzip der FRET-Sonden

1.2.5.2.2 Hydrolyse-Sonden (TaqMan Sonden)

TaqMan Sonden tragen an einem Ende den Fluoreszenzfarbstoff (Reporter), der bei Anregung mit einer bestimmten Lichtwellenlänge ein Signal emittiert (Holland et al. 1991, Heid et al. 1996). Solange die Sonde aber nicht an den gesuchten DNA-Abschnitt gebunden hat, kann diese Reaktion nicht ausgelöst werden, da der ebenfalls an die Sonde gebundene Quencher die Lichtaussendung verhindert.

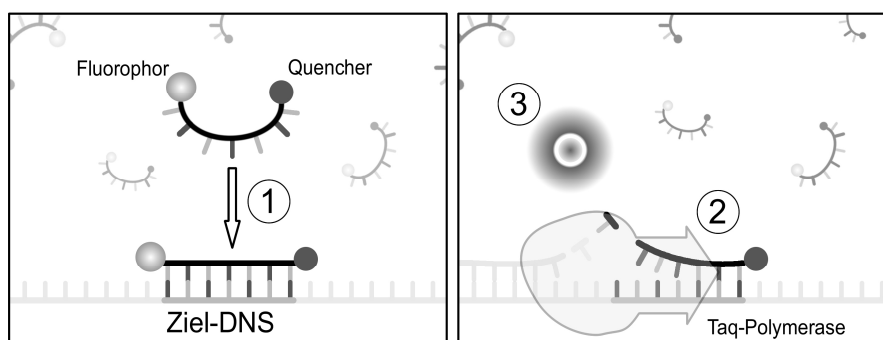


Abbildung 4: Funktionsprinzip der TaqMan-Sonden

Erst wenn die Taq-Polymerase durch ihre 5' → 3'-Exonucleaseaktivität die Sonde hydrolytisch spaltet, entfernt sich der Quencher vom Reporter und der Reporter kann durch Licht angeregt werden, eine Fluoreszenz einer definierten Wellenlänge zu emittieren, die gemessen wird. Mit jedem Amplifikationsschritt nimmt die Fluoreszenzintensität zu und ist dabei direkt proportional zur Menge des Amplifikates und somit zur Menge der Ausgangs-DNA (Holzapfel und Wickert 2007).

1.2.6 Multiplex PCR

In einer Multiplex-PCR werden mehrere Zielsequenzen gleichzeitig vervielfältigt. Sie wurde bereits 1988 erstmals von Chamberlain et al. beschrieben, die damit Gendelektionen bei der Duchenne Muskeldystrophie nachweisen wollten (Chamberlain et al. 1988). Mehrere Primerpaare, je ein Paar für jeden gesuchten Genomabschnitt, müssen dem Untersuchungsansatz beigegeben werden. Das Primerdesign ist hier besonders wichtig, damit unspezifische Reaktionen (Primer-Dimere) vermieden werden (Elnifro et al. 2000).

1.2.7 Real-Time Multiplex PCR

Bei einer Real-Time Multiplex PCR werden gleichzeitig mehrere Zielsequenzen vervielfältigt und sofort nach der Amplifikation nachgewiesen. Zur Detektion benutzt man für jede gesuchte Sequenz eine farbstoffmarkierte Sonde. Diese wird durch ihre spezifische Wellenlänge angeregt und gibt dann wiederum typische Wellenlängen ab. Bei der Auswahl ist darauf zu achten, dass sich die Emissionsspektren möglichst wenig überlagern und es keine Signalüberschneidungen gibt. Dann können die PCR-Produkte in den jeweiligen Messkanälen voneinander unterschieden werden (Wittwer et al. 2001).

Bereits zu Beginn der PCR-Ära gab es Ansätze, diese Technik umzusetzen (Bernard et al. 1998), aber erst mit den Entwicklungen des frühen 21. Jahrhunderts konnte diese Idee richtig Fuß fassen.

1.2.7.1 Thermocycler für Real-Time PCR

Die ersten Thermocycler für die Real-Time PCR kamen 1997 auf den Markt. Wichtige Charakteristika dieser Geräte sind neben der Robustheit der Exzitationseinheit, die Art des Heizens und damit die Temperaturhomogenität und –konstanz im Gerät. Die Geräte heizen über den Deckel, so dass die früher erforderliche Übersichtung

der Proben mit Mineralöl entfällt. Die gebräuchlichste Heizmethode ist die Verwendung eines Peltierelements. Dieser Halbleiter erzeugt je nachdem in welche Richtung er von Gleichstrom durchflossen wird, entweder Wärme oder Kälte. Roche[®] und QIAGEN[®] (bzw. Corbett[®]) nutzen Luft, die erwärmt und wieder aus dem Gerät gesaugt wird, um die entsprechenden Reaktionstemperaturen zu erzeugen. Dies funktioniert aber nur bei kleinen Probengefäßen mit einem günstigen Oberflächen/Volumenverhältnis.

Zur Anregung der Fluorophore werden LED Leuchten, Argon-Ionen-Laser oder Xenonlicht eingesetzt. Abhängig vom Leuchtmittel sind die Anregungsspektren entweder genau definiert oder decken eine gewisse Frequenzbreite ab. Die Detektion erfolgt durch Photodioden, CCD Kameras mit Spectrographen oder Photomultiplier (Wittwer et al. 2001). Die Signale werden durch einen Computer weiter verarbeitet.

Alle üblichen Thermocycler bieten eine entsprechende Betriebs- und Auswertungssoftware an. Insgesamt unterscheiden sich die auf dem Markt befindlichen Produkte nicht wesentlich in ihrer Genauigkeit, Empfindlichkeit und Leistung (Kubista et al. 2006). Nur Probenanzahl, Anzahl der Detektionskanäle und Preis differieren. Ein Vergleich der Eigenschaften gängiger Thermocycler für Real-Time PCR findet sich in Tabelle 32 im Anhang.

1.3 PCR in der Diagnostik enteropathogener Bakterien

Bereits kurz nach Etablierung der Technik in den Jahren 1983–87 begann man, Bakterien nachzuweisen und zu differenzieren mit PCR-Assays zu verschiedensten Zielgenen, z.B. ribosomale RNA, Proteingene oder repetitive Elemente (Sachse 2004). Vor allem schwer anzüchtbare oder hochpathogene Keime und Erreger von nosokomialen Infektionen wurden untersucht (Espy et al. 2006). In die Routinediagnostik fanden diese Methoden wegen ihres hohen Aufwandes zunächst keinen Eingang, obwohl sich bald zeigte, dass die PCR-Technik dem konventionellen Nachweis häufig in Sensitivität und Spezifität überlegen war (Sachse 2004).

1.3.1 PCR für *Shigella* spp.

Shigellen versuchte man seit Beginn der PCR-Ära molekularbiologisch nachzuweisen (Venkatesan et al. 1989, Sethabur et al. 1993, Lindqvist 1999).

Alle Untersucher wählten das invasion plasmid antigen H (ipaH) als Zielsequenz, da es in mehreren Kopien, sowohl auf dem virulenzvermittelnden Plasmid der Shigellen (Hale et al. 1983), als auch chromosomal vorkommt (Jin et al. 2002).

In der klinischen Anwendung wiesen Dutta et al. (2001) Shigellen und EIEC in den Stühlen von Patienten mit Durchfällen nach Anreicherung nach. Aranda et al. (2004) entwickelten eine Multiplex PCR zum Nachweis von Shigellen und *E.coli*. Eingesetzt wurde DNA aus Bakterienkulturen von Stühlen symptomatischer Kinder. Beide Untersucher entwickelten Primer für ipaH. Farshad et al. (2006) nutzten den Nachweis von ipaH und ipaBCD durch PCR zur Spezifizierung klinischer Shigellenisolate von Patienten mit blutiger Diarrhö.

Auch in der Lebensmittelüberwachung wurde die PCR eingesetzt. Wang et al. (2007) beschrieben eine Real-Time Multiplex PCR mit TaqMan Sonden zum Nachweis von Salmonellen, Shigellen und *E.coli* in Hackfleisch nach vorheriger Konzentrierung der Keime durch immunomagnetische Separation. Eine Real-Time PCR mit modifizierten Molecular beacons zum Nachweis von Shigellen und Salmonellen in Nahrungsmitteln entwickelten Shi et al. (2006), wieder mit ipaH als Target für Shigellen.

Die Real-Time Multiplex PCR auf Basis von SYBRGreen[®] von Yang et al. (2007) diente zum Nachweis von Salmonellen und Shigellen in beimpften Stühlen. Die Untersucher wählten virA, erstmals beschrieben von Villalobo und Torres (1998), als Zielsequenz für ihre Primer. Das virA Gen kommt ebenso wie ipaH auf dem Plasmid und chromosomal vor.

1.3.2 PCR für enteritische *Salmonella* spp.

Der molekularbiologischen Nachweis von Salmonellen als diagnostische Methode wurde erstmals 1990 von Bej et al. aus Wasserproben versucht. Es folgten zahlreiche weitere Arbeiten, in denen angestrebt wurde, die Salmonellen entweder nach Anzucht weiter zu spezifizieren oder sie in unterschiedlichsten biologischen Proben nachzuweisen. Verschiedene Gen-Loci wurden als Targetsequenz für einen PCR-Nachweis untersucht.

1992 beschrieben Rahn et al. das invA Gen als mögliches Target zur Detektion von Salmonellen aus Kultur. Dieser Genabschnitt wurde daraufhin häufig genutzt, u. a.

auch von Hoorfar et al. (2000), Dos Santos et al. (2001), Eyigor und Carli (2003), Wolffs et al. (2006), Malorny et al. (2007) und zuletzt von D'Souza et al. (2009), sowohl für den Nachweis von Salmonellen aus Kultur, als auch direkt aus Hühnerfleisch, Eiern, Schlachtabfällen, Hühnerfaeces und Wasser.

Whyte et al. versuchten 2002 durch die Amplifikation einer 1,8 kbp HindIII DNA-Sequenz, die bereits von Tsen et al. 1989 und 1991 als hochspezifisch für Salmonellen beschrieben worden war, Salmonellen in Hühnerhaut nachzuweisen und verglichen die Ergebnisse mit konventioneller Diagnostik.

Csordas et al. (2004) stellten früher veröffentlichte Primersets für *invA* einem eigenen Primerset für *invA*, sowie Primern für *iroB*, *fimA* und einem zufälligen Fragment von *Salmonella* Typhimurium gegenüber. In ihrer Untersuchung zeigten die Primer für *iroB* und *fimA* keine eindeutige Spezifität, die Primer für *invA* keine gleichbleibend hohe Sensitivität. Auch hier diente DNA aus Salmonellenkulturen als Probe.

Amavisit et al. (2001) benutzten *ompC* als Zielgen für die Synthese ihrer Primer, um Salmonellen in Pferdefaeces nachzuweisen, aber sie erreichten mit diesem Set keine sehr hohe Sensitivität.

Zur Differenzierung von *Salmonella* Typhi und *Salmonella* Paratyphi verwendeten Hirose et al. (2002) fünf verschiedene Primerpaare in einer Multiplex-PCR, die gegen die Vi-, O- und H-Antigene gerichtet waren. Diese PCR war ausschließlich zum Nachweis typhoider Salmonellen geeignet. Lim et al. (2003) konnten mit entsprechend modifizierten Primern gegen die gleichen Targets spezifisch *Salmonella* Typhimurium nachweisen.

Mittlerweile sind mehrere kommerzielle Kits zum Nachweis von Salmonellen mit PCR (SureFood[®], Pathogen Salmonella PLUS) verfügbar, die vor allem in der Lebensmittelüberwachung und Veterinärmedizin angewendet werden.

Malorny et al. (2004) wählten für die Real-Time PCR zum Nachweis von enteritischen Salmonellen und *Salmonella bongori* den *ttrRSBCA* Locus. Das Gen codiert für die Fähigkeit der Salmonellen Tetrathionat zu veratmen und unterliegt daher weniger Mutationen als *invA* oder andere Loci. Die Autoren messen einer PCR mit diesem Target eine höhere Spezifität zu, als anderen, die unter Umständen, bei

Deletionen oder Mutationen im betreffenden Zielgen, falsch negativ ausfallen können.

1.3.3 PCR für humanpathogene *Campylobacter* spp.

Auf Grund der schwierigen und langwierigen Anzuchtbedingungen für *Campylobacter* spp. wurde bald nach anderen Nachweismethoden gesucht. Es zeigten sich rasch gewisse Probleme beim molekularbiologischen Nachweis. 2000 wurde die erste Genomsequenz von *C. jejuni* veröffentlicht und bis heute folgten noch vier weitere. Alle diese Genomsequenzen von ein und derselben Spezies unterscheiden sich erheblich. Eine PCR mit nur einem genetischen Target wird auf Grund der hohen Variabilität des Genoms nicht alle Varianten einer Spezies sicher erfassen können. Bei der Verwendung mehrerer Zielgene hingegen kann relativ gut bis auf Subspeziesebene unterschieden werden. Für eine ganze Gruppe ist der Nachweis ähnlich schwierig.

On und Jordan (2003) verglichen 11 verschiedene PCR-Protokolle zum Nachweis thermotoleranter *Campylobacter* spp. (*C. jejuni* spp. *jejuni*, *C. jejuni* ssp. *doylei*, *C. coli* und *C. lari*). Kein Protokoll wies eine 100 %-ige Sensitivität und Spezifität für alle Spezies auf. Bis heute ist die eindeutige Identifizierung von *C. jejuni* mit Subspezies und *C. coli* durch nur ein einzelnes Primersset nicht gelungen. Da es sich bei den Erkrankungen durch *Campylobacter* spp. im eigentlichen Sinn um Zoonosen handelt und auch die Tiere durch die Infektionen betroffen sind, ist insbesondere in der Veterinärmedizin das Interesse groß, *Campylobacter* spp. aus verschiedenen Materialien nachzuweisen. Eine Übersicht über einige PCR Protokolle findet sich in Tabelle 27 im Anhang.

1.3.4 PCR für enteropathogene *Yersinia* spp.

Der molekularbiologischen Nachweis von Yersinien diene vor allem dem Nachweis von Yersinien in verschiedensten Medien zur Lebensmittelüberwachung und der Virulenzbestimmung. Wiederum wurden verschiedenste Gen-Loci als Target gewählt, die sowohl plasmidcodiert sind, wie *virF* und *yadA*, oder auf dem Chromosom liegen, wie das *ail*- und *inv*-Gen.

Die ersten PCR-Protokolle wurden von Wren und Tabaqchali (1990) und Fenwick und Murray (1991) beschrieben und beruhten auf *virF* und dem *ail* Gen.

Nakajima et al. (1992) fügten noch einen Primer für das *inv* Gen zu und konnten damit *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pseudotuberculosis* unterscheiden. Viele der folgenden PCR-Protokolle zum Nachweis von Yersinien aus Stuhl, Nahrungsmitteln und Schweinefleisch bauten auf diesen drei Targetgenen auf (Bhaduri 2002, Boyapalle et al. 2001, Jourdan et al. 2000, Rasmussen et al. 1995).

Ibrahim et al. (1992) wählten das *yst* Gen als Ziel, ebenso wie Zheng et al. (2008) und Harnett et al. (1996 – zusammen mit *virF* und *ail*).

Andere Ansätze versuchten die Unterschiede in der 16 S rRNA (Wolffs et al. 2004) und der 23 S rRNA (Xing et al. 2009) zur Diagnostik zu nutzen.

Kot und Trafny (2004) verwendeten eine PCR, die das *myfA* Gen nachweist, um speziell pathogene Serotypen von *Y. enterocolitica* zu identifizieren.

Weitere PCR-Protokolle z.B. mit *yadA* als Target wurden vor allem zum Nachweis von Yersinien in Nahrungsmitteln etabliert (Kapperud und Vardund 1993, Fredriksson-Ahomaa et al. 2000).

1.3.5 Ausblick

Die PCR hat sich in den letzten Jahrzehnten von einer aufwändigen und fehleranfälligen Methode zu einer nun halbautomatisierten Technik mit maschineller DNA Extraktion und Vereinfachung der Arbeitsschritte bis auf wenige Pipettiervorgänge entwickelt. Die modernen Thermocycler ermöglichen die Real-Time Multiplex PCR mit gleichzeitigem Nachweis von Gentargets in bis zu sechs Detektionskanälen und weitere davon abgeleitete Assays, wie die High resolution melt analysis (HRMA), erstmals beschrieben von Wittwer et al. (2003). Damit bietet es sich an, den molekularbiologischen Nachweis von Erregern weiter zu entwickeln und hier, insbesondere für bakterielle Durchfallserreger, auf der Grundlage der vorangegangenen Forschung in diesem Gebiet, eine schnelle und einfache Nachweismethode zu etablieren.

2 Zielsetzung der Arbeit

Die Diagnostik von bakteriellen Durchfallserregern kann in bestimmten Situationen dringlich und zeitkritisch sein, z.B. bei Ausbrüchen, schwerst kranken Patienten oder wenn Isolationsmaßnahmen nach dem IfsG erforderlich werden. Die konventionelle Diagnostik nimmt in diesen Fällen oft viel Zeit in Anspruch. Molekularbiologische Methoden, wie die PCR und insbesondere ihre Weiterentwicklung zur Real-Time Multiplex PCR eröffnen die Möglichkeit, sehr schnell und zuverlässig bakterielle Krankheitserreger zu identifizieren.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Real-Time Multiplex PCR zum Nachweis der vier häufigsten Enteritiserreger bei Erwachsenen in Deutschland (Shigellen, Salmonellen, Campylobacter, Yersinien) zu entwickeln, die in kurzer Zeit ein zuverlässiges Ergebnis liefert, das als Entscheidungshilfe bei der Suche nach Infektionsquellen, zur Therapie und für weitere Maßnahmen dienen kann. Die Methode sollte als Screening möglichst breit Erregergruppen erfassen, ohne eine Feindifferenzierung vorzunehmen. Um so schnell wie möglich ein Resultat zu erhalten, sollten wenige und einfache Arbeitsschritte erforderlich sein und die Stuhlprobe sollte ohne weitere Anreicherungsschritte direkt in den Versuch eingesetzt werden können.

3 Methoden

3.1 Allgemeiner Versuchsaufbau

Zunächst mussten geeignete Primer und Sonden zum Nachweis der jeweiligen Keime entworfen werden. Danach wurde das PCR-System installiert und optimiert. Es wurden die geeigneten Konzentrationen der Primer und des Magnesiumzusatzes ermittelt. Ziel war es, ein spezifisches Signal mit adäquater Endfluoreszenz in allen Kanälen zu erhalten. Auch die Überstrahlung in andere Kanäle sollte vermieden werden. Anschließend wurden im Rahmen der Sensitivitätsprüfung das Cycling-Protokoll adaptiert und erneut die Wirkung unterschiedlicher Magnesium-Konzentrationen auf das System überprüft, um verlässliche Ergebnisse auch bei niedrigen Keimzahlen zu erreichen.

Im zweiten Abschnitt wurden Sensitivität und Spezifität der PCR an DNA-Templates aus Kulturen und an artifiziell beimpften Stühlen überprüft. Schließlich untersuchten wir mit dem so evaluierten Test 556 klinische Stuhlproben und verglichen die Ergebnisse mit denen der konventionellen Diagnostik.

Tabelle 2: Arbeitsschritte und Ziel

Arbeitsschritt	Ziel
Auswahl der Genloci Primer- und Sondendesign	PCR-Design
Variation der Primerkonzentration Variation der Magnesiumkonzentration	Grundeinstellung der PCR
Prüfung der Nachweisgrenze In DNA Templates In beimpften Stühlen Adaptation des Cycling-Protokolls Prüfung der Spezifität an Proben verschiedener Bakterienstämme aus Kultur	Optimierung und Validierung der PCR
Testung von klinischen Proben mit konventionellen mikrobiologischen Untersuchungen und PCR	Erprobung der Methode im klinischen Alltag

3.2 Primer-Design

Die Auswahl der Gensequenzen orientierte sich an den in der Literatur beschriebenen Multiplex PCR Protokollen. Die Gensequenzen für die einzelnen Erreger sind veröffentlicht.

1999 beschrieben Hensel et al. ein 15 kbp-Fragment, das Gene umfasst, die die Strukturkomponenten einer Tetrathionatreduktase (ttrABC) und ihres Zwei-Komponenten-Systems (ttrRS) kodieren. Mit Hilfe dieses Genkomplexes ist *Salmonella* in der Lage, Tetrathionat als Elektronenakzeptor in der anaeroben Atmung zu nutzen. Für die Virulenz der Salmonellen ist es unerheblich. Diesen ttrRSBCA Locus nutzten Malorny et al. (2004) und Josefsen et al. (2007) erstmals für eine PCR zum sehr spezifischen Nachweis von *Salmonella enterica* und *Salmonella bongori* und standardisierten das Verfahren soweit, dass es allgemein als PCR-Protokoll zum Nachweis von Salmonellen aus Nahrungsmitteln verwendet werden konnte. Die in der Arbeit verwendeten Primer basieren auf Adaptationen des Protokolls von Malorny et al. (2007), das die Primer für *invA* und *ttrC* kombinierte.

Zum Design von Primern für Shigellen wurde das *ipaH*-Gen verwendet. Venkatesan et al. zeigten bereits 1989, dass Shigellenstämme ohne *ipaH* nicht virulent sind und dass dieser Locus effektiver zum Nachweis von Shigellen und EIEC ist als *ipaC* oder das 17-kbp *EcoRI* Fragment. EIEC werden gleichermaßen nachgewiesen.

Primer und Sonde zum Nachweis von Yersinien wurden auf der Grundlage des Gens für das Membranprotein *ail* entworfen, das auf dem Bakterienchromosom und nicht auf einem Plasmid liegt. Miller et al. (1989) fanden, dass dieses Gen nur bei humanpathogenen Stämmen vorkommt. Es wurde bereits mehrfach in Real-Time PCR Protokollen verwendet (Jourdan et al. 2000, Boyapalle et al. 2001).

Der Versuch alle thermophilen *Campylobacter* mit Primern und Sonde für die 16S rRNA zu erfassen, scheiterte, da die gewählten Primer keine verwertbaren Amplifikate bildeten. Padungtod et al. (2001) hatte für seine Real-Time PCR erfolgreich Primer für *gyrA* verwendet, ebenso wie Ragimbeau et al. (1998) und Fukushima et al. (2003) jeweils in Multiplex PCR Protokollen, so dass auf dieser Grundlage ein weiteres Primer/Sonden Set entworfen wurde, das allerdings nur *Campylobacter jejuni* und seine Subspezies erfasst.

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Gensequenzen

Erreger	Gensequenz	Beschrieben von
Salmonellen	<i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium strain LT2 tetrathionate reductase response regulator (ttrR), sensor-kinase (ttrS), subunit B (ttrB), subunit C (ttrC), and subunit A (ttrA), and ribokinase-like protein (rkh) genes, complete cds; and ntt gene, partial cds AF282268	Price-Carter M et al. (2001)
Shigellen	<i>S. flexneri</i> invasion plasmid antigen H (ipaH) gene M32063	Hartman AB et al. (1990)
Campylobacter	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> 81116, complete genome, DNA Gyrase subunit A – 971836-974427	Pearson BM et al. (2007)
Yersinien	<i>Yersinia enterocolitica</i> (type 0:3) pseudogene for transposase (partial), pseudogene for hypothetical protein, ail gene, and second pseudogene for transposase (partial) AJ605740.1	Biedzka-Sarek M et al. (2005)

Mit Hilfe einer frei verfügbaren Primerdesign Software (Rozen und Skaletzky 2000) wurde jeweils ein Forward- und ein Reverse Primer sowie eine Sonde entworfen. Die Spezifität der Primer und der Sonden wurde mit Blast (Altschul et al. 1997) geprüft und die Fragmente mit dem höchsten bit-score und dem geringsten e-value ausgewählt. Der bit-score errechnet sich aus der Anzahl der Lücken und Ersetzungen, die beim Alignment, dem Vergleich der Sequenzen mit den in der Datenbank gespeicherten Sequenzen, ermittelt werden. Durch mathematische Normalisierung sind die einzelnen score Werte miteinander vergleichbar. Je höher der score-Wert desto besser ist die Übereinstimmung. Der dazugehörige e-value, Erwartungswert, gibt an, wie viele Alignments mit gleichem oder besserem score bei einer zufälligen Durchsuchung der Datenbank gefunden werden würden. Je niedriger der e-value ist, desto signifikanter ist der score-Wert.

Tabelle 4: Primer und Sondensequenzen

Genlocus	Nr.	Länge des Primers (Basen)	Sequenz	Schmelztemperatur bei 3 mM Mg ²⁺ (°C)	Größe Amplifikat (Basen)
<i>Salmonella</i> tetrathionate reductase response regulator (ttrR), sensor-kinase (ttrS), subunit B (ttrB), subunit C (ttrC), and subunit A (ttrA)	4315 Primer right	21	5'AAT TAG CCA TGT TGT AAT CTC 3'	62,65	180
	4136 Primer left	21	5'ATT GTT GAT TCA GGT ACA AAC 3'	61,01	
	4163 Sonde	20	5'JOE-CAA GTTCAACGCGCAATTTA – BHQ1 3'	59.88	
<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> DNA Gyrase subunit A	529 Primer right	20	5'AAG TGT AAG CAC ACA AGG TA 3'	62,66	164
	366 Primer left	23	5'CTA TAA CAA CTG CAC CTA CTA At 3'	62,14	
	409 Sonde	20	5'FAM CTT AAT AGC CGT CAC CCC AC 3'TAMRA	59.45	
<i>Yersinia enterocolitica</i> (type 0:3) ail gene	2686 Primer right	20	ATCGAGTTTGGAGTATTCAT	62,85	182
	2505 Primer left	20	5'GCA TTA ACG AAT ATG TTA GC 3'	62,03	
	2636 Sonde	20	5'Cy5 CCG CTT CCA AAT TTT GTC AT 3' BHQ2	59.94	
<i>S. flexneri</i> invasion plasmid antigen H (ipaH) gene	1804 Primer right	18	5'CAG TAC CTC GTC AGT CAG 3'	60,9	170
	1635 Primer left	20	5'CAG AAG AGC AGA AGT ATG AG 3'	61,9	
	1747 Sonde	20	5'ROX ACA GGT GAT GCG TGA GAC TG 3'BHQ2	59.9	

Zur Markierung der Sonden wurden folgende Fluorophore verwendet:

	Excitation maximum (nm)	Emission maximum (nm)	
FAM™	494	521	Campylobacter
JOE™	520	548	Salmonellen
ROX™	587	607	Shigellen
Cy5™	643	667	Yersinien

Als Quencher dienten jeweils die dazu passenden BHQ Quencher. Alle Oligonucleotide wurden von der Firma Eurofins MWG synthetisiert.

3.3 Gewinnung von Material zur DNA-Extraktion aus Bakterienkulturen

Die ausgewählten Stämme für Positiv- und Negativkontrollen (Tabelle 5, Tabelle 16, Tabelle 17) wurden aus der Mikrobank entnommen und unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitsbank auf Blutagar ausgestrichen. Salmonellen und Shigellen wurden für 24 h bei 37°C, Campylobacter für 48 h bei 37°C in sauerstoffarmer Umgebung (GeneBag®) und Yersinien für 24 h bei Raumtemperatur bebrütet. Danach wurden die Kolonien mit einem Wattetupfer abgenommen und in 10 ml sterile NaCl 0,9 % Lösung homogenisiert. Anschließend wurde die Lösung zu 1 ml in Eppendorfgefäße aliquotiert und für 3 min bei 10 000 rpm zentrifugiert. Das nach Abheben des Überstands verbleibende Pellet wurde zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

Auf gleiche Weise wurde auch Kulturmaterial aus phänotypisch charakterisierten Stämmen/Isolaten des Institutes für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) und des Bernhard-Nocht-Institutes für Tropenmedizin Hamburg (BNI) zur Spezifitätsprüfung des Systems gewonnen (Tabelle 16, Tabelle 17).

3.4 DNA-Extraktion aus Bakterienkulturen

Zur Extraktion der DNA aus dem so gewonnenen Pellet wurde ein kommerzieller Kit (QIAamp® DNA Mini Kit, QIAGEN®) nach Herstellerangaben angewendet.

Das Pellet wurde in 180 µl ATL Puffer resuspendiert und 20 µl Proteinase K hinzugefügt. Nach Durchmischung inkubierte die Lösung für mindestens 1 h bei 56°C

im Schüttler. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde 200 µl AL Puffer zugefügt, gemischt und 10 min bei 70°C inkubiert. Danach wurde die Mischung mit 200 µl 96-100 %igem Ethanol versetzt und kräftig gemischt.

Die gesamte Lösung wurde nun einschließlich Präzipitat auf die QIAamp® Spin Column gegeben und für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 500 µl AW 1 Puffer gewaschen. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal wiederholt, diesmal wurde mit AW 2 Puffer gewaschen, danach mit 14 000 rpm für 3 min zentrifugiert und ein letztes Mal mit 200 µl AE Puffer gewaschen und bei 14 000 rpm für 2 min zentrifugiert. Das Eluat wurde als DNA-Template verwendet, bzw. bei -20°C gelagert.

3.5 Positivproben

Die DNA-Templates wurden zum Aufbau der PCR benutzt. Zuvor wurde der DNA-Gehalt der Extraktionen zusätzlich mit Spektrophotometrie und Gel-Elektrophorese (Ethidiumbromid-Gel, 0,7 % Agarose) ermittelt.

Folgende Stämme wurden ausgewählt und in allen folgenden Versuchen als Positivkontrollen eingesetzt.

Tabelle 5: Liste der Bakterienstämme, die als Positivprobe dienen

Name	Herkunft
<i>Salmonella enteritidis</i> Gruppe D	Hygieneinstitut Hamburg
<i>Shigella flexneri</i> 1a	Stamm SC 529 London
<i>Yersinia enterocolitica</i>	DSMZ 4780 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 3291 American Type Culture Collection

3.6 Reaktionsansätze zur Optimierung der Primer- und Magnesiumkonzentrationen

Die DNA-Proben wurde vor Verwendung im PCR-Ansatz auf eine Konzentration von unter 1 µg/50 µl eingestellt.

Ausgehend von früheren Erfahrungen mit der PCR auf der RotorGene 6000 von Corbett® und den Empfehlungen des Herstellers wurde folgender Ansatz gewählt.

3.6.1 Standardansatz

Der HotStar®Taq Mastermix ist kommerziell vorgefertigt und besteht bei einem Volumen von 25 µl aus:

- 2,5 Einheiten HotStar® Taq Polymerase
- PCR-Puffer mit Magnesium
- 200 µM jeder dNTP

Der Endmagnesiumgehalt beträgt 1,5 mM

Tabelle 6: Standardansatz für PCR

Ansatz pro Reaktionsgefäß			
HotStar® Taq Mastermix	12,5 µl		entspr. 1,5 mM MgCl ₂
MgCl ₂ 25 mM	1,5 µl	bzw. 2,5 µl oder 3,5 µl	entspr. 3, 4 oder 5 mM MgCl ₂
H ₂ O	7,75 µl	respektive add 25 µl	
DNA/Template	2,5 µl		
Primer Mix	0,75 µl	bzw. 0,25 µl oder 1,5 µl	
Gesamt Volumen	25 µl		

Zur Evaluierung wurde der Magnesiumgehalt des Ansatzes variiert (1,5 mM, 3 mM, 4 und 5 mM).

Der Primer Mix wurde zunächst in folgenden Konzentrationen eingesetzt.

- 0,25 µl entsprechend 3,125 pmol jedes Primers und 0,875 pmol der Sonde
- 0,75 µl entsprechend 9,375 pmol jedes Primers und 2,625 pmol der Sonde
- 1,5 µl entsprechend 18,75 pmol jedes Primers und 5,25 pmol der Sonde

Zur weiteren Optimierung wurde außerdem für Shigellen und Salmonellen die Sonde in der Verdünnung 1:5, entsprechend 0,525 pmol, untersucht.

3.6.2 Funktion und Einstellung des Thermocyclers

Der RotorGene 6000 ist geeignet, um Nukleinsäuren nachzuweisen, zu quantifizieren oder zu genotypisieren. Alle Arten der Farbstoffmarkierung können verwendet werden (SYBRGreen®, LUX TM, Molecular Beacons, Scorpion, FRET, TaqMan). Der RotorGene 6000 verarbeitet sehr kleine Probengefäße (200 µl), die kontinuierlich mit 400 rpm zentrifugiert werden. Dadurch werden Luftblasen und Kondensatbildung vermieden. Die Probengefäße rotieren in warmer Luft, die über ein Nickel-Chrom

Element im Deckel des Gerätes erhitzt wird. Zur Kühlung wird Umgebungsluft angesaugt und die erwärmte Luft nach außen geblasen. Da die Trägerscheibe für die Proben durchlöchert ist, kann die Luft ungehindert zirkulieren. Zur Detektion der Amplifikationsprodukte werden die Proben nach jedem Extensionsschritt durch eine Leuchtdiode angeregt. 6 verschiedene Wellenlängen können verwendet und gleichzeitig in 6 verschiedenen Kanälen abgelesen werden. Dadurch ist eine Real-Time Multiplex PCR zum Nachweis von maximal sechs verschiedenen Genabschnitten möglich. In einem Lauf können theoretisch bis zu 72 Proben analysiert werden.

3.6.2.1 Cycling Protokoll

Zur Erhöhung der Spezifität der PCR wurde vor den ersten PCR-Zyklen ein sogenannter Touch-down vorgeschaltet. Dabei beginnt das Annealing bei einer Temperatur, die oberhalb des Schmelzpunktes der Primer und Sonden liegt und wird dann schrittweise in jedem folgenden Zyklus abgesenkt. Insgesamt wird dabei während der ersten Zyklen die Annealingtemperatur um 6 °C erniedrigt. Bei hohen Temperaturen direkt unterhalb des Schmelzpunktes binden Primer und Sonde äußerst spezifisch. Allerdings ist diese Temperatur nicht exakt errechenbar, sondern nur im Experiment zu ermitteln. In einem Touch-down Protokoll wird ein ganzes Temperaturspektrum abgedeckt und mit großer Wahrscheinlichkeit die optimale Annealingtemperatur erreicht. In den ersten Zyklen mit optimaler Temperatur werden nur sehr spezifische Sequenzen amplifiziert; sie stehen dann im Überschuss in den folgenden Zyklen zur Verfügung, die bei geringeren Temperaturen stattfinden. Unspezifische Reaktionsprodukte werden so verringert.

Es wurde folgendes Basisprogramm gewählt:

Tabelle 7: Cycling-Protokoll für RotorGene 6000

Inkubation	15 min	95°C
40 Zyklen		
Denaturierung	15 sec	94°C
Annealing	20 sec	56°C Touch-down 50°C
Extension	30 sec	72°C
Final extension	30 sec	40°C

Mehrere Temperaturprotokolle mit einem Touch-down von 60°C zu 54°C, 58°C zu 52°C und 56°C zu 50°C wurden verglichen. Bei jedem Lauf wurden Positivkontrollen aus Bakterienkulturen (s.o.), sowie Negativkontrollen ohne DNA-Template mitgeführt.

3.6.2.2 Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der vom Hersteller des RotorGenes 6000 gelieferten Software (Rotor-Gene 1.7.65). Der C_t Wert der jeweiligen Probe ist definiert als der Bruchteil eines Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmals den gewählten Schwellenwert (Threshold) übersteigt. Er errechnet sich aus dem Kreuzungspunkt der Fluoreszenzkurve mit dem gewählten Threshold. Der Threshold für Probengefäße ohne DNA (Non Template Containing, NTC) wurde bei 15 % gewählt. Damit werden nur für die Proben C_t Werte ermittelt, die während der gesamten Reaktionszeit einen Fluoreszenzanstieg von wenigstens 15 % der maximal im Versuchsansatz gemessenen Fluoreszenz hatten.

Zur Eliminierung von Hintergrundsignalen wurde mit der Dynamic Tube Normalisation Funktion, die zur Grundeinstellung des RotorGenes 6000 gehört, die durchschnittliche Fluoreszenz jedes Probenröhrchens vor Beginn der Amplifikation ermittelt. Außerdem wurde die Noise Slope Correction aktiviert und damit Änderungen der Hintergrundfluoreszenz erfasst und ausgeblendet.

3.7 Herstellung der Bakterienverdünnungen für die Prüfung der Nachweisgrenze

Als Ausgangsmaterial dienten wiederum die in Tabelle 5 aufgeführten Positivproben.

Sie wurden wie oben beschrieben angezüchtet und dann in 5 ml steriler Kochsalzlösung 0,9 % homogenisiert, um eine Dichte von MF 2 (McFarland Standard) zu erreichen.

Aus dieser Suspension wurde eine Verdünnungsreihe im Faktor 1:10 (0,1 ml Lösung auf 0,9 ml Kochsalzlösung 0,9 %) in insgesamt 9 Stufen angelegt.

Die Bestimmung der Keimkonzentration (colony forming unit, cfu) erfolgte im Doppelansatz (I, II). Dazu wurde eine Blutagarplatte mit 0,5 ml der Lösung geflutet und nach 24 h Bebrütung bei 37°C, bzw. Raumtemperatur für die Yersinien, die Anzahl der Kolonien bildenden Einheiten bis zur maximal ablesbaren Platte ausgezählt.

Aus dem Mittelwert der beiden Bestimmungen errechnete sich dann die Keimkonzentration bzw. sie wurde bei den nicht mehr zählbaren Kolonienmengen aus den vorangegangenen Werten extrapoliert.

Tabelle 8: Aufbau der Verdünnungsreihe zur Prüfung der Nachweisgrenze

Verdünnungsstufe	CFU Lösung I (500 µl)	CFU Lösung II (500 µl)	CFU Stammlösung (1 ml)	Einsatz DNA-Isolierung 200 µl (:5)	Einsatz/PCR 2,5 µl der DNA-Isolierung (:80)
I (MF 2)			$= (I+K) \cdot 10^4$	$= ((I+K)/5) \cdot 10^4$	$= ((I+K)/400) \cdot 10^4$
II (1:10)			$= (I+K) \cdot 10^3$	$= ((I+K)/5) \cdot 10^3$	$= ((I+K)/400) \cdot 10^3$
III (1:10 ²)			$= (I+K) \cdot 10^2$	$= ((I+K)/5) \cdot 10^2$	$= ((I+K)/400) \cdot 10^2$
IV (1:10 ³)			$= (I+K) \cdot 10$	$= ((I+K)/5) \cdot 10$	$= ((I+K)/400) \cdot 10$
V (1:10 ⁴)	Zahl I	Zahl K	$= I+K$	$= (I+K)/5$	$= (I+K)/400$
VI (1:10 ⁵)	Zahl G	Zahl H	$= G+H$	$= (G+H)/5$	$= (G+H)/400$
VII (1:10 ⁶)	Zahl E	Zahl F	$= E+F$	$= (E+F)/5$	$= (E+F)/400$
VIII (1:10 ⁷)	Zahl C	Zahl D	$= C+D$	$= (C+D)/5$	$= (C+D)/400$
IX (1:10 ⁸)	Zahl A	Zahl B	$= A+B$	$= (A+B)/5$	$= (A+B)/400$

Die Verdünnungslösungen I und II wurden bis zur späteren Verwendung eingefroren und erst dann führte man die beiden Lösungen zu einer Stammlösung mit einem Gesamtvolumen von 1 ml zusammen. Die Ergebnisse wurden zum einen nach der maximal erreichten Verdünnungsstufe ausgewertet, entsprechend Spalte 1 in Tabelle 8, zum anderen nach der errechneten Keimzahl in 1 ml Probe (Spalte 4) und nach der Menge, die in die PCR eingesetzt wurde (Spalte 6).

3.8 Gewinnung von DNA-Templates aus den Bakterienverdünnungen

Zur DNA-Isolierung aus reinem Kulturmaterial wurden aus diesen Stammlösungen 200 µl in das QIAamp[®] DNA Mini Kit eingesetzt und wie folgt DNA extrahiert.

20 µl QIAGEN[®] Protease wurden vorgelegt und mit 200 µl Stammlösung sowie 200 µl AL Puffer gründlich vermischt und anschließend 10 min bei 56°C inkubiert. Danach wurde mit 200 µl Ethanol (96 %) inaktiviert, wieder gründlich gemischt und das Lysat

auf eine QIAamp® Spin Column gegeben. Es erfolgte eine erste Zentrifugation für 1 min bei 13 200 rpm. Das Filtrat wurde verworfen und die Säule in ein neues Sammelgefäß gestellt, 500 µl AW1 Puffer zugefügt und bei 13 200 rpm für 1 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Eluates wurden 500 µl AW2 Puffer auf die Säule gegeben und für 3 min bei 13 200 rpm zentrifugiert.

Die abschließende Waschung der Säule zur Gewinnung der DNA erfolgte für die Proben der Verdünnungsstufen I–VI mit 200 µl AE Puffer, für die Verdünnungsstufen VII–IX wegen des zu erwartenden sehr geringen DNA-Gehaltes mit 50 µl AE Puffer. Die Säulen wurden nun für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 1 min bei 13 200 rpm zentrifugiert. Das gewonnene Eluat enthielt die DNA-Extraktion und wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C ein gefroren.

3.9 Gewinnung von DNA-Templates aus beimpften Stühlen und Stuhlproben von Patienten

Das QIAamp® DNA Stool Mini Kit ist bereits mehrfach untersucht und mit anderen kommerziellen Extraktions-Kits verglichen worden. Es hat sich als effektiv in der DNA-Ausbeute und bei der Reduktion möglicher Inhibitoren erwiesen (Collins et al. 2001, Li et al. 2003, Nantavisai et al. 2007).

Zunächst wurde Stuhl von gesunden Testpersonen mit den Bakterienlösungen aus den Verdünnungsreihen im Verhältnis 1:1 versetzt und dann aus diesem Gemisch die DNA mit dem QIAamp® Stool Mini Kit wie folgt extrahiert. 200 mg gefrorener oder frischer Nativstuhl wurden in 1,4 ml ASL Puffer gelöst und gut durchgemischt, danach für 5 min bei 70°C inkubiert, erneut gemischt und 1 min bei 13 200 rpm zentrifugiert. 1,2 ml des Überstandes wurden weiter verwendet und in einem frischen Eppendorfgefäß mit 1 InhibitEX Tablette versetzt, zur Adsorption von möglichen DNA zerstörenden Substanzen oder Inhibitoren im Stuhl. Nach einer Minute wurde erneut für 3 min bei 13 200 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und wieder für 3 min bei 13 200 rpm zentrifugiert. In einem weiteren 1,5 ml fassenden Eppendorf Gefäß wurden inzwischen 15 µl Proteinase K vorgelegt, dem dann 200 µl des Überstandes der Stuhllösung und 200 µl AL Puffer zugegeben wurden. Die Substanzen wurden sehr kräftig durchgemischt und dann 10 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Ethanol 96 % zugegeben, wieder kräftig gemischt, das Lysat auf eine QIAamp® Spin column gegeben und 1 min bei 13 200

rpm zentrifugiert, bis das Lysat völlig durch die Säule gelaufen war. Das Eluat wurde verworfen und die Säule nun mit 500 µl AW1 Puffer gewaschen, 1 min bei 13 200 rpm zentrifugiert, das Eluat erneut verworfen und wieder mit 500 µl AW2 Puffer gewaschen. Nun wurde 3 min bei 13 200 rpm zentrifugiert und das Eluat verworfen. Nach einer Inkubationszeit von 1 min bei Raumtemperatur und einem letzten Zentrifugieren für 1 min bei 13200 rpm wurde mit 200 µl AE Puffer endgültig die DNA eluiert. Die extrahierte DNA wurde eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.10 Herkunft der klinischen Proben zur Testung mit konventionellen mikrobiologischen Untersuchungen und PCR

Die Real-Time Multiplex PCR wurde an insgesamt 552 klinischen Proben angewendet. Die DNA-Extraktion erfolgte analog mit dem QIAamp[®] Stool Mini Kit wie oben beschrieben. 134 Stühle stammten aus einem akademischen Lehrkrankenhaus, 70 bereits mikrobiologisch positiv gestestete Stühle aus einer Universitätsklinik und 159 Proben aus einer tropenmedizinischen Ambulanz. 189 Proben aus Bundeswehrkrankenhäusern waren auf Grund unterschiedlichster Fragestellungen von Soldaten mit und ohne Durchfall gewonnen worden.

4 Ergebnisse

4.1 Ermittlung der optimalen PCR-Bedingungen

4.1.1 Vergleich unterschiedlicher Primerkonzentrationen

Die Primerkonzentrationen wurden bei 1,5 mM MgCl, 3 mM MgCl, 4 mM MgCl und 5 mM MgCl im Master Mix einzeln mit DNA-Template der Positivproben aus Kultur getestet.

Die Primerkonzentrationen entsprechen folgenden Absolutwerten:

- 0,25 µl gleich 3,125 pmol Primer und 0,875 pmol Sonde
- 0,75 µl gleich 9,375 pmol Primer und 2,625 pmol Sonde
- 1,5 µl gleich 18,75 pmol Primer und 1,050 pmol Sonde

Es wurde ein Standardcyclingprotokoll mit einem Touch-down von 56°C auf 50°C gewählt

Bei einer Magnesiumkonzentration von 3 mM und einer Primerkonzentration von 0,75 µl zeigten sich die besten Ergebnisse. Die C_t-Werte aller Positivproben der vier nachzuweisenden Keime lagen dicht beieinander (Tabelle 9, Abbildung 5) und die Steigung der Kurven in der logarithmischen Phase der Amplifikation war bei allen vier Proben vergleichbar (MW 0,06 +/- 0,01). Die Endfluoreszenzen erreichten im Mittel einen Wert von 0,79.

Wurde bei gleicher Magnesiumkonzentration die Menge an Primern und Sonden erniedrigt, so ging die Endfluoreszenz um 18 % für alle Proben zurück, die C_t Werte blieben nahezu gleich (MW 11,59, +/- 1,00). Bei Erhöhung der Primerkonzentration auf 1,5 µl nahmen die Endfluoreszenzen für Yersinien und Campylobacter um mehr als 60 % zu. Für Shigellen hingegen ging die Endfluoreszenz um 40 % zurück und die Kurve zeigte einen Abfall in der Plateauphase als deutlichen Hinweis auf die Bildung von Primer-Dimeren.

Wurde die gleiche Versuchsanordnung bei einer Magnesiumkonzentration von

1,5 mM durchgeführt, also ohne Zugabe von zusätzlichem Magnesium zum Mastermix, so lagen die C_t Werte für die einzelnen Proben bis zu 10 Zyklen auseinander. Die Endfluoreszenzen für die niedrige und mittlere Primerkonzentration waren etwa 50 % niedriger als bei einem Magnesiumgehalt von 3 mM. Bei einer Primerkonzentration von 1,5 μ l zeigte das Primer-Sonden Set für Campylobacter keine Reaktion.

Tabelle 9: C_t Werte, Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (SD) der Positivproben bei verschiedenen Primer/Sondenkonzentrationen und unterschiedlichem Magnesiumgehalt des Mastermix

	Primerkonzentration	Salmonellen	Shigellen	Yersinien	Campylobacter	MW	SD
1,5 mM	0,25 μ l	16,28	17,82	16,07	26,09	19,07	4,75
	0,75 μ l	10,03	11,99	16,65	20,54	14,80	4,73
	1,5 μ l	8,28	9,87	15,47	0	8,41	6,40
3 mM	0,25 μ l	12,19	12,44	11,52	10,21	11,59	1,00
	0,75 μ l	12,08	10,48	11,3	9,53	10,85	1,09
	1,5 μ l	12,31	10,59	11,65	9,04	10,90	1,43
4 mM	0,25 μ l	11,43	10,99	10,97	9,4	10,70	0,89
	0,75 μ l	11,74	10,23	11,08	9,44	10,62	1,00
	1,5 μ l	12,09	9,98	11,68	9,27	10,76	1,35
5 mM	0,25 μ l	5,39	7,61	12,84	15,32	10,29	4,58
	0,75 μ l	5,83	6,34	13,55	16,21	10,48	5,20
	1,5 μ l	6,21	6	13,4	0	6,40	5,48

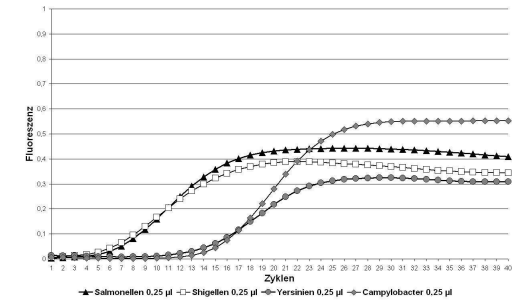
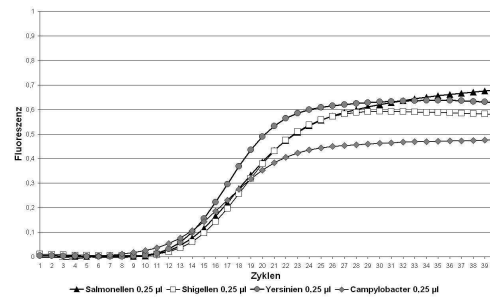
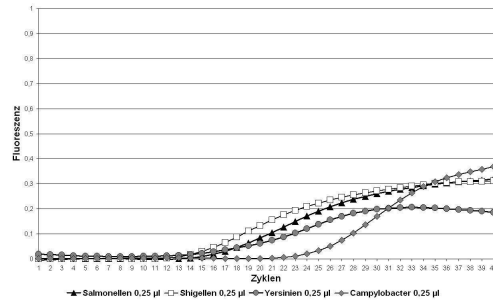
Ähnliche Reaktionen waren auch bei einer Magnesiumkonzentration von 5 mM im Mastermix zu beobachten. Die C_t Werte für Shigellen und Salmonellen waren sehr niedrig (< 10), für Yersinien und Campylobacter begann der Fluoreszenzanstieg erst etwa 10 Zyklen später. Campylobacter erreichte deutlich niedrigere Endfluoreszenzen als die anderen Keime. Bei einer Primer/Sondenkonzentration von 1,5 μ l gab es keine verwertbare Reaktion mehr. Der Kurvenverlauf für Shigellen war bei dieser Primerkonzentration wieder hinweisend auf unspezifische Reaktionen. Da die Ergebnisse für 3 mM Magnesium und 4 mM Magnesium sehr ähnlich sind, wird in Abbildung 5 auf die Darstellung der Ergebnisse für 4 mM Magnesium verzichtet.

Primer 1,5 mM Magnesium

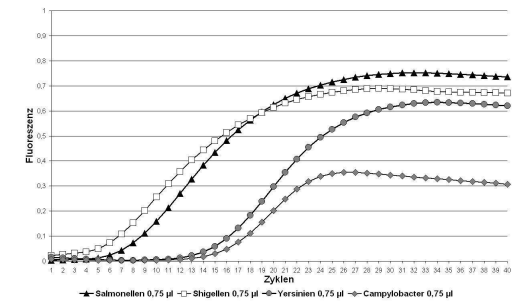
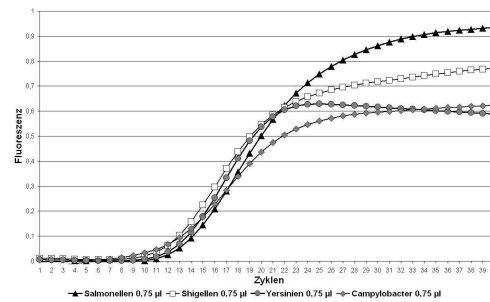
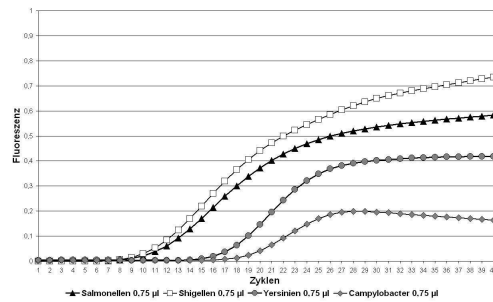
3 mM Magnesium

5 mM Magnesium

0,25
µl



0,75
µl



1,5 µl

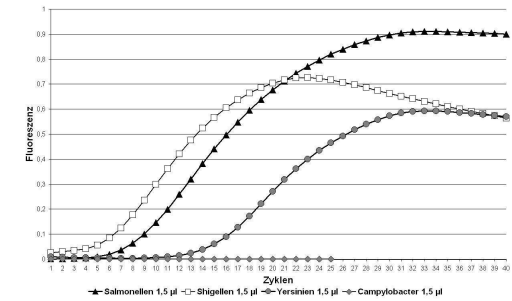
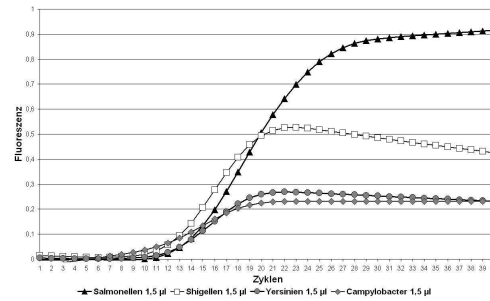
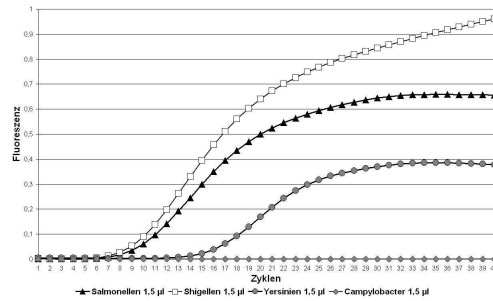


Abbildung 5: Fluoreszenzkurven für die einzelnen Proben bei unterschiedlichen Primer und Magnesiumkonzentrationen im PCR-Ansatz

4.1.2 Optimierung der Temperatur Protokolle

Alle Varianten wurden nun im Multiplexansatz, d.h. gemeinsam mit verschiedenen Cycling-Protokollen getestet. Im Wesentlichen unterschieden sich die Ergebnisse für die einzelnen Touch-down Protokolle nicht.

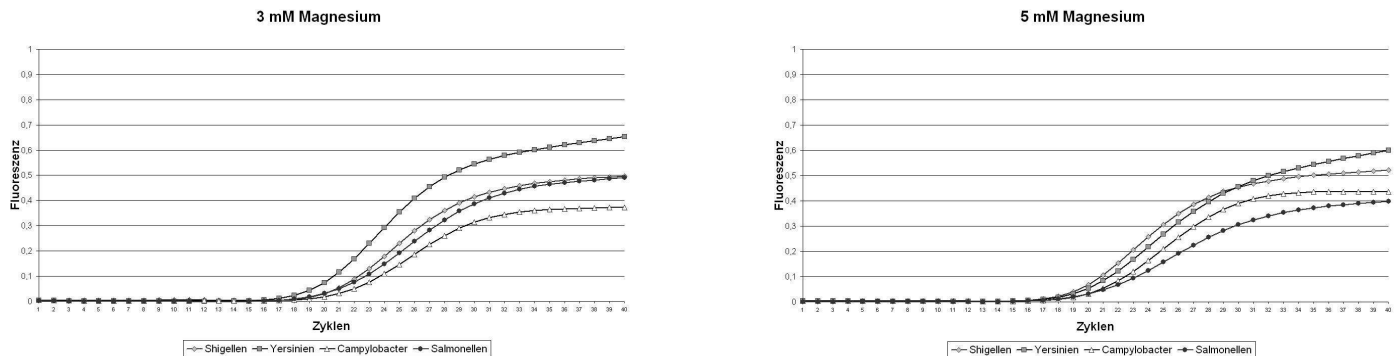


Abbildung 6: Fluoreszenzen für Salmonellen, Shigellen, Yersinien und Campylobacter bei 3 mM und 5 mM Magnesium und Touch-down Protokoll 56°C–50 °C

Der einheitlichste Kurvenverlauf für alle Proben mit fast identischen C_t Werten und einer guten Endfluoreszenz wurde bei einem Touch-down Protokoll von 56°C auf 50°C erreicht.

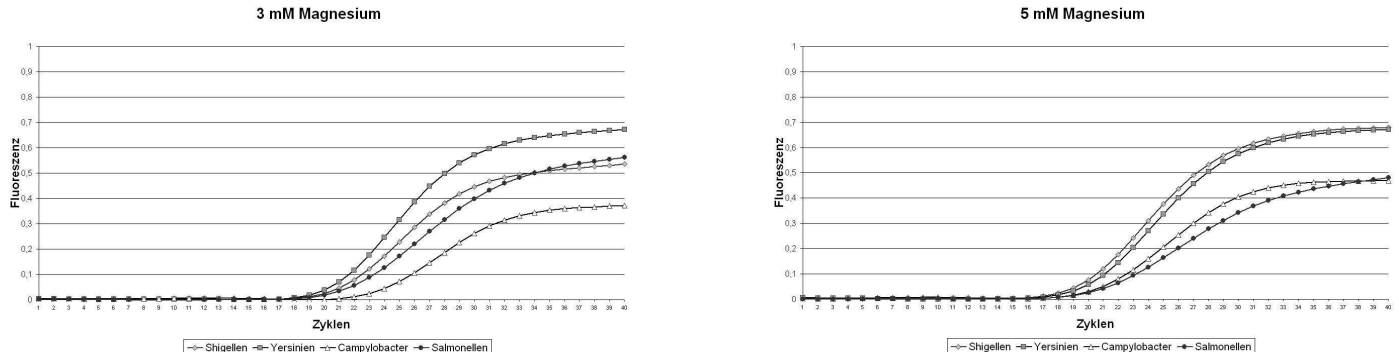


Abbildung 7: Fluoreszenzen für Salmonellen, Shigellen, Yersinien und Campylobacter bei 3 mM und 5 mM Magnesium und Touch-down Protokoll 58°C–52 °C

Bei Touch-down Protokollen mit höheren Temperaturen und größerem Magnesiumgehalt waren die Endfluoreszenzen im Shigellen und Yersinienkanal höher, das Campylobacter Primer/Sonden Set zeigte bei 3 mM Magnesium bereits eine Zunahme des C_t Wertes, ebenso dann bei 5 mM Magnesium. Hier verschlechterte sich auch das Ergebnis für Salmonellen.

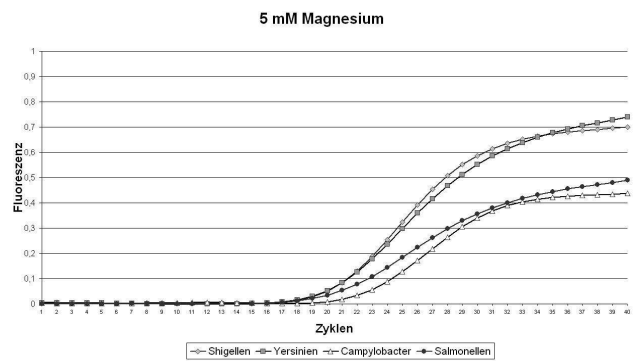
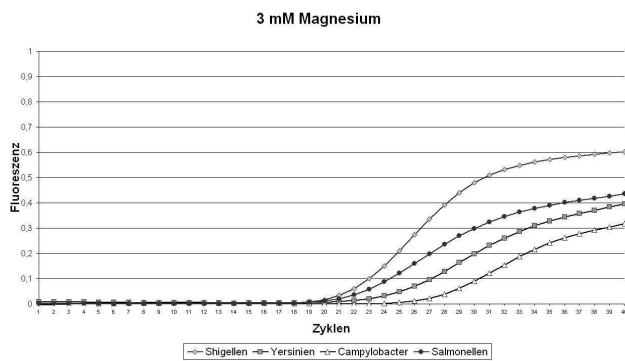


Abbildung 8: Fluoreszenzen für Salmonellen, Shigellen, Yersinien und Campylobacter bei 3 mM und 5 mM Magnesium und Touch-down Protokoll 60°C–54 °C

Bei der Variante 60–54°C und einer Magnesiumkonzentration von 3 mM flachten alle Kurven ab und die C_t Werte lagen weiter auseinander. Bei 5 mM Magnesium war wiederum für Campylobacter und Salmonellen der C_t Wert höher und die Empfindlichkeit verringert.

4.1.3 Weitere Einstellungen

In den folgenden Versuchen bereiteten unspezifische Bindungen des Shigellen- und des Salmonellenprimer/Sonden Sets mit den anderen Templates Probleme.

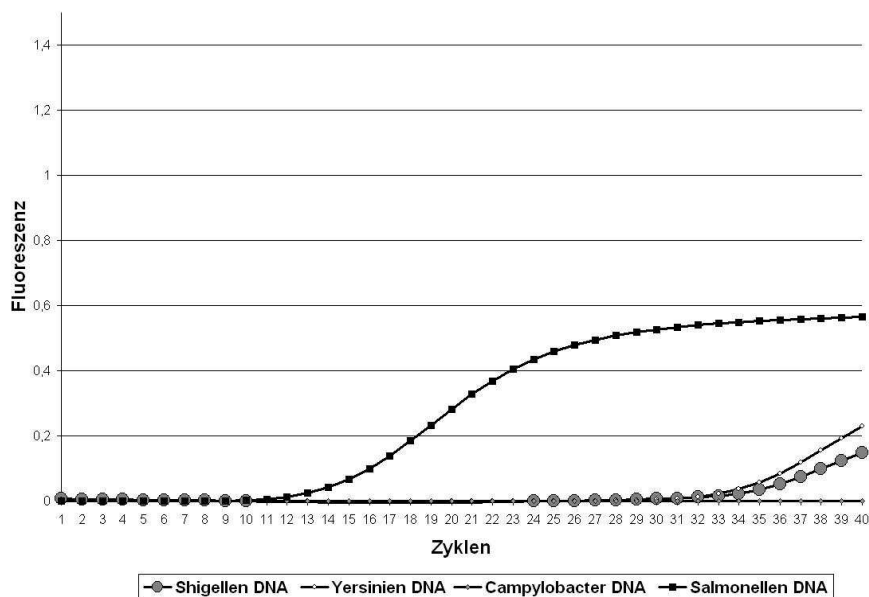


Abbildung 9: Kurven für Salmonellenprimer bei einer Primerkonzentration von 0,75 µl, einem Magnesiumgehalt von 3 mM im Primermix, Cycling-Protokoll mit Touch-down 56°C–50° mit unspezifischen Bindungen der Yersinien- und Shigellentemplates

Wechselwirkungen traten vor allem zwischen Salmonellen und Shigellen auf, sowie zwischen Shigellen und Yersinien. Durch Verdünnung der Sonden und Anpassung der Gesamtprimerkonzentration konnte dieses Problem eliminiert werden.

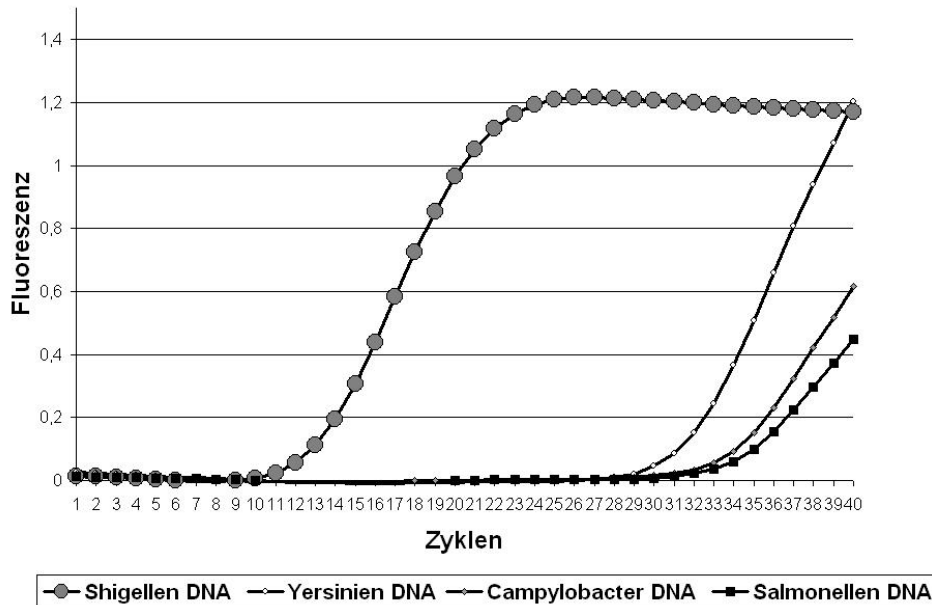


Abbildung 10: Kurven für Shigellenprimer bei einer Primerkonzentration von 0,75 µl, einem Magnesiumgehalt von 3 mM im Primermix, Cycling-Protokoll mit Touch-down 56°C–50°C, mit unspezifischen Bindungen aller anderen Templates

Das Primer/Sonden Set für Salmonellen wurde mit 1,5 µl eingesetzt, aber die Sonde 1:5 verdünnt. Von Shigellen und Yersinien Primer/Sonden wurden 0,75 µl verwendet, die Sonde für Shigellen in der Verdünnung 1:5. Nach dieser Anpassung traten keine irregulären Reaktionen mehr auf. Primer und Sonden für Campylobacter gaben bereits in niedriger Konzentration von 0,25 µl gute Ergebnisse.

Für alle weiteren Versuche wurde folgendes Protokoll verwendet:

4.2 Protokoll der Real-Time Multiplex PCR zum Nachweis enteropathogener Keime im Stuhl auf RotorGene 6000

Zunächst werden aus den kommerziell angefertigten Primern und Sonden Stammlösungen mit einer Konzentration von 100 pg/µl hergestellt. Die Sonden werden entsprechend verdünnt. Der Primermix besteht dann aus den in der Tabelle angegebenen Mengen und enthält die aufgeführten Endkonzentrationen.

Tabelle 10: Zusammensetzung des Primermix

	Menge	Endkonzentration Primer	Endkonzentration Sonde
Salmonellen	1,5 µl	18,75 pmol	1,050 pmol (1:5 verdünnt)
Shigellen	0,75 µl	9,375 pmol	0,525 pmol (1:5 verdünnt)
Yersinien	0,75 µl	9,375 pmol	2,625 pmol
Campylobacter	0,25 µl	3,125 pmol	0,875 pmol

Aus Primermix, vorgefertigter Mastermix, Magnesium und isolierter Proben-DNA wird dann der zu untersuchende PCR-Ansatz zusammengefügt.

Tabelle 11: PCR-Ansatz pro Reaktionsgefäß

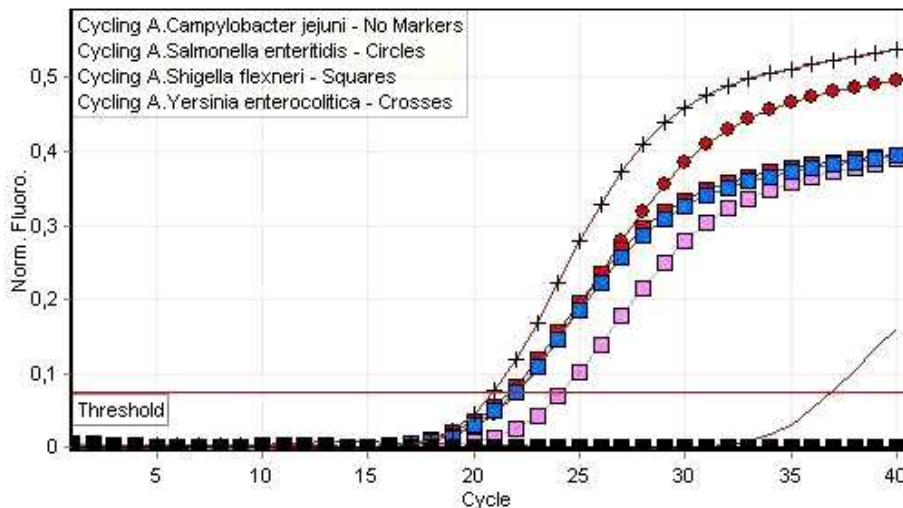
HotStar® Taq Mastermix	12,50 µl	enthält 1,5 mM MgCl ₂
MgCl ₂ 25 mM	1,50 µl	entspr. 3 mM MgCl ₂ Endkonzentration
H ₂ O	5,50 µl	
DNA/Template	2,50 µl	
Primermix	0,75 µl	
Gesamt Volumen	25,00 µl	

Diese wird mit folgendem Cycling-Protokoll in der RotorGene 6000 amplifiziert und von der internen Software ausgewertet.

Tabelle 12: Cycling-Protokoll für RotorGene 6000

Inkubation	15 min	95°C
40 Zyklen:		
Denaturierung	15 sec	94°C
Annealing	20 sec	56°C Touch-down 50°C
Extension	30 sec	72°C
Final extension	30 sec	40°C

Die Darstellung der Resultate für mehrere Proben kann dann wie unten abgebildet aussehen. Es wurde die Option „allelic discrimination“ gewählt. Alle Kanäle werden nebeneinander dargestellt, so dass für die Proben, bei denen es zu einer PCR-Amplifikation gekommen ist in der Datenausgabe „Reaction“, und für Proben bei denen es zu keiner PCR-Amplifikation gekommen ist “No Reaction“ angegeben wird. Alle dazugehörigen Fluoreszenzkurven werden gemeinsam in einer Grafik dargestellt. Alternativ kann auch jeder Kanal einzeln analysiert werden, die jeweiligen C_t Werte abgelesen und die jeweiligen Fluoreszenzkurven begutachtet werden. In Abbildung 11 sieht man die Ergebnisausgabe für zwei positive Proben für Shigellen, in der Tabelle gelb markiert, die vier Positivproben für die einzelnen Keime, in der Tabelle rot markiert, sowie die grafische Darstellung.



No.	Colour	Probe	Result	C. jejuni	S. enteritidis	Sh. flexneri	Y. enterocolitica
1	■	Sal	Sal	No Reaction	Reaction	No Reaction	No Reaction
2	■	Yers	Yers	No Reaction	No Reaction	No Reaction	Reaction
3	■	Camp	Camp	Reaction	No Reaction	No Reaction	No Reaction
4	■	Shig	Shig	No Reaction	No Reaction	Reaction	No Reaction
5	■	D.F. 15	Shig	No Reaction	No Reaction	Reaction	No Reaction
6	■	D.F. 1	Shig	No Reaction	No Reaction	Reaction	No Reaction
7	■	D.F. 23		No Reaction	No Reaction	No Reaction	No Reaction
8	■	D.F. 24		No Reaction	No Reaction	No Reaction	No Reaction
9	■	D.F. 25		No Reaction	No Reaction	No Reaction	No Reaction
10	■	H2O		No Reaction	No Reaction	No Reaction	No Reaction

Abbildung 11: Beispiel der Befundausgabe auf Rotor Gene 6000, hier Option „allelic discrimination“, die alle positiven Ergebnisse in einer Grafik darstellt

4.3 Semiquantifizierung

Obwohl das Ziel ein rein qualitativer Erregernachweis war, konnte aus der Höhe des C_t Wertes auf die Menge der DNA in der Probe und damit indirekt auf die Keimzahl geschlossen werden. Proben mit einem hohen DNA-Gehalt zeigten einen niedrigen C_t Wert, Proben mit einem niedrigen DNA-Gehalt einen hohen C_t Wert.

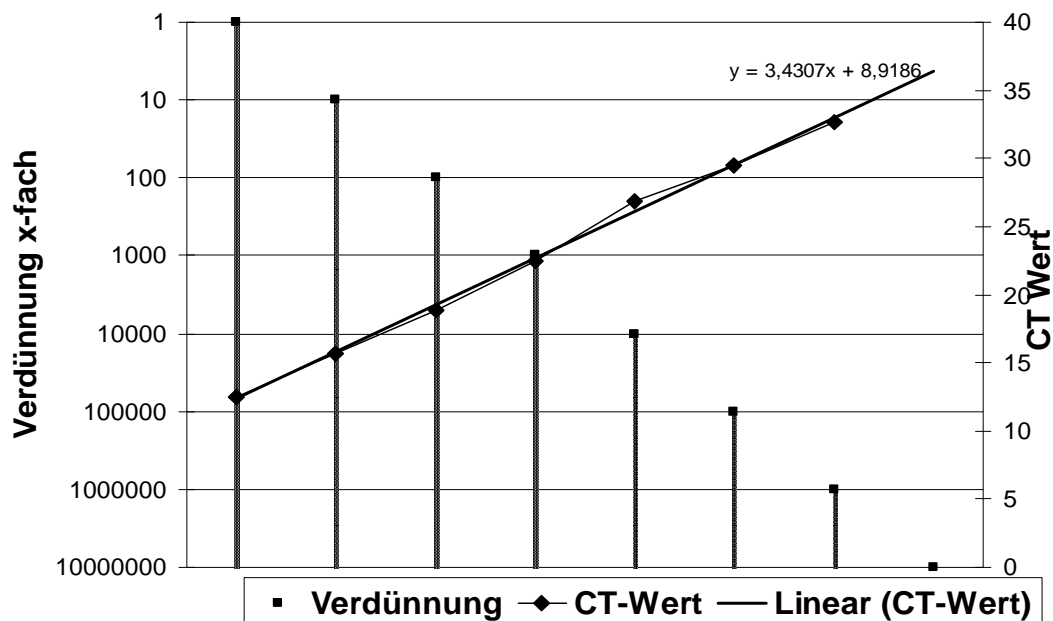


Abbildung 12: C_t Wert im Verhältnis zum DNA Gehalt der Probe. DNA-Template aus Salmonellenkultur in Verdünnungen bis 1: 10^8 Standardprotokoll (Touch-down 56°C–50°C, 3mM Magnesium)

Für die Verdünnungsreihen aus Stuhlproben, die zur Sensitivitätsbestimmung verwendet wurden, wurde die Effizienz bestimmt. Sie errechnet sich aus der Steigung M der Standardkurve nach der Formel:

$$[10^{-1/M}] - 1$$

Sie lag für Campylobacter, Shigellen und Yersinien zwischen 102 und 105 %. Für die Salmonellen errechnete sich ein Wert von 189 %, der anzeigt, dass es entweder zu unspezifischen Hydrolysen und der Bildung von Primer-Dimeren kommt oder die Probe Inhibitoren enthielt.

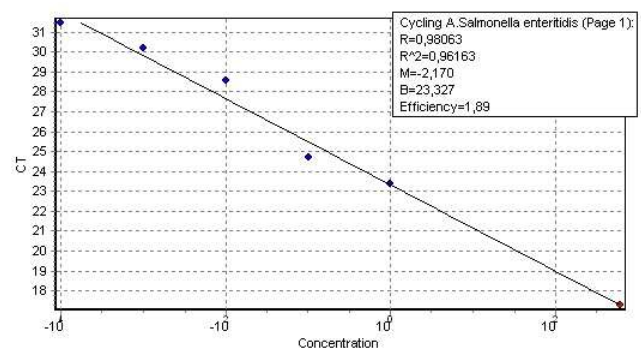
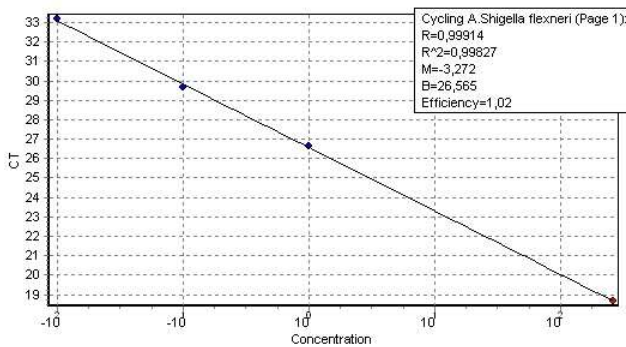
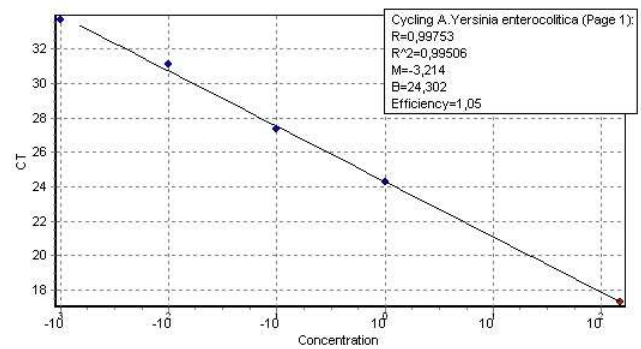
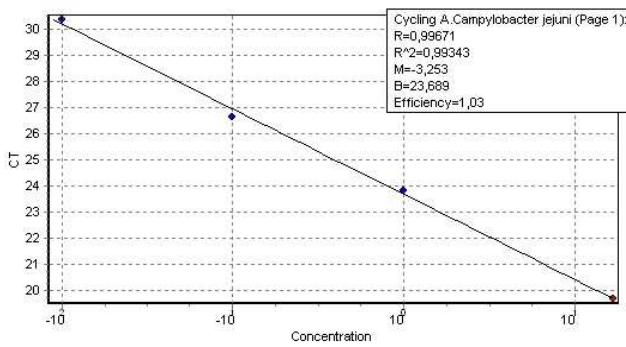


Abbildung 13: Effizienzberechnung der jeweiligen Primer/Sonden Sets für die PCR aus mit DNA-Verdünnungen beimpften Stühlen

Aus reiner DNA hingegen war das Ergebnis mit 96 % (Steigung $M = 3,4307$, Efficiency 0,96) im Erwartungsbereich, siehe auch vorangegangene Abbildung 12.

Da keine Quantifizierung der Ergebnisse angestrebt war, wurde auf eine weitere Optimierung verzichtet. Die Ergebnisse zeigen aber, dass ein Rückschluss vom C_t Wert auf die Keimmenge zulässig ist.

4.4 Robustheit

Die Ergebnisse der PCR waren von Versuch zu Versuch und von Versuchsreihe zu Versuchsreihe stabil reproduzierbar.

Die intraAssay Varianz, also die Standardabweichung des C_t Wertes innerhalb eines Versuches lag für Salmonellen bei 0,33, für Campylobacter bei 0,35, Yersinien 0,14 und Shigellen 0,09, d.h. weniger als 1 Zyklus.

Tabelle 13: Variabilität der C_t-Werte der Positivproben bei wiederholten Bestimmungen innerhalb eines Laufes (intraAssay Varianz)

Probe	Salmonellen	Shigellen	Campylobacter	Yersinien
1	19,33	19,1	21,46	19,99
2	20,04	19,05	22,16	19,87
3	19,9	18,91	22,11	19,67
4	19,53	18,95	22,2	19,96
MW	19,7	19,0025	21,9825	19,8725
SD	0,32731229	0,08770215	0,3502737	0,1443087

Von Test zu Test (interAssay Varianz) betrug die Standardabweichung des C_t Wertes für Salmonellen 0,41, für Campylobacter 0,74, für Yersinien 0,30 und für Shigellen ebenfalls 0,30. Diese Werte sind alles Bruchteile eines Zyklus, so dass keine relevante Abweichung auftrat.

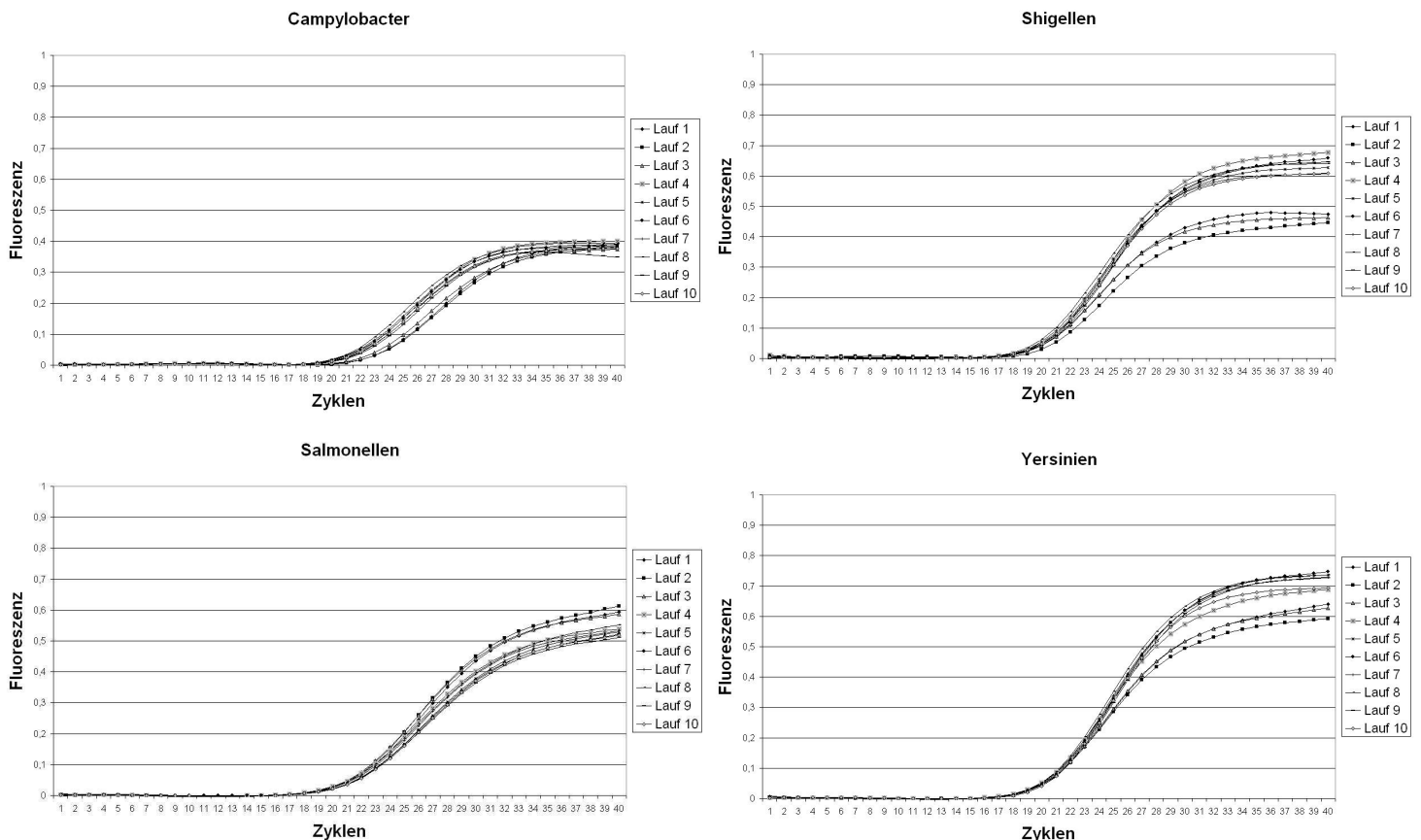


Abbildung 14: InterAssay Varianz dargestellt an 10 Kurven der Positivkontrollen aus verschiedenen Versuchen an verschiedenen Tagen mit Standardprotokoll (Touch-down 56°C–50°C, 3mM Magnesium)

4.5 Sensitivitätsprüfung

Mit diesen Versuchsparametern wurde die Sensitivität des Systems getestet. Wie im Methodenteil beschrieben, wurden Verdünnungen der Bakterien hergestellt und entweder direkt aus diesen Lösungen DNA extrahiert oder Stuhl von gesunden Testpersonen mit den Verdünnungslösungen im Verhältnis 1:1 versetzt, und dann aus diesem Gemisch die DNA extrahiert. Von der so extrahierten DNA wurde wiederum 1/80stel in die PCR eingesetzt. Die Verdünnungsstufen reichten von 1:1 bis 1:10⁸. Die Ergebnisse der PCR aus beimpften Stühlen und den entsprechenden Kulturen zeigten keine wesentlichen Unterschiede.

Tabelle 14: Erreichte Verdünnungsstufen für die einzelnen Keime im Vergleich von DNA Isolationen aus Kultur und beimpften Stühlen

C _t Wert	Salmonellen		Shigellen		Campylobacter		Yersinien	
	Reine DNA	Stuhl	Reine DNA	Stuhl	Reine DNA	Stuhl	Reine DNA	Stuhl
I (MF 2)	24,13	24,96	24,64	27,45	22,43	24,10	24,38	24,91
II (1:10)	28,63	27,54	28,53	30,67	24,76	27,02	28,75	28,08
III (1:10 ²)	29,63	30,96	32,68	34,58	28,75	30,61	32,29	31,96
IV (1:10 ³)	32,88	32,94	35,36		32,39	35,77		34,55
V (1:10 ⁴)		34,61						
VI (1:10 ⁵)								
VII (1:10 ⁶)								
VIII (1:10 ⁷)								
IX (1:10 ⁸)								

Im Stuhl konnten höhere Verdünnungen für Yersinien und Salmonellen als positiv gewertet werden, während dies aus der reinen DNA nicht gelang. Der Grund für dieses Phänomen ist nicht bekannt. Veränderungen des Touch-downs oder der Magnesiumkonzentration hatten keinen verbessernden Effekt auf die Nachweisgrenze. Der Anstieg des C_t Wertes war bei allen Keimen außer Salmonellen annähernd linear. Proportional zum Verdünnungsgrad der Bakteriensuspension fiel die Endfluoreszenz bei allen Keimen ab, außer bei Campylobacter (siehe Abbildung 15).

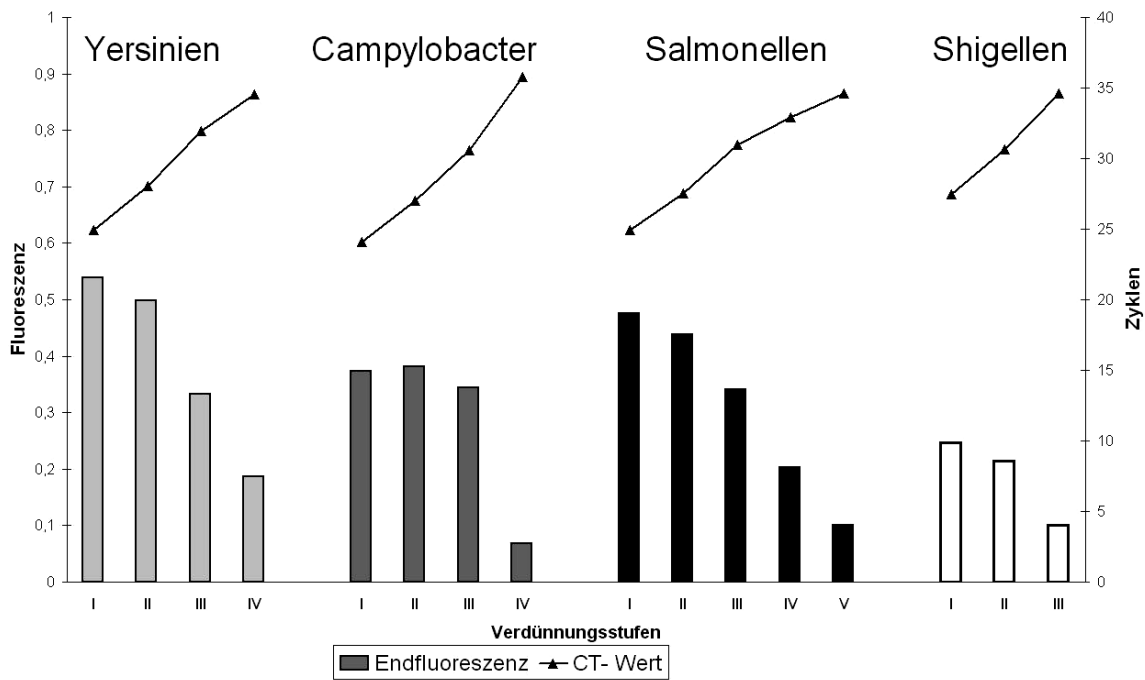


Abbildung 15: Übersicht der C_t -Werte und Endfluoreszenzen für die einzelnen Verdünnungsstufen für alle Keime aus beimpften Stühlen mit Standardprotokoll (Touch-down 56°C–50°C, 3mM Magnesium)

Für Campylobacter konnte sowohl mit reiner Bakteriensuspension als auch aus beimpften Stühlen bis zu einer Verdünnung des Ausgangsmaterials von 1:10³ ein reproduzierbarer Nachweis geführt werden. Bei Salmonellen wurden positive Ergebnisse bis zu einer Verdünnung von 1:10⁴ erreicht. Dieses Ergebnis war allerdings in 3 von 8 Versuchen nicht reproduzierbar, so dass nur die Verdünnung 1:10³ gewertet wurde. Bei Shigellen und Yersinien lag die Nachweisgrenze im Stuhl bei 1:10².

Die erreichte Verdünnungsstufe entsprach bei Yersinien einer Keimzahl von 4×10^5 cfu/ml, bei Salmonellen einer Keimzahl von 4×10^4 cfu/ml und bei Campylobacter einer Keimzahl von 3×10^3 cfu/ml im Ausgangsmaterial. Shigellen konnten aus Stuhl bei einer Keimzahl von 3×10^5 cfu/ml nachgewiesen werden, aus reiner Kultur bis 3×10^4 cfu/ml. Diese Werte beziehen sich jeweils auf 1 ml Probe, also entweder Bakteriensuspension oder nicht angereicherter Stuhl.

Aus dieser Probe wurden 200 µl zur Extraktion der DNA verwendet und von der Elution wiederum 2,5 µl in die PCR eingesetzt. Betrachtet man die effektiv in die PCR eingesetzte Bakterienanzahl, so ergaben sich folgende theoretische Nachweisgrenzen für die einzelnen Keime.

Tabelle 15: Errechnete Nachweisgrenzen für die einzelnen Keime pro PCR Ansatz

	Salmonellen	Shigellen	Campylobacter	Yersinien
Reine DNA	103 cfu	71 cfu	9 cfu	1080 cfu
Stuhl	103 cfu	708 cfu	9 cfu	1080 cfu

Insgesamt erschien die Affinität der Shigellen- und Yersinienprimer nicht so hoch wie die der Salmonellen und des Campylobacterprimer. Veränderungen der Cycling-Protokolle, der Magnesiumkonzentrationen oder der Primerkonzentrationen hatten keinen positiven Einfluss auf die Nachweisgrenze.

4.6 Spezifitätsprüfung

Zur Prüfung der Spezifität des optimierten Testsystems wurden DNA-Präparationen der in Tabelle 16 aufgeführten Bakterienstämme verwendet. Alle Keime aus Patientenmaterial oder sog. „Hausstämme“ waren mit Hilfe des Vitek[®]-Analyzers (Fa. bioMérieux, Nürtingen) spezifiziert worden.

Tabelle 16: Bakterienstämme zur Spezifitätsprüfung – Negativproben

Name	Herkunft	Quelle
<i>Aeromonas spp.</i>	Patientenmaterial	UKE
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	ATCC
<i>Escherichia coli</i>	DSM 1806	DSMZ
<i>Citrobacter freundii</i>	Hausstamm	UKE
<i>Enterobacter cloacae</i>	DSM 30054	DSMZ
<i>Enterobacter aerogenes</i>	DSM 30057	DSMZ
<i>Klebsiella oxytoca</i>	DSM 5157	DSMZ
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DSM 30104	DSMZ
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	ATCC
<i>Morganella morganii</i>	Hausstamm	UKE
<i>Proteus mirabilis</i>	DSM 4479	DSMZ
<i>Proteus ox19 spp.</i>	Patientenmaterial	UKE
<i>Proteus vulgaris</i>	NCTC 8313	NCTC
<i>Providencia rettgeri</i>	Patientenmaterial	BNI
<i>Providencia spp.</i>	Patientenmaterial	UKE
<i>Serratia marcescens</i>	DSM 30121	DSMZ
<i>Campylobacter coli</i>	DSM 4689	DSMZ
<i>Campylobacter spp. Hip neg</i>	748/08 I	UKE
<i>Campylobacter spp. Hip neg</i>	748/08 II	UKE
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Patientenmaterial	UKE
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Hausstamm	BNI
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Patientenmaterial	UKE
<i>Enterococcus faecalis</i>	Patientenmaterial	UKE
<i>Enterococcus faecalis Gruppe D</i>	Hausstamm	BNI
<i>Enterococcus faecium</i>	Patientenmaterial	UKE
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	ATCC
<i>Streptococcus agalactiae Gruppe B</i>	Hausstamm	BNI
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 19615	ATCC
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6638	ATCC

Die Primer und Sonden für die einzelnen nachzuweisenden Erreger zeigten keine Reaktion mit den 29 Probekeimen, sowie anderen nicht pathogenen oder fakultativ pathogenen gramnegativen Keimen im Stuhl. In keinem der Versuche kam es zu falsch positiven Ergebnissen.

Tabelle 17: Bakterienstämme zur Spezifitätsprüfung – Positivproben

Name	Herkunft	Quelle	C _t Wert
<i>Campylobacter jejuni</i>	CCUG*15259 Stamm 870220	BNI	18
<i>Campylobacter jejuni</i>	Hausstamm	BNI	18
<i>Campylobacter jejuni</i>	Hausstamm	BNI	18
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 3291	ATCC	18
<i>Campylobacter jejuni</i> Hip pos	Hausstamm	BNI	12
<i>Campylobacter jejuni</i> Hip pos	Hausstamm	BNI	12
<i>Salmonella anatum</i>	Stamm 278/66	BNI	18
<i>Salmonella caracas</i> Gruppe H	Ringversuch	BNI	13
<i>Salmonella cholerasuis</i> Gruppe C	418M/68 Minor Stamm Paris	BNI	20
<i>Salmonella enteritidis</i> Gruppe D	Patientenmaterial	BNI	20
<i>Salmonella enteritidis</i> Gruppe D	Lebensmittel	BNI	13
<i>Salmonella enterocolitica</i>	Hausstamm	BNI	15
<i>Salmonella paratyphi</i> B	Patientenmaterial	BNI	19
<i>Salmonella typhi</i> Gruppe D	Hausstamm	BNI	13
<i>Salmonella typhimurium</i>	Hausstamm	BNI	16
<i>Salmonella typhimurium</i>	Hausstamm	ZInst BW LA II Vet*	16
<i>Shigella dysenteriae</i> O2	Stamm Schnitzii	BNI	20
<i>Shigella flexneri</i>	Hausstamm	BNI	17
<i>Shigella flexneri</i> 1a	Stamm SC 529 London	BNI	18
<i>Shigella sonnei</i>	SZ920/97	BNI	19
<i>Shigella sonnei</i>	Hausstamm	BNI	18
<i>Yersinia enterocolitica</i>	DSMZ 4780	DSMZ	17
<i>Yersinia enterocolitica</i> O3	Hausstamm	BNI	16
<i>Yersinia group</i>	Patientenmaterial	UKE	11
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	HH941/89	BNI	17

*CCUG: Culture Collection University of Göteborg

*ZInst BW LA II Vet: Zentralinstitut der Bundeswehr LA II, Veterinärmedizin, Kiel

Die Primer/Sonden Sets für Salmonellen waren spezifisch für *S. enteritidis* und *S. typhimurium*, sowie *S. typhi*. Primer und Sonden für Yersinien wiesen sowohl *Y. pseudotuberculosis* als auch *Y. enterocolica* nach, die für Shigellen erkannten alle Shigellenspezies.

Die Spezifität der Campylobacter-PCR wurde außerdem an einer kleinen Probenzahl mit dem Verfahren der MALDI-TOF (Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization-Time-Of-Flight-Mass-Spectrometry) geprüft. 23 Isolate wurden in Kultur, biochemisch und mit MALDI-TOF analysiert. Gleichzeitig wurde eine PCR aus den Stuhlproben und aus den angelegten Kulturen gemacht und die Ergebnisse verglichen.

Tabelle 18: Ergebnisse für PCR aus Stuhl und Kultur für Campylobacter Isolate im Vergleich mit Kultur, Biochemie und MALDI-TOF

Nr	Kultur/Biochemie	Maldi-TOF	PCR aus Stuhl	PCR aus Stuhl C _t Wert	PCR aus Kultur C _t Wert
1	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	21	15
2	<i>Camp spp.</i>	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	20	13
3	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	32	13
4	<i>Camp spp.</i>	<i>Camp coli</i>	neg	neg	neg
5	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	24	13
6	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	27	12
7	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	25	11
8	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	24	10
9	<i>Camp spp.</i>	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	33	25
10	<i>Camp spp.</i>	<i>Camp coli</i>	<i>Camp jejuni</i>	26	neg*
11	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	34	11
12	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	24	12
13	<i>Camp spp.</i>	<i>Camp coli</i>	neg	neg	neg
14	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	24	14
15	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	26	15
16	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	25	14
17	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	32	17
18	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	22	14
19	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	23	12
20	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	22	11
21	<i>Camp spp.</i>	<i>Camp coli</i>	<i>Camp jejuni</i>	30	neg*
22	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	21	15
23	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	<i>Camp jejuni</i>	32	12

*= fraglich Doppelinfektion

Das Primer/Sonden Set für *C. jejuni* reagierte ausschließlich mit *C. jejuni ssp.jejuni* und *doylei*, nicht mit anderen thermophilen *Campylobacter*, insbesondere nicht mit *C. coli*. Bei vier Proben wies die MALDI-TOF *Campylobacter coli* nach. Folgerichtig waren diese aus der Kultur mit PCR nicht nachweisbar. Allerdings hatte bei zwei dieser Proben die PCR aus dem Stuhl positiv für *C. jejuni* reagiert, mit jeweils eindeutigen C_t Werten, war aber aus der Kultur negativ, so dass hier eventuell eine Doppelinfektion vorgelegen haben könnte.

4.7 Klinische Prüfung

Schließlich erfolgte die Testung der PCR im klinischen Alltag. Zusätzlich zur standardisierten mikrobiologischen Diagnostik der Institute der Krankenhäuser wurde die PCR durchgeführt und die Ergebnisse anschließend verglichen. Insgesamt wurden 552 Proben untersucht.

4.7.1 Beschreibung der Probenkollektive

70 Proben kamen aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE). 32 stammten von männlichen Personen, 27 von weiblichen. Die Spannweite des Alters reichte von 1 Jahr bis 87 Jahre mit einem Median von 30 Jahren. 26 % (n=18) der Proben kamen von Kindern bzw. Jugendlichen unter 18 Jahren, 14 % (n=10) von Patienten über 60 Jahren. Die Indikation zur Untersuchung wurde klinisch gestellt. Daten über Grunderkrankungen oder Symptome waren nicht verfügbar. 65 Proben waren mikrobiologisch positiv. In je 2 Proben wurde EHEC und *Aeromonas spp.* nachgewiesen. In den anderen Proben fanden sich Salmonellen (*S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. spp.*), Shigellen (*S. sonnei*, *S. boydii*, *S. flexneri*), *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter spp.* und *Yersinia enterocolitica* O:3.

Weitere 134 Stuhlproben wurden über die Medilys Laborgesellschaft mbH Hamburg aus der Asklepios Klinik Altona/Hamburg (AKA) zur Verfügung gestellt (73 m, 61 w, Alter: 1–89 Jahre, Median 47 Jahre). Der Anteil an Kindern und Jugendlichen unter 18 Jahren betrug 13 % (n=17), der von Personen älter als 60 Jahre 37 % (n=49). Alle Proben waren mikrobiologisch positiv. Nachgewiesen wurden: *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. cholerasuis*, *S. typhi*, *S. spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter spp.*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica* O:3, *Yersinia pseudotuberculosis* und *Clostridium difficile*.

Die Mikrobiologischen Institute der Bundeswehrkrankenhäuser Berlin und Koblenz stellten insgesamt 189 Proben bereit, die von Soldaten aus dem Inland oder nach Auslandseinsatz stammten (156 m, 12 w, bei 21 Personen Geschlecht nicht erfasst, Alter: 22–63 Jahre, Median 33 Jahre, bei 61 Personen Alter nicht erfasst). Aus Auslandseinsätzen kamen 46 % der Proben (n=86), aus Deutschland 29 % (n=54), bei den verbleibenden 26 % (n=49) war kein Herkunftsland aufgezeichnet worden. Die Auslandseinsätze waren nach Afghanistan, Bosnien-Herzegowina, Djibouti, DR Kongo, Sudan und Pakistan erfolgt. Zwei Proben stammten von Soldaten, die zur See gefahren waren. Symptome der Probanden waren nicht dokumentiert worden. In einer Probe wurde *Shigella sonnei* und in einer zweiten *Salmonella typhimurium* mikrobiologisch nachgewiesen, alle übrigen waren negativ.

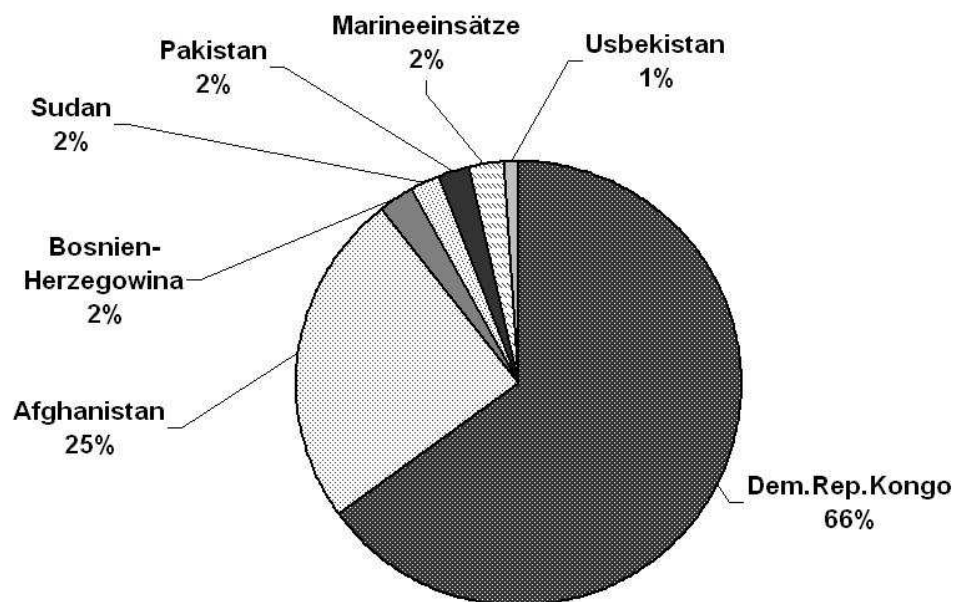


Abbildung 16: Prozentuale Verteilung der Einsatzländer im Kollektiv der Soldaten

Weitere 159 Stuhlproben waren in der Tropenmedizinischen Ambulanz des Bernhard-Nocht Institutes von Reiserückkehrern mit Durchfällen gewonnen worden (77 m, 82 w, Alter: 15–84 Jahre, Median 44 Jahre). Die Patienten hatten unterschiedliche Länder bzw. Kontinente bereist. Der größte Anteil mit 26 % (n=40) kam aus Indien, Pakistan oder Nepal zurück. Bei 13 Personen lagen keine Daten zum Reiseziel vor. In 12 Proben konnten kulturell Bakterien nachgewiesen werden (*ETEC*, *Shigella boydii*, *C. jejuni*, *C. spp.*); die verbleibenden 147 waren mikrobiologisch negativ.

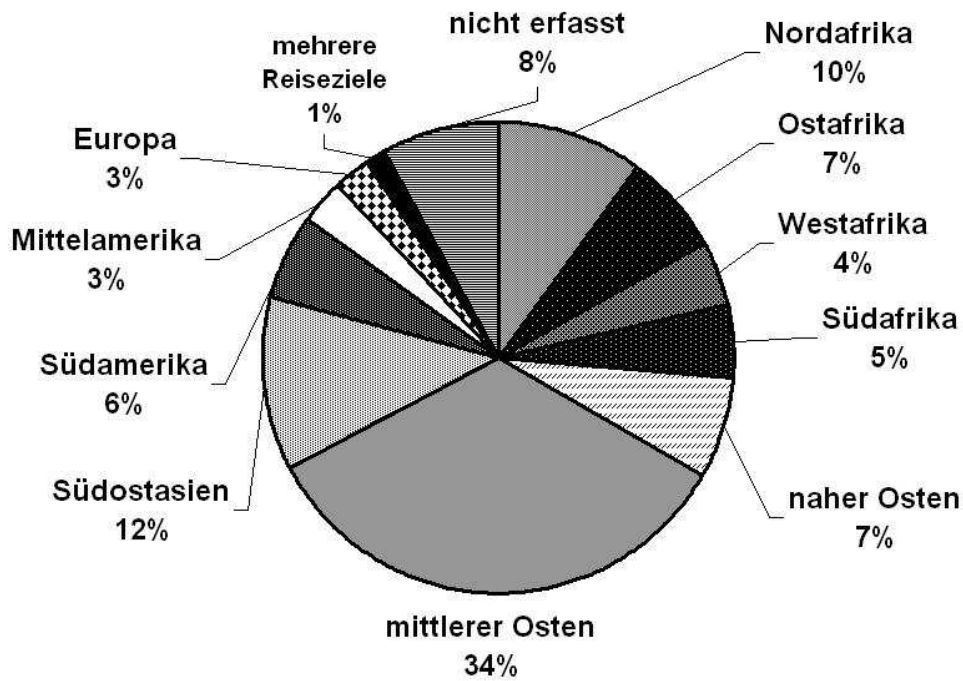


Abbildung 17: Prozentuale Verteilung der Reiseländer im Kollektiv der Reiserückkehrer

Insgesamt wurden 213 mikrobiologisch positive und 339 mikrobiologisch negative Kulturen zusätzlich mit der neu etablierten PCR untersucht.

4.7.2 Ergebnisse der Real-Time Multiplex PCR bei Proben aus klinischem Routinebetrieb im Vergleich mit der mikrobiologischen Standarddiagnostik

Im Folgenden werden zunächst nur die Ergebnisse aus dem Routinebetrieb der Krankenhäuser (UKE, AKA) sowie der Bundeswehrkrankenhäuser betrachtet. Von diesen Proben waren 51 % (n=201) mikrobiologisch positiv und 49 % (n=192) mikrobiologisch negativ.

Keime, die von der PCR nicht erfasst werden sollten, wie EHEC (n=2), *Aeromonas* spp. (n=2) und *Clostridium difficile* (n=1) ergaben keine positiven Ergebnisse. Die Ergebnisse für *Salmonella* spp., *Shigella* spp./EIEC, *C. jejuni* und *Yersinia enterocolitica* und *Yersinia pseudotuberculosis* sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 19: Vergleich der Ergebnisse der Untersuchung positiver Stuhlproben mit konventioneller mikrobiologischer Diagnostik und Real-Time Multiplex PCR

	Mikro- biologie	Salmonellen PCR	Shigellen PCR	Campylobacter PCR	Yersinien PCR	Sensitivität
<i>Salmonella</i> <i>spp.</i>	74	71 ^a	∅	2 ^b	∅	96 %
<i>Shigella</i> <i>spp.</i> / EIEC	8	∅	8	∅	∅	100 %
<i>C. jejuni</i>	81	2 ^b	2 ^b	79	∅	97,5 %
<i>Yersinia</i> <i>ent./pseudo</i>	10	∅	∅	∅	10	100 %

a = 2 x kulturell *S. typhimurium*, 1 x kulturell *S. enteritidis*

b = Doppelnachweis

Für alle Kultur-positiven Ergebnisse mit negativem PCR-Ergebnis gilt, dass nicht fälschlicherweise ein anderer Keim stattdessen erkannt wurde.

Die Sensitivität für Salmonellen lag bei 96 % (71 von 74). Bei den 3 Salmonellenisolaten, die in der PCR nicht nachgewiesen werden konnten, handelte es sich zweimal um *S. typhimurium* und einmal um *S. enteritidis*. Bei einer Prüfung der Funktionsfähigkeit des PCR-Systems, bei der einer menschlichen Ziel-DNA entsprechende Primer und Sonden im Reaktionsansatz zugefügt wurden, wurde festgestellt, dass zwei diese Proben inhibiert waren, so dass überhaupt keine Amplifikation stattfand. Eine stufenweise Verdünnung der Proben bis 1:10 konnte den Inhibitionseffekt nicht aufheben. Auf Inhibitoren der PCR wurde im theoretischen Abschnitt der Arbeit bereits eingegangen. Für Stuhlproben können z.B. ein hoher Anteil an Gallensäuren oder Hämoglobinabbauprodukte inhibierend wirken. Würde man das Ergebnis um diese beiden inhibierten Proben bereinigen, stiege die Sensitivität auf 99 %. Nur eine kulturell positive, nicht inhibierte Probe von *S. typhimurium* erzielte kein Ergebnis in der PCR.

Von 81 mikrobiologisch nachgewiesenen *Campylobacter jejuni* wurden 79 auch in der PCR detektiert, entsprechend einer Sensitivität von 97,5 %. Auch in dieser Gruppe war eine Probe inhibiert. Die Sensitivität würde ohne Einbeziehung dieses Ergebnisses auf 99 % steigen. In zwei nicht inhibierten Proben, die mikrobiologisch *Campylobacter jejuni* enthielten, konnte in der PCR nichts amplifiziert werden.

Bei Infektionen mit Salmonellen oder Campylobacter wurde in einzelnen Fällen eine Doppelinfektion nachgewiesen. Die PCR sprach hier im Leitkeim, also dem Keim, der auch kulturell nachgewiesen werden konnte, mit einem niedrigen C_t Wert und zusätzlich für einen zweiten Keim mit einem höheren C_t Wert an, hinweisend auf eine niedrigere Keimzahl.

Von weiteren 23 Stühlen, bei denen die Isolate mikrobiologisch als *Campylobacter spp.* eingestuft wurden, identifizierte die PCR 8 Proben (35 %) nicht. Die verbleibenden 15 Proben (65 %) sprachen in der Campylobacter-PCR mit C_t Werten zwischen 19 und 37 (Mittelwert 27) an. Einmalig wurden Salmonellen zusätzlich nachgewiesen.

Tabelle 20: Vergleich der Ergebnisse der Untersuchung positiver Stuhlproben für *Campylobacter spp.* mit konventioneller mikrobiologischer Diagnostik und Real-Time Multiplex PCR

<i>Campylobacter spp.</i>	Mikrobiologie	Salmonellen PCR	Shigellen PCR	Campylobacter PCR	Yersinien PCR
	23	1 ^b	∅	15	∅

b = Doppelnachweis

Die Ergebnisse der MALDI-TOF bestätigen das Ergebnis, dass die PCR mit hoher Treffsicherheit *C. jejuni*, nicht aber *C. coli* nachweist. Die Proben, die in der MALDI-TOF untersucht wurden, sind nicht identisch mit den hier dargestellten *Campylobacter*-positiven. Proben. Damit handelt es sich bei den 8 Proben, die in der PCR ohne Ergebnis blieben, mit großer Wahrscheinlichkeit um *C. coli*. Es wurde nicht geprüft, in wie weit andere *Campylobacter spp.* z.B. *C. lari*, oder *C. upsalensis*, möglicherweise von der PCR erkannt werden. Die theoretische Analyse der Primer und Sonden mit BLAST lässt dies unwahrscheinlich erscheinen. Primer und Sonde wurden jedoch so konzipiert, dass *C. jejuni* Subsp. *doylei* mit erfasst wird (e-value 0,017).

Für Shigellen und Yersinien betrug die Sensitivität 100 %; 8 von 8 Shigellen und 10 von 10 Yersinien wurden sowohl in Kultur als auch mit PCR nachgewiesen.

Bei den in der mikrobiologischen Diagnostik als negativ beurteilten Stühlen (n=192) erwies sich die PCR als empfindlicher. Sie stammten zu 98 % von Soldaten, die

routinemäßig im Inland oder nach einem Auslandseinsatz untersucht worden waren. Nur 5 Proben kamen aus dem Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

Tabelle 21: PCR-Ergebnisse von 192 mikrobiologisch negativen Stuhlproben

Mikrobiologie negativ	Salmonellen PCR positiv	Shigellen PCR positiv	Campylobacter PCR positiv	Yersinien PCR positiv
192	1/192	2/192	5/192	∅

Es wurden in kulturell negativen Stühlen zusätzlich 5-mal Campylobacter, 2-mal Shigellen und 1-mal Salmonellen nachgewiesen.

4.7.3 Ergebnisse der Real-Time Multiplex PCR bei Proben von Reiserückkehrern im Vergleich mit der mikrobiologischen Standarddiagnostik

Die Untersuchung von Stühlen von Reiserückkehrern mit Diarrhö (n = 159) brachte vergleichbare Ergebnisse. Hier waren in 12 Proben (8 %) mikrobiologisch Bakterien nachweisbar, 147 (92 %) waren negativ. Salmonellen und Yersinien kamen nicht vor. 2-mal wurden ETEC nachgewiesen, die in der PCR nicht ansprechen. Ein als *Campylobacter jejuni* in der konventionellen Diagnostik eingestufte Stamm wurde von der PCR nicht identifiziert. Eine weitere Analyse dieses Isolates war nicht erfolgt. Ebenso war ein als *C.spp.* klassifiziertes Isolat in der PCR positiv für *Campylobacter jejuni*.

Tabelle 22: Vergleich der Ergebnisse der Untersuchung von Stühlen von Reiserückkehrern mit konventioneller Diagnostik und Real-Time Multiplex PCR

	Mikrobiologie	Salmonellen PCR	Shigellen PCR	Campylobacter PCR	Yersinien PCR
<i>Salmonella spp.</i>	∅	∅	∅	∅	∅
<i>Shigella spp. / EIEC</i>	3	∅	3	∅	∅
<i>C. jejuni</i>	6	∅	∅	5 ^a	∅
<i>C. spp.</i>	1	∅	∅	1	∅
<i>Yersinia ent./pseudo</i>	∅	∅	∅	∅	∅

a = Doppelnachweis von ETEC und *C.jejuni*

Bei den negativen Stuhlproben konnte die PCR Campylobacter wiederum häufiger nachweisen als in der Kultur.

Tabelle 23: Ergebnisse der Untersuchung mikrobiologisch negativer Stuhlproben im Kollektiv der Reiserückkehrer mit konventioneller Diagnostik und Real-Time Multiplex PCR

Mikrobiologie negativ	Salmonellen PCR positiv	Shigellen PCR positiv	Campylobacter PCR positiv	Yersinien PCR positiv
147	∅	22/147	10/147	∅

Die positiven Ergebnisse der Shigellen-PCR stammten vorwiegend aus Stühlen von Reiserückkehrern aus dem Nahen und Mittleren Osten, sowie zu geringeren Anteilen aus Südostasien und Afrika.

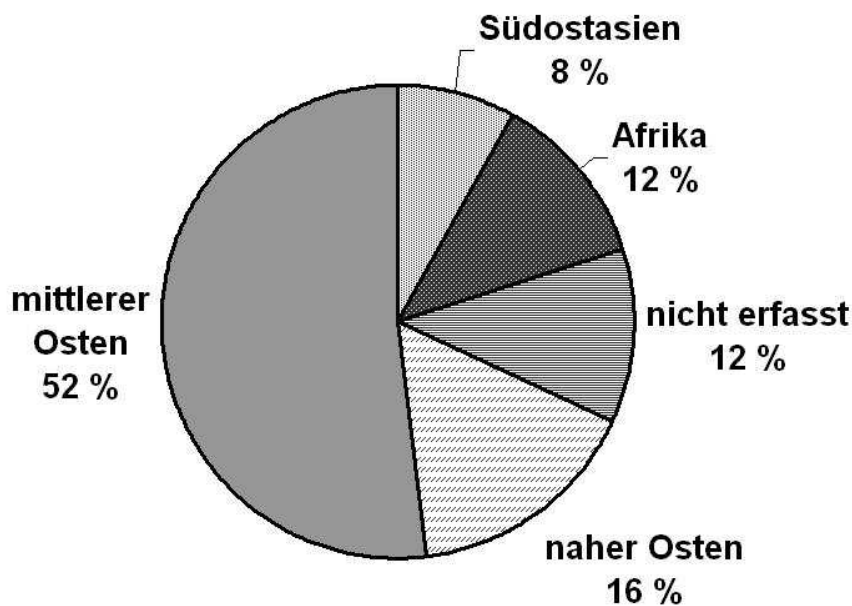


Abbildung 18: Prozentuale Verteilung der Reiseländer von Rückkehrern mit Diarrhö und Nachweis von Shigellen/EIEC im Stuhl

Hier hat die PCR mit großer Wahrscheinlichkeit eine Infektion mit EIEC nachgewiesen. EIEC werden in der konventionellen Diagnostik nicht erfasst. Das ipaH-Gen tragende Plasmid kommt in beiden, genetisch fast identischen, Erregern vor, und somit werden diese von der Shigellen-PCR erkannt und nachgewiesen.

4.7.4 Gesamtergebnis

Im gesamten Kollektiv entspricht die Verteilung der Häufigkeit der einzelnen Erregerspezies im Wesentlichen der Prävalenz der Erreger in Deutschland im Jahr 2009 (RKI 2009). Das Verhältnis mikrobiologisch-positiver Proben zu mikrobiologisch-negativen Proben betrug 2:3 (213 positive, 339 negative, 552 gesamt).

Tabelle 24: Prozentualer Anteil der einzelnen Erregerspezies am Gesamtergebnis im Vergleich zum prozentualen Anteil der in Deutschland 2009 gemeldeten mikrobiologisch nachgewiesenen Enteritiserreger

Mikrobiologie	Gemeldete Fälle Deutschland 2009	Anteil (%)	Mikrobiologisch positive Proben im Untersuchungskollektiv (n)	Anteil (%)
C. jejuni /C spp.	57006	59	111	53
Salmonella spp.	28919	30	74	35
Path. E. coli, Shigellen	6972	8	15	7
Yersinien	3373	4	10	5
gesamt	96270	100	210 ^a	100

a = nicht aufgeführt: *Aeromonas* spp. (n=2), *Clostridium difficile* (n = 1)

Von 182 mikrobiologisch eindeutig als *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter jejuni* oder *Yersinia* spp. identifizierten Isolaten wurden in der PCR 176 (97 %) erkannt. 3 Proben von 182 (2 %) waren inhibiert. Alle anderen mikrobiologisch bestätigten Bakterienspezies (n= 7), einschliesslich ETEC (n = 4), wies die PCR richtigerweise nicht nach.

In 7 Fällen (3 %) zeigte die PCR zwei Erreger in der gleichen Probe an. Es handelte sich ausschließlich um ein zusätzliches Signal entweder im Salmonellen- oder Campylobacter- Kanal. Als Leitkeim wurde jeweils das Ergebnis mit dem kleineren C_t-Wert angesehen, dies stimmte durchweg mit dem mikrobiologischen Ergebnis überein.

Tabelle 25: PCR-Ergebnisse für mikrobiologisch positive Proben

	Mikrobiologie	Salmonellen PCR	Shigellen PCR	Campylobacter PCR	Yersinien PCR	Sensitivität
<i>Salmonella</i> <i>spp.</i>	74	71 ^b	∅	2 ^a	∅	96 %
<i>Shigella</i> <i>spp. / EIEC</i>	11	∅	11	∅	∅	100 %
<i>C. jejuni</i>	87	2 ^a	2 ^a	84 ^c	∅	97 %
<i>C. spp.</i>	24	1 ^a	∅	16	∅	nd
<i>Yersinia</i> <i>ent./pseudo</i>	10	∅	∅	∅	10	100 %
<i>Andere spp.</i>	7	∅	∅	∅	∅	100 %

a = Doppelnachweis

b = 2 Proben inhibiert

c = 1 Probe inhibiert

Die größten Unterschiede fanden sich in der Gruppe der mikrobiologisch als *Campylobacter spp.* klassifizierten Erreger (n=24). Ausgehend davon, dass nur *C. jejuni* Subspezies *jejuni* und *doylei* in der PCR nachgewiesen wird, gaben 8 Proben (35 %) erwartungsgemäß kein Signal in der PCR. 16 Proben (65 %) konnten hingegen im Campylobacter-Kanal detektiert werden.

339 Proben waren mikrobiologisch negativ, jedoch wies die PCR in 40 Proben (12 %) 24-mal Shigellen (7 %) 15-mal Campylobacter (4 %) und einmal Salmonellen zusätzlich nach.

Tabelle 26: PCR-Ergebnisse für mikrobiologisch negative Proben

Mikrobiologie negativ	Salmonellen PCR positiv	Shigellen PCR positiv	Campylobacter PCR positiv	Yersinien PCR positiv
339	1/339	24/339	15/339	∅

5 Diskussion

Seit Erfindung der PCR wurde diese Technik in der mikrobiologischen und virologischen Diagnostik eingesetzt. Besondere Verbreitung findet die PCR bereits in der Virologie, wo sie als Ersatz für die aufwändige Virusanzucht anerkannt ist (Espy et al. 2006). Aber auch in der Bakteriologie hat sich die PCR zunehmend, vor allem zum Nachweis langsam wachsender Keime oder von Erregern die anspruchsvolle Kulturbedingungen benötigen, etabliert (Mackay 2004).

5.1 Stellenwert der PCR in der Diagnostik enteropathogener Bakterien

Obwohl es viele Ansätze zum molekularbiologischen Nachweis enteropathogener Bakterien gibt, wurde nur gelegentlich versucht, die konventionelle Diagnostik durch die PCR-Methode zu ersetzen. Häufig verwendete man die PCR als Ergänzung und zur genaueren Spezifizierung der bereits isolierten Erreger. Dabei beschränken sich viele Protokolle auf den Nachweis einer Spezies und ihrer nahen Verwandten (Al Rashid et al. 2000, Klena et al. 2004, Miller et al. 2007).

Lediglich in der Lebensmittelüberwachung machte man sich die hohe Sensitivität der PCR-Technik zu Nutze und entwickelte unterschiedliche Protokolle um bereits geringen Mengen an Krankheitsüberträgern in Nahrungsmitteln nachzuweisen (Kapperud und Vardund 1993, Villalobo und Torres 1998, Malorny et al. 2004, Wolffs et al. 2005).

5.2 Bisherige Untersuchungen

Der gleichzeitige Nachweis mehrerer Erreger wird durch die Unterschiede bei den optimalen PCR-Bedingungen für die jeweiligen Primersets bzw. mögliche Interaktionen limitiert (Wittwer et al 2001).

1997 entwickelten Wang et al. ein Universalprotokoll mit Primern zum Nachweis von 13 verschiedenen Krankheitserregern in Lebensmitteln. Er benutzte dazu eine konventionelle nested-PCR. Die DNA für die Untersuchung wurde aus Lebensmittelproben gewonnen, die über Nacht inkubiert wurden. Die Sensitivitätsunterschiede waren in dieser Untersuchung groß und reichten von 2 Zellen für *E. coli*-O157:H17 bis 5×10^4 Zellen für *Shigella* spp. Die Empfindlichkeit wurde für Yersinien bei 4 - 40 Zellen, für Salmonellen bei 40 Zellen und für Shigellen

bei 5×10^4 Zellen pro Reaktionsansatz angegeben. Dieses Protokoll nutzte erstmals ein einheitliches Kulturmedium und das gleiche PCR-Protokoll für alle Primer, dennoch entsprach der Ansatz im Grunde 13 einzelnen, parallel durchgeführten Gel-PCRs.

Klinische Stuhlproben wurden nur in einigen Veröffentlichungen untersucht, die nachfolgend beschrieben werden. Bisher wurden in keinem der Protokolle die nachzuweisenden Erreger gleichzeitig und in einem Versuchsansatz identifiziert. Meist erfolgte eine Voranreicherung und dann die sequentielle Analyse des Untersuchungsmaterials, so dass bis zum Vorliegen des Ergebnisses wenigstens 24 h vergingen.

Eine Kombination von Primern für mehrere Bakterienarten in einem PCR-Ansatz versuchte zum ersten Mal Fukushima et al. (2003) mit einer Duplex-Real-Time PCR mit SYBRGreen. Jeweils 2 verschiedene Erreger konnte er in einem Ansatz nachweisen. Insgesamt wurden Primerpaare für 17 enteropathogene Keime entwickelt.

Iijima et al. (2004) setzten eine Real-Time PCR mit TaqMan-Sonden zum Nachweis von Durchfallerregern ein. Allerdings wurde kein Multiplex-Ansatz versucht, da man die Interaktionen der Reaktanden fürchtete. Nachgewiesen werden konnten *Salmonella enterica*, *Vibrio parahaemolyticus*, *C. jejuni* und STEC (Shiga-Toxin produzierende *E.coli*)

Amar et al. (2007) verwendeten ebenfalls eine Real-Time PCR mit TaqMan Sonden, zum Teil als Duplex-PCR, zur Aufarbeitung von 4627 eingefrorenen Stuhlproben aus den Jahren 1993–1996. Mit aufeinander folgenden Einzeluntersuchungen in Gel und Real-Time Technik wurden diese auf insgesamt 11 verschiedene enteropathogene Erreger, Bakterien, Viren und Protozoen, hin überprüft.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine empfindliche und spezifische Real-Time Multiplex PCR entwickelt, mit deren Hilfe erstmals gleichzeitig in einem Ansatz die vier wichtigsten Erreger von Durchfall bei Erwachsenen in Deutschland direkt aus Stuhlproben nachgewiesen werden können. Neben dem Nachweis von *Campylobacter jejuni* wurde der breiten Erfassung der Erregergruppen *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* / EIEC und *Yersinia spp.* Vorzug vor einer speziegenauen Identifizierung gegeben, um so für die weitere klinische Behandlung erste, wichtige

Anhaltspunkte zu erhalten. Andere gram-negative oder gram-positive Erreger werden nicht erfasst.

5.3 Analytische Empfindlichkeit der neuen Real-Time Multiplex PCR

Die Nachweisgrenze der neu etablierten Real-Time Multiplex PCR ist mit 10^3 – 10^5 KBE pro ml Probe im Wesentlichen mit den in der Literatur vorbeschriebenen Nachweisgrenzen für Real-Time Multiplex PCR (Fukushima et al. 2003, Iijima et al. 2004) vergleichbar. Auch die Einzel-PCR Assays waren bei der Untersuchung von Stuhlproben ohne Anreicherung nicht empfindlicher (Aranda et al. 2004, Yang et al. 2007). Niedrigere Nachweisgrenzen werden nur erreicht, wenn die PCR direkt aus Kulturmaterial, DNA-Präparationen oder nach Anreicherungsschritten erfolgt (Persson und Olsen 2005, Wolffs et al. 2006, Gómez-Duarte et al. 2009), was aber immer auch mit einem grösseren Zeit- und Materialaufwand verbunden ist.

5.4 Spezifität der neuen Real-Time Multiplex PCR

Die Verwendung von Hydrolyse-Sonden bei der Real-Time Multiplex PCR gewährleistet eine hohe Spezifität der Methode, da sowohl Primer als auch Sonde an den gewählten Genabschnitt binden müssen, damit bei der Amplifikation ein positives Fluoreszenzsignal erzeugt wird (Wilhelm und Pingoud 2003). Allerdings ist die Spezifität geringer als in PCR-Systemen, die mehrere Genloci oder Primerpaare zur Identifizierung eines einzelnen Erregers einsetzen können.

5.4.1 Spezifität für *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter* spp.

Dieses Problem wird besonders beim Nachweis der *Campylobacter* deutlich. So wählten Klena et al. (2004) nur ein Target-Genabschnitt, den *lpxA*-Locus, benötigten aber zur Unterscheidung von *Campylobacter coli*, *C. jejuni*, *C. lari* und *C. upsalensis* 4 verschiedene Primerpaare. Auch in anderen Arbeiten (siehe Tabelle 27 im Anhang) werden in der Regel mehrere Targets zur präzisen Erfassung von *Campylobacter* verwendet. Gómez-Duarte et al. (2009) verwenden in ihrer Gel-Multiplex PCR zwar nur ein Primerset für *hipO* zum Nachweis von *Campylobacter jejuni*. Allerdings gibt es in dieser Arbeit keine Angaben über Spezifität und Sensitivität; die PCR wurde mit DNA-Präparationen aus Kulturmaterial bereits bekannter Stämme durchgeführt. Auf die Unterscheidung der einzelnen *Campylobacter*-Spezies wird nicht eingegangen.

In der oben beschriebenen Arbeit gelang es nicht unter den gewählten Multiplex-Bedingungen, ein allgemeines Primer-Sondenset für alle thermophilen *Campylobacter*-Spezies zu finden. Primerpaare und Sonde auf Basis der 16 S rRNA, die als Universaltarget für *Campylobacter spp.* beschrieben wurde (Bang et al. 2002, Abu-Halaweh et al. 2005), konnten nicht in das Multiplexsystem integriert werden. Nur die Primer-Sondensets für GyrA erbrachten in der PCR verwertbare Ergebnisse.

In der Datenbankanalyse reagiert das gewählte Primer/Sondenset sehr spezifisch auf *C. jejuni* mit den Subspezies *jejuni* und *doylei*. *C. coli* kann dagegen nicht nachgewiesen werden. Dies bewies die zusätzliche Analyse der Isolate, die mittels MALDI-TOF-Spektrometrie eindeutig identifiziert werden konnten. Wegen der Unschärfe der konventionellen Diagnostik bezüglich der genauen Identifizierung der *Campylobacter spp.* bis auf Speziesebene konnte keine vollständige Übereinstimmung mit den PCR-Ergebnissen erzielt werden. Ähnliche Diskrepanzen zwischen Kultur und PCR-Ergebnis für *Campylobacter* beschrieben auch Iijima et al. 2004.

Zur Unterscheidung von *C. jejuni* von anderen *Campylobacter*-Spezies dient die Fähigkeit von *C. jejuni* zur Hydrolyse von Hippurat. Die *Campylobacter jejuni* Subspezies *doylei* kann bei der biochemischen Prüfung sowohl „Hippurat-negativ“ als auch „Hippurat-positiv“ sein (Fitzgerald und Nachamkin 2007). Diese Diversität erklärt möglicherweise, warum bei den Stuhlproben, bei denen die phänotypische Einstufung der Isolate „*Campylobacter spp.*“ lautete, dennoch ein positives PCR-Ergebnis für „*Campylobacter jejuni*“ zu erzielen war. Dann wären hier *Campylobacter jejuni* Subspezies *doylei* nachgewiesen worden, die phänotypisch wegen ihrer Hippurat-Negativität nicht als *C.jejuni* angesehen wurden.

5.4.2 Spezifität für *Shigella spp.*

Auch für die Shigellen zeigten sich Besonderheiten bezüglich der Spezifität. Bereits Wang et al. (1997) beobachteten in ihrem PCR-Ansatz Kreuzreaktionen zwischen verschiedenen *E. coli* und *Shigella spp.* auf Grund der hohen genetischen Verwandtschaft. In dem hier beschriebenen Versuchsansatz liefert die PCR ein positives Ergebnis sowohl für enteroinvasive *E. coli* (EIEC) als auch für Shigellen, da beide Spezies das ipaH-Gen auf ihrem Plasmid tragen. EIEC werden in der konventionellen Diagnostik normalerweise nicht nachgewiesen, denn *E. coli* ist ein Kommensale des Darmes und eine Spezifizierung wäre aufwändig. Lediglich bei

Säuglingen wird gezielt nach EPEC (enteropathogene *E. coli*) und EHEC (enterohämorrhagische *E. coli*) gesucht, weil in dieser Altersgruppe Erkrankungen mit schweren Komplikationen möglich sind (Tschäpe et al. 2009)

Die PCR konnte insbesondere bei den Reiserückkehrern durch ihr spezielles Profil eine wichtige Zusatzinformation erbringen. Offensichtlich war bei dieser Personengruppe die Diarrhö, die nach der konventionellen Untersuchung als „ohne Erregernachweis“ klassifiziert werden musste, tatsächlich durch EIEC verursacht. Umgekehrt muss dafür in Kauf genommen werden, dass die PCR nicht zwischen *Shigella spp.* und EIEC unterscheiden kann. Dies könnte bei Bedarf durch weitere Untersuchungen erbracht werden. Aranda et al. entwickelten 2004 ein entsprechendes Multiplex-PCR Protokoll.

5.4.3 Spezifität für *Salmonella spp.*

Enteritische und typhöse Salmonellen werden durch die hier beschriebene PCR gleichermaßen detektiert. Alle bei der Evaluierung der PCR verwendeten Salmonella-Stämme, darunter zwei *S. typhimurium* Isolate wurden korrekt erkannt (siehe Tabelle 17). Lediglich bei der Untersuchung der Stuhlproben wurde eine Probe als negativ getestet, aus der bei der Anzucht *Salmonella typhimurium* isoliert werden konnte. Die für die PCR zur Verfügung stehende Probe enthielt weniger als die für die effektive DNA-Extraktion geforderte Stuhlmenge von 180 – 220 mg (QIAGEN® 2007). Möglicherweise stößt die PCR hier an die Nachweisgrenze. Malorny et al. (2004) hatten ihre Primersets an 110 verschiedenen Salmonellenstämmen getestet und beschrieben keine falsch-negativen Ergebnisse. Allerdings wurden hier keine Patientenproben sondern lediglich DNA-Extraktionen aus Kulturen verwendet.

5.4.4 Spezifität für *Yersinia spp.*

Auch für Yersinien ergaben sich keine Spezifitätsprobleme bei der Austestung der Isolate. Sowohl *Yersinia enterocolitica* als auch *Yersinia pseudotuberculosis* erbrachten eindeutige Ergebnisse in der PCR. Allerdings war die Anzahl der Isolate klein, die zur Spezifitätstestung zur Verfügung standen. Auch in der Untersuchung der klinischen Proben konnten alle positiven Stühle mit *Yersinia enterocolitica* und einmalig *Yersinia pseudotuberculosis* nachgewiesen werden. Eine Subtypisierung ist durch die PCR teilweise möglich (Ibrahim et al. 1992, Jacobsen et al. 2005) und könnte in einer zweiten Analyse nach positivem Yersiniennachweis durchgeführt werden.

5.5 Klinische Sensitivität der neuen Real-Time Multiplex PCR

Die statistische Gesamtsensitivität der neu entwickelten Real-Time Multiplex PCR im Vergleich zur konventionellen mikrobiologischen Diagnostik liegt bei 94 %, die statistische Gesamtspezifität bei 90 %. In diese Werte geht der hohe Anteil an PCR-positiven und Kultur-negativen Ergebnissen ein. Diese scheinbar falsch-positiven Werte entstehen durch die weitaus höhere Empfindlichkeit der PCR-Methode im Vergleich zum sog. „Goldstandard“, der mikrobiologischen Untersuchung.

Amar et al. (2007) beobachten eine deutliche, wenn auch nicht für alle Erreger statistisch signifikante, Zunahme positiver Ergebnisse, wenn die Kultur mit PCR Untersuchungen ergänzt wird, ebenso wie Iijima et al. (2004), die einen Anstieg der positiven Befunde um bis zu 30 % beschreiben.

Beim Nachweis von *Campylobacter* sind die Ergebnisse sehr variabel. Amar et al. (2007) und Maher et al. (2003) beschreiben eine Zunahme der positiven Befunde für *C. jejuni* und *C. spp.* durch Einsatz der PCR, während bei Iijima et al. (2004) die PCR im Bezug auf den Nachweis von *C. jejuni* keinen Vorteil gegenüber der Kultur erbringt.

Eine Ursache für die großen Unterschiede in den Ergebnissen liegt darin, daß die PCR neben viablen auch nicht viable, also nicht kultivierbare Bakterien nachweist (Wolffs et al. 2005). Nonviabilität tritt beispielsweise nach Beginn einer Antibiotikatherapie auf oder bei langen Transportzeiten der Probe (Persson und Olsen 2005). Auch die schwierigen Anzuchtbedingungen, besonders bei *Campylobacter spp.*, können ein Grund dafür sein, dass die PCR häufiger Erreger nachweist, als die Kultur (Mackay 2004).

Die Problematik der diskrepanten Werte und der Umgang damit wurden ausführlich von McAdam (2000) diskutiert, der eine Nachanalyse, der in der Referenzmethode negativen Befunde für unzulässig hält. Eine adäquate Lösung für den Umgang mit der Tatsache, dass beim Vergleich der PCR-Methode mit der Kultur, der neue Test empfindlicher ist als der Referenztest, wurde bisher noch nicht gefunden (McAdam 2000, Burkardt 2000, Sachse 2004).

Es bietet sich daher an, eher von Übereinstimmung zwischen den beiden Testverfahren zu sprechen, als von Sensitivität und Spezifität im statistischen Sinn.

Die Übereinstimmung von PCR und Kultur bei der Untersuchung der Salmonellen lag bei 96 %. Bei 71 von 74 Proben konnte ein richtig-positives Ergebnis erzielt werden. In kultur-negativen Proben ergab die PCR in einer Probe ein positives Ergebnis. Bei den Stuhlproben, die phänotypisch eindeutig als „*Campylobacter jejuni*“ identifiziert wurden, lieferte die PCR in 84 von 87 Fällen ein positives Ergebnis (97 %). Bei den Shigellen wurden alle kulturbestätigten Proben mit der PCR als positiv erkannt. Der Gesamtanteil aller Shigellenproben war mit 5 % (11/213) niedrig und spiegelt die Prävalenz des Erregers in Deutschland wieder. Auch bei den Yersinien wurden alle 10 kultur-positiven Stuhlproben in der PCR richtig nachgewiesen. Zusätzliche PCR-Befunde bei kultur-negativen Proben ergaben sich nicht. Die niedrige Zahl positiver Proben zeigt, dass diese Erreger bei akuten Durchfallserkrankungen keine große Rolle spielen.

O’Leary et al. (2009) geben für ihre kommerzielle Multiplex PCR mit Voranreicherung eine Übereinstimmung mit den Kulturbefunden von 100 % an. Das beschriebene System verarbeitet Stuhl nach Anreicherung. Die extrahierte DNA wird amplifiziert und anschließend hybridisiert. Nachgewiesen werden können *Campylobacter spp.*, *Salmonella enterica*, *Shigella spp.* und *E. coli* O157. Iijima et al. (2004) erreichten mit ihrer PCR mit Hydrolyse-Sonden nach Anreicherung für *Salmonella enterica* und *Vibrio haemolyticus* eine Übereinstimmung von 100 % und für *Campylobacter jejuni* von 84 %. Amar et al (2004) verglichen bei 92 Proben von Patienten mit Durchfall Mikroskopie, Kultur, Immunoassays und PCR in ihrer Fähigkeit Durchfallserreger im Stuhl zu erkennen. Die Übereinstimmung des verwendeten PCR-Assays lag bei 75 % für *Salmonella enterica* (3 von 4) und *Campylobacter jejuni* (5 von 6). Diese Werte errechnen sich allerdings aus äußerst kleinen Kollektiven. Die in der neu entwickelten Real-Time Multiplex PCR erzielten Ergebnisse von 96 – 100% entsprechen somit den vorbeschriebenen Resultaten, obwohl nur wenige Untersuchungen wirklich miteinander vergleichbar sind.

Beeinträchtigt wird die Genauigkeit der PCR von nahezu 100 % durch die Inhibition der PCR-Reaktion. Der Anteil der inhibierten Proben reichte von 1 % (1/87) in der Gruppe der *Campylobacter* bis 3 % (2/74) in der Gruppe der Salmonellen. Er entsprach damit der Rate an inhibierten Proben, die Iijima et al. (2004) mit dem gleichen kommerziellen DNA-Extraktionskit beobachteten. Idealerweise wird zur Aufdeckung dieses Phänomens eine interne Kontrolle mitgeführt. Hier stößt die Real-Time Multiplex PCR an Grenzen, da mit der Besetzung eines weiteren

Detektionskanals, also der Einführung eines fünften Primer/Sonden Sets, die Wahrscheinlichkeit von Überstrahlungen und möglichen unspezifischen Reaktionen weiter steigt (Wittwer et al 2001).

5.6 Ergebnisse in den einzelnen Untersuchungsgruppen

98% der Proben aus dem klinischen Routinebetrieb, die sowohl in der PCR als auch mikrobiologisch negativ getestet wurden, stammten von Soldaten. Dieser Bias erklärt sich durch die Auswahl der Proben. Die Stühle aus dem Universitätskrankenhaus und dem Akademischen Lehrkrankenhaus wurden erst nach der positiven mikrobiologischen Analyse zur Nachtestung mit PCR übersandt und stammten durchweg von Patienten mit Diarrhö. Das Patientengut der Zentralinstitute der Bundeswehr hingegen ist relativ heterogen und besteht vorwiegend aus asymptomatischen Soldaten und Bundeswehrangeestellten, die aus gutachterlichen Fragestellungen untersucht werden, z.B. Verwendungsfähigkeit für bestimmte Tätigkeiten, vor Auslandseinsätzen oder bei Entlassung. Auch die, aus den Auslandseinsätzen zurückgekehrten, Soldaten sind überwiegend beschwerdefrei und die Stuhluntersuchungen erfolgen im Rahmen standardisierter Rückkehreruntersuchungen. Die Stuhlproben dieser Patienten wurden hier ungeachtet des mikrobiologischen Befundes zur Untersuchung mit PCR zur Verfügung gestellt. Dadurch erklärt sich der hohe Anteil an negativen Ergebnissen, sowohl in der mikrobiologischen Untersuchung als auch in der PCR. Das Verhältnis der positiven zu den negativen Proben mit etwa 1:1 gibt nicht das tatsächliche Verhältnis in einem Patientenkollektiv mit Diarrhö an, sondern ist artifiziell und durch die Probenwahl bestimmt.

Das Kollektiv der Reiserückkehrer mit Diarrhö unterlag nicht einer solchen Vorauswahl; PCR und mikrobiologische Untersuchung konnten zeitgleich erfolgen. Hier waren der größte Teil der Ergebnisse negativ (92 %) und nur 8 % positiv. Berücksichtigt man die zusätzlichen Ergebnisse der PCR mit, so erhält man Werte von 25 % Proben mit bakteriellem Erregernachweis und 75 % Proben ohne Erregernachweis. Diese Zahlen lassen sich in Einklang bringen mit Ergebnissen aus der Literatur, die bei Reiserückkehrern in bis zu 60 % aller Fälle keine infektiöse Ursache finden können, Viren und Protozoen eingeschlossen (Ericsson 2003).

5.7 Vergleich mit der konventionellen mikrobiologischen Diagnostik

Durch die Multiplex-Technik mit sechs Detektionskanälen ist die Anzahl der gleichzeitig detektierbaren Erreger limitiert. Je mehr Primer/Sondensets eingesetzt werden und je mehr Kanäle benutzt werden, desto größer ist die Gefahr unspezifischer Reaktionen und Überstrahlungen. Eine höhere Zahl von Erregern bzw. einer weitere Differenzierung kann nur durch sequentielle Analyse erreicht werden (Mackay 2004).

Damit wird deutlich, dass die konventionelle, mikrobiologische Diagnostik nicht vollständig von der PCR ersetzt werden kann. Die Kultur liefert in der Regel mehr Informationen, da ein breites Spektrum möglicher Keime angezüchtet und differenziert wird. So können neben *Salmonellen*, *Shigellen*, *Campylobacter* und *Yersinien* auch z.B. *Clostridien*, *Aeromonas spp.*, *Plesiomonas spp.*, Pilze u.a nachgewiesen werden. Auch die Resistenztestung gehört zu den Domänen der konventionellen mikrobiologischen Diagnostik, da sie recht einfach in den Untersuchungsgang integriert werden kann.

Bei einer ausschließlich molekularbiologisch basierten Analyse würde hier die entsprechende Untersuchung im Falle eines positiven Befundes angeschlossen werden. Allerdings wird die Analyse hier sehr viel komplexer, da man nicht nach dem Phänotyp der Resistenz suchen muss, sondern nach dem Genotyp (Louie und Cockerill 2001), also vielen verschiedenen der Resistenz zugrunde liegenden Mutationen. Dafür müssen andere molekularbiologische Techniken, wie der DNA-Chip, eingesetzt werden, die sich noch in der Entwicklung befinden. Auch reicht die Datenlage über resistenzbestimmende Mutationen bisher noch nicht aus, um effektiv die phänotypischen Untersuchungen ersetzen zu können (Fluit et al 2001).

Die hohe Empfindlichkeit der PCR wird kontrovers diskutiert. Burkardt (2000) und Mackay (2004) befürchten, dass durch den Nachweis nonviabler Organismen oder von Erregern in ganz geringer Zahl, die Häufigkeit von Infektionen überschätzt und klinisch falsche Schlüsse daraus gezogen werden könnten. Sachse (2004) hingegen räumt zwar ein, dass insbesondere nach Antibiotikatherapie noch DNA des Erregers vorhanden sein kann, ohne dass dem eine klinische Bedeutung zukommt, andererseits würden Informationen über Ausscheidertum oder das Vorhandensein

von Pathogenen an sich in einem Kollektiv einen wichtigen Beitrag zur Epidemiologie leisten.

In dieser Untersuchung führte die hohe Empfindlichkeit der Methode dazu, dass Doppelinfektionen entdeckt wurden. In einigen Proben fand sich neben dem in der Kultur als Leitkeim erkannten Erreger gleichzeitig ein zweiter Keim mit einem hohen C_t Wert (entsprechend einer niedrigen Erregerkonzentration), der in der Kultur nicht isoliert wurde. Vermutlich werden hier beide Erreger ausgeschieden.

Eine derartige Information könnte z.B. bei scheinbarem Therapieversagen bei der Behandlung einer schweren Diarrhö wichtig werden, wenn einer der Keime resistent gegen das gewählte Antibiotikum ist (Sachse 2004). Untersuchungen zur Persistenz positiver PCR-Ergebnisse nach erfolgreicher Antibiotikabehandlung wurden bisher nicht durchgeführt.

Es wäre auch möglich, auf diesem Wege Dauerausscheider nach durchgemachter Erkrankung sicher und schnell zu identifizieren. Allerdings besteht hier besonders die Gefahr, dass es falsch-positive Ergebnisse gibt, indem man in der PCR nur Genmaterial aber keine lebenden Organismen mehr nachweist. Der Betreffende würde dann noch als Dauerausscheider eingestuft werden, obwohl er längst nicht mehr infektiös ist.

Insgesamt sollte die Bewertung des PCR-Ergebnisses immer unter Berücksichtigung klinischen Bildes vorgenommen werden.

5.8 Vorteile der Real-Time Multiplex PCR

Der Nachweis der meisten Erreger erfordert eine arbeitsintensive Vorbehandlung der Proben und die mikrobiologische Analyse nimmt viel Zeit und wiederholte Anzüchtung auf verschiedensten Nährböden in Anspruch. (Geiss 2009, Regnath 2009)

Im Vergleich dazu liegt bei der neuentwickelten Real-Time Multiplex PCR bereits in weniger als 4 Stunden nach Eingang der Proben ein Ergebnis vor, das im positiven Fall den Erreger in die vier großen Gruppen der bakteriellen Durchfallserreger, Salmonellen, Shigellen, Campylobacter und Yersinien einordnet. Damit ist diese Methode auch schneller als z. B. das kommerzielle System (EntericBio Multiplex

PCR), das von O'Leary et al (2009) mit der konventionellen Diagnostik verglichen wurde und innerhalb von 24 bis 32 h ein Ergebnis liefert.

Bei der in dieser Arbeit beschriebenen Real-Time Multiplex PCR wurde auf den Anreicherungsschritt verzichtet, da er nach den Ergebnissen der klinischen Prüfung mit Übereinstimmungen zwischen 96 bis 100 % nicht erforderlich schien. Möglicherweise würde sich die Empfindlichkeit der Untersuchung nach Anreicherung weiter erhöhen. Es würde aber bis zum Erhalt der Diagnose deutlich länger dauern.

Speziell die Real-Time Multiplex Technik ist auf Grund ihrer one-tube Reaktion sehr viel einfacher und kostengünstiger in der Durchführung als die bisher beschriebenen PCR-Systeme, da die Möglichkeit besteht, verschiedene Targets in einem Ansatz („one-tube reaction“) mit gleichzeitig hoher Spezifität zu erkennen (Bustin und Müller 2005). Nach der Extraktion der DNA werden alle Reaktanden in einem Reaktionsgefäß zusammengefügt. Danach erfolgt die Amplifikation der Probe mit Detektion des Fluoreszenzsignals vollautomatisiert im Thermocycler. Das System liefert nach Beendigung des Versuchs durch die implementierte Software direkt die Ergebnisse, ohne dass eine weitere Manipulation am Probengefäß stattfinden muss. Ein Öffnen der Reaktionsgefäße ist nicht mehr notwendig, wie dies bei der konventionellen PCR mit Gel-Elektrophorese erforderlich war. Dadurch vermindert sich das Risiko einer Kreuzkontamination entscheidend, die von Burkardt (2000) und Mackay (2004) noch als wesentlicher Nachteil der PCR angesehen wurde.

Die extrahierte DNA kann für weitere Untersuchungen mit anderen Systemen zur Erreger-Identifizierung verwendet werden. So gibt es bereits ähnliche Multiplex-Protokolle zum Nachweis einiger Diarrhö verursachenden Protozoen (Verweij et al. 2004) und Viren (Beuret 2004). Aber auch eine weitere, sehr genaue und schnelle Spezifizierung des detektierten Erregers durch PCR ist möglich. Es ist ebenso denkbar, Protokolle zu entwickeln, die speziell auf die, in der entsprechenden Region häufig vorkommenden Erreger abgestimmt sind.

Ein weiterer Vorzug ist der vergleichbar geringe Materialaufwand und die damit verbundene Mobilität sowie die Tatsache, dass wenig und vor allem kein infektiöser Abfall erzeugt wird. Die gesamte erforderliche Ausrüstung kann in einer mittelgroßen Transportkiste verstaut werden. Die meisten Reagenzien liegen in lyophilisierter Form vor, nur die farbmarkierten Sonden müssen gekühlt aufbewahrt und

transportiert werden. Damit ist der Einsatz für eine Felduntersuchung in den Tropen, für die sich die Methode ebenfalls gut eignen würde, etwas limitiert.

5.9 Einsatzmöglichkeiten

Diese Real-Time Multiplex PCR kann als Mittel zur schnellen, vorläufigen Diagnostik in Ausbruchssituationen zur Aufdeckung der Infektionsquelle, bei Intensivpatienten und in allen anderen Situationen, bei der Zeit eine Rolle spielt, eingesetzt werden.

Als Beispiel sei hier eine Ausbruchsuntersuchung von 2004 genannt, die im Rahmen einer Epidemie von *Salmonella enteritidis* in Krankenhäusern und Pflegeheimen im Landkreis Oberallgäu durchgeführt wurde. Heißenhuber et al. (2005) berichten, dass am 07.07.2004 eine erste Meldung über das gehäufte Auftreten von Gastroenteritiden beim Gesundheitsamt des Landkreises Oberallgäu einging. Erst am 12.07., also 5 Tage später, wurde *Salmonella enteritidis* nachgewiesen und das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit konnte sich auf die Suche nach der Infektionsquelle machen. Bis dahin waren bereits mehrere Patienten verstorben. Ähnlich verlief es wohl bei einem Ausbruch von Erkrankungen mit *Salmonella enteritidis* im Krankenhaus Fulda 2007. Die ersten Fälle traten am 24.04.2007 auf, 6 Tage später, am 30.04., informierte die Hygieneabteilung des Krankenhauses das Kreisgesundheitsamt über gehäufte Fälle. Das Epidemiologische Bulletin Nr.48/2007 des RKI gibt keine Auskunft darüber, wann erstmals Salmonellen im Stuhl der Betroffenen nachgewiesen wurden. Gleiches gilt für die zwei weiteren Ausbrüche mit Salmonellengastroenteritis in Kliniken, die in der gleichen Ausgabe des Epidemiologischen Bulletins beschrieben werden. Die Autoren fordern in ihrer abschließenden Beurteilung unter anderem: „...die vorübergehende Etablierung einer zeitnahen Erfassung von allen akuten Gastroenteritiden bei Patienten und Mitarbeitern und deren zeitnahe mikrobiologische Stuhluntersuchung;“

In diesen Situationen ist die neuentwickelte Real-Time Multiplex PCR ein geeignetes Mittel um rasch den möglichen Erreger und die Infektionsquelle einzugrenzen.

Insbesondere in Lagersituationen, sei es ein militärisches Feldlager oder ein Flüchtlingslager, kann diese Methode zügig die notwendigen Informationen liefern, die erforderlich sind, um eine weitere Ausbreitung der Erkrankung zu verhindern. Dies gilt auch für Orte, an denen aus Platzgründen kein komplettes mikrobiologisches Labor mitgeführt werden kann, der Ausbruch einer Gastroenteritis

aber weitreichende Folgen hat, wie z.B. auf einem Kreuzfahrtschiff. Ebenso ist sie als Screeningmethode oder in epidemiologischen Untersuchungen anwendbar.

5.10 Schlussfolgerung

Das Protokoll wurde als Screeningverfahren zur orientierenden Identifikation der wichtigsten enteropathogenen Bakterien konzipiert. Ohne die Mikrobiologie ersetzen zu wollen nutzt das Verfahren in erster Linie die Schnelligkeit der PCR-Methode. Wie die Ergebnisse zeigen ist sie auch in Sensitivität und Spezifität der konventionellen Diagnostik ebenbürtig, wenn nicht sogar teilweise überlegen. Eine weitere Optimierung durch Einführung einer internen Kontrolle würde die Sicherheit der Ergebnisse erhöhen.

6 Zusammenfassung

Infektiöse Gastroenteritis gehört zu den wichtigsten Gesundheitsproblemen und betrifft gut $\frac{3}{4}$ der Weltbevölkerung. Außer Viren sind enteropathogene Bakterien die Hauptverursacher von Diarrhöen. In Deutschland stehen *Campylobacter* an der Spitze der an das RKI gemeldeten bakteriellen Enteritiserreger, gefolgt von Salmonellen, Yersinien und Shigellen. Bei Ausbrüchen muss die Infektionsquelle rasch identifiziert werden, um der weiteren Verbreitung Einhalt zu gebieten. Zur schnellen Diagnostik wurde eine Real-Time Multiplex PCR entwickelt, die in einem Reaktionsansatz gleichzeitig die vier wichtigsten bakteriellen Durchfallserreger bei Erwachsenen nachweisen kann.

Auf der Grundlage bereits publizierter Gensequenzen wurden Primer und Sonden für die einzelnen Bakterien mit der primer3software entworfen. Anschließend erfolgte die Entwicklung und Optimierung eines PCR-Protokolls für den Thermocycler RotorGene 6000. Danach wurde die Empfindlichkeit und Spezifität der Methode mittels bakterieller DNA aus Kultur sowie aus Stuhlproben, die mit definierten Bakteriensuspensionen versetzt worden waren, geprüft.

552 Stuhlproben aus dem klinischen Alltag, u.a. von Reiserückkehrern, wurden abschließend mit der neu entwickelten Real-Time Multiplex PCR untersucht und die Resultate mit den Ergebnissen der konventionellen mikrobiologischen Diagnostik verglichen.

Die Ergebnisse der PCR, einschließlich DNA-Extraktion, liegen in weniger als vier Stunden vor. Die analytische Sensitivität für Salmonellen beträgt 4×10^4 cfu/ml, für Shigellen 3×10^5 cfu/ml, für *Campylobacter* 3×10^3 cfu/ml und für Yersinien 4×10^5 cfu/ml. Bei den klinischen Proben lag die Sensitivität für Salmonellen bei 99 % (71/72), für *Campylobacter jejuni* bei 99 % (79/80), für Shigellen (11/11) und Yersinien (10/10) bei je 100 %. Mikrobiologisch als *C.spp.* beurteilte Stämme wurden von der PCR zu 65 % (15/23) als *C. jejuni* identifiziert. 35 % (8/23) waren in der PCR negativ und entsprachen mit großer Wahrscheinlichkeit *C. coli*. Andere gramnegative oder grampositive Keime wurden nicht nachgewiesen. In 12 % (40/339) der Proben detektierte die PCR zusätzlich Keime, die kulturell nicht nachgewiesen wurden.

Die PCR könnte als zweckmäßige diagnostische Methode in Situationen eingesetzt werden, bei denen der Zeitfaktor eine Rolle spielt, wie z.B. bei Ausbruchsuntersuchungen, sowie für epidemiologische Fragestellungen.

7 Abkürzungsverzeichnis

°C:	Grad Celsius
µg:	Mikrogramm
µl:	Mikroliter
AKA:	Asklepios Klinik Altona/Hamburg 64
ATCC:	American Type Culture Collection
BHQ:	Black hole Quencher
BNI:	Bernhard-Nocht Institut für Tropenmedizin Hamburg
CCUG:	Culture Collection University of Göteborg
cfu:	Colony forming Units
CIN-Agar:	Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin Agar
C _t ::	Cycle threshold
DNA:	Desoxyribonucleinsäure
DSMZ:	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E. coli:	Escherichia coli
EHEC:	enterohämorrhagische Escherichia coli
ELISA	: enzyme linked immunosorbent Assay
EPEC:	enteropathogene E.coli
Eppi:	Eppendorfgefäß
g:	Gramm
h:	Stunde
HRMA:	high resolution melt analysis
IfSG:	Infektionsschutzgesetz
ipaH:	Invasion plasmid antigen H
kbp:	KiloBasenpaare
LED:	Light emitting Diode
M:	molar ; Steigung
MALDI-TOF:	Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionisation-Time Of Flight-Mass-Spectrometry	
MF:	McFarland-Standard
min:	Minute
ml:	Milliliter
MTP:	Microtiterplatte
MW:	Mittelwert

ng:	Nanogramm
PBS:	Phosphate buffered Saline
PCR:	Polymerase Chain Reaction
pg:	Picogramm
pmol:	Pikomol
RFLP:	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RKI:	Robert-Koch Institut
rpm:	Revolutions per minute
rRNA:	ribosomale RNA
SD:	Standardabweichung
sec:	Sekunden
SPI:	Salmonella Pathogenitätsinsel
spp.:	Spezies
SS-Agar:	Salmonella-Shigella Agar
ssp.:	Subspezies
STEC:	Shiga-Toxin produzierende Escherichia coli
Stx:	Shiga-Toxin
UKE:	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UV:	Ultraviolett
WHO:	World Health Organisation
XLD-Agar:	Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar
Yop:	Yersinia outer protein
Zinst BW LA II Vet:	Zentralinstitut der Bundeswehr LA II, Veterinärmedizin, Kiel

8 Literatur

Abu Al-Soud W, Rådström P (1998) Capacity of Nine Thermostable DNA Polymerases To Mediate DNA Amplification in the Presence of PCR-Inhibiting Samples.

Appl. Environ Microbiol. 64 (10): 3748–53.

Abu Al-Soud W, Rådström P (2000) Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. J Clin Microbiol. 38 (12): 4463–70.

Abu-Halaweh M, Bates J, Patel BK (2005) Rapid detection and differentiation of pathogenic *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by real-time PCR. Res Microbiol. 156 (1): 107–14.

Aepfelbacher M, Zumbihl R, Ruckdeschel K, Jacobi CA, Barz C, Heesemann J (1999) The tranquilizing injection of *Yersinia* proteins: a pathogen's strategy to resist host defense.

Biol Chem. 380 (7-8): 795–802.

Akane A, Matsubara K, Nakamura H, Takahashi S, Kimura K (1994) Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. J Forensic Sci. 39 (2): 362–72.

Allos BM, Moore MR, Griffin PM, Tauxe RV (2004) Surveillance for sporadic food-borne disease in the 21st century: the FoodNet perspective. Clin Inf Dis 338: Suppl 3: 115–20.

Al Rashid ST, Dakuna, I, Louie H, Ng D, Vandamme P, Johnson W, Chan VL (2000) Identification of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *Arcobacter butzleri*, and *A. butzleri*-like species based on the *glyA* gene. J Clin Microbiol. 38: 1488–94.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.

Nucleic Acids Res. 25: 3389–402.

Amar CF, East CL, Maclure EA, McLauchlin J, Jenkins C, Duncanson P, Wareing DR (2004) Blinded application of microscopy, bacteriological culture, immunoassays and PCR to detect gastrointestinal pathogens from faecal samples of patients with community-acquired Diarrhoea.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 23: 529–34.

Amar CF, East CL, Gray J, Iturriza-Gomara M, Maclure EA, McLauchlin J (2007) Detection by PCR of eight groups of enteric pathogens in 4,627 faecal samples: re-examination of the English case-control Infectious Intestinal Disease Study (1993-1996). Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 26 (5): 311–23.

Amavisit P, Browning GF, Lightfoot D, Church S, Anderson GA, Whithear KG, Markham PF (2001) Rapid PCR detection of *Salmonella* in horse faecal samples. Vet Microbiol. 79 (1): 63–74.

Aranda KR, Fagundes-Neto U, Scaletsky IC (2004) Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. J Clin Microbiol. 42 (12): 5849–53.

- Bang DD, Wedderkopp A, Pedersen K, Madsen M (2002)** Rapid PCR using nested primers of the 16S rRNA and the hippuricase (hip O) genes to detect *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental samples. *Mol Cell Probes* 16: 359–69.
- Baumforth KR, Nelson PN, Digby JE, O'Neil JD, Murray PG (1999)** Demystified...the polymerase chain reaction. *Mol Pathol.* 52 (1): 1–10.
- Bej AK, Steffan RJ, DiCesare J, Haff L, Atlas RM (1990)** Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes. *Appl Environ Microbiol.* 56 (2): 307–14.
- Bélec L, Authier J, Eliezer-Vanerot MC, Piédouillet C, Mohamed AS, Gherardi RK (1998)** Myoglobin as a polymerase chain reaction (PCR) inhibitor: a limitation for PCR from skeletal muscle tissue avoided by the use of *Thermus thermophilus* polymerase. *Muscle Nerve* 21 (8): 1064–70.
- Bernard PS, Ajioka RS, Kushner JP, Wittwer CT (1998)** Homogeneous multiplex genotyping of hemochromatosis mutations with fluorescent hybridization probes. *Am J Pathol.* 153 (4): 1055–61.
- Bernard PS, Pritham GH, Wittwer CT (1999)** Color Multiplexing Hybridization Probes Using the Apolipoprotein E Locus as a Model System for Genotyping. *Anal Biochem.* 273 (2): 221–28.
- Beuret C (2004)** Simultaneous detection of enteric viruses by multiplex real-time RT-PCR. *J Virol Methods* 115 (1): 1–8.
- Bhaduri S. (2002)** Comparison of multiplex PCR, PCR-ELISA and fluorogenic 5' nuclease PCR assays for detection of plasmid-bearing virulent *Yersinia enterocolitica* in swine feces. *Mol Cell Probes* 16 (3): 191–96.
- Bickley J, Short JK, McDowell DG, Parkes HC (1996)** Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Lett Appl Microbiol.* 22 (2): 153–58.
- Biedzka-Sarek M, Venho R, Skurnik M (2005)** Role of YadA, Ail, and Lipopolysaccharide in Serum Resistance of *Yersinia enterocolitica* Serotype O:3. *Infect. Immun.* 73 (4): 2232–44.
- Bockemühl J, Roggentin P (2004)** Enterale Yersiniosen. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz* 44: 685–91.
- Bottone EJ (1997)** *Yersinia enterocolitica*: The charisma continues. *Clin Microbiol Rev.* 10: 257–76.
- Boyapalle S, Wesley IV, Hurd HS, Reddy PG (2001)** Comparison of culture, multiplex, and 5' nuclease polymerase chain reaction assays for the rapid detection of *Yersinia enterocolitica* in swine and pork products. *J Food Prot.* 64 (9): 1352–61.
- Bruckner S, Rhamouni S, Tautz L, Denault JB, Alonso A, Becattini B, Salvesen GS, Mustelin T (2005)** *Yersinia* phosphatase induces mitochondrially dependent apoptosis of T cells. *J Biol Chem.* 280: 10388–94.

- Burkardt** HJ (2000) Standardization and Quality Control of PCR Analyses. *Clin Chem Lab Med.* 38 (2): 87–91.
- Bustin** SA, Mueller R (2005) Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond)* 109 (4): 365–79.
- Buyse** JM, Hartman AB, Strockbine N, Venkatesan M (1995) Genetic polymorphism of the ipaH multicopy antigen gene in *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Microb Pathog.* 19 (5): 335–49.
- Cardullo** RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, Wolf DE (1988) Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85 (23): 8790–8794.
- Cairncross** S, Hunt C, Boisson S, Bostoen K, Curtis V, Fung IC, Schmidt WP (2010) Water, sanitation and hygiene for the prevention of diarrhoea. *Int J Epidemiol.* 39 Suppl 1: i193–205.
- Chamberlain** JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT (1988) Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucl. Acids Res.* 16 (23): 11141–56.
- Collins** E, Glennon M, Hanley S, Murray AM, Cormican M, Smith T, Maher M (2001) Evaluation of a PCR/DNA probe colorimetric membrane assay for identification of *Campylobacter* spp. in human stool specimens. *J Clin Microbiol.* 39 (11): 4163–5.
- Csordas** AT, Barak JD, Delwiche MJ (2004) Comparison of primers for the detection of *Salmonella enterica* serovars using real-time PCR. *Lett Appl Microbiol.* 39 (2): 187–93.
- De Buck** J, Van Immerseel F, Haesebrouck F, Ducatelle R (2004) Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by *Salmonella*. *J Appl Microbiol.* 97 (2): 233–45.
- Didenko** VV (2001) DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechniques* 31: 1106–21.
- Dorak** MT (2006) *Real-Time PCR (Advanced Methods Series)*. Taylor & Francis, Oxford. Veröffentlichung aus dem Internet, Update 2009, www.dorak.info/genetics/realtime.html
- Dos Santos** LR, do Nascimento VP, de Oliveira SD, Flores ML, Pontes AP, Ribeiro AR, Salle CT, Lopes RF (2001) Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Salmonella* in artificially inoculated chicken meat. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 43 (5): 247–50.
- D'Souza** DH, Critzer FJ, Golden DA (2009) Real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction for the rapid detection of salmonella using *invA* primers. *Foodborne Pathog Dis.* 6 (9): 1097–106.
- DuPont** HL (2009) Bacterial Diarrhea. *N Engl J Med.* 361 (16): 1560–69.

Dutta S, Chatterjee A, Dutta P, Rajendran K, Roy S, Pramanik KC, Bhattacharya SK (2001) Sensitivity and performance characteristics of a direct PCR with stool samples in comparison to conventional techniques for diagnosis of Shigella and enteroinvasive Escherichia coli infection in children with acute diarrhoea in Calcutta. India J Med Microbiol. 50 (8): 667–74.

Eckhart L, Bach J, Ban J, Tschachler E (2000) Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and inhibits its activity. Biochem Biophys Res Commun. 271 (3): 726–30.

Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE (2000) Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology. Clin Microbiol Rev. 13 (4): 559–70.

Engvall EO, Brändström B, Gunnarsson A, Mörner T, Wahlström H, Fermér C (2002) Validation of a polymerase chain reaction/restriction enzyme analysis method for species identification of thermophilic campylobacters isolated from domestic and wild animals. J Appl Microbiol. 92 (1): 47–54.

Ericsson CD (2003) Travellers' diarrhoea. Int J Antimicrob Agents. 21 (2): 116–24.

Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JD, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR 3rd, Smith TF (2006) Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. Clinical Microbiology Reviews. 19 (1): 165–256.

Eyigor A, Dawson KA, Langlois BE, Pickett CL (1999) Cytolethal distending toxin genes in Campylobacter jejuni and Campylobacter coli isolates: detection and analysis by PCR. J Clin Microbiol. 37 (5): 1646–50.

Eyigor A, Carli KT (2003) Rapid detection of Salmonella from poultry by real-time polymerase chain reaction with fluorescent hybridization probes. Avian Dis. 47 (2): 380–86.

Farshad S, Sheikhi R, Japoni A, Basiri E, Alborzi A (2006) Characterization of Shigella strains in Iran by plasmid profile analysis and PCR amplification of ipa genes. J Clin Microbiol. 44 (8): 2879–83.

Fenwick SG, Murray A (1991) Detection of pathogenic Yersinia enterocolitica by polymerase chain reaction. Lancet 337: 496–97.

Fitzgerald C, Nachamkin I (2007) Campylobacter and Arcobacter In: Murray PR (Hrsg) Manual of Clinical Microbiology. ASM Press, Washington DC, Vol. 1, S 938

Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ (2001) Molecular detection of antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev. 14 (4): 836–71.

Förstert T (1948) Zwischenmolekulare Energieumwandlung und Fluoreszenz. Ann Phys. 6: 55–75.

Fredriksson-Ahomaa M, Korte T, Korkeala H (2000) Contamination of carcasses, offals, and the environment with yadA-positive Yersinia enterocolitica in a pig slaughterhouse. J Food Prot. 63 (1): 31–35.

Fredriksson-Ahomaa M, Stolle A, Siitonen A, Korkeala H (2006b) Sporadic human *Yersinia enterocolitica* infections caused by bioserotype 4/O:3 originate mainly from pigs. *J Med. Microbiol.* 55: 747–49.

Fukushima H, Tsunomori Y, Seki R (2003) Duplex real-time SYBR green PCR assays for detection of 17 species of food- or waterborne pathogens in stools. *J Clin Microbiol.* 41 (11): 5134–46.

Geiss HK (2009) Präanalytik: Materialauswahl, Probennahme, Lagerung und Transport. In: Neumeister B, Geiss HK, Braun RW, Kimmig P (Hrsg) *Mikrobiologische Diagnostik Bakteriologie – Mykologie – Virologie – Parasitologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2. Auflg. S 126–134

Glass RI, Noel J, Ando T, Fankhauser R, Belliot G, Mounts A, Parashar UD, Bresee JS, Monroe SS (2000) The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J Infect Dis.* 181 Suppl 2: 254–61.

Gómez-Duarte OG, Bai J, Newell E (2009) Detection of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, and *Campylobacter* spp. enteropathogens by 3-reaction multiplex polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 63 (1): 1–9.

Gonzalez I, Grant KA, Richardson PT, Park SF, Collins MD (1997) Specific identification of the enteropathogen *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using a PCR test based on the *ceuE* gene encoding a putative virulence determinant. *J Clin Microbiol.* 35: 759–63.

Greisman SE, Hornick RB (1972) Cellular inflammatory responses of man to bacterial endotoxin: a comparison with PPD and other bacterial antigens. *J Immunol.* 109 (6): 1210–22.

Guerrant RL, Hughes JM, Lima NL, Crane J (1990) Diarrhea in developed and developing countries: magnitude, special settings, and etiologies. *Rev Infect Dis.* 12 Suppl 1: S 41–50.

Hale TL, Sansonetti JP, Schad PA, Austin S, Formal SB (1983) Characterization of virulence plasmids and plasmid-associated outer membrane proteins in *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 40: 340–50

Hansen-Wester I, Hensel M (2001) *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect.* 3: 549–59.

Harnett N, Lin YP, Krishnan C (1996) Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* using the multiplex polymerase chain reaction. *Epidemiol Infect.* 117 (1): 59–67.

Hartman AB, Venkatesan M, Oaks EV, Buysse JM (1990) Sequence and molecular characterization of a multicopy invasion plasmid antigen gene, *ipaH*, of *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.* 172 (4): 1905–15.

Hartmann B (2007) Entwicklung einer Real-Time PCR-Nachweismethode für *Yersinia enterocolitica*. Tiermed. Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität, München.

- Heesemann J** (1990) Enteropathogene Yersinien: Pathogenitätsfaktoren und neue diagnostische Methoden. *Immun. Infekt.* 18: 186–191.
- Heesemann J**, Hantke K, Vocke T, Saken E, Rakin A, Stojiljkovic I, Berner R (1993) Virulence of *Yersinia enterocolitica* is closely associated with siderophore production, expression of an iron-repressible outer membrane polypeptide of 65,000 Da and pesticin sensitivity. *Mol Microbiol.* 8 (2): 397–408.
- Heesemann J** (2001) Die Familie der Enterobacteriaceae. In: Köhler W, Ansorg R (Hrsg) *Medizinische Mikrobiologie*. Elsevier, Urban & Fischer Verlag, München, Jena, 8. Aufl, S 288–92.
- Heesemann J** (2001) Die Gattung *Yersinia*, Yersiniosen. In: Köhler W, Ansorg R (Hrsg) *Medizinische Mikrobiologie*. Elsevier, Urban & Fischer Verlag, München, Jena, 8. Aufl, S 315–28.
- Heid CA**, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real-time quantitative PCR. *Genome Research* 6 (10): 986–94.
- Heißhuber A**, Hautmann W, Arenz S, Kugler R, Kleih W, Ludwig S, Wildner M (2005) Gehäuftes Auftreten von Erkrankungen mit *Salmonella* Enteritidis in Krankenhäusern und Altenheimen im Landkreis Oberallgäu (Bayern) im Juli 2004. *Gesundheitswesen* 2005. 67: 845–52.
- Hellenbrand W** (2003) Neu und vermehrt auftretende Infektionskrankheiten. In: Robert Koch-Institut (Hrsg) *Gesundheitsberichterstattung des Bundes*, Oktoberdruck, Berlin, Heft 18 S 21–22.
- Hensel M**, Hinsley AP, Nikolaus T, Sawers G, Berks BC (1999) The genetic basis of tetrathionate respiration in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol.* 32 (2): 275–87.
- Higuchi R**, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences. *BioTechnology.* 10 (4): 413–17.
- Hirose K**, Itoh K, Nakajima H, Kurazono T, Yamaguchi M, Moriya K, Ezaki T, Kawamura Y, Tamura K, Watanabe H (2002) Selective amplification of *tyv* (*rfbE*), *prt* (*rfbS*), *viaB*, and *fliC* genes by multiplex PCR for identification of *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi A. *J Clin Microbiol.* 40 (2): 633–36.
- Holland PM**, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88 (16): 7276–80.
- Holzapfel B**, Wickert L (2007) Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Biol. Unserer Zeit* 37 (2): 120–26.
- Hoorfar J**, Ahrens P, Rådström P (2000) Automated 5' nuclease PCR assay for identification of *Salmonella enterica*. *J Clin Microbiol.* 38 (9): 3429–35.

Houng HS, Sethabutr O, Nirdnoy W, Katz DE, Pang LW (2001) Development of a *ceuE*-based multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for direct detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Thailand. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 40 (1-2): 11–19.

Hu L, Kopecko DJ (2003) *Campylobacter* species. In: Miliotis MD, Bier JW, (Hrsg). *International Handbook of Foodborne Pathogens*. Marcel Dekker, New York, S 181–98.

Ibrahim A, Liesack W, Stackebrandt E (1992) Polymerase chain reaction-gene probe detection system specific for pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica*. *J Clin Microbiol.* 30 (8): 1942–47.

Iijima Y, Asako NT, Aihara M, Hayashi K (2004) Improvement in the detection rate of diarrhoeagenic bacteria in human stool specimens by a rapid real-time PCR assay. *J Med Microbiol.* 53 (Pt 7): 617–22.

Inglis GD, Kalischuk LD (2004) Direct quantification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter lanienae* in feces of cattle by real-time quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol.* 70 (4): 2296–306.

Iriarte M, Cornelis GR (1995) MyfF, an element of the network regulating the synthesis of fibrillae in *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol.* 177 (3): 738–44.

Jacobs J, Jamaer D, Vandeven J, Wouters M, Vermeylen C, Vandepitte J (1989) *Yersinia enterocolitica* in donor blood: a case report and review. *J Clin Microbiol.* 27 (5): 1119–21.

Jacobsen NR, Boganovic T, Skurnik M, Lübeck PS, Ahrens P, Hoorfar J (2005) A real-time PCR assay for the specific identification of serotype O:9 of *Yersinia enterocolitica*. *J. Microbiol. Meth.* 63, 151-156

Jin Q, Yuan Z, Xu J, Wang Y, Shen Y, Lu W, Wang J, Liu H, Yang J, Yang F, Zhang X, Zhang J, Yang G, Wu H, Qu D, Dong J, Sun L, Xue Y, Zhao A, Gao Y, Zhu J, Kan B, Ding K, Chen S, Cheng H, Yao Z, He B, Chen R, Ma D, Qiang B, Wen Y, Hou Y, Yu J (2002) Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. *Nucleic Acids Res.* 30 (20): 4432–41.

Josefsen MH, Krause M, Hansen F, Hoorfar J (2007) Optimization of a 12-hour TaqMan PCR-based method for detection of *Salmonella* bacteria in meat. *Appl Environ Microbiol.* 73 (9): 3040–48.

Jourdan AD, Johnson SC, Wesley IV (2000) Development of a fluorogenic 5' nuclease PCR assay for detection of the *ail* gene of pathogenic *Yersinia enterocolitica*. *Appl Environ Microbiol.* 66 (9): 3750–55.

Karanis P, Koureti C, Smith H (2007) Waterborne transmission of protozoan parasites : A worldwide review of outbreaks and lessons learnt *J Water Health.* 5 (1): 1–38.

Kasimir S (2005) Verlaufsuntersuchungen zum Vorkommen potentiell humanpathogener *Yersinia enterocolitica* und *Campylobacter* spp. in Schweinebeständen von der Geburt bis zur Schlachtung sowie Genotypisierung ausgewählter Isolate. *Tiermed. Dissertation, Universität Leipzig, Leipzig.*

- Kapperud G, Vardund T (1993)** Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food, water, and feces by nested polymerase chain reactions and immunomagnetic separation. *Contrib Microbiol Immunol.* 13: 130–33.
- Khan G, Kangro HO, Coates PJ, Heath RB (1991)** Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA. *J Clin Pathol.* 44 (5): 360–65.
- Kim JB, Blackshaw S (2001)** One-step enzymatic purification of PCR products for direct sequencing. *Curr Protoc Hum Genet.* Chapter 11: Unit 11.6.
- Kist M (2001)** Die Gattungen *Streptobacillus*, *Campylobacter*, *Arcobacter* und *Helicobacter*. In: Köhler W, Ansorg R (Hrsg) *Medizinische Mikrobiologie*. Elsevier, Urban&FischerVerlag, München, Jena, 8. Aufl, S 288–92.
- Klena JD, Parker CT, Knibb K, Ibbitt JC, Devane PM, Horn ST, Miller WG, Konkel ME (2004)** Differentiation of *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter upsaliensis* by a multiplex PCR developed from the nucleotide sequence of the lipid A gene *lpxA*. *J Clin Microbiol.* 42 (12): 5549–57.
- Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG (1971)** Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNAs as catalyzed by DNA polymerases. *J. Mol. Biol.* 56: 341–61.
- Kot B, Trafny EA (2004)** The application of PCR to the identification of selected virulence markers of *Yersinia* genus. *Pol J Vet Sci.* 7 (1): 27–31.
- Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti PJ, Adak GK, Levine MM (1999)** Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull World Health Organ.* 77 (8): 651–66.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N (2006)** The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 27 (2-3): 95–125.
- LaGier MJ, Joseph LA, Passaretti TV, Musser KA, Cirino NM (2004)** A real-time multiplexed PCR assay for rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Mol Cell Probes* 18: 275–82.
- Lantz PG, Matsson M, Waldström T, Rådström P (1997)** Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for sample preparation prior to PCR. *J Microbiol Methods* 18: 159–67.
- Lawson AJ, Logan JM, O’Neill GL, Stanley J (1998)** Large-Scale Survey of *Campylobacter* Species in Human Gastroenteritis by PCR and PCR-Enzyme Linked immunosorbent Assay. *J. Clin Microbiol.* 37 (12): 3860–64.

Lee MA, Squirrell DJ, Leslie DL, Brown T (2009) Homogenous Fluorescent Chemistries for Real-Time PCR. In: Logan J, Edwards K, Saunders N (Hrsg) Real-Time PCR current Technology and Applications. Caister Academic Press, Norfolk UK, S 23–47

Le Pecq JB, Paoletti C (1966) A new fluorometric method for RNA and DNA determination. *Anal Biochem.* 17 (1): 100–107.

Li M, Gong J, Cottrill M, Yu H, de Lange C, Burton J, Topp E (2003) Evaluation of QIAamp[®] DNA stool mini kit for ecological studies of gut microbiota. *J Microbiol Methods* 54 (1): 13–20.

Lim YH, Hirose K, Izumiya H, Arakawa E, Takahashi H, Terajima J, Itoh K, Tamura K, Kim SI, Watanabe H (2003) Multiplex polymerase chain reaction assay for selective detection of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Jpn J Infect Dis.* 56 (4): 151–55.

Lindqvist R (1999) Detection of *Shigella* spp. in food with a nested PCR method – sensitivity and performance compared with a conventional culture method. *J Appl Microbiol.* 86: 971–78.

Linton D, Lawson AJ, Owen RJ, Stanley J (1997) PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *J Clin Microbiol.* 35 (10): 2568–72.

Logan JM, Edwards KJ, Saunders NA, Stanley J (2001) Rapid identification of *Campylobacter* spp. By meltig peak analysis of bioprobes in real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 39: 2227–32.

Louie M, Cockerill FR (2001) Susceptibility testing. Phenotypic and genotypic tests for bacteria and mycobacteria. *Infect Dis Clin North Am.* 15 (4): 1205–26.

Lübeck PS, Wolffs P, On SL, Ahrens P, Rådström P, Hoorfar J (2003) Toward an international standard for PCR-based detection of food-borne thermotolerant *Campylobacters*: assay development and analytical validation. *Appl Environ Microbiol.* 69 (9): 5664–69.

Mackay M (2004) Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 10 (3): 190–212.

Maher M, Finnegan C, Collins E, Ward B, Carroll C, Cormican M (2003) Evaluation of culture methods and a DNA probe-based PCR assay for detection of *Campylobacter* species in clinical specimens of feces. *J Clin Microbiol* 41: 2980–2986.

Malorny B, Paccassoni E, Fach P, Bunge C, Martin A, Helmuth R (2004) Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Appl Environ Microbiol.* 70 (12): 7046–52.

Malorny B, Bunge C, Helmuth R (2007) A real-time PCR for the detection of *Salmonella* Enteritidis in poultry meat and consumption eggs. *J Microbiol Methods.* 70 (2): 245–51.

McAdam AJ (2000) Discrepant analysis: how can we test a test? *J Clin Microbiol.* 38 (6): 2027–9.

Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. (1999) Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis.* 5 (5): 607-25.

Miller VL, Falkow, S. (1988) Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infect Immun.* 56: 1242–1248.

Miller VL, Farmer JJ 3rd, Hill WE, Falkow S. (1989) The ail locus is found uniquely in *Yersinia enterocolitica* serotypes commonly associated with disease. *Infect Immun.* 57: 121–131.

Miller WG, Parker CT, Heath S, Lastovica AJ (2007) Identification of genomic differences between *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* and *C. jejuni* subsp. *doylei* at the nap locus leads to the development of a *C. jejuni* subspeciation multiplex PCR method. *BMC Microbiol.* 28 (7): 11.

Moore JE, Corcoran D, Dooley J, Fanning S, Lucey B, Matsuda M, McDowell D, Mégraud F, Millar BC, O'Mahony R, O'Riordan L, O'Rourke M, Rao JR, Rooney P, Sails A, Whyte P (2005) *Campylobacter*. *Vet. Res.* 36: 351–82.

Mülhardt C (2006) *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Elsevier, Heidelberg, München 5. Aufl., S 8; S 26–35 und S 81–91.

Musher DM, Musher BL (2004) Contagious Acute Gastrointestinal Infections. *N Engl J Med.* 351:2417–27.

Nakajima H, Inoue M, Mori T, Itoh KI, Arakawa E, Watanabe H (1992) Detection and identification of *Yersinia pseudotuberculosis* and pathogenic *Yersinia enterocolitica* by an improved polymerase chain reaction method. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2484–86.

Nantavisai K, Mungthin M, Tan-ariya P, Rangsin R, Naaglor T, Leelayoova S (2007) Evaluation of the sensitivities of DNA extraction and PCR methods for detection of *Giardia duodenalis* in stool specimens. *J Clin Microbiol.* 45 (2): 581–83.

Niefnecker J (2009) Identifizierung von virulenzassoziierten Antigenen bei enteropathogenen *Yersinien* und *Campylobacter jejuni*. Biol. Dissertation. Ludwig-Maximilian-Universität München.

O'Leary J, Corcoran D, Lucey B (2009) Comparison of the EntericBio multiplex PCR system with routine culture for detection of bacterial enteric pathogens. *J Clin Microbiol.* 47 (11): 3449-53. Epub 2009 Sep 2.

Olsvik O, Popovic T, Cudjoe KS, Hornes E, Ugelstad J, Uhlen M (1994) Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 7, 43–54

On SL (2001) Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. *J Appl Microbiol.* 90: 1S–15S.

On SL, Jordan PJ (2003) Evaluation of 11 PCR assays for species-level identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Clin Microbiol.* 41 (1): 330–36.

- Oni GA** (1996) Infant feeding practices, socio-economic conditions and diarrhoeal disease in a traditional area of urban Ilorin, Nigeria. *East Afr Med J.* 73 (5): 283–8.
- Oyfo BA**, Thornton SA, Burr DH, Trust TJ, Pavlovskis OR, Guerry P (1992) Specific detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 30 (10): 2613–19.
- Padungtod P**, Hanson R, Wilson DL, Bell J, Linz JE, Kaneene JB (2002) Identification of *Campylobacter jejuni* isolates from cloacal and carcass swabs of chickens in Thailand by a 5' nuclease fluorogenic polymerase chain reaction assay. *J Food Prot.* 65 (11): 1712–16.
- Pawlowski SW**, Warren CA; Guerrant R (2009) Diagnosis and Treatment of Acute or Persistent Diarrhea. *Gastroenterology* 136 (6): 1874–86.
- Pearson BM**, Gaskin DJ, Segers RP, Wells JM, Nuijten PJ (2007) The complete genome sequence of *Campylobacter jejuni* strain 81116 (NCTC11828). *J Bacteriol.* 189 (22): 8402–03.
- Pepe JC**, Wachtel MR, Wagar E, Miller VL (1995) Pathogenesis of defined invasion mutants of *Yersinia enterocolitica* in a BALB/c mouse model of infection. *Infect Immun.* 63: 4837–48.
- Persson S**, Olsen KE (2005) Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. *J Med Microbiol.* 54 (Pt 11): 1043–47.
- Pertoft H** (2000) Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll®. *J Biochem Biophys Methods* 44 (1-2): 1–30.
- Pingoud A**, Urbanke C (1997) *Arbeitsmethoden der Biochemie de Gruyter*, Berlin, New York
- Portnoy DA**, Falkow S (1981) Virulence-associated plasmids from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis*. *J Bacteriol.* 148: 877–83.
- Powell HA**, Gooding CM, Garret SD, Lund BM, McKee RA (1994) Proteinase inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol.* 18: 59–61.
- Price-Carter M**, Tingey J, Bobik TA, Roth JR (2001) The alternative electron acceptor tetrathionate supports B12-dependent anaerobic growth of *Salmonella enterica* serovar typhimurium on ethanolamine or 1,2-propanediol. *J. Bacteriol.* 183 (8): 2463–75.
- QIAGEN** (2007) Sample size. In *QIAamp®DNA Stool Handbook*, QIAGEN® Sample & Assay Technologies, Second Edition 07, S 8.
- Rådström P**, Knutsson R, Wolffs P, Lövenklev M, Löfström C (2004) Pre-PCR processing. *Mol Biotechnol.* 26 (2): 133–46.

Ragimbeau C, Salvat G, Colin P, Ermel G (1998) Development of a multiplex PCR gene fingerprinting method using *gyrA* and *pflA* polymorphisms to identify genotypic relatedness within *Campylobacter jejuni* species. *J Appl Microbiol.* 85 (5): 829–38.

Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galán JE, Ginocchio C, Curtiss R 3rd, Gyles CL (1992) Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol Cell Probes* 6 (4): 271–79.

Rasmussen HN, Rasmussen OF, Christensen H, Olsen JE (1995) Detection of *Yersinia enterocolitica* O:3 in faecal samples and tonsil swabs from pigs using IMS and PCR. *J Appl Bacteriol.* 78 (5): 563–68.

Regnath T (2009) Manuelle und automatisierte Verfahren: Bakteriologie. In: Neumeister B, Geiss HK, Braun RW, Kimmig P (Hrsg) *Mikrobiologische Diagnostik. Bakteriologie – Mykologie – Virologie – Parasitologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2. Auflg. S 143–177.

Robert-Koch-Institut (2001) Ratgeber Infektionskrankheiten Shigellose. *Epidemiologisches Bulletin* 32/2001.
http://www.rki.de/cln_171/nn_195896/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2001/32__01,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/32_01.pdf

Robert-Koch-Institut (2007) *Campylobacter-jejuni*-Infektionen treten 2007 vermehrt auf. *Epidemiologischen Bulletin* 36/2007: 331–34.
http://www.rki.de/cln_091/nn_466816/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2007/36__07,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/36_07.pdf

Robert-Koch-Institut (2007) Salmonellose, *S. enteritidis* Erkrankungen: Zu einem Ausbruch in Fulda; Zu einem Ausbruch in einem Wolfsburger Klinikum; Zu einem Ausbruch am Klinikum Dortmund; Kommentar aus dem RKI. *Epidemiologischen Bulletin* 48/2007: 445–452.
http://www.rki.de/cln_151/nn_264978/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2007/48__07,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/48_07.pdf

Robert-Koch-Institut (2009) Ratgeber Infektionskrankheiten Salmonellosen. *Epidemiologisches Bulletin* 13/2009: 117–121.
http://www.rki.de/cln_151/nn_1378492/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2009/13__09,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/13_09.pdf

Robert-Koch-Institut (2009) Aktuelle Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten 47. Woche 2009 (Datenstand 9.12.2009) *Epidemiologisches Bulletin* 50/2009: 522–523.
http://www.rki.de/cln_178/nn_1378492/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2009/50__09,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/50_09.pdf

Rohner P, Pittet D, Pepey B, Nije-Kinge T, Auckenthaler R (1997) Etiological agents of infectious diarrhea: implications for requests for microbial culture. *J Clin Microbiol.* 35 (6): 1427–32.

- Rolfs A**, Schuller I, Finkh U, Weber-Rolfs I (1992) PCR: Clinical diagnostics and research, Springer, Berlin Heidelberg New York, S 1–10 und 53–57.
- Roy SL**, Scallan E, Beach MJ (2006) The rate of acute gastrointestinal illness in developed countries. *J Water Health*. 4 Suppl 2: 31–69.
- Rozen S**, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, S 365–86.
- Sachse K** (2004) Specificity and Performance of PCR Detection Assays for Microbial Pathogens. *Mol Biotechnol*. 26: 61–79.
- Saiki RK**, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* 230 (4732): 1350–54.
- Saiki RK**, Gelfand DH Stoffel S. Scharf SJ Higuchi R. Horn GT Mullis KB Erlich HA (1988) Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 239 (4839): 487–91.
- Sansonetti PJ**, Kopecko DJ, Formal SB (1982) Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. *Infect. Immun*. 35: 852–60.
- Sansonetti PJ** (2001) Microbes and microbial toxins: paradigms for 25 microbial-mucosal interactions III. Shigellosis: from symptoms to molecular pathogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 280: G319–G323.
- Sethabur O**, Venkatesan M. Murphy GS, Eampokalap B, Hoge CW, Echeverria P (1993) Detection of *Shigellae* and enteroinvasive *Escherichia coli* by amplification of the invasion plasmid antigen H DNA sequence in patients with dysentery. *J Infect Dis*. 167: 458–61.
- Shi XL**, Hu QH, Zhang JF, Li QG, Wang B, Lin YM, Zhuang ZX, Liu XL, Zhang SX (2006) [Rapid simultaneous detection of *Salmonella* and *Shigella* using modified molecular beacons and real-time PCR]. (in Chinese) *27 Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. (12): 1053–56.
- Stryer L**, Haugland RP (1967) Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 58 (2): 719–26.
- Tacket CO**, Davis BR, Carter GP, Randolph JF, Cohen ML (1983) *Yersinia enterocolitica* pharyngitis. *Ann Intern Med*. 99: 40–42.
- Tauxe RV**, Vandepitte J, Wauters G, Martin SM, Goossens V, De Mol P, Van Noyen R, Thiers G (1987) *Yersinia enterocolitica* infections and pork: the missing link. *Lancet* 1 (8542): 1129–32.

- Terpe K** (2007) DNA-Polymerase & Annealingtemperatur. Sonderdruck aus Methoden und Anwendungen Biospektrum 06 13. Jahrgang.
- Thielman AM, Guerrant RL** (2004) Clinical Practice. Acute Infectious Diarrhea. N Engl J Med. 350 (1): 38–47.
- Tholozan JL, Cappelier JM, Tissier JP, Delattre G, Federighi M** (1999) Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1110–16.
- Tindall BJ, Grimont PA, Garrity GM, Euzéby JP** (2005) Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. Int J Syst Evol Microbiol. 55: 521–24.
- Tindall KR, Kunkel TA** (1988) Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Biochemistry 27 (16): 6008–13.
- Tschäpe H, Reissbrodt R, Prager R** (2009) *Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, Aeromonadaceae*. In: Neumeister B, Geiss HK, Braun RW, Kimmig P (Hrsg) Mikrobiologische Diagnostik. Bakteriologie – Mykologie – Virologie – Parasitologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2. Auflg. S 431–41.
- Tschäpe H, Reissbrodt R, Prager R** (2009) Darmpathogene *E. coli*. In: Neumeister B, Geiss HK, Braun RW, Kimmig P (Hrsg) Mikrobiologische Diagnostik. Bakteriologie – Mykologie – Virologie – Parasitologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2. Auflg. S 443–48.
- Tsen HY, Chen MH, Shieh JJ, Wang SJ, Hu NT** (1989) Possible use of a 1.8 kb DNA fragment for the specific detection of *Salmonella* in foods. J Ferment Bioeng. 68: 1–6.
- Tsen HY, Wang SJ, Roe BA, Green SS** (1991) DNA sequence of a *Salmonella*-specific DNA fragment and the use of oligonucleotide probes for *Salmonella* detection. Appl Microbiol Biotechnol. 35 (3): 339–47.
- Vandamme P** (2000) Taxonomy of the family *Campylobacteriaceae*. In Nachamkin I, Blaser M.J (Hrsg) *Campylobacter*, ASM Press Ausgabe 2, S 3–26.
- Venkatesan M, Buysse JM, Kopecko DJ** (1989) Use of *Shigella flexneri* ipaC and ipaH sequences for the general identification of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 27: 2687–91.
- Verweij JJ, Blangé RA, Templeton K, Schinkel J, Brienen EA, van Rooyen MA, van Lieshout L, Polderman AM** (2004) Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. J Clin Microbiol. 42 (3): 1220–23.
- Villalobo E, Torres A** (1998) PCR for detection of *Shigella* spp. in mayonnaise. Appl Environ Microbiol. 64: 1242–45.

Vogt K, Suerbaum H, Hahn H, Miksits K (2005) *Campylobacter*. In Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann, U (Hrsg) *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, Springer, Berlin, Heidelberg, S 287–90.

Volokhov D, Chizhikov V, Chumakov K, Rasooly A (2003) Microarray-based identification of thermophilic *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*. *J Clin Microbiol.* 41: 4071–80.

Waegel A, Nachamkin I (1996) Detection and molecular typing of *Campylobacter jejuni* in fecal samples by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 10 (2): 75–80.

Wang L, Li Y, Mustaphai A (2007) Rapid and simultaneous quantitation of *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* in ground beef by multiplex real-time PCR and immunomagnetic separation. *J Food Prot.* 70 (6): 1366–72.

Wang RF, Cao WW, Cerniglia CE (1997) A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *J Appl Microbiol.* 83 (6): 727–36.

Weber A, Lembke C (1981) [Comparison of two enrichment methods and five selective media for the isolation of *Yersinia enterocolitica* from tonsils of slaughter pigs (author's transl)]. (in Deutsch) *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg. A* 250 (1-2): 72–7.

Weber A, Schwarzkopf A (2003) Heimtierhaltung – Chancen und Risiken für die Gesundheit. In Robert-Koch Institut (Hrsg) *Gesundheitsberichterstattung des Bundes Oktoberdruck*, Berlin, Heft 19, S 14–15.

Wei J, Goldberg M B, Burland V, Venkatesan M M, Deng W, Fournier G, Mayhew G F, Plunkett III G, Rose D J, Darling A, Mau B, Perna N T, Payne S. M, Runyen-Janecky L J, Zhou S, Schwartz D C, Blattner F R (2003) Complete Genome Sequence and Comparative Genomics of *Shigella flexneri* Serotype 2a Strain 2457T†. *Infect Immun.* 71: 2775–86.

Whyte P, Mc Gill K, Collins JD, Gormley E (2002) The prevalence and PCR detection of *Salmonella* contamination in raw poultry. *Vet Microbiol.* 89 (1): 53–60.

Widdowson MA, Bresee JS, Gentsch JR, Glass RI (2005) Rotavirus disease and its prevention. *Curr Opin Gastroenterol.* 21(1): 26–31.

Wittwer CT, Herrmann MG, Gundry CN, Elenitoba-Johnson KS (2001) Real-Time Multiplex PCR Assays. *Methods* 25 (4): 430–42.

Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ (2003) High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem* 49: 853–860.

Wolffs P, Knutsson R, Norling B, Rådström P (2004) Rapid quantification of *Yersinia enterocolitica* in pork samples by a novel sample preparation method, flotation, prior to real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 42 (3): 1042–47.

- Wolffs P, Norling B, Hoorfar J, Griffith M, Rådström P (2005)** Quantification of *Campylobacter* spp. In chicken Rinse Samples by Using Flotation prior to Real-Time PCR. *Appl Environ Microbiol* 71 (10): 5759–64.
- Wolffs P, Glencross K, Thibaudeau R, Griffiths M (2006)** Direct quantitation and detection of salmonellae in biological samples without enrichment, using two-step filtration and real-time PCR. *Appl Environ Microbiol*. 72 (6): 3896–900.
- World Health Organization (1999)** Generic protocol to estimate the burden of *Shigella* diarrhoea and dysenteric mortality. WHO/V&P/99.26. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- World Health Organization (2008)** The Global Burden of Disease 2004 Updated Projections. Health statistics and informatics Department, World Health Organization, Geneva, Switzerland
<http://www.who.int/evidence/bod>
- Wren BW, Tabaqchali S (1990)** Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by the polymerase chain reaction. *Lancet* 336 (8716): 693.
- Xing JM, Zhang S, Du Y, Bi D, Yao LH (2009)** Rapid detection of intestinal pathogens in fecal samples by an improved reverse dot blot method. *World J Gastroenterol*. 15 (20): 2537–42.
- Yang YG, Song MK, Park SJ, Kim SW (2007)** Direct detection of *Shigella flexneri* and *Salmonella typhimurium* in human feces by real-time PCR. *J Microbiol Biotechnol*. 17 (10): 1616–21.
- You Y, Fu C, Zeng X, Fang D, Yan X, Sun B, Xiao D, Zhang J (2008)** A novel DNA microarray for rapid diagnosis of enteropathogenic bacteria in stool specimens of patients with diarrhea. *J Microbiol Methods* 75 (3): 566–71.
- Zheng H, Sun Y, Lin S, Mao Z, Jiang B. (2008)** *Yersinia enterocolitica* infection in diarrheal patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 27 (8): 741–52.
- Zilbauer M, Dorrell N, Wren BW, Bajaj-Elliott M (2008)** *Campylobacter jejuni*-mediated disease pathogenesis: an update. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 102 (2): 123–9.
- Zychlinsky A, Raupach B (2003)** Molekulare Grundlagen der Pathogenese von *Shigella*-Infektionen. In: Tätigkeitsbericht 2003, Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin, S 1–6.

9 Material

ARTIKELBEZEICHNUNG	ARTIKELNR.	FIRMA
QIAamp [®] DNA Stool Mini Kit	Cat.No. 51504	QIAGEN GmbH
QIAamp [®] DNA Mini Kit	Cat.No. 51304	QIAGEN GmbH
DNA-ExitusPlus	A7089.0500P	VWR
Filterspitzen im Rack, 50-1000 µl, (L=78mm)	BAA41331007	Armin Baack
Filterspitzen im Rack, 5-200 µl, (L=51mm)	BAA41330207	Armin Baack
Filterspitzen im Rack, 0,5-20 µl, (L=51mm)	BAA41330027	Armin Baack
Filterspitzen im Rack, 0,1-10 µl, (L=46mm)	BAA41330017	Armin Baack
Reaktionsgefäß 1,5 ml/2000, SafeSeal	72706	Sarstedt
Reaktionsgefäß 2,0 ml/5000, SafeSeal	72695	Sarstedt
Ethanol, absolut zur Analyse	1009831000	Merck
Serologische Pipette, 5 ml, wattiert	861253001	Sarstedt
Serologische Pipette, 10 ml, wattiert	861254001	Sarstedt
MgCl ₂ Stock Solution	11699113001	Roche Diagnostics
CorbettCups 0,2 ml, SE 1003	1020150	LTF-Labortechnik
HotStar [®] Taq Mastermix Kit	203445	QIAGEN GmbH
Columbia-Agar mit Schafblut	PB5008A	OXOID
GEN bag CO ₂	45533	Fa. bioMérieux

9.1 Bezugsquellen

9.1.1 Labormaterial

- QIAGEN GmbH
QIAGEN Str. 1, 40724 Hilden
- VWR International GmbH
Hilperstr. 20A, 64295 Darmstadt
- Armin Baack – Bedarf und Technik für Labor und Medizin
Werkstr. 715, 19061 Schwerin
- Eurofins MWG GmbH
Anzinger Strasse 7a, 85560 Ebersberg
- OXOID GmbH
Am Lippeglacis 4-8, 46483 Wesel
- Roche Diagnostics GmbH Roche Applied Science
Sandhofer Straße 116, 68305 Mannheim
- SARSTEDT AG & Co.
Rommelsdorfer Straße, Postfach 1220, 51582 Nümbrecht
- LFT Labortechnik GmbH & Co. KG
Hattnauer Strasse 18, 88142 Wasserburg
- bioMérieux Deutschland GmbH
Weberstraße 8, 72622 Nürtingen

9.1.2 Hersteller von Thermocyclern

- Eppendorf AG
Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg, Deutschland
- Bio-Rad Laboratories Inc.
1000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94547, USA
- Cepheid
904 Caribbean Drive, Sunnyvale, CA 94089, USA
- Applied Biosystems Inc
850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94404 , USA
- Roche Diagnostics GmbH Roche Applied Science
Sandhofer Straße 116, 68305 Mannheim, Deutschland
- QIAGEN GmbH Germany
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden

9.2 Tabellen

Tabelle 27: PCR-Protokolle zum Nachweis von thermophilen *Campylobacter*

ZIELGEN	REFERENZ	METHODE	MATERIAL	SENSITIVITÄT	SPEZIFITÄT
flaA, flaB	Oyofa et al. (1992)	Gel-PCR	Stuhl, Abstriche, Kultur	30-60 cfu/PCR	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i>
	Waegel und Nachamkin (1996)	Gel-PCR	Stuhl	10 pg reine DNA 104 Genome/PCR	<i>C. jejuni</i>
hipO, asp	Linton et al. (1997)	Gel-PCR und RFLP	Stuhl	k. Angabe	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i>
	Lawson et al. (1998)	PCR, PCR-ELISA (Stufendiagnostik)	Stuhl	k. Angabe	<i>C. jejuni</i> , <i>coli</i> , <i>upsalensis</i> , <i>lari</i> , <i>hyointestinalis</i> , <i>fetus</i> , <i>helveticus</i>
	Persson und Olsen (2005)	Gel-Multiplex PCR	Stuhl	10 ⁵ cfu/ml Stuhl	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i>
ceuE	Gonzalez et al. (1997)	Gel-PCR, Hybridisierung	Kultur	k. Angabe	Unterscheidung <i>C. jejuni</i> und <i>C.</i> <i>coli</i>
	Houng et al. (2001)	Gel-Multiplex PCR	Stuhl	10 ³ cfu/PCR	Unterscheidung <i>C. jejuni</i> und <i>C.</i> <i>coli</i>
16 S rRNA, hipO	Bang et al. (2002)	Gel-PCR, nested PCR	Bodenproben, Abstriche nach Anreicherung	2-3 cfu/ml 0,01 pg reine DNA	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i>
	Abu- Halaweh et al. (2005)	Real-Time PCR (FRET, LightCycler)	Kultur, Anreicherung aus Hühnerproben	k. Angabe	<i>C. coli</i> , <i>C. jejuni</i>
16/23 S rRNA,	Lübeck et al. (2003)	Gel-PCR	Kultur	3,1 X 10 ¹⁴ /g (reine DNA)	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> , <i>C. lari</i>
16 S rRNA mapA	Inglis und Kalischuk (2004)	Real-Time PCR, nested PCR (SYBRGreen)	Stuhl	3 x 10 ³ cfu/g Stuhl	<i>C. jejuni</i> , <i>C. laeniae</i>

23S rRNA	Engvall et al. (2002)	Gel-PCR, RFLP	Kultur	1-5 cfu/PCR	C. jejuni, C. coli, C. lari, C. upsalensis
Cdt	Eyigor et al. (1999)	Gel-PCR	Kultur	k. Angabe	C. jejuni, C. coli
glyA	Al Rashid et al. (2000)	PCR, Hybridisierung	Kultur	200 Genome/PCR 0,4 pg reine DNA	C. jejuni, C. coli, C. lari, C. upsalensis, Arcobacter butzleri, Arcobacter spp.
hipO, glyA	LaGier et al. (2004)	Real-Time PCR	Stuhl	10 ³ cfu/g Stuhl	C. jejuni, C. coli
Fur, glyA, cdtABC, ceuB-E, fliY	Volokhov et al. (2003)	Gel-PCR, DNA-Microarray	Kultur	k. Angabe	Identifizierung C. jejuni, C. coli, C. lari, C. upsalensis
lpxA	Klena et al. (2004)	Multiplex-PCR	Kultur	k. Angabe	Identifizierung C. jejuni, C. coli, C. lari, C. upsalensis
Nap A mpx1	Miller et al. (2007)	Multiplex-PCR	Kultur	k. Angabe	Differenzierung C. jejuni Subspezies
Gyr A	Fukushima et al. (2003)	Real-Time, Duplex LC-PCR	Stuhl	10 ⁵ cfu/g Stuhl	Campylobacter jejuni
hipO	Gómez-Duarte et al. (2009)	Multiplex-PCR	Stuhl	1 pg reine DNA, 1-10 Genome/PCR	Campylobacter jejuni
mapA, cdt, ceuE	You et al. (2008)	Gel-PCR, DNA-Microarray	Stuhl	58 Genome/μl	C. jejuni
yphC gyrA	Iijima et al. (2004)	Real-Time PCR	Stuhl	10 ⁴ cfu/ g Stuhl, 40 Genome/PCR	C. jejuni
16S rRNA, mapA, ceuE	Amar et al. (2007)	Real-Time PCR	Stuhl	k. Angabe	C. jejuni, C. coli

Tabelle 28: Bekannte PCR Inhibitoren aus Probenmaterialien

Inhibitor	Quelle	Referenz
Gallensäuren	Stuhl	Lantz et al. (1997)
Komplexe Polysaccharide	Stuhl, pflanzliches Material	Rådström et al. (2004)
Kollagen	Gewebe	Kim und Blackshaw (2001)
Häm	Blut	Akane et al. (1994)
Melanin und Eumelanin	Haare, Haut	Eckhart et al. (2000)
Myoglobin	Muskelgewebe	Bélec et al. (1998)
Proteinasen	Milch	Bickley et al. (1996)
Kalziumionen	Milch, Knochen	Powell et al. (1994)
Harnstoff	Urin	Khan et al. (1991)
Hämoglobin, Lactoferrin	Blut	Al-Soud und Rådström (2000)
Immunglobulin G	Blut	Al-Soud und Rådström (2000)

Tabelle 29: Eigenschaften häufig genutzter Polymerasen (Terpe 2007)

	Taq	Pfu	Tth	Pwo
Herkunft	Thermus aquaticus	Pyrococcus furiosus	Thermus thermophilus	Pyrococcus wosei
Halbwertszeit	40 min / 95°C	95 % Aktivität nach 1 h	20 min / 95°C	>120 min / 100°C
Optimale Extensionstemperatur	75–80°C	72–80°C	70–74°C	72°C
Extensionsrate [kbp/min]	2–4,5	0,5–1,5	2,0	k.A
3' → 5' Exonucleaseaktivität (Proof reading)	Nein	Ja	Nein	Ja

	Taq	Pfu	Tth	Pwo
5' → 3' Exonucleaseaktivität	Ja	Ja	Ja	Nein
Reverse-Transkriptase Aktivität	Schwach	k.A	Ja	k.A
Produktenden	3' A	Glatt	3' A	Glatt
Blutmenge (v/v) im Probenmaterial, die inhibierend wirkt (Al-Soud und Rådström 1998)	0,004 %	k.A	Bis 20 %	Bis 20 %
Stuhlmenge (v/v) im Probenmaterial die inhibierend wirkt (Al-Soud und Rådström 1998)	0,2 %	k.A	2 %	2 %

Tabelle 30: Übersicht über Methoden zur DNA Reinigung

Methode	Prinzip	Vorteile	Nachteile
Phenol-Chloroform-Extraktion	Phenol-Chloroform denaturiert Proteine, DNA sammelt sich in der wässrigen Phase	Billig, einfach	Verwendung giftiger Substanzen
Fällung mit Polyethylenglycol (PEG)	DNA wird durch PEG ausgefällt	Robust, billig, einfach, schonend	Dauert sehr lange, geringe Ausbeute
Proteinbindende Filtermembran	Proteine werden an Membranen mit hoher Affinität zu Proteinen gebunden	Einfach, schnell	Entfernt nur Enzyme
Dichtegradientenzentrifugation	DNA sammelt sich gemäß ihrer Dichte in der entsprechenden Phase des Gemisches	Hoher Reinheitsgrad der Nukleinsäuren, große Mengen können verarbeitet werden	Ultrazentrifuge erforderlich, bei Verwendung von Cäsiumchlorid fällt Sondermüll an
Anionenaustauschersäulen	Negativ geladene DNA bindet an positiv geladene Gruppen der Matrix (Dextrose, Cellulose)	geringerer Materialaufwand, keine Verwendung gefährlicher Substanzen	Beschränkte Bindungskapazität der Säulen, fehleranfällig
Glasmilch, Silikabasierte Systeme	DNA bindet in Gegenwart chaotroper Salze an Silikate	Einfach, schnell, hoher Reinheitsgrad	Teuer, für kleinere Mengen
Dialyse	Filtrierung über eine semipermeable Membran entlang eines Druck- und Konzentrationsgefälles	Entfernt Phenol und Salze, sehr schonend	Dauert lange, für kleine Mengen ungeeignet

Tabelle 31: Häufig für Real-Time PCR genutzte Farbstoffe

Farbstoffbezeichnung	Exzitationsmaximum (nm)	Emissionsmaximum (nm)
Fluorescein	490	513
FAM (6-carboxy fluorescein)	494	518
SYBR [®] Green I	494	521
TET (6-carboxy-4,7,2',7'- tetrachlorofluorescein)	521	538
JOE	520	548
VIC [®]	538	552
Yakima Yellow [™]	526	552
HEX	535	553
TAMRA(6-carboxy-tetra-methyl- rhodamin)	560	582
ROX (6-carboxy-X-rhodamin)	587	607
Texas Red [®]	596	615
LightCycler [®] Red 640	625	640
Cy5	643	667

Tabelle 32: Übersicht über die Eigenschaften einiger gebräuchlicher Thermocycler für Real-Time Multiplex PCR

Hersteller/ Vertrieb	Eppendorf AG	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Cepheid	Applied Biosystems Inc	Roche Diagnostics GmbH Roche Applied Science		QIAGEN GmbH Germany
Produktname (Beispiel aus Produkt familie)	Mastercycler®	CFX96	SmartCycler	7900 HT Fast Real-Time PCR System	LightCycler 480	LightCycler	RotorGene 6000
Heizsystem	Peltier	Peltier	Keramische Heizplatte und Lüfter	Peltier	Peltier	Heissluft-Rotations system	Heissluft-Rotationssystem
Anregungs spektrum	LED 470 nm	LED 450–684 nm	LED 450–495 nm, LED 500–550 nm LED 565–590 nm LED 630–650 nm	488 nm Argon-ion Laser	LightCycler® 480 Xenon Lampe (430–630 nm)	LED 470 nm	LED 365 nm LED 470 nm LED 530 nm LED 585 nm LED 625 nm LED 680 nm LED 460 nm (HRM)
Detektions spektrum	520 nm 550 nm 580 nm 605 nm	6 Kanäle 550–730 nm	510–527 nm 565–590 nm 606–650 nm 670–750 nm	500–660 nm	488 nm 510 nm 580 nm 610 nm 640 nm 660 nm	530 nm, 555 nm 610 nm, 640 nm 670 nm 705 nm	460 nm 510 nm 555 nm 610 nm 660 nm 712 nm,
Probenanzahl	96	96	16-96	96–384	96-384	32	72
Reaktions volumen	200 µl	1–50 µl	25 µl	5–100 µl	5–100 µl	20–100 µl	5–100 µl
Anmerkung	Micro titerplatten (MTP), Eppi	MTP, Eppi	Spezielle Röhren erforderlich	Nur MTP	MTP,	Spezielle Glas kapillaren	Keine MTP

9.3 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Schematische Darstellung der PCR (Grafik: W. Wiemer)	21
Abbildung 2: Typische Schmelzkurven von SYBRGreen® – hier Nachweis von 4 verschiedenen Plasmodien-Arten	26
Abbildung 3: Funktionsprinzip der FRET-Sonden.....	27
Abbildung 4: Funktionsprinzip der TaqMan-Sonden	27
Abbildung 5: Fluoreszenzkurven für die einzelnen Proben bei unterschiedlichen Primer und Magnesiumkonzentrationen im PCR-Ansatz.....	49
Abbildung 6: Fluoreszenzen für Salmonellen, Shigellen, Yersinien und Campylobacter bei 3 mM und 5 mM Magnesium und Touch-down Protokoll 56°C–50°C.....	50
Abbildung 7: Fluoreszenzen für Salmonellen, Shigellen, Yersinien und Campylobacter bei 3 mM und 5 mM Magnesium und Touch-down Protokoll 58°C–52°C.....	50
Abbildung 8: Fluoreszenzen für Salmonellen, Shigellen, Yersinien und Campylobacter bei 3 mM und 5 mM Magnesium und Touch-down Protokoll 60°C–54°C.....	51
Abbildung 9: Kurven für Salmonellenprimer bei einer Primerkonzentration von 0,75 µl, einem Magnesiumgehalt von 3 mM im Primermix, Cycling-Protokoll mit Touch-down 56°C–50° mit unspezifischen Bindungen in der Yersinien- und Shigellentemplates.....	51
Abbildung 10: Kurven für Shigellenprimer bei einer Primerkonzentration von 0,75 µl, einem Magnesiumgehalt von 3 mM im Primermix, Cycling-Protokoll mit Touch-down 56°C–50°C, mit unspezifischen Bindungen aller anderen Templates	52
Abbildung 11: Beispiel der Befundausgabe auf Rotor Gene 6000, hier Option „allelic discrimination“, die alle positiven Ergebnisse in einer Grafik darstellt	54
Abbildung 12: C _t Wert im Verhältnis zum DNA Gehalt der Probe. DNA-Template aus Salmonellenkultur in Verdünnungen bis 1: 10 ⁸ Standardprotokoll (Touch-down 56°C–50°C, 3mM Magnesium).....	55
Abbildung 13: Effizienzberechnung der jeweiligen Primer/Sonden Sets für die PCR aus mit DNA-Verdünnungen beimpften Stühlen.....	56
Abbildung 14: InterAssay Varianzdargestellt an 10 Kurven der Positivkontrollen aus	

verschiedenen Versuchen an verschiedenen Tagen mit Standardprotokoll (Touch-down 56°C–50°C, 3mM Magnesium) ...	57
Abbildung 15: Übersicht der C _t -Werte und Endfluoreszenzen für die einzelnen Verdünnungsstufen für alle Keime aus beimpften Stühlen mit Standardprotokoll (Touch-down 56°C–50°C, 3mM Magnesium) ...	59
Abbildung 16: Prozentuale Verteilung der Einsatzländer im Kollektiv der Soldaten	65
Abbildung 17: Prozentuale Verteilung der Reiseländer im Kollektiv der Reiserückkehrer.....	66
Abbildung 18: Prozentuale Verteilung der Reiseländer von Rückkehrern mit Diarrhö und Nachweis von Shigellen/EIEC im Stuhl.....	70

9.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: DNA Extraktion – Einzelne Schritte.....	23
Tabelle 2: Arbeitsschritte und Ziel	35
Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Gensequenzen	37
Tabelle 4: Primer und Sondensequenzen	38
Tabelle 5: Liste der Bakterienstämme, die als Positivprobe dienen	40
Tabelle 6: Standardansatz für PCR	41
Tabelle 7: Cycling-Protokoll für RotorGene 6000	42
Tabelle 8: Aufbau der Verdünnungsreihe zur Prüfung der Nachweisgrenze ..	44
Tabelle 9: C _t Werte, Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (SD) der Positivproben bei verschiedenen Primer/Sondenkonzentrationen und unterschiedlichem Magnesiumgehalt des Mastermix	48
Tabelle 10: Zusammensetzung des Primer-Mix	53
Tabelle 11: PCR-Ansatz pro Reaktionsgefäß.....	53
Tabelle 12: Cycling-Protokoll für RotorGene 6000	53
Tabelle 13: Variabilität der C _t -Werte der Positivproben bei wiederholten Bestimmungen innerhalb eines Laufes (intraAssay Varianz)	57
Tabelle 14: Erreichte Verdünnungsstufen für die einzelnen Keime im Vergleich von DNA Isolationen aus Kultur und beimpften Stühlen	58
Tabelle 15: Errechnete Nachweisgrenzen für die einzelnen Keime pro PCR Ansatz	60
Tabelle 16: Bakterienstämme zur Spezifitätsprüfung – Negativproben	61
Tabelle 17: Bakterienstämme zur Spezifitätsprüfung – Positivproben.....	62

Tabelle 18:	Ergebnisse für PCR aus Stuhl und Kultur für <i>Campylobacter</i> Isolate im Vergleich mit Kultur, Biochemie und MALDI-TOF	63
Tabelle 19:	Vergleich der Ergebnisse der Untersuchung positiver Stuhlproben mit konventioneller mikrobiologischer Diagnostik und Real-Time Multiplex PCR.....	67
Tabelle 20:	Vergleich der Ergebnisse der Untersuchung positiver Stuhlproben für <i>Campylobacter spp.</i> mit konventioneller mikrobiologischer Diagnostik und Real-Time Multiplex PCR.....	68
Tabelle 21:	PCR-Ergebnisse von 192 mikrobiologisch negativen Stuhlproben	69
Tabelle 22:	Vergleich der Ergebnisse der Untersuchung von Stühlen von Reiserückkehrern mit konventioneller Diagnostik und Real-Time Multiplex PCR.....	69
Tabelle 23:	Ergebnisse der Untersuchung mikrobiologisch negativer Stuhlproben im Kollektiv der Reiserückkehrer mit konventioneller Diagnostik und Real-Time Multiplex PCR.....	70
Tabelle 24:	Prozentualer Anteil der einzelnen Erregerspezies am Gesamtergebnis im Vergleich zum prozentualen Anteil der in Deutschland 2009 gemeldeten mikrobiologisch nachgewiesenen Enteritiserreger	71
Tabelle 25:	PCR-Ergebnisse für mikrobiologisch positive Proben.....	72
Tabelle 26:	PCR-Ergebnisse für mikrobiologisch negative Proben	72
Tabelle 27:	PCR-Protokolle zum Nachweis von thermophilen <i>Campylobacter</i>	107
Tabelle 28:	Bekannte PCR Inhibitoren aus Probenmaterialien.....	109
Tabelle 29:	Eigenschaften häufig genutzter Polymerasen.....	110
Tabelle 30:	Übersicht über Methoden zur DNA Reinigung	111
Tabelle 31:	Häufig für Real-Time PCR genutzte Farbstoffe.....	112
Tabelle 32:	Übersicht über die Eigenschaften einiger gebräuchlicher Thermocycler für Real-Time Multiplex PCR.....	113

10 Danksagung

Mein Dank geht als erstes und vor allem an Frau Simone Priesnitz, ohne deren unermüdliche Arbeit bei der Etablierung und Durchführung der PCR all dies nicht möglich gewesen wäre.

Bei Herrn Prof. Dr. med Tannich und Herrn Prof. Dr. med Fleischer möchte ich mich für die zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten und Geräte bedanken, sowie bei Herrn Prof. Dr. med. Tannich für die Übernahme der Aufgaben des Doktorvaters.

Des Weiteren danke ich Herrn OFA Dr. med Hagen und Herrn OSA PD Dr. med Graefe für die Betreuung, Beratung, Unterstützung und Diskussionsbereitschaft sowie die „Gehhilfen“ beim wissenschaftlichen Arbeiten.

Ein großer Dank geht an Frau Heidrun von Thien für die „Initialzündung“, die kontinuierliche Beratung und Hilfe in allen technischen und praktischen Belangen der PCR-Technik.

Nicht ganz unschuldig am Gelingen sind Frau Picker und Frau Köhler aus dem mikrobiologischen Labor des BNI mit ihrer großen Berufserfahrung und den flinken, sicheren Händen. Auch ihnen meinen herzlichen Dank.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. med Aepfelbacher, der es ermöglichte, dass mich Frau Dr. med Speicher in die Geheimnisse des Stuhllabors einführte und Frau Dr. med Loderstädt, sowie dem gesamten Team des Institutes für Mikrobiologie und Hygiene des UKE für ihre Unterstützung, die Bereitstellung der klinischen Proben und die Durchführung der MALDI-TOF.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr.med von Wulffen (Medilys Labor, Hamburg) sowie dem Mikrobiologischen Institut der Bundeswehr in Berlin, Herrn Helm und der Ambulanz des BNI dafür, dass sie mir Proben zur Verfügung stellten.

Last but not least geht mein Dank an meinen Sohn Wolfgang für die Erstellung der Abbildungen, an meinen Vater für seine anhaltende Unterstützung und Fürsorge und an Thomas, der mich in der ganzen Zeit ertragen und getragen hat.

Alle diejenigen, die ich versehentlich vergessen habe namentlich zu erwähnen, bitte ich dieses zu entschuldigen.

11 Lebenslauf

12 Eidesstattliche Versicherung

In Kenntnis der Strafbarkeit einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung versichere ich an Eides statt,, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: