Universitätsklinikum Ulm
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. S. Stenger

Direktnachweis von *Salmonella enterica* mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) aus dem Stuhl

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Andrea Hänle
aus Ulm
2008

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Steffen Stenger
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Kratzer

Tag der Promotion: 24.04.2009

Gewidmet meinen Eltern,

Maria Hänle, geb. Rösler (1954)

und Wolfgang Hänle (1954)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis VI

1. Einleitung 1

1.1. Geschichtlicher Hintergrund von *Salmonella* 1

1.2. Charakterisierung des Bakteriums 1

1.3. *Salmonella* als Krankheitserreger 3

1.4. Therapie einer Infektion 8

1.5. Diagnostik von *Salmonella*-Infektionen 9

1.6. Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) 11

1.7. Zielsetzung der Promotionsarbeit 14

2. Material und Methoden 15

2.1. Material 15

2.2. Methoden 22

3. Ergebnisse 34

3.1. Optimierung der Fixierungsverfahren 34

3.2. Design und Auswahl der Sonden 36

3.3. Bestimmung der Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer 36

3.4. Evaluierung der Sonden 38

3.5. Evaluierung der Methode FISH zum Nachweis von *Salmonella* spp. aus Patientenstuhl 48

3.6. Direktnachweis von *Salmonella enterica* aus positiven Blutproben 55

4. Diskussion 56

4.1. Auswahl und Evaluierung der Sonden 56

4.2. Entwicklung spezifischer Salmonellensonden 59

4.3. Nachweis von *Salmonella* spp. aus positiven Stuhlproben 60

4.4. FISH in positiven Blutkulturen 64

4.5. Bedeutung der FISH für die mikrobiologische Diagnostik 65

5. Zusammenfassung 66

6. Literaturverzeichnis 68

7. Danksagung 76

Abkürzungsverzeichnis

1. Allgemein

16S	16 Svedberg
23S	23 Svedberg
Abb.	Abbildung
ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, USA
bp	Basenpaare
CFU	Colony forming units
Cy3	5,5`-Disulfo-1,1`-di (X-Carbopentynyl)-3,3,3`,3`-tetramethyindolo-carbocyanin-N-hydroxy-succimidester
DAPI	4`,6-Diamino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
Epi	Eppendorf-Reaktionsgefäß
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
FACS	fluorescence activated cell sorting
FI	Fluoreszenzintensität
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FluoX	5-(-6-)Carboxy-Fluorescein-N-Hydroxysuccemid-Ester
HCl	Salzsäure
H_2S	Schwefelwasserstoff
ISH	In Situ Hybridisierung
kb	Kilobasenpaare
KBE	Kolonie bildende Einheit
M	molare Masse
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid (Natronlauge)
OD	Optical density
ODC	Ornithindecarboxylase
OT	Objektträger
PBS	Phosphat buffered saline

PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
PYD	Physiologische Darmflora
RKI	Robert Koch Institut
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
spp.	Spezies
Tab.	Tabelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothyocyanid
U	Units
UE	Untereinheit
U/min	Umdrehungen pro Minute
V.a.	Verdacht auf
VP	Voges-Proskauer
XLD-Agar	Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar

2. Mikroorganismen

Campy.	*Campylobacter*
E. coli	*Escherichia coli*
PSA	*Pseudomonas aeruginosa*
S.	*Salmonella*
San	*Salmonella enterica* Serotyp Enteritidis
Shigella flex.	*Shigella flexneri*
tm	*Salmonella enterica* Serotyp Typhimurium
Yers. Ent.	*Yersinia enterocolitica*

1. Einleitung

1.1. Geschichtlicher Hintergrund von *Salmonella*

Bereits im Jahre 1839 nahm Johannes Lucas Schönlein die Unterscheidung zwischen Typhus abdominalis (engl. typhoid fever) und Typhus exanthemicus (engl. typhus, Fleckfieber, Erreger sind Rickettsien) vor [29]. Die Erreger des Typhus abdominalis wurden aber erst 1880 von Robert Koch und Karl Joseph Eberth entdeckt und 1884 von Theodor August Gaffky in Reinkultur gezüchtet [24]. Ihren Namen verdanken sie dem nordamerikanischen Bakteriologen Daniel E. Salmon (1850-1914) [52], in dessen Labor Theobald Smith 1886 die Enteritis-Salmonellen entdeckte.

1.2. Charakterisierung des Bakteriums

1.2.1. Morphologie und biochemische Eigenschaften

Salmonella spp. stellen sich in der Gramfärbung als gerade, sporenlose, plumpe, gram-negative Stäbchenbakterien von 0,7 - 1,5 x 2.0 - 5.0 µm Größe [35] da. Sie sind in den meisten Fällen peritrich begeißelt und beweglich [24].
Salmonella spp. sind anspruchslos und vermehren sich sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen. Bei Temperaturen von +7 bis +40°C zeigt sich bei ausreichendem Nährstoffangebot (ca. 60 mg Protein/l) [7] ein gutes Wachstumsverhalten. Sie stellen sich als runde, glänzende Kolonien mit einem Durchmesser von 2 - 4 mm [33] dar.
Salmonellen sind von anderen Enterobakterien morphologisch nicht zu unterscheiden.

1.2.2. Taxonomie und Klassifikation

Die Nomenklatur der Salmonellen hat sich im Laufe der Jahre geändert. Bis 1980 wurden von vielen Mikrobiologen unzählige Speziesnamen vorgeschlagen [8]. Dieses Problem hat sich aber durch die DNA-Homologie-Studien gelöst [53].
Heute werden Bakterien der Gattung *Salmonella* in zwei Spezies (*Salmonella enterica* und *Salmonella bongeri*) und mehrere Subspezies untergliedert [34], die aufgrund biochemischer Unterscheidungsmerkmale in die Subspezies I - VI unterteilt werden.
Die Subspezies I (*S. enterica* Subspezies *Enterica*) umfasst diejenigen *Salmonella* Serovare, die überwiegend bei warmblütigen Wirbeltieren - inklusive dem Menschen -

gefunden werden. Die Subspezies II - VI von *S. enterica* und Stämme von *S. bongori* sind für Warmblüter weniger pathogen [64].

Eine weitere Unterscheidung in Serovare ergibt sich aufgrund unterschiedlicher Antigenmuster. Durch diese Antigenbestimmung lassen sich die enteritischen Salmonellen serologisch in mehr als 2.400 Serovare unterteilen und nach dem Kauffmann-White-Schema auflisten. Dieses Schema ist die Grundlage der kulturellen Salmonellen-Diagnostik [41].

Dabei werden Oberflächen-, Geißel- und Kapselantigene unterschieden [54]:

- Oberflächenantigene (O-Antigene): Es sind mehr als 60 unterschiedliche O-Antigene bei den Salmonellen bekannt.
- Geißelantigene (H-Antigene): Es können zwei Phasen unterschieden werden, die als H1 und H2 bezeichnet werde. Diese beiden Phasen können gemeinsam oder einzeln vorkommen. Die H1-Antigene werden mit Kleinbuchstaben gekennzeichnet und z wird zusätzlich nummeriert. Die H2-Antigene werden durch Kleinbuchstaben und Zahlen gekennzeichnet [24].
- Kapselantigene (Vi-Antigene): Sie kommen nicht sehr häufig vor, kennzeichnen aber besonders die humanpathogenen Arten *Salmonella* Typhi und *Salmonella* Paratyphi C [24].

Tab. 1: Beispielhafte Darstellung einiger wichtiger Salmonellenvarietäten nach dem Kauffmann-White-Schema [24]

Serovar	***Gruppe***	***O-Antigen***	***H-Antigen***	
			Phase 1	***Phase 2***
***S.* Enteritidis**	D1	1, 9, 12	g, m	(1, 7)
***S.* Paratyphi C**	C1	6, 7 (Vi)	c	1, 5
***S.* Infantis**	C1	6, 7	r	1, 5
***S.* Panama**	D1	1, 9, 12	l, v	1, 5
***S.* Paratyphi A**	A	1, 2, 12	a	1, 5
***S.* Paratyphi B**	B	1, 4, (5), 12	b	1, 2
***S.* Typhi**	D1	9, 12, Vi	d	-
***S.* Typhimurium**	B	1, 4, (5), 12	i	1, 2
***S.* Arizonae**	56-65	56-65	l, v, …	e, n, x, …

S.: *Salmonella*, O-Antigen: Oberflächenantigen, H-Antigen: Geißelantigen

Nach dem heutigen Stand wäre die korrekte Bezeichnung für die jeweilige *Salmonella* sp. z. B. *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. Diese komplizierte Bezeichnung wird aber der Einfachheit halber abgekürzt in z. B. *Salmonella* Enteritidis.

1.3. *Salmonella* als Krankheitserreger

Von klinischer Bedeutung ist vor allem die Unterscheidung zwischen den typhösen (Erreger: *S.* Typhi, *S.* Paratyphi A, B und C) und enteritischen Salmonellosen, sowohl für die Prognose als auch für die Therapie.

1.3.1. Epidemiologie

a) Enteritische Salmonellosen

Von den bisher bekannten *Salmonella* Serovaren haben nur 20 bis 30 als Erreger von lebensmittelbedingten Erkrankungen eine epidemiologische Bedeutung.

Am häufigsten ist hierbei die Isolation von *S.* Enteritidis und *S.* Typhimurium [23]. Die Infektion erfolgt oral durch Nahrungsmittel, seltener durch Trinkwasser. Die Infektionsdosis ist hoch ($>10^5$ Bakterien) [33], weil ein Teil der Erreger durch die Magensäure abgetötet wird. Bei Kleinkindern und älteren Menschen, bei welchen diese unspezifische Abwehr fehlen kann, ist die Infektionsdosis entsprechend niedriger [59]. Enteritis-Salmonellen kommen weltweit vor. In Deutschland wurden im Jahre 2006 52.600 Fälle von Salmonellen-Enteritis gemeldet, 2007 waren es 55.155 [48]. Allerdings wird die Dunkelziffer auf das 10-fache geschätzt.

Salmonellosen des Menschen sind zumeist lebensmittelbedingte Erkrankungen und treten weltweit als sporadische Fälle (ca. 90 %) [58], Familienerkrankungen oder als Epidemien auf.

Die Ausbreitung von Enteritis-Salmonellosen wird durch Massentierhaltung und fehlerhafte Küchenhygiene begünstigt.

b) Typhöse Salmonellosen

Typhus ist weltweit eine häufig auftretende und oft letal verlaufende Erkrankung. Jährlich erkranken ca. 22 Millionen Menschen weltweit an Typhus abdominalis und die Sterblichkeitsrate wird auf 200.000 [49] geschätzt. Als primäre Infektionsquelle fungieren Erkrankte und besonders Dauerausscheider, die Trinkwasser und Lebensmittel (sekundäre Infektionsquelle) kontaminieren [22]. Besonders die Entwicklungsländer sind hiervon aufgrund von schlechten hygienischen Verhältnissen betroffen. In den industrialisierten Ländern tritt Typhus überwiegend durch „importierte Infektionen“ durch Touristen oder Gastarbeiterfamilien aus Endemiegebieten auf [49]. Von den Paratyphuserregern ist nur Paratyphi B in Deutschland endemisch. *S.* Paratyphi A und C kommen nur in tropischen

und subtropischen Regionen vor [24]. 2007 wurden 59 Fälle von Typhus abdominalis und 68 Fälle von Paratyphus in Deutschland gemeldet [48].

	Darmkrankheiten														
	Campylobacter-Enteritis			EHEC-Erkrankung (außer HUS)			Erkr. durch sonstige darmpathogene E. coli			Salmonellose			Shigellose		
	52.	1.–52.	1.–52.	52.	1.–52.	1.–52.	52.	1.–52.	1.–52.	52.	1.–52.	1.–52.	52.	1.–52.	1.–52.
Land	2007		2006	2007		2006	2007		2006	2007		2006	2007		2006
Baden-Württemberg	62	7.379	5.705	1	85	143	7	300	364	30	6.130	6.164	0	120	139
Bayern	52	7.700	5.667	1	185	217	16	1.067	1.086	37	7.350	8.047	0	190	173
Berlin	16	2.561	2.256	0	16	19	1	215	102	4	1.548	1.836	0	83	60
Brandenburg	9	2.292	1.927	0	20	26	2	273	319	10	1.930	1.862	0	21	21
Bremen	1	365	319	0	6	4	1	29	33	2	302	255	0	8	20
Hamburg	10	2.056	1.612	0	19	32	0	91	37	2	872	1.028	0	32	30
Hessen	23	3.732	2.842	0	19	19	1	150	147	14	4.494	3.674	0	76	49
Mecklenburg-Vorpommern	9	2.262	1.715	0	12	8	5	252	350	6	1.449	1.460	0	0	6
Niedersachsen	22	5.136	3.972	0	91	169	2	270	307	33	5.213	4.500	2	41	38
Nordrhein-Westfalen	89	16.165	13.492	0	207	275	6	1.021	1.277	61	10.718	10.621	0	76	60
Rheinland-Pfalz	18	3.602	2.569	1	54	59	2	334	276	23	3.611	3.269	0	43	47
Saarland	14	1.343	927	0	4	14	1	51	50	12	1.126	859	0	6	2
Sachsen	50	5.436	4.359	1	68	81	11	1.035	1.018	19	3.289	3.604	0	81	85
Sachsen-Anhalt	12	1.761	1.400	0	9	29	7	637	594	17	2.802	1.946	0	30	26
Schleswig-Holstein	9	2.099	1.797	0	41	60	0	84	76	3	1.470	1.318	0	14	16
Thüringen	14	1.896	1.485	0	12	24	11	592	436	25	2.851	2.157	0	46	45
Deutschland	410	65.785	52.044	4	848	1.179	73	6.401	6.472	298	55.155	52.600	2	867	817

Abb. 1: Aktuelle Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten. 52. Woche 2007 (Datenstand v. 16.01.2008) [48]

1.3.2. Pathogenese

a) Enteritische Salmonellosen

Die enteritischen Salmonellen unterscheiden sich bezüglich ihrer Pathogenese nur wenig von den typhösen Salmonellen. Ein wichtiger Pathogenitätsfaktor ist die Fähigkeit zur Adhärenz an Darmepithelzellen und die darauf folgende Internalisierung durch Darmepithelzellen und M-Zellen der Peyer-Plaques. Die pathogenen Salmonellen können zum Teil in Makrophagen überleben durch Hemmung des lysosomalen Abbaus. Infizierte Zellen sterben ab. Eine lokale Entzündungsreaktion wird induziert, die zur Einwanderung von Entzündungszellen wie Granulozyten führt, die wiederum Elektrolytsekretion und damit Durchfall bewirken [24].

In der Regel bleibt die Infektion lokalisiert. Bei abwehrgeschwächten Personen und Kindern kann es jedoch zu einer Generalisation kommen [59].

b) Typhöse Salmonellosen

Die Infektion erfolgt vorwiegend durch die Aufnahme von Trinkwasser und Nahrungsmitteln, die durch Fäkalien kontaminiert wurden. Eine direkt fäkal-orale Übertragung ist von untergeordneter Bedeutung. Die Infektionsdosis liegt bei weniger als 10^5 Bakterien, hängt aber auch von der Empfindlichkeit des Patienten (Alter, Immmunitätslage, Grunderkrankung) und dem Vehikel der Übertragung (Wasser oder Lebensmittel) ab [49].

Die Erreger werden nach der Magen-Darm-Passage von M-Zellen der Peyer-Plaques und Darmepithelzellen internalisiert (Makropinozytose). Sie gelangen in die regionalen Lymphknoten, wo sie sich vermehren und nach kurzer Zeit hämatogen streuen. Von dort disseminieren sie in das retikuloendotheliale System (Milz, Leber, Knochenmark, u. a.). Dieser Vorgang führt zu einer transienten Bakteriämie und macht sich i. d. R. nicht bemerkbar.

Von besonderer Bedeutung ist die Vermehrung der Keime in den lymphatischen Systemen des Darmes, da diese nach Aktivierung des Immunsystems zu einer Nekrotisierung führt, welche dann Darmblutungen- und -perforationen verursacht [24].

1.3.3. Klinik

a) Enteritische Salmonellosen

Die Inkubationszeit beträgt 6 - 72 Stunden und ist abhängig von der Infektionsdosis [50]. Die Salmonellose beginnt meist plötzlich mit Brechdurchfall und kolikartigen Bauchschmerzen. Der Durchfall ist meist wässrig, selten auch schleimig-blutig. Die Symptome können jedoch auch milder verlaufen, z. B. als reine Diarrhoe. Hohes Fieber bis 40° C tritt häufig auf, muss aber nicht auftreten. In der Regel stellt sich bei unkompliziertem Verlauf innerhalb einer Woche Beschwerdefreiheit ein. In ca. 20 % aller Fälle kommt es zur hämatogenen Streuung der Erreger mit entsprechenden extraintestinalen Symptomen wie z. B. Sepsis, Osteomyelitis, Endokarditis oder Meningitis [24]. Die Erregerausscheidung im Stuhl persistiert in der Regel nach ca. 3-6 Wochen. Dauerausscheidung über einen Zeitraum von 6 Monaten ist extrem selten.

b) Typhöse Salmonellosen

Typhus und Paratyphus gehören zu den zyklischen, systemischen Infektionskrankheiten. Beim Paratyphus ist der klinische Verlauf meist kürzer und milder als beim Typhus. Die Krankheitsdauer beträgt hier 4 - 10 Tage. Die Erkrankung wird in mehrere Stadien unterteilt [24]:

Inkubationszeit

Die Inkubationszeit liegt zwischen 3 - 60 Tagen, im Mittel bei 10 Tagen [49].
Krankheitszeichen bestehen während der Inkubationszeit nicht, auch die primäre Bakteriämie verläuft in der Regel unbemerkt. Es finden sich weder Erreger im Stuhl noch in der Blutbahn.

Stadium incrementi (1. Krankheitswoche)

Bei unbehandelten Fällen kommt es innerhalb der ersten Krankheitswoche zu einem stufenförmigen Anstieg der Körpertemperatur auf 39 - 41 °C. Die Patienten leiden häufig unter Angina oder Bronchitis. Charakteristisch für dieses Stadium sind eine relative Bradykardie, eine Leukopenie, Milzschwellung und Obstipation. Zwar typisch, aber nur selten zu verzeichnen sind hellrote, stecknadelkopfgroße, nicht-juckende Hauteffloreszenzen (Roseolen), zumeist an der Bauchhaut. Es handelt sich hierbei um Absiedelungen der Salmonellen in Hautgefässen. In diesem Stadium sind die Erreger evtl. im Sputum oder Rachenabstrich nachzuweisen.

Stadium acmes (2.-3. Krankheitswoche)

Die hohen Temperaturen um 40° C können bis zu einem Zeitraum von 3 Wochen anhalten (Kontinua). Es kommt hierbei zu erbsbreiartigen Durchfällen. Die Patienten leiden unter starken Kopfschmerzen und werden häufig apathisch und desorientiert (typhos: griechisch Nebel, Rauch). Das Allgemeinbefinden ist stark reduziert. Komplikationen wie Darmblutungen und -perforationen mit Peritonitis, nekrotisierender Cholezystitis, thromboembolische Ereignisse, Osteomyelitis, Endokarditis oder Meningitis können auftreten und eine rasche Intervention notwendig machen. In diesem Stadium sind die Erreger im Stuhl nachweisbar.

Stadium decrementi (4. – 5. Krankheitswoche)

Es kommt zu einer amphibolen Fieberkurve, bei welcher die Fieberminima fallen, während die Maxima unverändert hoch bleiben. Trotz Besserung des Allgemeinbefindens ist dieses Stadium besonders kritisch, da jetzt eine Perforationsblutung infolge der immunbedingten Nekrosebildung im Bereich der Peyer-Plaques droht.

Relaps

Bei nicht antibakteriell behandelten Patienten schließt sich u. U. eine verlängerte Phase der Rekonvaleszenz an. Bei weiterhin nachweisbaren subfebrilen Temperaturen ist mit dem Auftreten eines Rezidivs zu rechnen. Auch Mehrfachrezidive sind möglich.

Unbehandelt liegt die Letalität des Typhus bei 15 % [24]. Nach Überstehen der Erkrankung bleiben 2 – 5 % der Infizierten Dauerausscheider und können damit eine Infektionsquelle sein. Die registrierten Dauerausscheider sind meist älter als 50 Jahre und bevorzugt weiblich.

Eine überstandene Typhus- bzw. Paratyphuserkrankung hinterlässt eine partielle Immunität von mindestens einem Jahr, die jedoch mit einer hohen Infektionsdosis jederzeit durchbrochen werden kann [49]. Außerdem besteht keine Kreuzimmunität zwischen S. Typhi und den drei Paratyphuserregern.

1.3.4. Prävention und Prophylaxe

a) Enteritische Salmonellosen

Die Bekämpfung und Verhütung der Salmonellosen wird in erster Linie durch Tiere erschwert, die Krankheitserreger ausscheiden, ohne erkennbar erkrankt zu sein. Die Übertragung von enteritischen Salmonellosen ist daher nicht vollständig zu vermeiden.

Die Erkrankung kann aber durch strikte Einhaltung der Hygienevorschriften bei Gewinnung, Be- und Verarbeitung, Lagerung, Transport und Verkauf von Lebensmitteln, insbesondere tierischen Ursprungs eingedämmt werden [15].

Eine besondere Bedeutung hat die Küchenhygiene, insbesondere auch in privaten Haushalten, wo die allbekannten Regeln der Hygiene nicht selten gedankenlos vernachlässigt werden [50].

b) Typhöse Salmonellosen

Die Übertragung von *Salmonella* Typhi und Paratyphi kann durch eine konsequente Kontrolle der Nahrungsmittelhygiene und der Wasserversorgung weitgehend unterbunden werden. Zusätzlich sind die Isolierung der Patienten und die Aufdeckung von Dauerausscheidern von Bedeutung. Bei Reisen in ein Typhusendemiegebiet besteht die Möglichkeit einer prophylaktischen Immunisierung [49]. Dafür stehen in Deutschland ein oraler Lebendimpfstoff (Typhoral L®) und ein parenteral zu applizierender Totimpfstoff (Typhim Vi®) zu Verfügung. Beide Impfstoffe vermitteln jedoch nur eine partielle Immunität. Bei dem Lebendimpfstoff beträgt diese ein Jahr, bei dem Totimpfstoff bis zu drei Jahren [24].

1.3.5. Meldepflicht

a) Enteritische Salmonellosen

Gemäß § 6 Abs. 1 Nr. 2 IfSG ist der Verdacht auf oder die Erkrankung an akuter infektiöser Gastroenteritis meldepflichtig, wenn eine Person betroffen ist, die im Lebensmittelbereich tätig ist oder zwei und mehr gleichartige Erkrankungen auftreten, bei denen ein epidemischer Zusammenhang wahrscheinlich ist oder vermutet wird [65].

Nach § 7 IfSG ist jeglicher Nachweis von Salmonellen unverzüglich, spätestens jedoch innerhalb von 24 Stunden, durch das untersuchende Labor dem für den Einsender zuständigen Gesundheitsamt zu melden.

b) Typhöse Salmonellosen

Nach § 7 IfSG besteht eine Meldepflicht für alle direkten Nachweise von *Salmonella* Typhi und *Salmonella* Paratyphi. Gemäß § 6 IfSG sind Krankheitsverdacht, Erkrankung und Tod an Typhus abdominalis und Paratyphus meldepflichtig [65]. Darüber hinaus stellt das Gesundheitsamt gemäß § 25 Abs. 1 IfSG ggf. eigene Ermittlungen an.

1.4. Therapie einer Infektion

a) Enteritische Salmonellosen

Meist reicht eine symptomatische Therapie zur Behebung der Elektrolyt- und Wasserverluste. Fluorochinolone können bei frühzeitigem Therapiebeginn, also noch vor der bakteriologischen Abklärung, die Erkrankungsintensität und Dauer positiv beeinflussen. Besonders Ciprofloxacin ist hierbei zu erwähnen, da es sowohl über die Galle als auch aktiv über die Darmschleimhaut sezerniert wird und von allen Fluorochinolonen die höchsten Konzentrationen im Darm erreicht [24].

Bei spätem Beginn der Antibiotika-Therapie führt diese meist nur zu einer Verlängerung der Ausscheidungsdauer [50].

b) Typhöse Salmonellosen

Die typhösen Salmonellosen werden im Gegensatz zu den enteritischen Salmonellosen immer antibiotisch behandelt. Mittel der Wahl sind hierbei Fluorochinolone, Cephalosporine oder Cotrimoxazol. Bei vitaler Bedrohung kann auch Chloramphenicol eingesetzt werden. Die neueren Fluorochinolone (z. B. Ciprofloxacin) können außerdem zur Sanierung von Dauerausscheidern eingesetzt werden. Oftmals ist hierbei trotzdem nur das chirurgische Vorgehen (Cholezystektomie) erfolgreich [24, 49].

1.5. Diagnostik von *Salmonella*-Infektionen

1.5.1. Kultureller Nachweis und Identifizierung

Der kulturelle Nachweis gilt als Goldstandard für den Nachweis einer akuten *Salmonella*-Infektion. Seit ca. 80 Jahren werden dafür diagnostische Medien entwickelt, die laufend verändert, modifiziert und verbessert werden [1, 11, 45].

Die Anzucht von Salmonellen ist selbst auf einfachen Nährböden und in gebräuchlichen Nährbouillons problemlos durchzuführen. Zur Unterdrückung der Begleitflora beim Nachweis aus Patientenmaterialien wie Stuhl oder Urin muss jedoch mit speziellen Selektiv-Nährböden gearbeitet werden. Hierfür wird bei den enteritischen Salmonellosen frischer Stuhl zusätzlich zu Blutagar und Mac Conkey-Agar auf dem Selektivnährmedium XLD-Agar ausgestrichen und über Nacht bei 36°C bebrütet (Abb. 2, Abb. 3, Abb. 4).



Abb. 2: Salmonellen auf Blutagar

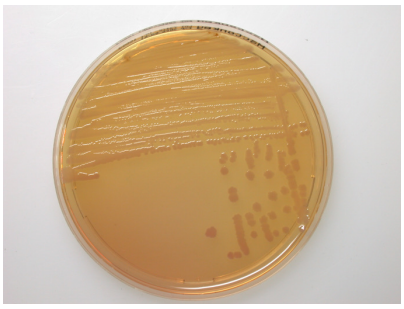


Abb. 3: Salmonellen auf Mac Conkey-Agar

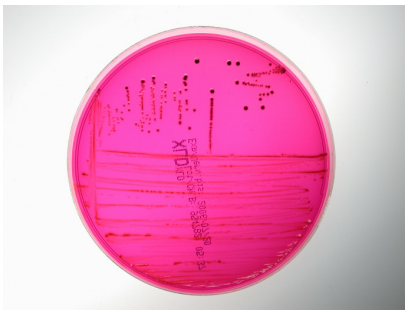


Abb. 4: Salmonellen auf XLD-Agar

Gleichzeitig wird eine Selenitboullion zur Anreicherung von Salmonellen beimpft und am darauf folgenden Tag nach Bebrütung bei 36°C auf XLD-Agar ausgestrichen.
Bei den typhösen Salmonellosen werden in der ersten Krankheitswoche und der ersten Hälfte der zweiten Krankheitswoche Salmonellen aus dem Blut angezüchtet. Da es sich hierbei um Material ohne Begleitflora handelt können Salmonellen auch bei normaler Bebrütung auf nichtselektiven Nährböden nachgewiesen werden.
Bei Vorliegen einer Bronchitis oder Angina kann zusätzlich auch Material wie Sputum oder Rachenabstrich verwendet werden. Später erfolgt der weitere Erregernachweis wie bei den enteritischen Salmonellosen aus dem Stuhl.
Wird zur Identifizierung einer Salmonelleninfektion eine Bunte Reihe durchgeführt, so sind folgende biochemische Eigenschaften der *Salmonella* spp. überprüfbar:

Tab. 2: Biochemische Eigenschaften von *Salmonella* spp. [42]

Glukose	+	**Indolbildung**	-
Laktose	-	**ODC**	+
H_2S-Bildung	+	**Zitrat**	+
Gas-Bildung	+	**Urease**	-
Beweglichkeit	+	**VP**	-

ODC: Ornithindecarboxylase, H_2S: Schwefelwasserstoff, VP: Voges-Proskauer-Reaktion

Nach Bestätigung des Salmonellenverdachts durch die genannten biochemischen Methoden, erfolgt die Feintypisierung durch Objektträger-Agglutination mit Antiseren nach dem Kauffmann-White-Schema [24]. Im Routinelabor ist aber nur eine begrenzte Anzahl von Antiseren sinnvoll und essentiel. Zur endgültigen Typisierung kann das Isolat deshalb auch an das Referenzlabor des RKI geschickt werden.
Von der Anlage bis zum Endbefund vergehen bei einem negativen Salmonellenbefund 2 - 3 Tage.
Der Verdacht auf Salmonellen kann frühestens nach 1 - 2 Tagen geäußert werden.
Die endgültige Identifizierungszeit einer Salmonellose liegt meist bei 2 - 5 Tagen.

1.5.2. Serologischer Nachweis

Bei Verdacht auf post-enteritische Komplikationen oder Verdacht auf eine typhöse Salmonellose kann es indiziert sein, den Nachweis von Antikörpern mittels Widal-Test anzustreben [63]. Der Test weist Antikörper gegen O- und H-Phasen Antigene der Salmonellen nach.

O-Phasen-Antikörper sind wenig spezifisch, treten jedoch relativ früh im Krankheitsverlauf auf (ab der 2. Krankheitswoche), fallen nach der akuten Erkrankung wieder ab und sind daher hinweisend auf eine akute Salmonellose.
H-Phasen-Antikörper sind hoch spezifisch für Salmonellen, steigen aber frühestens 10 Tage nach einer Infektion an und bleiben über Monate bis Jahre erhöht.
Serologische Untersuchungen sollten zu Beginn der Krankheit und in der zweiten Krankheitswoche durchgeführt werden.
Ein deutlicher Anstieg des H- und O-Antigen-Antikörpertiters (um mindestens das vierfache) innerhalb dieser Zeit ist der Nachweis für das Vorliegen einer typhösen Salmonellose. Allerdings ist darauf hinzuweisen, dass der serologische Nachweis nicht für eine akute Salmonellen-Erkrankung geeignet ist.

1.6. Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

1.6.1. Geschichte der FISH

Die In Situ Hybridisierung (ISH) wurde 1969 in zwei verschiedenen Forschungsgruppen unabhängig voneinander entwickelt [27, 39]. Es wurden hierfür präparierte Zellen vom Krallenfrosch (Xenopus) mit radiomarkierter DNA oder 18S-RNA hybridisiert und mit Hilfe der Mikroautoradiographie nachgewiesen. Diese Technik ermöglicht es, die Nukleinsäuresequenz einer Zelle zu untersuchen, ohne die Morphologie oder die Integrität der Zellkompartimente zu verändern. Seitdem wird die ISH für Chromosomenanalysen bei Tumoren und Leukämien und in der pränatalen Diagnostik benutzt. Giovannoni wandte die ISH 1988 zum ersten Mal im Bereich der Bakteriologie an [18].
Durch DeLong [13] wurden 1989 erstmals fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide für den Nachweis von einzelnen Zellen angewandt. Seitdem wurde die Methode fortlaufend optimiert [5]. Durch die Entwicklung der Fluoreszenzmarkierung durch Langer [31], Pinkel [40] und Landegent [30] verlor die radioaktive Markierung immer mehr an Bedeutung.

1.6.2. Grundlagen der FISH

Bei der Fluoreszenz in situ Hybridisierung werden Sonden verwendet, die aus Einzelstrang-Nukleinsäuren bestehen und die höchst spezifisch an eine komplementäre Zielregion der DNA oder RNA binden. In der Mikrobiologie ist die Zielsequenz der FISH die ribosomale RNA der Pro- bzw. Eukaryoten.

Prokaryonten besitzen Ribosomen, die aus einer 30S- und einer 50S-Untereinheit bestehen. Jede dieser Untereinheiten besitzt eine einsträngige ribosomale RNA (rRNA)-Struktur. Auf der 30S-Untereinheit liegt die 16S-rRNA und auf der 50S-Untereinheit die 23S-rRNA. Komplementär zu der jeweiligen rRNA können Sonden aus Oligonukleotiden [4] entwickelt werden, welche dann an die entsprechende Stelle binden. Kovalent gebundene Fluoreszenzfarbstoffe befinden sich meist am 5´-Ende der Sonden.

Da Oligonukleotide mit Fluoreszenzfarbstoffen unterschiedlicher Absorptionsmaxima bei unterschiedlichen Wellenlängen markiert werden können, ist es möglich, Sonden an unterschiedliche Zielsequenzen in einem Hybridisierungsschritt nachzuweisen.

Zur Darstellung aller Zellen eines Präparates kann das Material zusätzlich mit einem blauen Fluoreszenzfarbstoff, 4´6-Diamidino-2´-phenylindoldihydrochlorid (DAPI), gegengefärbt werden, der mit sehr großer Affinität an DNA bindet [67].

Die ribosomale RNA bietet sich wegen ihrer genetischen Stabilität, der hohen Anzahl in jeder Zelle (bis zu 20.000 Kopien pro Zelle) und ihrer Domänenstruktur mit variablen und konstanten Regionen an. Hierdurch kann bei der FISH auf den Amplifikationsschritt, wie er zum Beispiel bei der PCR nötig ist [47, 55], verzichtet werden.

Mit einer Länge von 3.000 Nukleotiden ist die 23S-RNA spezifischer, als die 16S-RNA, welche nur 1.500 Nukleotide aufweist. Daher wäre es am besten, die Sonden komplementär zu diesem RNA-Abschnitt zu entwerfen. In den letzten Jahren wurde aber vor allem die 16S-RNA von Bakterien sequenziert. Dadurch liegen über diese weit mehr Informationen vor als über den 23S-RNA-Abschnitt.

1.6.3. Technische Aspekte

FISH weist Nukleinsäuresequenzen durch eine Fluoreszenzfarbstoff-markierte Oligonukleotid-Sonde nach, die bei Bakterien spezifisch mit komplementären Zielsequenzen der ribosomalen 16S-, bzw. 23S-rRNA hybridisiert.

Dabei werden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

1. Ausstreichen der Bakterien auf einem Objektträger (OT).
2. Lufttrocknen.
3. Fixieren des Untersuchungsmaterials auf dem OT.
4. Hybridisierung der markierten Sonde mit der Zielsequenz.
5. Abwaschen von ungebundener Sonde.
6. Mikroskopie am Fluoreszenzmikroskop.

Üblicherweise besteht eine Oligonukleotid-Sonde, die zur FISH eingesetzt wird, aus 15 - 30 Basenpaaren [4]. Die Herstellung von Oligonukleotid-Sonden mit der gewünschten Sequenz kann kommerziell in Auftrag gegeben werden und erfolgt vollautomatisiert in Oligonukleotid-Synthesizern.

Es gibt verschiedene Arten der Fluoreszenz-Markierung. Die direkte Fluoreszenz-Markierung wird am häufigsten eingesetzt. Sie benötigt im Gegensatz zur indirekten Markierung keine weiteren Aufzeichnungsschritte nach der Hybridisierung und ist somit die einfachste, schnellste und billigste Möglichkeit der Markierung. Die Fluoreszenzmoleküle werden direkt an die Oligonukleotide gelinkt. Dies geschieht entweder chemisch während der Synthese durch einen „Aminolinker“ am 5`-Ende oder enzymatisch mit Hilfe der terminalen Transferase am 3´-Ende.

Folgende Farbstoffe werden im Allgemeinen in der Mikrobiologie angewandt:

- Fluorescein- Derivate wie Fluorescein-Isothiocynat (FITC).
- FluoX (5-(6-)Carboxy-Fluorescein-N-Hydroxysuccemid-Ester).
- TRITC (Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat).
- Cyanine wie Cy3 und Cy5.
- Aromatischen Diamiden wie DAPI.

Die kombinierten Fluoreszenz-Farbstoffe sollten einen spitzen Absorptionsgipfel haben, da sich die Farben sonst vermischen könnten.

1.6.4. Vorteile der FISH

Die Methode der FISH kombiniert die Präzision der molekularen Genetik mit der mikroskopischen Information um eine einzelne Zelle darzustellen. FISH ist eine Methode, die gleichzeitig Visualisierung, Identifizierung, Quantifizierung und Lokalisierung eines Mikroorganismus möglich macht. Außerdem kommt es weniger zu falsch positiven Reaktionen, wie sie zum Beispiel bei der PCR auftreten können, da bei der FISH kein Amplifikationsschritt nötig ist. Die FISH ist ein schnelles und kostengünstiges Verfahren, welches besonders für die Routinediagnostik von Vorteil ist.

1.6.5. Einsatz in der Biologie

Zum Nachweis von Salmonellen in Lebensmitteln wurden bereits mehrere Sonden publiziert [16, 37, 51]. Die FISH spielt außerdem eine wichtige Rolle bei der Identifizierung von Mikroorganismen im Abwasser von Kläranlagen [36].

1.6.6. Einsatz in der Medizin

In den letzten 10 Jahren stieg die Bedeutung der FISH in der Mikrobiologie als kulturunabhängige, schnelle und hochspezifische Methode. Beispiel hierfür ist die Anwendung der FISH zum Nachweis von Erregern aus dem Respirationstrakt bei Patienten mit cystischer Fibrose [9]. Auch zum Nachweis von Bakterien aus dem Liquor [43], aus Blutkulturen [61] und aus dem Stuhl [46] wird die FISH bereits angewendet.

1.7. Zielsetzung der Promotionsarbeit

Salmonellen haben zum einen eine besondere klinisch-epidemiologische Bedeutung als Gastroenteritis-Erreger. Zum anderen können die so genannten enteritischen Salmonellen in seltenen Fällen als Verursacher verschiedenster extraintestinaler Infektionen in Erscheinung treten (z. B. Osteomyelitis, Perikarditis, Sepsis). Darüber hinaus können einige wenige Serovare schwere systemische Infektionen wie Typhus und Parathypus verursachen. Die weiteren Behandlungsansätze hängen insbesondere von einer schnellen Identifizierung des Bakteriums ab.
Die bisher verfügbare mikrobiologische Diagnostik zum Nachweis von Salmonellosen ist zwar sehr spezifisch, aber auch sehr zeitaufwändig. Das primäre Ziel dieser Promotionsarbeit ist daher, durch Entwicklung und Evaluierung eines FISH-Assays zu einer Verbesserung und Beschleunigung der Diagnostik von Salmonellen beizutragen. Die konkrete Zielsetzung dieser Dissertation umfasst die Evaluierung des FISH-Verfahrens zur 16S- bzw. 23S-rRNA-gestützten Identifizierung von *Salmonella* spp. anhand von ausgewählten *Salmonella*-Stämmen zur Beschleunigung der Diagnostik bei Patienten mit Verdacht auf Salmonellosen.

Die Promotionsarbeit gliedert sich in folgende Schritte:

1. Entwicklung und Evaluierung von neu entwickelten Salmonellen-Sonden an Referenzstämmen und klinischen Isolaten.
2. Evaluierung und Etablierung eines Verfahrens zum Direktnachweis von Salmonellen aus positiven Stuhlproben.
3. Direktnachweis von *Salmonella enterica* aus positiven Blutproben.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Geräte	Bezugsquelle
Brutschrank 36° C, 5 % CO_2	Kendro, Hanau
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Kamera Axiophot 2	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Lamin Air Flow	Kendro, Hanau
Magnetrührer, Ikamag Rec-G	Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen i. Br.
pH- Meter digital WTW pH 525	Wissenschaftlich- Technische Werkstätten GmbH, Weilheim i. Obb.
Pipetboy	Tecnomara Deutschland GmbH, Fernwald
Pipetboy plus	Integra Biosciences AG, Chur, Schweiz
Pipetten:	
Eppendorf, fest (50 µl, 100 µl)	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH,Hamburg
Eppendorf, variabel (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Gilson Pipetman (P 2, P 10, P 20, P100, P 200, P 1000)	Abimed GmbH, Langenfeld
Vortex Genie II	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Zentrifuge Heraeus biofuge fresco	Kendro, Hanau

2.1.2. Materialien

Materialien	Bezugsquelle
Einmal-Küvetten 1,5 ml halbmikro PS	BRAND GmbH, Wertheim
Deckgläser „Menzel-Gläser“ 24 x 50 mm	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig
Glasküvetten	VWR International, Ulm
Glasschrott (3mm Durchmesser)	VWR International, Ulm

H.C. Gene Frame 10 x 10 mm (für 25 µl)	Thermo Life Sciences, Egelsbach
H. C. Gene Frame Deckgläser	Thermo Life Sciences, Egelsbach
Hybridisierungsgefäße seaFAST	seapro Theranostics International, NL
Objektträger:	
gereinigt, Kanten geschnitten, bds. Mattrand, ca. 76 x 26 x 1 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co KG, Lauda-Königshofen
gereinigt, geschnitten, Mattrand, ca. 76 x 26 mm	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig
Cytoslide (schwarz beschichtet, Öffnung ∅ 13 mm)	Thermo Shandon, Pittsburgh, USA
Schwarz beschichtet, Öffnung ∅ 15mm	Advanta, Boston, USA
Diagnostika 12 Felder, blau, benetzbar	Dade Behring, Vertriebs GmbH & Co OHG, Schwalbach
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Sterile Impfnadeln	Nalge Nunc International
Sterile Impfschlingen (10 µl)	Greiner Labortechnik GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zentrifugenröhrchen:	
Bluecap (15 ml, 50 ml)	Falcon®, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA

2.1.3. Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	**Bezugsquelle**
DAPI	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
EDTA	Serva Elecrophoresis GmbH, Heidelberg
Eindeckmedium Citifluor	Plano GmbH, Wetzlar
Eindeckmedium Vectashield mit DAPI	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Ethanol	Riedel-de Haën AG, Seelze
Formamid	Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
HCl 1 mol/l	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
NaCl 0,9 %	Delta-Pharma GmbH, Pfullingen

NaOH 1 mol/l	Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, USA
Paraformaldehyd	Sigma –Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
PBS- Tabletten	Gibico, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
SDS (Laurylsulfat)	Sigma –Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tris	USBTM, Cleveland, Ohio, USA

2.1.4. Lösungen und Puffer

2.1.4.1. Stocklösungen

EDTA 0,5 M:	Ethylendiamintetraacid, Molekulares Gewicht: 292,3 g/mol, in 1000ml auflösen → 1M
NaCl 5M:	Natriumchlorid, Molekulares Gewicht : 58,44 g/mol
PBS (1x):	1 Tablette in 500 ml Aqua bidest auflösen
PFA (4 %):	Paraformaldehyd, Molekulares Gewicht: 30,03 g/mol, 8g in 100ml Aqua bidest auflösen
SDS 10 %:	Dodecylsulfat- Na- Salz, Molekulares Gewicht: 288,4 g/mol, 10g mit 90g Aqua bidest auffüllen
Tris HCl 1M:	Molekulares Gewicht (Tris): 121,14 g/mol, pH- Einstellung auf pH= 8 mit 1M NaCl

2.1.4.2. Sondenlösungen

Für Stocklösungen werden die lypophylisierten Sonden in destilliertem Wasser gelöst. Fluorescein-markierte Sonden werden in einer Konzentration von 500 µg/ml und Cy3-markierte Sonden in einer Konzentration von 300 µg/ml gelöst. Die Stocklösung wird aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Für die Hybridisierung wird 1 Teil Stocklösung zu 10 Teilen Hybridisierungspuffer gegeben.

2.1.4.3. Puffer

Die Hybridisierungspuffer wurden nach dem Schema in Tab. 3 in 2 ml Reaktionsgefäße pipettiert und konnten bei -18 °C für mehrere Monate aufbewahrt werden.

Tab. 3: Herstellung des Hybridisierungspuffers für die FISH

Bestandteile und Konzentrationen von 100 ml Hybridisierungspuffer

Formamid-konzentration (in %)	5M NaCl (ml)	1M Tris HCl (ml)	Formamid (ml)	Aqua bidest (ml)	10 %SDS (ml)
10	18	2	10	70	0, 1
20	18	2	20	60	0, 1
30	18	2	30	50	0, 1
40	18	2	40	40	0, 1
50	18	2	50	30	0, 1

Das Mischungsverhältnis der einzelnen Bestandteile ist abhängig von der Formamidkonzentration. FISH: Fluoreszenz in situ Hybridisierung, NaCl: Natriumchlorid, Tris HCl: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Salzsäure, SDS: Sodiumdodecylsulfat

Die Waschpuffer wurden in größeren Mengen, meist 500 ml oder 1000 ml, hergestellt, weil damit Blue Caps oder Küvetten gefüllt werden mussten. Bei + 4 °C waren sie für mehrere Monate haltbar. Das Pipettierschema zeigt Tab. 4.

Tab. 4: Herstellung des Waschpuffers für die FISH

Bestandteile und Konzentrationen von 100 ml Waschpuffer

Formamid im Hybridisierungs-puffer (in %)	5M NaCl (µl)	0,5M EDTA (µl)	1M Tris HCl (µl)	Aqua bidest (ml)	10 %SDS (µl)
10	9000	0	2000	89	100
20	4000	1000	2000	93	100
30	2040	1000	2000	95	100
40	920	1000	2000	96	100
50	360	1000	2000	96,5	100

Je nach Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer gibt es ein anderes Mischungsverhältnis. FISH: Fluoreszenz in situ Hybridisierung, NaCl: Natriumchlorid, EDTA: Ethylendiaminotetraessigsäure, Tris HCl: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Salzsäure, SDS: Sodiumdodecylsulfat

2.1.5. Nährmedien und Agarplatten

Nährmedium	Bezugsquelle
CASO-Blutagar	Heipha Dr. Müller GmbH, Eppelheim
Mac Conkey-Agar	Heipha Dr. Müller GmbH, Eppelheim
XLD-Agar	Oxoid GmbH, Wesel

2.1.6. Bakterienstämme

2.1.6.1. Referenzstämme

Tab. 5: Referenzstämme

Nummer	Spezies
ATCC 13311	*Salmonella* Chelax Suis
ATCC 8090	*Citrobacter freundii*
ATCC XX	*Arcobacter sp.*
ATCC 25922	*E. coli*
ATCC 35218	*E. coli*
ATCC 13048	*Enterobacter aerogenes*
ATCC 35657	*Klebsiella pneumonie*
ATCC 700603	*Klebsiella sp.*
ATCC 29906	*Proteus mirabilis*
ATCC 27853	*Pseudomonas aeruginosa*
DSM 9676	*Yersinia entercolitica*

ATCC: American Type Culture Collection, DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, *sp*.: Spezies, *E. coli : Escherichia coli*

2.1.6.2. Klinische Isolate

In der Routinediagnostik werden *Salmonella* spp. für mindestens 2 Jahre im Kühlschrank bei 8°C aufbewahrt.

Diese konnten dann für die Versuche auf herkömmlichen Blutagarplatten subkultiviert werden.

2.1.7. Sonden

Die im Folgenden aufgeführte Sequenz der Sonden ist immer vom 5´- zum 3´- Ende notiert, wobei die einzelnen Buchstaben jeweils für den Anfangsbuchstaben der Base stehen (A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin).
Es handelt sich bei allen Sonden um DNA-Sonden, die am 5`-Ende fluoreszenzmarkiert sind.

2.1.7.1. Übergreifende Sonden

Bei der Sonde EUB 338 handelt es sich um eine eubakterielle Universalsonde. Diese Sonde färbt alle Eubakterien an. Sie wird als Positivkontrolle verwendet.

Tab. 6: Übergreifende Sonden

Ziel-organismus	Name der Sonde	Markierung	Sequenz	Ribosomale Untereinheit (UE)	Quelle
Eubakterien	EUB 338	FITC, Cy3	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	16 S	[3]

FITC: Fluorescein-Isothiocyanat, Cy3: 5,5`-Disulfo-1,1`-di (X-Carbopentynyl)-3,3,3`,3`-tetramethyindolo-carbocyanin-N-hydroxy-succimidester, A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin

2.1.7.2. Spezies-spezifische Sonden

Diese Sonden binden spezifisch an komplementäre Zielsequenzen der 16S-, bzw. 23S-rRNA von *Salmonella enterica*.

Tab. 7: Spezies-spezifische Sonden

Ziel-organismus	Name der Sonde	Markierung	Sequenz	Ribosomale UE	Quelle
S. enterica	SAL 331	Cy3	TGC GCT TTT GTG TAC GGG GCT	23 S	
S. enterica	SAL 3	FITC, Cy3	AAT CAC TTC ACC TAC GTG	23 S	[37]
S. enterica	SalYer 1705	FITC, Cy3	CTT CAC CTA CGT GTC AGC G	23 S	
S. enterica	Sal sp 263	Cy3	TGC TGA TTC AGG CTC TGG GCT C	23 S	

S. enterica	Sal 821	FITC, Cy3	CAA GGG CAC AAC CTC CAA GTA GA	16 S	
S. enterica	Sal 335	Cy 3	TGC GCT TTT GTG TAC GG	23 S	
S. enterica	Sal 1	FITC	ACA GCA CAT GCG CTT TTG TG	23 S	[51]
S. enterica	Sal 544	Cy3	GCA GTC ACA CAG GTA AAC	23 S	[16]
S. enterica	Sal Ari tm	Cy3	TTG ACG TCG CTT CGC TCC	23 S	

S.: *Salmonella*, FITC: Fluorescein-Isothiocyanat, Cy3: 5,5`-Disulfo-1,1`-di (X-Carbopentynyl)-3,3,3`,3`-tetramethyindolo-carbocyanin-N-hydroxy-succimidester, A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin

2.1.7.3. Kompetitor

Die Kompetitoren wurden entwickelt um die Spezifität der Sonden zu erhöhen. Dabei handelt es sich um unmarkierte Sonden, die spezifisch an die Bakterien binden, die in ihrer Basen-Sequenz den Zielorganismen sehr ähnlich sind und aus diesem Grund häufig eine Kreuzbindung eingehen. Die Kompetitoren blockieren diese Basenregionen, die dann den fluoreszenzmarkierten Sonden nicht mehr zugänglich sind.

Tab. 8: Kompetitor

Ziel-organismus	**Name der Sonde**	**Markierung**	**Sequenz**	**Ribosomale UE**	**Quelle**
Andere Enterobakterien	Komp. Sal 331	-	GTG CAT TTT TGT GTA CGG GGC	23 S	
Andere Enterobakterien	Komp. SalYer 1705	-	TCA CCT ACA TAT CAG CGT GC	23 S	
Andere Enterobakterien	Komp. Sal 263	-	CAC ACT GAT TCA GGC TCT GGG	23 S	
Andere Enterobakterien	Komp. Sal 821	-	GGG CAC AAC CTC CAA GTC GAC	16 S	

Komp.: Kompetitor, A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin

2.2. Methoden

2.2.1. Kultivierung von Bakterienstämmen

Die Anzucht des Erregers ist in der Regel unproblematisch. Hierfür wird frischer Stuhl zusätzlich zu Blutagar und Mac Conkey-Agar auf dem Selektivmedium XLD-Agar ausgestrichen und über Nacht bei 36° C bebrütet. In Materialien ohne Begleitflora wie Blut oder Biopsien können Salmonellen auch bei normaler Bebrütung auf nichtselektiven Nährböden nachgewiesen werden. Für die Subkultivierung der Referenzstämme und klinischen Isolate aus der Stammsammlung reicht die Anzucht auf dem nichtselektiven Nährboden Blutagar aus.

2.2.2. Paraformaldehydherstellung

Zur Herstellung von einem Liter 4 %-igem Paraformaldehyd (PFA) wurden zunächst zwei PBS-Tabletten in 500 ml Aqua bidest gelöst. Danach wurden 40 g Paraformaldehyd in 500 ml Aqua bidest gelöst und im Wasserbad auf 60° C erwärmt. Anschließend wurde solang NaOH hinzugefügt bis sich das PFA vollständig gelöst hatte und eine klare Flüssigkeit ergab. Diese Lösung wurde dann unter dem Abzug auf Raumtemperatur abgekühlt. Danach wurden 500 ml des zu Beginn hergestellten 2x-PBS hinzugefügt und der pH-Wert mit HCl und NaOH mittels pH-Meter auf einen Wert zwischen 7,2 und 7,4 eingestellt. Die Aufbewahrung des 4 %-igen PFA erfolgte für kurze Zeit im Kühlschrank bei + 4° C. Zur längerfristigen Lagerung wurde es bei -18° C eingefroren. Um das zur Fixierung benötigte 2%-ige PFA zu erhalten, wurde das 4%-ige PFA mit 1x-PBS im Verhältnis 1:1 verdünnt.

2.2.3. Herstellung der Präparate

Die (Einzel- oder Mehrfelder-) Objektträger wurden zunächst mit Labornummern, bzw. Keimnamen und Datum beschriftet. Bei Benutzung von Mehrfelder-Objektträgern konnten in einem Arbeitsgang verschiedene Sonden in einem Ansatz an einem Keim getestet werden. Mit einem in sterilem NaCl angefeuchteten Wattetupfer wurden 3-5 Kolonien einer Bakterienkultur auf ca. fünf Objektträger verrieben. Die Präparate wurden anschließend luftgetrocknet und fixiert.

2.2.4. Fixierung der Präparate

Vor Durchführung einer FISH müssen die zu untersuchenden Präparate zunächst fixiert werden. Dazu stehen die Methoden der Hitze-, der Methanol-, sowie der PFA-Fixierung zu Verfügung.

Die Art der Fixierung ist abhängig von dem Mikroorganismus und dessen Zellwandtyp.

- Hitzefixierung: Das Präparat wird drei Mal durch die blaue Flamme eines Bunsenbrenners gezogen.
- Methanolfixierung: Der Objektträger wird für 10 Minuten in eine Küvette mit 100 % Methanol gestellt.
- PFA-Fixierung: Der Objektträger wird für eine halbe Stunde in eine Küvette mit 2 %- PFA gestellt.

Bei der Arbeit mit *Salmonellen* spp. hat sich die Fixierung mit PFA als die beste Methode heraus gestellt. Bei dieser Art der Fixierung waren immer ausreichend Bakterien auf dem Objektträger vorhanden.

Die ursprüngliche Fixierungszeit wurde von einer Stunde auf eine halbe Stunde reduziert.

Die fixierten, nicht benötigten Präparate konnten bei -18° C über mehrere Wochen gelagert werden. Nach der PFA-Fixierung wurden die Objektträger vor der Hybridisierung durch eine aufsteigende Ethanolreihe mit 50 %, 80 % und 100 % Ethanol für jeweils 3 Minuten entwässert.

2.2.5. FISH

Die Durchführung einer Fluoreszenz in situ Hybridisierung erfordert folgende Schritte: Hybridisierung, Waschvorgang und Mikroskopie.

2.2.5.1. Hybridisierung

Der Hybridisierungspuffer wurde nach Tab. 3 im Materialteil hergestellt. SDS wurde als letzte Substanz dazugegeben, um eine mögliche Ausflockung zu vermeiden. Die Reihenfolge der Beigabe der anderen Substanzen spielte keine Rolle. Alle Hybridisierungsschritte wurden im abgedunkelten Labor durchgeführt, um ein Ausbleichen des Fluoreszenz-Farbstoffs zu vermeiden. Die Hybridisierungspuffer-Sonden-Gemische wurden in 0,5 ml Reaktionsgefäßen im Verhältnis 10:1 hergestellt. Die Hybridisierung erfolgt im dunklen Brutschrank bei einer Temperatur von 46° C oder im Wasserbad bei 48° C. Diese Temperaturen wurden während den ganzen Versuchsreihen immer konstant

gehalten. Die Hybridisierungszeit wurde auf 60 – 90 Minuten festgesetzt. Es wurden zwei unterschiedliche Hybridisierungssysteme benutzt.

Bei der Methode mit **Cytoslide-Objektträgern** wurden schwarz beschichtete Objektträger als Deckgläser auf die Objektträger gelegt, auf die zuvor 20 µl Hybridisierungspuffer-Sonden-Gemisch pipettiert wurde. Die gedeckelten Objektträger wurden dann in Präparatemappen für 60 - 90 Minuten in den Brutschrank gelegt.

Bei der Methode mit **SeaFAST Hybridisierungsgefäßen,** auch Schwimmer genannt, werden 12- bzw. 8-Feld-Objektträger benutzt. Je 5 µl des Hybridisierungspuffer-Sonden-Gemischs wurde auf die einzelnen Felder pipettiert. In den Schwimmer wurde 2 ml Hybridisierungspuffer auf einen Papierstreifen gegeben. Dadurch entstand eine feuchte Kammer für den Hybridisierungsvorgang. 2 - 3 Objektträger konnten so in einen Schwimmer geschoben werden. Die Schwimmer wurden dann für 90 Minuten in ein Wasserbad mit 48° C gelegt.

2.2.5.2. Waschvorgang

Im Anschluss der Hybridisierungsreaktion mussten die ungebundenen Sonden wieder abgewaschen werden. Dazu wurden die Objektträger in Küvetten mit dem entsprechenden Waschpuffer gegeben. Der Waschpuffer wurde zuvor gemäß Tab. 4 im Materialteil hergestellt, wobei auch hier SDS als letztes Reagenz hinzugefügt wurde. Die Objektträger wurden dann für 20 Minuten im Wasserbad in auf 48° C vorgewärmte Küvetten gestellt. Anschließend wurde der Waschpuffer mit Aqua bidest abgespült und die Präparate schnellstmöglich getrocknet. Dazu wurde ein Fön verwendet, da die Sonden auf den nassen Objektträger sonst ausbleichen könnten. Danach wurden die Präparate mit einem Eindeckmedium und Deckgläsern versehen. Das Eindeckmedium enthält Glycerin und weitere Substanzen, die ein Ausbleichen der Sonden verhindern. Bei Bedarf kann ein Eindeckmedium mit DAPI-Farbstoff zur Visualisierung aller DNA-haltigen Zellen verwendet werden. Bei Verwendung der Cytoslide-Objektträger wurden die Deckel-Objektträger nach gründlicher Reinigung mehrfach wiederverwendet.

2.2.5.3. Mikroskopie

Für die Dokumentation wurde ein Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2) der Firma Carl Zeiss Jena GmbH verwendet. Dieses war zusätzlich mit einer Kamera zur Festhaltung der Ergebnisse der FISH ausgestattet.

2.2.6. Bewertungsmaßstab

Zur Auswertung der FISH wurden die Zahlenwerte 0 - 5 festgelegt und zwar in Bezug auf die Fluoreszenzintensität (FI), mit welcher die Sonde leuchtete (Abb. 5.1. - 5.6.).

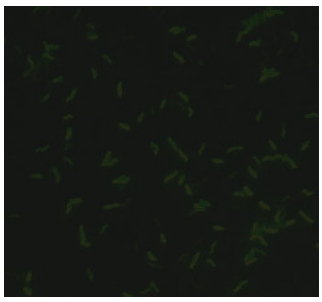


Abb. 5.1.: Zahlenwert 0

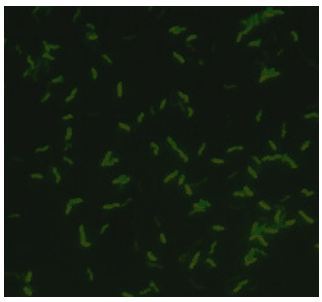


Abb. 5.2.: Zahlenwert 1

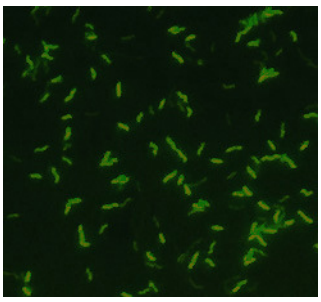


Abb. 5.3.: Zahlenwert 2

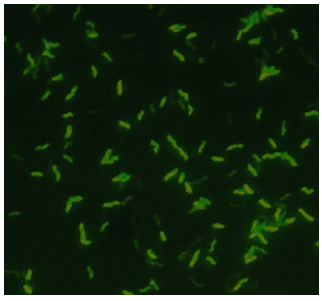


Abb. 5.4.: Zahlenwert 3

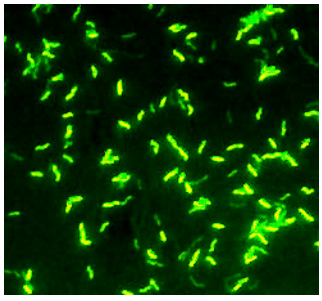


Abb. 5.5.: Zahlenwert 4

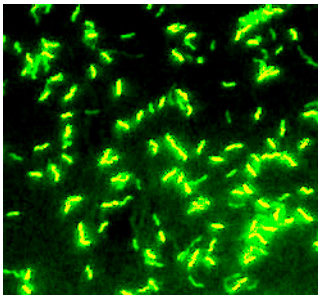


Abb. 5.6.: Zahlenwert 5

Den einzelnen Zahlenwerten wurden folgende Aussagen zugeordnet:

0 = Auf dem Objektträger ist nichts zu sehen (Abb. 5.1.).

1 = Es sind gerade noch Bakterien auf dem Objektträger zu erkennen (Abb. 5.2.).

2 = Die Bakterien heben sich klar vom Hintergrund ab, leuchten aber nicht (Abb. 5.3.).

3 = Die Sonde hat funktioniert und leuchtet (Abb. 5.4.).

4 = Die Sonde leuchtet gut (Abb. 5.5.).

5 = Die Sonde leuchtet maximal hell (Abb. 5.6.).

Werte von 0 - 2 gelten als negativ. Das heißt, die Sonde hat nicht gebunden. Werte von 3 - 5 werden als positiv gewertet.

2.2.7. Formamidreihe

Die Stärke der komplementären (hydrogenen) Bindung kann sowohl durch eine Änderung der Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer bzw. der Salzkonzentration im Waschpuffer, als auch durch eine Änderung der Hybridisierungstemperatur variiert werden.

Bei einer Erhöhung der Formamidkonzentration nimmt die Stärke der Bindung an die rRNA ab. Das soll verhindern, dass die Sonden an anderen Enterobakterien binden, sogenannte Kreuzreaktionen. Allerdings wird mit steigender Formamidkonzentration auch die Anlagerung der Sonde an den Zielorganismus erschwert. Das heißt, es muss für jede Sonde diejenige Formamidkonzentration festgelegt werden, bei welcher sie am Zielorganismus noch gut bindet, aber gleichzeitig keine Kreuzbindung mit genetisch ähnlichen Bakterien aufweist. Für jede Sonde wurde eine Formamidverdünnungsreihe mit aufsteigenden Formamidkonzentrationen im Hybridisierungspuffer zwischen 10 % und 60 % erstellt. Dadurch kann die Konzentration ermittelt werden, bei der die Sonde ein optimales Bindungsverhalten aufzeigt. Für gewöhnlich zeigt das Bindungsverhalten einer Sonde einen monophasischen Verlauf. Am Anfang liegt sie auf einem Plateau und fällt dann, meist bei 30 oder 40 %-iger Formamidkonzentration, steil ab.

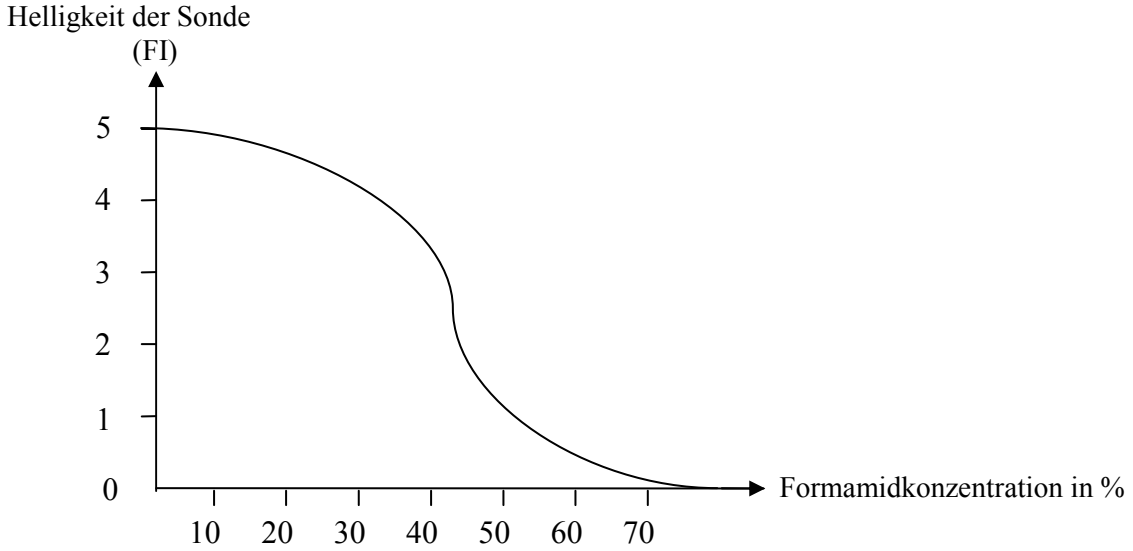


Abb. 6: Beispiel einer Bindungskurve in Abhängigkeit von der Formamidkonzentration. Die Helligkeit der Sonde entspricht der Fluoreszenzintensität (FI). Die Werte reichen dabei von 0 (keine Fluoreszenz) bis 5 (maximale Fluoreszenz).

2.2.8. Design der Sonden

Mit Hilfe der kostenlosen Software der Technischen Universität München (erhältlich unter www.arb-home.de) konnten die entsprechenden Sonden entworfen werden.

2.2.9. Stuhlversuche

Die Qualität der Stuhlpräparate ist für die Auswertung nach Durchführung der FISH von entscheidener Bedeutung. Aus diesem Grund wurden Versuche zur Aufbereitung von Stuhlproben für die Verbesserung der Qualität der Präparate durchgeführt.

2.2.9.1. Vorversuche: Salmonellen nur in PBS

Zunächst wurden Vorversuche durchgeführt, um die optimalen Zentrifugationszeiten und -geschwindigkeiten herauszufinden, bei der noch genügend Salmonellen nach Ablauf der Zentrifugation auf dem Objektträger vorzufinden sind. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

1. In ein 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden 8 ml PBS und etwa 2 Ösen Salmonellen hineingefügt und anschließend 1 Minute mit dem Vortex Genie 2 gemischt.
2. Die ganze Mischung ließ man danach ca 1 - 2 Minuten absetzen.
3. Je 0,25 ml dieser Mischung wurden in insgesamt 26 Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben.

Jedes Reaktionsgefäß wurde verschieden lang (1 Minute versus 5 Minuten) und mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten (600 U/min – 6000 U/min) zentrifugiert.
Insgesamt erhielt man bei Abstufungen von ca. 500 U/min pro Zentrifugationsschritt 25 Präparate. Hierfür wurden von jedem Reaktionsgefäss 10 µl Überstand auf je einen Objektträger pipettiert, diese luftgetrocknet und danach in PFA 2 % für eine Stunde fixiert. Die Niederschläge der einzelnen Reaktionsgefässe wurden erneut mit PBS (0,25 ml) resuspendiert und daraus weitere Präparate gefertigt (erneut 25 Stück). Für den Nachweis der Keime auf dem Objektträger wurde die DAPI-Färbung eingesetzt.
Diese Versuchsreihe wurde drei Mal wiederholt, um die ideale Zentrifugationsgeschwindigkeit und -zeit zu ermitteln, bei der noch ausreichend Salmonellen auf den Objektträgern vorzufinden waren.

2.2.9.2. Nachweis von Salmonellen aus gespikten Stuhlproben

Durch die Vorversuche wurden die optimale Zentrifugationsgeschwindigkeiten und -zeiten für die folgenden Versuche festgelegt. Hierbei wurde versucht herauszufinden, in wie weit sich die Qualität der Stuhlpräparate in Abhängigkeit von den Zentrifugationsgeschwindigkeiten verändert.
Zur Herstellung von annähernd physiologischen Stuhlbedingungen wurde folgendermaßen vorgegangen:

Aufschwemmen des Stuhls

1. In ein 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden ca. 2 mm große Glasbeads, sowie 4,5 ml PBS vorgelegt.
2. Dieses wurde mit ca. 10 KBE Salmonellen gespikt.
3. Es wurden 4 Ösen Stuhl dazugegeben (gesunder Probandenstuhl).
4. Danach wurde das Zentrifugenröhrchen 1 Minute gevortext.
5. Den Niederschlag ließ man ca. 1 - 2 Minuten absetzen.

Herstellung der Präparate

1. Für das Präparat 1 wurden 10 µl vom Überstand auf OT pipettiert, luftgetrocknet und in PFA 2 % fixiert.
2. Die Suspension wurde je für 1 Minute bei Zentrifugationsgeschwindigkeiten zwischen 2000 U/min und 3600 U/min zentrifugiert.
3. Davon wurden jeweils 10 µl des Überstandes auf OT pipettiert, luftgetrocknet und in PFA 2 % für 1 Stunde fixiert (Präparate 2a - 2d).
4. Parallel wurden alle Niederschläge (Pellets) mit 0,95 ml PBS resuspendiert, gevortext und daraus Präparate gemacht (1R und 2aR - 2dR).

Bei all diesen Präparaten wurde die unter 2.2.5. beschriebene FISH mit der Sonde Sal 331 und Kompetitor durchgeführt. Insgesamt wurde die Versuchsreihe unter diesen Bedingungen drei Mal durchgeführt.

Es wurde folgendes Protokoll für die mikroskopische Auswertung der Präparate aus der Stuhlaufbereitung verwendet:

Zentrifugations-Ergebnisse-Stuhlaufbereitung

Präparate Nr.
Konsistenz des Stuhls

	Sonden			**Sonden**		
	Sal 331 Cy 3 + Komp.	**EUB 338 FITC**	**DAPI**	**Sal 331 Cy3 +Komp.**	**EUB 338 FITC**	**DAPI**
Aufarbeitung: Zentrifugationszeit und -geschwindigkeit						
Bakterienzahl						
Begleitflora						
Hintergrund						
Beurteilbarkeit						
Fluoreszenz						
Kommentar						

Abb. 7: Protokoll zur Auswertung der Präparate aus der Stuhlaufbereitung. In das Feld der Aufarbeitung wurde deskriptiv die Zentrifugationsgeschwindigkeit eingetragen, bzw. die Zentrifugationszeit. Alle anderen Felder wurden wie in Tab. 9 beschrieben ausgefüllt. Bei der Sonde Sal 331 handelt es sich um eine Spezies-spezifische Sonde und bei der Sonde EUB 338 [3] um eine übergreifende Sonde. Der Kompetitor wurde zur Erhöhung der Spezifität entwickelt. DAPI: 4`,6-Diamino-2-phenylindol, FITC: Fluorescein-Isothiocyanat, Cy3: 5,5`-Disulfo-1,1`-di (X-Carbo-pentynyl)-3,3,3`,3`-tetra-methyindolo-carbocyanin-N-hydroxy-succimidester

Die einzelnen Bewertungspunkte wurden nach folgendem, zuvor festgelegtem Schema ausgefüllt:

Tab. 9: Bewertungsschema Mikroskopie bei den Präparaten aus der Stuhlaufbereitung

Aufarbeitung	deskriptiv
Bakterien a) Zahl	-2 = keine -1 = gering 0 = Optimum +1 = vermehrt +2 = überlagert
Verunreinigungen	0 = keine bis 5 = massenhaft
Hintergrund (HG)	0 = optimal (sauber,klar) bis 5 = verunreinigt
Beurteilbarkeit (Wie kann ich die gesuchten Bakterien von den anderen unterscheiden?)	0 = sehr schlecht bis 5 = optimal
Fluoreszenzintensität (FI)	0 = keine Fluoreszenz 5 = stärkste Fluoreszenz

2.2.10. Versuche zur analytischen Sensitivität und Spezifität

Bei den Versuchen zur analytischen Sensitivität und Spezifität wurde die FISH mit der Routinediagnostik verglichen. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

Vorbereitung

1. Es wurden 10 ml steriles PBS und eine Öse Salmonellen vom Blutagar in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gefüllt.
2. Danach wurde die Trübung mit dem Photometer auf 0,2 OD eingestellt (Photometer WL = 578 nm).
3. Es wurden 11 Eppendorf-Reaktionsgefäße für die Verdünnungsreihe mit je 0,9 ml PBS gefüllt.

Herstellung einer Verdünnungsreihe

Es wurden 100 µl Bakteriensuspension in das erste Reaktionsgefäß pipettiert und gut vermischt. Davon wurden dann 100 µl in das zweite Reaktionsgefäß pipettiert und vermengt, usw., bis zum letzten Reaktionsgefäß (Nr. 11). Von diesem wurden dann 100 µl verworfen.

Ermittlung der Bakterienmenge in der Suspension

Von allen Verdünnungsstufen wurden je 100 µl auf je zwei Agarplatten, samt sterilisierten Glaskugeln gegeben und die Platten gleichmäßig geschüttelt. Danach wurden die Glaskugeln verworfen und die Agarplatten bei 37 ° C über Nacht bebrütet.

Von den Verdünnungsstufen 0 bis 10^{-5} wurden zusätzlich je 20 µl auf je einen OT pipettiert, luftgetrocknet und 30 Minuten in PFA 2 % fixiert.

Ablauf in der Routinediagnostik:

Aus einer Patientenprobe und PBS wurde ein dünnflüssiger Stuhl hergestellt (mind. 10 ml). In 11 Eppendorf-Reaktionsgefässe (Epis) wurden je 0,4 ml flüssiger Stuhl hineinpipettiert. Jedes dieser Epis wurde mit je 100 µl der Verdünnungsstufen 0 bis 10^{-10} vermischt.

Teilversuch a) Sensitivität der Kultur

Von allen Verdünnungsstufen wurden je 1 Öse Stuhl auf je einer XLD-Platte mittels Drei-Ösen-Ausstrich verteilt und die Agarplatten bei 37 ° C über Nacht bebrütet.

Teilversuch b) Sensitivität der FISH

Die Verdünnungsstufen 0 bis 10^{-5} wurden auf 4-Felder-OT nach dem Routineschema direkt ausgestrichen (30 µl pro Feld).

Die Objektträger wurden wie in 2.2.5. beschrieben weiter bearbeitet.

2.2.11. Direktnachweis von *Salmonella enterica* aus dem Patientenstuhl

Zum Direktnachweis von *Salmonella enterica* wurde je 10 µl Durchfallstuhl nach Homogenisierung in einer PBS-Lösung direkt auf alle drei Felder eines Mehrfelderobjektträger pipettiert. Nach der Lufttrocknung der Präparate wurden diese für eine Stunde in einer 2 %-PFA-Lösung fixiert.
Anschließend wurden sie im Gefrierschrank bis zur Durchführung der FISH gelagert.
Die FISH wurde geblinded durchgeführt, um die Auswertung nicht zu beeinflussen. Um aussagekräftigere Ergebnisse zu gewinnen, wurden die meisten Präparate mit den zwei Sonden Sal 331 und SalYer 1705 und den dazugehörigen Kompetitoren hybridisiert.
Dabei wurde das folgende Schema angewandt:

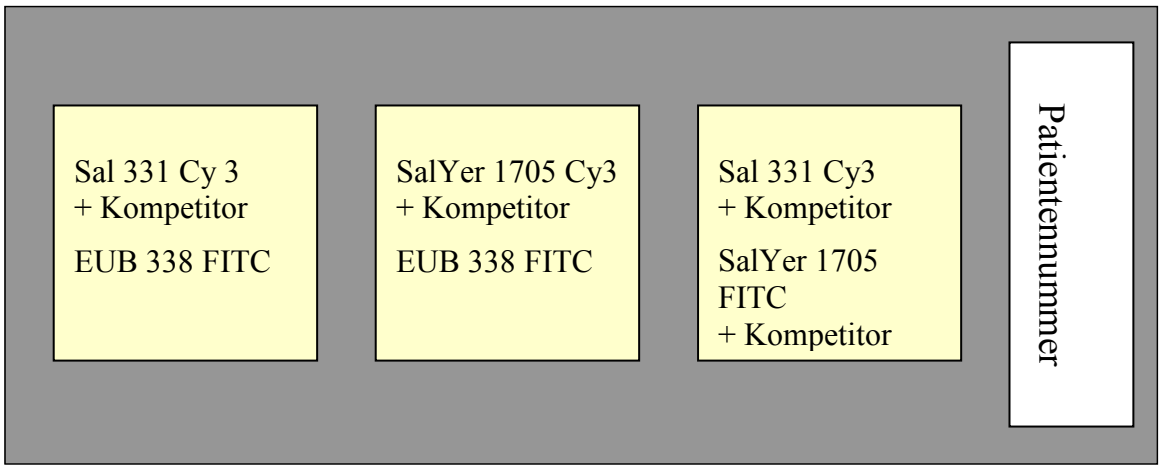


Abb. 8: Darstellung eines Objektträgers mit dem Sondenschema für den Direktnachweis von Salmonellen aus dem Stuhl. Bei den Sonden Sal 331 und SalYer 1705 handelt es sich um Spezies-spezifische Sonden und bei der Sonde EUB 338 [3] um eine übergreifende Sonde. Die Kompetitoren wurde zur Erhöhung der Spezifität entwickelt. FITC: Fluorescein-Isothiocyanat, Cy3: 5,5`-Disulfo-1,1`-di (X-Carbo-pentynyl)-3,3,3`,3`-tetramethyindolo-carbocyanin-N-hydroxy-succimidester

In der Routinediagnostik erfolgte die Identifizierung von *Salmonella* spp. nach dem im Einleitungsteil unter 1.5.1 beschriebenen Vorgehen.

2.2.12. Direktnachweis von *Salmonella enterica* aus positiven Blutproben

Für den Direktnachweis von Salmonellen aus positiven Blutproben wurde anhand von in der Literatur beschriebenen Verfahren [28, 61, 62] folgendermaßen vorgegangen:

1. Entnahme von 8 ml Blut aus der positiven Blutkulturflasche.
2. Zentrifugation für 10 Minuten bei 800 U/min.
3. Überstand in ein neues Reaktionsgefäss.
4. Zentrifugation für 5 Minuten bei 3000 U/min.
5. Verdünnung des Niederschlages mit 0,9 % NaCl-Lösung.

Von dieser Suspension wurden dann je 10 µl auf einen Objektträger pipettiert, luftgetrocknet, in Methanol für 10 Minuten fixiert und die FISH mit der Sonde SalYer 1705 und Kompetitor wie in 2.2.5. beschrieben durchgeführt.

2.2.13. Statistische Analyse

2.2.13.1. Berechnung der Sensitivität und Spezifität der einzelnen Sonden

Zunächst muss eine Vierfeldertafel für jede Sonde aufgestellt werden. Dabei wurde das folgende Schema befolgt:

Tab. 10: Beispiel einer Vierfeldertafel zur Berechnung der Sensitivität und Spezifität der FISH (Fluoreszenz in situ Hybridisierung)

	Positiver Salmonellennachweis in der Kultur (a+c)	**Negativer Salmonellennachweis in der Kultur (b+d)**
FISH positiv (a+b)	richtig positiv (a)	falsch positiv (b)
FISH negativ (c+d)	falsch negativ (c)	richtig negativ (d)

Diagnostische Sensitivität

Die Sensitivität wird nach der folgenden Formel berechnet: **a / (a+c)**
Unter Sensitivität versteht man die Wahrscheinlichkeit, dass eine vorhandene Krankheit auch als solche erkannt wird (Richtig-Positiv-Rate).

Diagnostische Spezifität

Die Spezifität wird nach der folgenden Formel berechnet: **d / (b+d)**
Unter Spezifität versteht man die Wahrscheinlichkeit, dass bei einem gesunden Menschen keine Krankheit fälschlicherweise diagnostiziert wird (Richtig-Negativ-Rate).

2.2.13.2. Speicherung und Auswertung der Daten

Alle Daten wurden in einer mit Microsoft Excel® erstellten Eingabemaske eingetragen und in zwei von einander getrennten Tabellen gespeichert. In der einen Tabelle waren die Keime nach Patientennummern, in der anderen nach dem Alphabet aufgelistet.

Wenn es bei einem Bakterium zu einer falsch positiven, bzw. falsch negativen Bindung kam, wurden die FISH insgesamt dreimal wiederholt um das Ergebnis zu verifizieren.

2.2.13.3. Stuhlversuche

Insgesamt wurden alle Versuchsreihen dreimal wiederholt und daraus Durchschnittswerte ermittelt. Diese Durchschnittswerte konnten graphisch dargestellt werden.

2.2.13.4. Versuch zur analytischen Sensitivität und Spezifität

Bei der konventionellen, kulturellen Nachweismethode wurde die Keimmenge als Kolonie bildende Einheiten (KBE), bzw. als Drei-Ösen-Ausstrich angegeben. Bei der FISH wurde die Bakterienanzahl mikroskopisch, wie in Tab. 9 beschrieben, ausgewertet. Die Kriterien der Auswertung der zwei Nachweismethoden wurden zwar objektiv festgelegt, waren aber nicht äquivalent.
Aus diesem Grund konnte eine exakte statistische Auswertung nicht durchgeführt werden.

3. Ergebnisse

3.1. Optimierung der Fixierungsverfahren

3.1.1. Fixierungsmethoden

Vor der Durchführung der FISH ist eine Fixierung der Keime notwendig, damit sie nicht bei den unterschiedlichen Schritten abgewaschen oder abgetötet werden. Durch diese Fixierung werden die Ribosomen „konserviert“ und die Bakterienwand für das Eindringen der Sonden durchlässiger gemacht. In der vorliegenden Promotionsarbeit wurden die Ausfällungsreaktion mittels Methanol und die Quervernetzungsreaktion mittels Aldehyden (PFA-Fixierung) eingesetzt. Es wurde untersucht, welche Fixierungsmethode sich am besten für die FISH-Darstellung von Enterobakterien eignet. Wegen der langen Fixierungsdauer von 30 - 60 Minuten und der aufwändigen Herstellung der 2 %-PFA-Fixierlösung wurde zunächst das kürzere und weniger aufwändige Verfahren der Methanolfixierung angestrebt. Dazu wurden drei *Salmonella* Enteritidis, eine *Salmonella* Typhimurium, eine *Serratia sp.* und eine *Citrobacter sp.* sowohl mittels Methanol- als auch mit der PFA-Fixierung nach dem im Methodenteil unter 2.2.4. beschriebenen Ablauf fixiert. Nach der Durchführung der FISH wurde sowohl die Fluoreszenzintensität der Sonden als auch die Lage der Keime auf dem Objektträger überprüft.

Bei der PFA-Fixierung waren alle Keime gleichmäßig auf dem Objektträger verteilt. Bei der Methanolfixierung waren die Keime in 4 von 6 Fällen nur noch verklumpt am Objektträgerrand auffindbar.

Tab.11: Vergleich der verschiedenen Fixierungsarten.

Bakterien-spezies	**Fixierungsarten**			
	PFA 2 %		**Methanol**	
	Helligkeit (FI) (Sal 3 Cy3)	**Verteilung**	**Helligkeit (FI)** (Sal 3 Cy3)	**Verteilung**
San	5	gleichmäßig	4	Keime am OT-Rand
San	5	-``-	4	-``-
San	4	-``-	4	-``-
Tm	5	-``-	4	gleichmäßig
Serratia sp.	0	-``-	0	gleichmäßig
Citrobacter sp.	0	-``-	0	Keime am OT-Rand

Die Fluoreszenzintensität wurde mit Zahlen von 0 (keine Fluoreszenz) bis 5 (stärkste Fluoreszenz) angegeben. Als FISH-Sonde wurde die Spezies-spezifische Sonde Sal 3 [37] verwendet. San: *Salmonella* Enteritidis, tm: *Salmonella* Typhimurium, *sp:* Spezies, PFA: Paraformaldehyd, FI: Fluoreszenzintensität, Cy3: 5,5`-Disulfo-1,1`-di (X-Carbo-pentynyl)-3,3,3`,3`-tetramethyindolo-carbocyanin-N-hydroxy-succimid-ester, OT: Objektträger. Die Patientennummern wurden aus Gründen des Datenschutzes weggelassen.

3.1.2. Fixierungsdauer

Bei der FISH-Technik handelt es sich um ein schnelles Nachweisverfahren. Aus diesem Grund ist auch eine Verkürzung der Vorbereitungszeit der Präparate erstrebenswert. Hierfür wurden Präparate anhand ihrer Fixierungsdauer untersucht. Die anfänglich festgelegte Fixierzeit der 2 % PFA-Fixierlösung von 60 Minuten konnte auf 30 Minuten reduziert werden, da auch bei dieser kürzeren Fixierungszeit noch genügend Keime auf den Objektträgern nach Durchführung der FISH vorhanden waren.
Beim Direktnachweis von Salmonellen aus Patientenstühlen wurde wegen der vorhandenen Begleitflora aber weiterhin eine Fixierungszeit von 60 Minuten vorgezogen.

3.1.3. Entwässerungsversuche

Vor der Durchführung einer FISH müssen die bereits fixierten Präparate üblicherweise in einer aufsteigenden Alkoholreihe für je 3 Minuten entwässert werden. Das macht bei den Alkoholkonzentrationen von 50 %, 80 % und 100% insgesamt eine Entwässerungszeit von 9 Minuten. Da bei der diagnostischen FISH ein möglichst einfacher, schneller Keimnachweis angestrebt wird, wurden Versuche durchgeführt, ob schon eine alleinige Entwässerung mit 100 % Alkohollösung für 3 Minuten ausreicht, oder ob man auf die gesamte Entwässerung verzichten kann.
Dafür wurden entwässerte und nicht entwässerte Präparate nach Ablauf der FISH miteinander verglichen. Die Präparate waren auch ohne den Entwässerungsschritt den herkömmlichen Präparaten nicht unterlegen, so dass bei Durchführung eine FISH bei Präparaten aus klinischen Isolaten auf den Schritt der Entwässerung verzichtet werden kann.

3.1.4. Stabilität von Sondenmischungen

Da die Herstellung der FISH-Mischung (Hybridisierungspuffer, Sonden (Sal, EUB), Kompetitor) viel Zeit in Anspruch nimmt, wurde untersucht, wie lange eine größere Menge an vorgefertigter Sondenlösung gekühlt aufbewahrt werden konnte, ohne auszubleichen. Dabei wurde über ein halbes Jahr lang alle vier Wochen sowohl bei Zielorganismen *(Salmonella* spp.) als auch bei anderen Enterobakterien mit dieser Sondenmischung eine FISH durchgeführt und sowohl die Fluoreszenzintensität der Salmonellensonde als auch die Fluoreszenzintensität der eubakteriellen Sonde bewertet.

Erst nach 7 Monaten war eine leichte Abnahme der Fluoreszenintensität (FI) der Salmonellensonde zu verzeichnen. Die FI der eubakteriellen Sonde nahm hingegen schon nach 2 Monaten leicht ab, blieb dann aber auf einem stabilen Niveau (FI 3 - 4).
Für Präparate aus klinischen Isolaten konnte somit zur Zeitersparnis eine vorher angesetzte Sondenmischung verwendet werden. Für die Direktpräparate wurden aber weiterhin frische Sondenlösungen angesetzt, da diese aufgrund der geringen Materialmenge (Durchfallstuhl) im Zweifelsfall schlechter reproduzierbar waren und deshalb hierfür nur unter idealen Bedingungen gearbeitet wurde.

3.2. Design und Auswahl der Sonden

Salmonellen sind in ihrer Basensequenz anderen Enterobakterien wie z. B. *Escherichia coli, Shigella spp.* oder *Citrobacter spp*. sehr nah verwandt. Daher gehen Salmonellensonden sehr oft mit diesen Kreuzbindungen ein. Ziel dieser Promotionsarbeit war es, eine Sonde zu entwickeln, die es ermöglicht, *Salmonella* spp. am sensitivsten und spezifischsten zu identifizieren. Um diese Sonde zu erhalten, wurde ein großer Sondensatz an Salmonellensonden mit Hilfe der ARB-Software entworfen (www.arb-home.de) und die drei Sonden Sal 1 [51], Sal 3 [37] und Sal 544 [16] aus der Literatur entnommen.
Bei jeder Sonde wurde zunächst die optimale Formamidkonzentration ermittelt und die Sonde bei dieser Konzentration an Referenzstämmen und klinischen Isolaten evaluiert. Sobald eine Sonde eine geringe Sensitivität oder Spezifität aufwies, wurde sie aus dem Sondensatz entfernt. Alle Sonden mit der dazugehörigen Basensequenz sind im Abschnitt 2.1.7. des Materialteils aufgeführt.

3.3. Bestimmung der Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer

Vor der Anwendung der Sonden an klinischen Isolaten ist die Bestimmung der optimalen Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer von Nöten. Hierfür wurden für jede Sonde Formamidverdünnungsreihen aufgestellt, um die Konzentration zu ermitteln, bei denen die Sonde optimal am Zielorganismus bindet und noch keine Kreuzbindung an Nicht-Zielorganismen aufweist.
Je höher die Formamidkonzentration ist, desto schwächer ist die Bindung der Sonde an den Zielorganismus und desto geringer ist das Risiko einer unspezifischen Bindung an Nicht-Zielorganismen.
Die Bewertung der Fluoreszenzintensität bei korrektem Bindungsverhalten der Sonden mit ihren Zielorganismen erfolgte mit Zahlen von 0 bis 5, wie in Abb. 5 im Methodenteil

beschrieben. Zum Nachweis, ob die FISH überhaupt funktioniert hat, wurde zusätzlich zur untersuchten Sonde noch eine übergreifende Sonde (EUB338) verwendet.

Alle Sonden bis auf Sonde Sal 821 zeigten bei steigender Formamidkonzentration eine Abnahme der Bindungsstärke (Tab.12). Die Sonde Sal Ari tm zeigte wiederholt bei keiner Formamidkonzentration eine positive Reaktion und wurde somit aus dem Sondenschema entfernt.

Zusammenfassend ergab sich für die Sonden Sal 331, SalYer 1705, Sal 263 und Sal 821 eine gute Bindung bei 30 % Formamidkonzentration. Somit konnte für diese Sonden ein einheitlicher Hybridisierungspuffer mit einer Formamidkonzentration von 30 % gewählt werden, was für die Anwendung der FISH unter Routinebedingungen in der Diagnostik hilfreich sein kann.

Für die bereits evaluierten Sonden Sal 1, Sal 3 und Sal 544 wurden keine Verdünnungsreihen aufgestellt, da die Formamidkonzentration bereits in der Literatur mit 10 % angegeben war [16, 37, 51].

Tab.12: Bindungsverhalten am Zielorganismus bei unterschiedlichen Formamidkonzentrationen

Sonden	**Formamidkonzentration**				
	10 %	**20 %**	**30 %**	**40 %**	**50 %**
Sal 23S 331	5	5	**5**	4	4
SalYer 23S 1705	5	5	**5**	4	4
Sal 23S 263	5	5	**5**	4	4
Sal 16S 821	5	5	**5**	5	5
Sal 335	**3**	2	1	1	0
Sal Ari tm 23S	**1**	-	-	-	-
Sal 1, 3, 544	10 % [16, 37, 51]				

Die Zahlen 0 bis 5 geben die Helligkeit (FI) an, mit der die Sonden an den Keimen gebunden haben (0 = keine Fluoreszenz, 5 = beste Fluoreszenz). Die rot unterlegten Fluoreszenzintensitäten markieren die festgelegten Formamidkonzentrationen der jeweiligen Sonden. Alle Sonden mit der dazugehörigen Basensequenz sind in Abschnitt 2.1.7. des Materialteils aufgeführt.

3.4. Evaluierung der Sonden

Nachdem die optimale Formamidkonzentration für jede Sonde festgelegt worden war, konnte die Auswahl an Sonden an Referenzstämmen und an klinischen Isolaten evaluiert werden.

Zusätzlich zu der getroffenen Auswahl an Cy3-markierten übergreifenden Sonden wurde eine FITC-markierte eubakterielle Sonde (EUB 338) zur Kontrolle eingesetzt.

3.4.1. Evaluierung der Sonden an Referenzstämmen

Die selbst entworfenen Sonden Sal 331 und SalYer 1705 wurden an 11 Referenzstämmen evaluiert.

Zunächst kam es dabei zu einigen Kreuzreaktionen mit anderen Enterobakterien. Nach Einführung eines Kompetitors (2.1.7.3. im Materialteil) haben beide Sonden richtig positiv reagiert und es kam zu keiner Kreuzbindung (Tab. 13) mehr. Die FISH-Ergebnisse waren alle eindeutig positiv und von einer leichten unspezifischen Autofluoreszenz klar abzutrennen. Die Sensitivität und Spezifität beträgt bei beiden Sonden 100 %.

Tab.13 :Evaluierung der Sonden an Referenzstämmen.

Nummer	**Spezies**	**Sal 23S 331 + Komp.**	**SalYer 23S 1705 +Komp.**
ATCC 13311	*Salmonella* Chelax Suis	5	5
ATCC 8090	*Citrobacter freundii*	0	1
ATCC XX	*Arcobacter sp.*	0	-
ATCC 25922	*E. coli*	0	-
ATCC 35218	*E. coli*	0	0
ATCC 13048	*Enterobacter aerogenes*	0	1
ATCC 35657	*Klebsiella pneumonie*	0	1
ATCC 700603	*Klebsiella sp.*	0	1
ATCC 29906	*Proteus mirabilis*	0	1
ATCC 27853	*Pseudomonas aeruginosa*	0	1
DSM 9676	*Yersinia entercolitica*	0	0

Die Zahlen 0 bis 5 geben die Helligkeit an, mit der die Sonden an den Keimen gebunden haben (0 = keine Fluoreszenz, 5 = beste Fluoreszenz). Bei den Sonden Sal 331 und SalYer 1705 handelt es sich um Spezies-spezifische Sonden. Die Kompetitoren wurde zur Erhöhung der Spezifität entwickelt. *E. coli: Escherichia coli*, ATCC: American Type Culture Collection, DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Komp.: Kompetitor.

3.4.2. Evaluierung der Sonden an klinischen Isolaten

Im nächsten Schritt wurde die Evaluierung der Sonden Sal 331, SalYer 1705 und Sal 3 an über 300 klinischen Isolaten durchgeführt. Die FISH wurde geblindet durchgeführt und bei Stämmen mit atypischem Reaktionsmuster dreimal wiederholt. Bei diskrepanten Ergebnissen zwischen der FISH und der Biochemie wurde zusätzlich der biochemische Nachweis im Anschluss wiederholt. Dabei konnte in einem Fall auch eine *Salmonella* sp. als solche bestätigt werden, die durch die Biochemie zunächst fälschlicherweise als *Citrobacter sp.* identifiziert wurde.

Abb. 9 zeigt das Bindungsverhalten der Sonde Sal 331. Diese konnte alle 110 *Salmonella* spp. bis auf eine *Salmonella* Typhimurium eindeutig nachweisen. Diese *Salmonella* Typhimurium konnte auch weder von der Sonde SalYer 1705, noch von der Sonde Sal 3 korrekt identifiziert werden. Der Versuch, diese *Salmonella* Typhimurium zu subkultivieren, gelang nicht mehr und das FISH-Ergebnis konnte somit nicht mehr reproduziert werden. Mit zwei *Citrobacter spp.* ging die Sonde Sal 331 eine Kreuzbindung ein. An alle anderen Enterobakterien hat diese Sonde nicht gebunden. Insgesamt wurde für diese Sonde eine Sensitivität und Spezifität von 99 % errechnet.

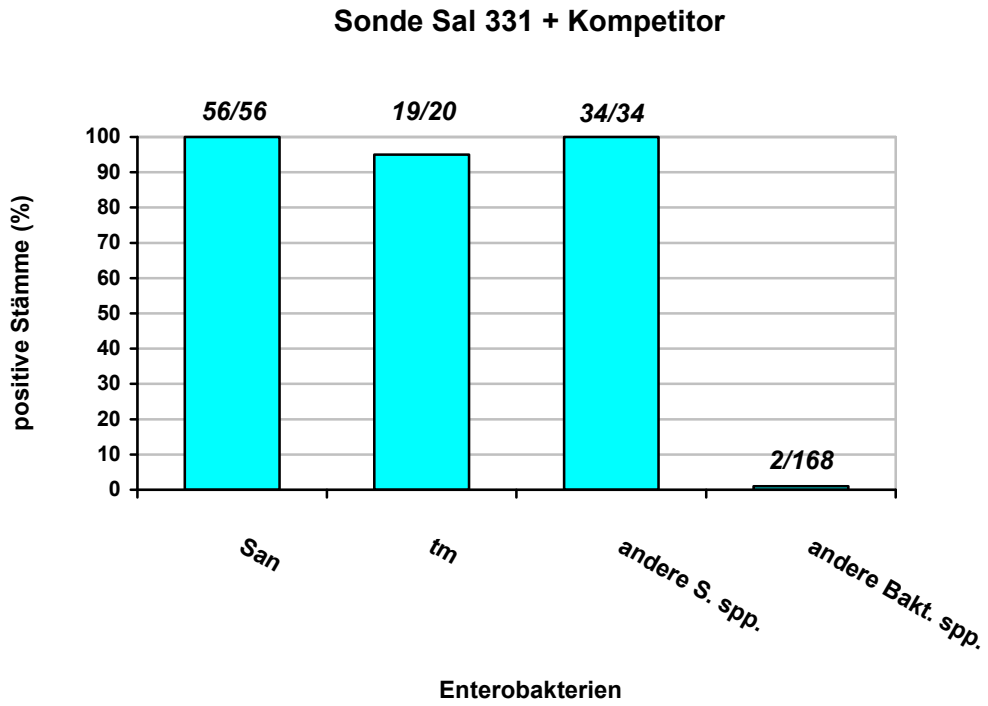


Abb. 9: Bindung der *S. enterica*-Sonde Sal 331 an Enterobakterien. Die Abb. gibt die Anzahl der Salmonellen, bzw. anderer Enterobakterien (in %, sowie numerisch) an, die die Sonde gebunden haben. Der Kompetitor wurde zur Erhöhung der Spezifität entwickelt. San: *S.* Enteritidis, tm: *S.* Typhimurium, *S.: Salmonella*, spp.: Spezies, Bakt.: Bakterien.

Die Sonde SalYer 1705 konnte ebenfalls diese eine *Salmonella* Typhimurium nicht korrekt identifizieren. Alle anderen 104 *Salmonella* spp. wurden eindeutig nachgewiesen. Sie ging eine Kreuzreaktion mit einer *Hafnia sp.*, einer *Shigella sp,* einer *Citrobacter sp.* und einer *Serratia sp.* ein. Für diese Sonde ergaben sich eine Sensitivität von 99 % und eine Spezifität von 98 %.

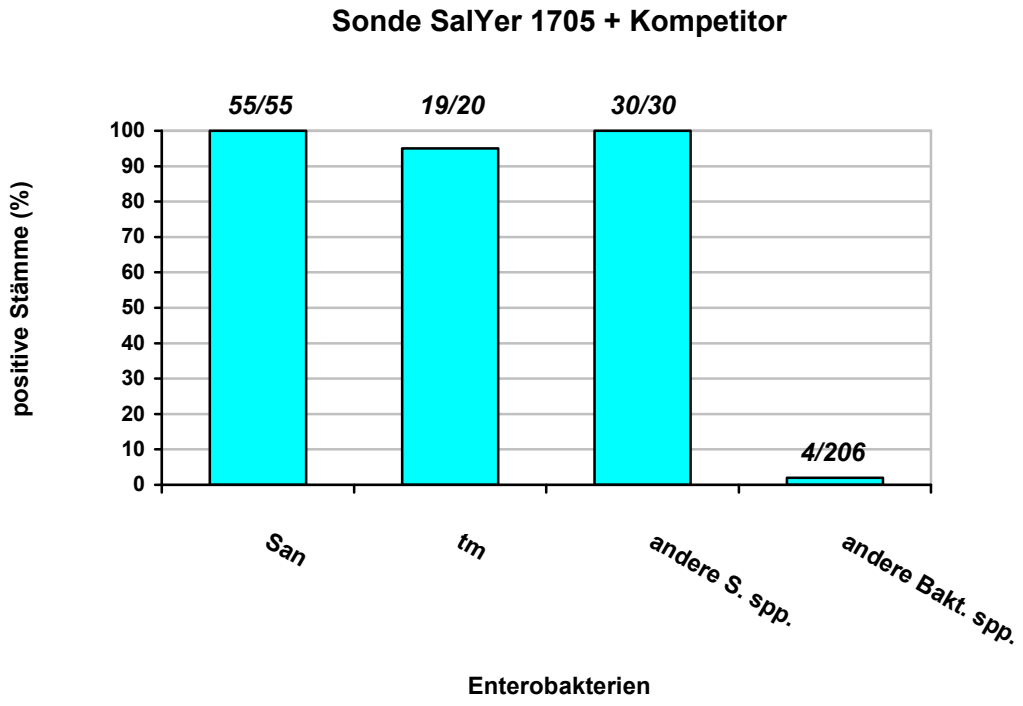


Abb.10: Bindung der *S. enterica*-Sonde SalYer 1705 an Enterobakterien. Die Abb. gibt die Anzahl der Salmonellen, bzw. anderer Enterobakterien (in %, sowie numerisch) an, die die Sonde gebunden haben. Der Kompetitor wurde zur Erhöhung der Spezifität entwickelt. San: *S.* Enteritidis, tm: *S.* Typhimurium, *S.: Salmonella*, spp.: Spezies, Bakt.: Bakterien.

Die bereits publizierte Sonde Sal 3 [37] wies eine Sensitivität von 97 % und eine Spezifität von 99 % auf. Sie konnte ebenfalls diese eine *Salmonella* Typhimurium, sowie zwei *Salmonellae* Enteritidis nicht nachweisen und ging eine Kreuzbindung mit einer *Serratia sp.* ein.

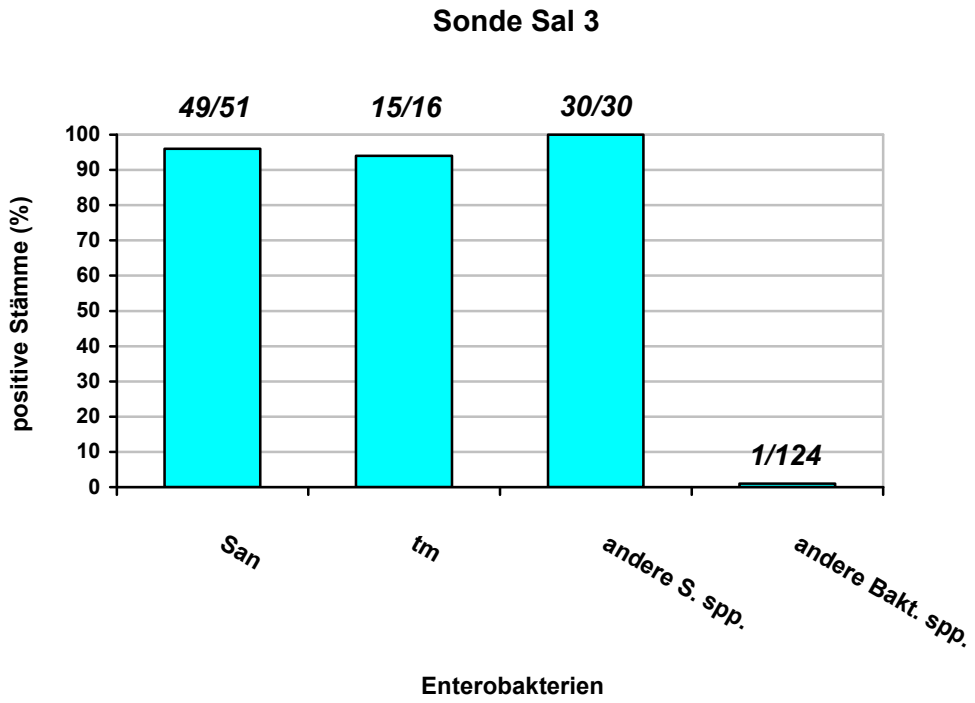


Abb.11: Bindung der *S. enterica*-Sonde Sal 3 [37] an Enterobakterien. Die Abb. gibt die Anzahl der Salmonellen, bzw. anderer Enterobakterien (in %, sowie numerisch) an, die die Sonde gebunden haben. San: *S.* Enteritidis, tm: *S.* Typhimurium, *S.: Salmonella*, spp.: Spezies, Bakt.: Bakterien.

3.4.3. Evaluierung der nicht weiter verwendeten Sonden an klinischen Isolaten

Einige der selbstentworfenen Sonden und die bereits publizierten Sonden Sal 544 [16] und Sal 1 [51] zeigten eine niedrige Sensitivität und Spezifität.
Die folgenden Tabellen zeigen das Bindungsverhalten der jeweiligen Sonde.
Die Abb. 12 und Abb. 13 stellen das Bindungsverhalten all dieser Sonden graphisch dar.

3.4.3.1. Sonde Sal 1

Die bereits publizierte Sonde Sal 1 [51] hat eine *Salmonella* arizonae nicht korrekt identifiziert und ging mit 12 weiteren Enterobakterien Kreuzbindungen ein. Damit lässt sich für diese Sonde eine Sensitivität von 99 % und eine Spezifität von 50 % berechnen.

Tab.14: Evaluierung der Sonde Sal 1 [51] an Enterobakterien.

Bakterienspezies	**Sal 1**	
	Anzahl	**%**
Salmonella Enteritidis	10/10	100
Salmonella Typhimurium	3/3	100
Salmonella Infantis	1/1	100
Salmonella Paratyphi B	2/2	100
Salmonella spp. Unklassifiziert	5/5	100
Andere *Salmonella* spp.	11/12	92
Citrobacter spp.	1/2	50
Escherichia coli	6/7	86
Hafnia	0/2	0
Klebsiella oxytoca	1/2	50
Klebsiella pneumoniae	1/1	100
Morganella spp.	1/2	50
Proteus spp.	2/3	67
Pseudomonas spp.	0/2	0
Serratia spp.	0/2	0
Shigella spp.	0/1	0
Enterobakterien non *Salmonella*	**12/24**	**50**
Salmonella	**32/33**	**99**

Die Zahlen in der linken Spalte geben die Anzahl von positiven Bindungen der Sonde Sal 1 pro Bakterienspezies an. Die Zahlen in der rechten Spalte demonstrieren das Bindungsverhalten an den jeweiligen Stämmen in %. spp.: Spezies, FI: Fluoreszenzintensität.

3.4.3.2. Sonde Sal 263

Die Sonde Sal 263 konnte jede Salmonelle richtig identifizieren, ging aber mit 7 von 11 anderen Enterobakterien eine Kreuzbindung ein. Jede *Escherichia coli* wurde fälschlicherweise als *Salmonella* spp. identifiziert. Auch ein dazu entwickelter Kompetitor konnte diese Kreuzbindungen nicht vermindern.
Zusammenfassend konnte für diese Sonde eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 36 % berechnet werden.

Tab.15: Evaluierung der Sonde Sal 263 an Enterobakterien.

Bakterienspezies	**Sal 263 + Komp.**	
	Anzahl	**%**
Salmonella Enteritidis	14/14	100
Salmonella Typhimurium	4/4	100
Salmonella Infantis	1/1	100
Salmonella Paratyphi B	2/2	100
Salmonella spp. Unklassifiziert	5/5	100
Andere *Salmonella* spp.	12/12	100
Arcobacter spp.	0/1	0
Citrobacter spp.	1/1	100
Escherichia coli	4/4	100
Hafnia	0/1	0
Klebsiella pneumoniae	1/1	100
Pseudomonas spp.	0/2	0
Shigella spp.	1/1	100
Enterobakterien non *Salmonella*	**7/11**	**64**
Salmonella	**38/38**	**100**

Die Zahlen in der linken Spalte geben die Anzahl von positiven Bindungen der Sonde Sal 263 pro Bakterienspezies an. Die Zahlen in der rechten Spalte demonstrieren das Bindungsverhalten an den jeweiligen Stämmen in %. Der Kompetitor wurde zur Verminderung einer Kreuzreaktion mit anderen Enterobakterien entwickelt. spp.: Spezies, FI: Fluoreszenzintensität.

3.4.3.3. Sonde Sal 821

Die Sonde Sal 821 konnte eine *Salmonella* arizonae nicht korrekt nachweisen und 10 von 21 Keimen wurden trotz Kompetitor als falsch positiv identifiziert. Besonders *Escherichia coli* und *Klebsiella spp*. gingen Kreuzbindungen mit dieser Sonde ein.
Es ließ sich für diese Sonde eine Sensitivität von 97 % und eine Spezifität von 52 % errechnen.

Tab.16: Evaluierung der Sonde Sal 821 an Enterobakterien.

Bakterienspezies	**Sal 821 + Komp.**	
	Anzahl	**%**
Salmonella Enteritidis	13/13	100
Salmonella Typhimurium	4/4	100
Salmonella Infantis	1/1	100
Salmonella Paratyphi B	2/2	100
Salmonella spp. Unklassifiziert	5/5	100
Andere Salmonella spp.	11/12	92
Arcobacter spp.	0/1	0
Candida spp.	0/1	0
Citrobacter spp.	1/1	100
Escherichia coli	4/5	80
Hafnia	0/1	0
Klebsiella oxytoca	1/2	50
Klebsiella pneumoniae	2/2	100
Morganella spp.	0/1	0
Proteus spp.	0/2	0
Pseudomonas spp.	0/2	0
Serratia spp.	2/2	100
Shigella spp.	0/1	0
Enterobakterien non *Salmonella*	**10/21**	**48**
Salmonella	**36/37**	**97**

Die Zahlen in der linken Spalte geben die Anzahl von positiven Bindungen der Sonde Sal 821 pro Bakterienspezies an. Die Zahlen in der rechten Spalte demonstrieren das Bindungsverhalten an den jeweiligen Stämmen in %. Der Kompetitor wurde zur Verminderung einer Kreuzreaktion mit anderen Enterobakterien entwickelt. spp.: Spezies, FI: Fluoreszenzintensität.

3.4.3.4. Sonde Sal 335

Die Sonde Sal 335 konnte eine *Salmonella* enteritidis und eine *Salmonella* typhimurium nicht nachweisen, ging aber mit den zwei anderen getesteten Spezies keine Kreuzbindung ein. Die Fluoreszenzintensität war bei dieser Sonde mit einem Wert von 3 aber sehr gering, so dass auf eine weitere Evaluierung dieser Sonde verzichtet wurde.
Insgesamt konnte für diese Sonde eine Sensitivität von 50 % und eine Spezifität von 100 % errechnet werden.

Tab.17: Evaluierung der Sonde Sal 335 an Enterobakterien.

Bakterienspezies	**Sal 335**	
	Anzahl	**%**
Salmonella Enteritidis	2/3	67
Salmonella Typhimurium	0/1	0
Escherichia coli	0/1	0
Serratia spp.	0/1	0
Enterobakterien non *Salmonella*	**0/2**	**100**
Salmonella	**2/4**	**50**

Die Zahlen in der linken Spalte geben die Anzahl von positiven Bindungen der Sonde Sal 335 pro Bakterienspezies an. Die Zahlen in der rechten Spalte demonstrieren das Bindungsverhalten an den jeweiligen Stämmen in %. spp.: Spezies, FI: Fluoreszenzintensität.

3.4.3.5. Sonde Sal 544

Die publizierte Sonde Sal 544 [16] hat an keine der 26 getesteten *Salmonella* spp. gebunden und es kam somit nur zu falsch negativen Ergebnissen. Dadurch ergibt sich eine Sensitivität von 0 %. Allerdings hat sie auch an keine der drei anderen Enterobakterien gebunden, wodurch eine Spezifität von 100 % besteht. Wegen der mangelnden Sensitivität dieser Sonde wurde sie frühzeitig ausselektiert und nicht an weiteren Enterobakterien evaluiert.

Tab.18: Evaluierung der Sonde Sal 544 [16] an Enterobakterien.

Bakterienspezies	**Sal 544**	
	Anzahl	**%**
Salmonella Enteritidis	0/7	0
Salmonella Typhimurium	0/3	0
Salmonella Infantis	0/1	0
Salmonella spp. unklassifiziert	0/4	0
Andere *Salmonella* spp.	0/11	0
Hafnia spp.	0/1	0
Pseudomonas spp.	0/1	0
Shigella spp.	0/1	0
Enterobakterien non *Salmonella*	**0/3**	**100**
Salmonella	**0/26**	**0**

Die Zahlen in der linken Spalte geben die Anzahl von positiven Bindungen der Sonde Sal 544 pro Bakterienspezies an. Die Zahlen in der rechten Spalte demonstrieren das Bindungsverhalten an den jeweiligen Stämmen in %. spp.: Spezies, FI: Fluoreszenzintensität.

3.4.3.6. Sonde Sal Ari tm

Diese Sonde wurde entwickelt, da eine *Salmonella* Typhimurium von allen Sonden nicht erfasst wurde. Allerdings hat auch diese Sonde 7 von 7 getesteten *Salmonella* Typhimurium nicht erfasst. Für diese Sonde ergibt sich somit eine Sensitivität von 0 %. Sie wurde deswegen auch nicht an weiteren Enterobakterien evaluiert.

Die folgenden Abbildungen (Abb. 12 und Abb. 13) geben graphisch das Bindungsverhalten aller nicht verwendeter Sonden in der Gesamtübersicht wieder.

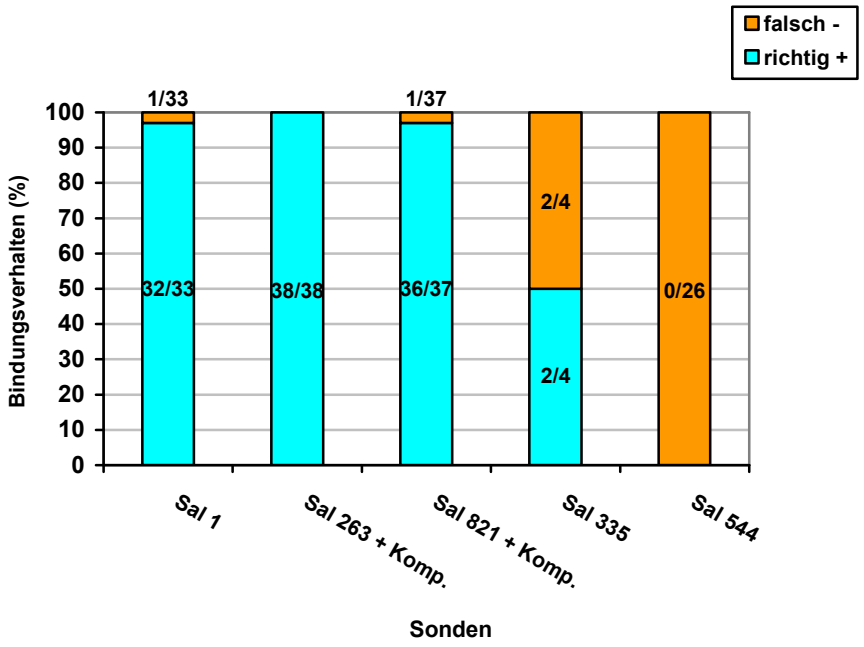


Abb.12: Diese Abb. demonstriert das Bindungsverhalten der nicht verwendeten Sonden in %. Die blauen Balken demonstrieren richtig positive Ergebnisse, d.h. wie viele *Salmonella* spp. von den jeweiligen Sonden auch als solche erkannt wurden. Die orangenen Balken zeigen falsch negative Resultate, d.h. wieviele *Salmonella* spp. nicht als solche erkannt wurden. Die Zahlen in den Balken geben die genaue Anzahl der untersuchten Stämme an. Alle Sonden mit der dazugehörigen Basensequenz sind in Abschnitt 2.1.7. des Materialteils aufgeführt.

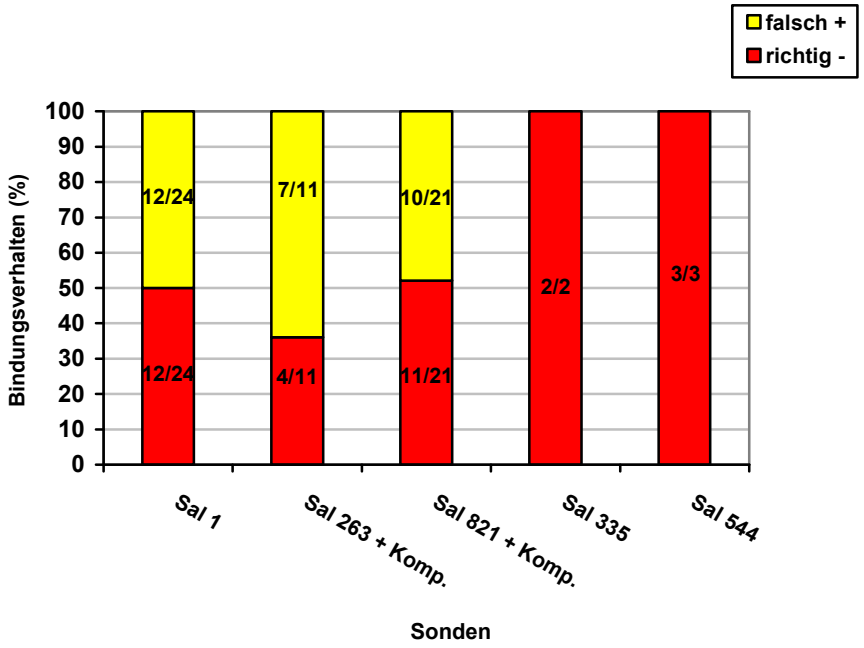


Abb.13: Diese Abb. demonstriert das Bindungsverhalten der nicht verwendeten Sonden in %. Die roten Balken demonstrieren richtig negative Resultate, d.h. wie viele Enterobakterien (in %) mit den jeweiligen Salmonellen-Sonden korrekterweise keine positive Bindung eingegangen sind. Die gelben Balken zeigen falsch positive Resultate, d.h. wieviele Enterobakterien mit den Sonden eine Kreuzreaktion eingegangen sind. Die Zahlen in den Balken geben die genaue Anzahl der untersuchten Stämme an. Alle Sonden mit der dazugehörigen Basensequenz sind in Abschnitt 2.1.7. des Materialteils aufgeführt.

3.5. Evaluierung der Methode FISH zum Nachweis von *Salmonella* spp. aus Patientenstuhl

Nach der Evaluierung der Sonden an klinischen Isolaten erfolgte im nächsten Schritt der direkte Nachweis von *Salmonella* spp. in Patientenstuhlpräparaten.

3.5.1. Vorversuche zur Ermittlung der optimalen Zentrifugationsbedingungen

Da der Nachweis von Salmonellen aus dem Stuhl bis dato sehr zeit- und arbeitsintensiv war, wurde versucht, ein Verfahren zu entwickeln, welches den direkten Nachweis von Salmonellen aus dem Patientenstuhl vereinfacht. Anhand mehrerer Publikationen [6, 17, 19 - 21, 26, 32, 46, 57, 68] wurden die Parameter bestimmt, die bei der Stuhlaufbereitung eine wichtige Rolle spielen, wie z. B. die Stuhlkonsistenz, die Zentrifugationsbedingungen, die Fixierungsmethode, die Begleitflora, die Autofluoreszenz und das Alter des Stuhles.
Ziel der Versuche war es, Präparate mit möglichst vielen Bakterien und möglichst wenig Begleitflora und Autofluoreszenz auf den Objektträgern zu erhalten. Dafür wurden zunächst Vorversuche durchgeführt um die optimale Zentrifugationszeit und -geschwindigkeit herauszufinden, bei welcher sich nach Ablauf der Zentrifugation noch genügend Salmonellen in der Suspension befanden. Mittels niedrigtouriger Zentrifugation und Verwendung des Überstandes bei Verwerfen der Pellets sollten grobe Partikel aus der Stuhlprobe entfernt werden. Mittels hochtouriger Zentrifugation sollten anschließend die Bakterien im Pellet angereichert werden und der Überstand mit feinen Schwebestoffen verworfen werden. Für die Abreicherung der Stuhlprobe von groben Partikeln galt es also die maximale Geschwindigkeit zu ermitteln, bei der sich nach Ablauf der Zentrifugation ein Großteil der Salmonellen im Überstand befindet. Für die Entfernung der feinen Schwebestoffe sollte die niedrigste Geschwindigkeit ermittelt werden, bei welcher die Salmonellen im Pellet angereichert werden.
Hierfür wurde mit genau definierten Mengen an Salmonellen (2 Ösen) und PBS (8 ml) eine homogene Lösung hergestellt und insgesamt 25 verschiedene Zentrifugationszeiten und -geschwindigkeiten durchgeführt. Sowohl vom Überstand als auch vom Pellet wurden anschließend Präparate angefertigt und die Menge der Salmonellen mittels DAPI-Färbung ermittelt.
Dabei nahm die Bakterienzahl im Überstand mit steigender Zentrifugations-geschwindigkeit immer mehr ab, aber auch bei Geschwindigkeiten um 6000 U/min waren noch einige Keime auf dem Überstand auf dem Objektträger vorhanden. Auch durch die

Verlängerung der Zentrifugationszeit auf 5 Minuten konnte die Keimzahl auf den OT durch steigende Zentrifugationsgeschwindigkeiten reduziert werden.

Bei der Resuspension der Pellets nahm die Bakteriendichte in der Mischung mit steigender Zentrifugationsgeschwindigkeit zu. Bei den länger zentrifugierten Präparaten (5min R) nahm die Bakterienzahl schon bei geringeren Geschwindigkeiten zu.

Es konnte damit gezeigt werden, dass die Keimzahl in der PBS-Salmonellensuspension abhängig von der Zentrifugationsgeschwindigkeit und –zeit war.

Die besten Präparate, bei denen die Bakterien gleichmäßig und nicht überlagert auf den Objektträgern vorzufinden waren (Bakteriendichte 0), erhielt man bei Geschwindigkeiten zwischen 2600 und 3000 U/min und einer Zentrifugationszeit von 1 Minute. Auch bei den Präparaten aus den Niederschlägen zeigten diese Zentrifugationsbedingungen die besten Ergebnisse.

Insgesamt wurde diese Versuchsreihe dreimal durchgeführt und daraus Durchschnittswerte ermittelt. Abb. 14 stellt die Durchschnittswerte aus den drei durchgeführten Versuchen graphisch dar.

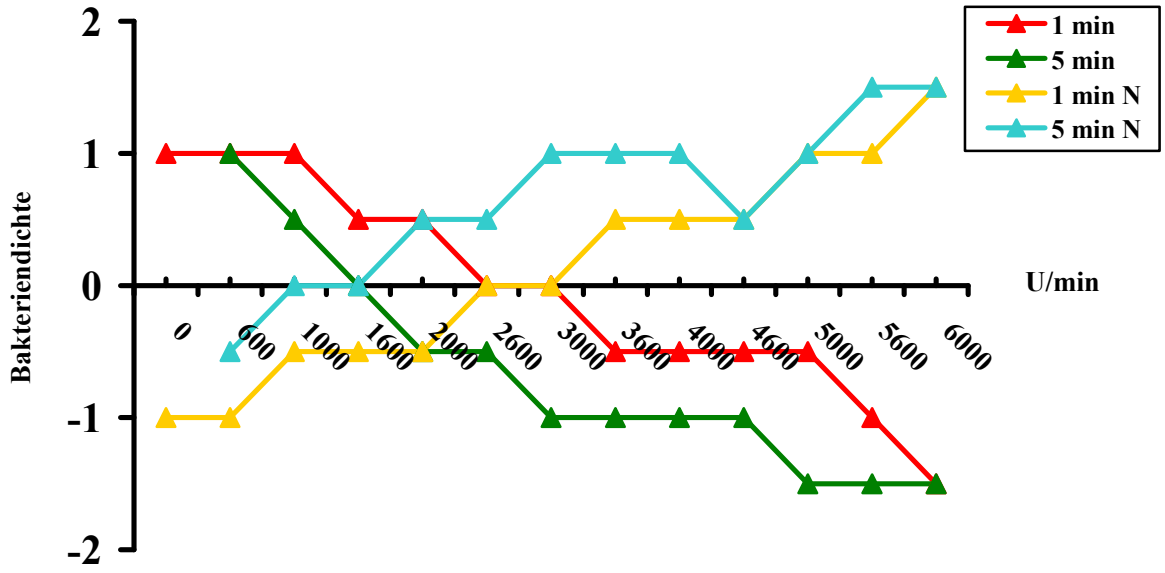


Abb.14: Nachweis von Salmonellen in steriler PBS. Die Bakteriendichte auf der y-Achse wird durch Zahlenwerte von -2 (keine Bakterien) bis +2 (Bakterien überlagert) angegeben. Auf der x-Achse sind die durchgeführten Zentrifugationsgeschwindigkeiten (U/min) aufgetragen. Die rote Linie stellt die Bakterienanzahl im Überstand nach 1 Minute Zentrifugation mit der jeweiligen Geschwindigkeit dar. Die grüne Linie steht für eine Zentrifugation von 5 Minuten Dauer. Die gelbe Linie gibt die Keimzahl wieder die sich in der Resuspension der Niederschläge der jeweiligen Zentrifugationsgeschwindigkeit nach 1 Minute auf den OT befunden hat. Die blaue Linie gibt die Anzahl in der Resuspension nach 5 Minuten wieder. Die Werte sind Durchschnittswerte aus den drei durchgeführten Versuchen. PBS: Phosphat buffered saline, OT: Objektträger.

3.5.2. Nachweis von Salmonellen aus gespikten Stuhlproben

Als nächster Schritt wurde versucht, Salmonellen direkt aus dem Stuhl nachzuweisen. Hierfür wurde Stuhl von gesunden Probanden nach dem in 2.2.9.2. im Methodenteil beschriebenen Verfahren verdünnt und mit einer genau definierten Menge einer Salmonellen-Suspension vermischt. Danach wurde die Zentrifugation nach den Bedingungen durchgeführt, die in den Vorversuchen die besten Resultate erbrachten. Dabei handelte es sich um Zentrifugationsgeschwindigkeiten von 2000 - 3600 U/min und einer Dauer von 1 Minute.

Von jedem Zentrifugationschritt wurden je 10 µl auf je einen Objektträger pipettiert und die FISH nach dem in 2.2.5. im Methodenteil beschriebenen Verfahren durchgeführt. Zur Auswertung wurde ein Protokoll (Abb. 7) verwendet. Insgesamt wurde diese Versuchsreihe drei Mal durchgeführt. Es konnte bei diesen Versuchen aber keine eindeutige Verbesserung der Qualität der Stuhlpräparate durch die Einführung eine Zentrifugation erzielt werden. Auch der Hintergrund wurde dadurch nicht wesentlich reduziert. Falls Salmonellen auf den Objekträgern aufzufinden waren, konnten diese in den meisten Fällen auch eindeutig von diesem Hintergrund unterschieden werden und eine Autofluoreszenz spielte eine eher untergeordnete Rolle.

Zusammenfassend konnte keine Verbesserung der Methode für die Stuhlaufbereitung durch die Einführung einer Zentrifugation erzielt werden, so dass bei den folgenden Versuchen auf dieses umständliche und zeitaufwändige Verfahren verzichtet wurde.

3.5.3. Versuch zur analytischen Sensitivität und Spezifität

Der kulturelle Nachweis von Salmonellen aus dem Durchfallstuhl ist immer noch der Goldstandard der Salmonellendiagnostik. Daher wurde in dieser Versuchsreihe die Sensitivität der FISH-Technik im Vergleich zur kulturellen Routinediagnostik dargestellt. Da die Versuche zur Stuhlaufbereitung keine signifikant besseren Präparate durch den Schritt der Zentrifugation erbrachten, wurde für diese Versuchsreihe der Einfachheit halber auf diesen verzichtet.

Im ersten Schritt wurde anhand einer Verdünnungsreihe von Salmonellen in PBS die Sensitivität der FISH errechnet. Im zweiten Schritt wurde mit diesen Verdünnungsstufen genau definierte Mengen an dünnflüssigem Stuhl gespikt und die FISH-Technik mit der Kultur unter Standardbedingungen verglichen.

Der Ablauf dieser Versuche ist im Methodenteil unter 2.2.10. beschrieben.

Bei der Herstellung einer Verdünnungsreihe zeigte sich, dass die Kultur der FISH um mehr als 4 Zehnerpotenzen überlegen war. In der FISH konnte nur bis zu einer Verdünnung von $2*10^{-2}$ OD Salmonellen nachgewiesen werden, in der Kultur bis zu einer Verdünnung von $>2*10^{-6}$ OD (Tab. 19).

Tab.19: Herstellung einer Verdünnungsreihe zum Vergleich der FISH mit der herkömmlichen Diagnostik (Blut-Agar mittels Glasperlen)

Bakteriendichte (OD)	**Kultur (KBE)**	**FISH (Anzahl pos. Bakterien)**
2×10^{-1}	>1000	+2
2×10^{-2}	>1000	+1
2×10^{-3}	>1000	-2
2×10^{-4}	>1000	-2
2×10^{-5}	>1000	-2
2×10^{-6}	245	-2

Da die Bakteriendichte in der Verdünnungsreihe photometrisch ermittelt wurde, ist sie hier in OD angegeben. KBE steht für Kolonie bildende Einheit und gibt an, wie viele Bakterienkolonien auf dem Blut-Agar gewachsen sind. Die Anzahl der Bakterien nach Durchführung der FISH wurde nach dem Bewertungsschema in Tab. 9 angegeben: -2 (keine Bakterien) bis +2 (Bakterien überlagert). OD: Optical density, KBE: Kolonie bildende Einheit, FISH: Fluoreszenz in situ Hybridisierung.

Beim Nachweis von Salmonellen aus den gespikten Stuhlproben war die Kultur der FISH nur noch um zwei Zehnerpotenzen überlegen. Allerdings waren bei der FISH auch bei einer Bakteriendichte von $4*10^{-3}$ nur wenige Keime auf den Objektträgern aufzufinden, während bei der Verdünnung von $4*10^{-5}$ noch 12 H_2S positive (schwarze) KBE, die für ein Salmonellenwachstum spezifisch sind, auf dem XLD-Agar aufzufinden waren.

Tab.20: Versuch zur analytischen Sensitivität und Spezifität zum Vergleich der FISH mit der herkömmlichen Diagnostik (XLD-Agar mittels Dreiösen-Ausstrich).

Bakteriendichte (OD)	**Kultur (Drei-Ösen-Ausstrich)**	**FISH**	
		Sal 331 + Komp.	**SalYer 1705 + Komp.**
4×10^{-2}	+++	0	0
4×10^{-3}	+++	-1	-1
4×10^{-4}	+++	-2	-2
4×10^{-5}	12 KBE	-2	-2
4×10^{-6}	-	-2	-2
4×10^{-7}	-	-2	-2
Nativstuhl	-	-2	-2

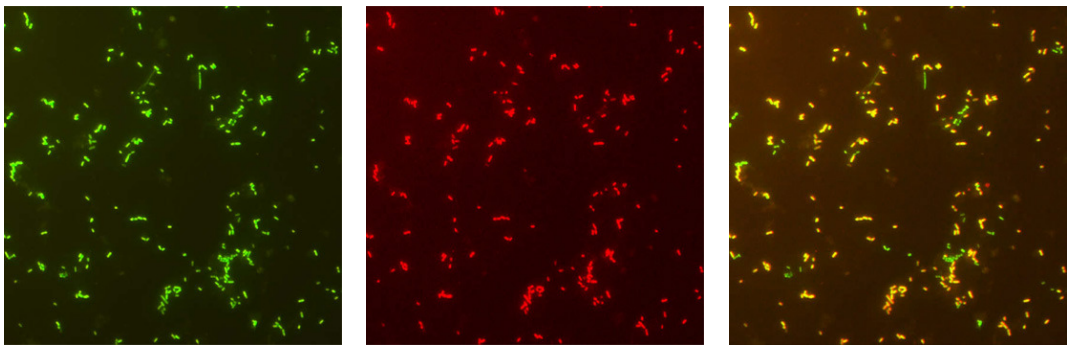
Da die Bakteriendichte in der Verdünnungsreihe photometrisch ermittelt wurde, ist sie hier in OD angegeben. +++ beim Drei-Ösen-Ausstrich bedeutet, dass bei allen drei Ausstrichen KBE aufzufinden waren. KBE gibt an, wie viele Bakterienkolonien auf dem XLD-Agar gewachsen sind. Die Anzahl der Bakterien nach Durchführung der FISH wurde nach dem Bewertungsschema in Tab. 9 angegeben: -2 (keine Bakterien) bis +2 (Bakterien überlagert). Bei den Sonden Sal 331 und SalYer 1705 handelt es sich um Spezies-spezifische Sonden. Die Kompetitoren wurden zur Erhöhung der Spezifität entwickelt. OD: Optical density, FISH: Fluoreszenz in situ Hybridisierung, XLD: Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar, Komp.: Kompetitor.

3.5.4. Direktnachweis von *Salmonella enterica* aus Durchfallstuhl

Es wurden 43 Patientenstühle, die in der Diagnostik als V.a. *Salmonella* Enteritis angemeldet waren, mittels FISH einfachblind getestet. Diese Stühle wurden direkt auf Objektträger ausgestrichen und in der 2 % PFA-Lösung für eine Stunde fixiert. Anschließend wurden sie im Gefrierschrank bis zur Durchführung der FISH gelagert.

Die Identifizierung von *Salmonella* spp. erfolgte in der Routinediagnostik nach dem im Einleitungsteil unter 1.5.1 beschriebenen Vorgehen.

Abb. 15 zeigt einen positiven *Salmonella*-Direktnachweis (Nr. 9 in Tab. 21) nach Durchführung einer FISH.



EUB 338 FITC [3] | Sal 331 Cy3 + Kompetitor | Overlay

Abb.15: Beispiel eines positiven *Salmonella*-Direktnachweises (Nr. 9 in Tab. 21). Bei der Sonde Sal 331 handelt es sich um Spezies-spezifische Sonde und bei der Sonde EUB 338 [3] um eine übergreifende Sonde. Der Kompetitor wurde zur Verminderung einer Kreuzreaktion mit anderen Enterobakterien entwickelt.

Zum besseren Vergleich der Ergebnisse der konventionellen Routinediagnostik und der FISH wurden zusätzlich noch die Keimmengen in der Routinediagnostik berücksichtigt.

Falls bereits in der Routinediagnostik die Keimlast sehr gering war, konnten auch nach Durchführung der FISH nicht viele Keime auf dem Objektträger vorhanden sein.

Tab. 21 zeigt für die untersuchten Durchfallstühle den Vergleich zwischen konventioneller Routinediagnostik und Anwendung der FISH-Technik.

34 der untersuchten Stühle wurden jeweils mit der Sonde Sal 331 und der Sonde SalYer 1705 und den dazugehörigen Kompetitoren hybridisiert um ein eindeutigeres Ergebnis zu erhalten.

Tab. 21: Direktnachweis von *Salmonella* spp. aus Durchfallstuhl.

Nr.	Keim	Diagnostik		FISH		Übereinstimmung
		Keimmenge		Fluoreszenzintensität		
		XLDAgar H_2S+	Blutagar	Sal 331 +Komp.	SalYer1705 + Komp.	
1	San	+++	+++	5	4	⊕
2	San	+	+++	4	2	⊖
3	San	+	+	4	4	⊕
4	San	+++	+++	4	4	⊕
5	San	+++	+++	4	-	⊕
6	San	+	++	5	-	⊕
7	San	+	++	5	-	⊕
8	San	+	+++	4	-	⊕
9	San	+	+++	4	-	⊕
10	San	+	+++	3	-	⊕
11	San	++	++	1	1	⊖
12	San	+	++	1	1	⊖
13	San	+	++	2	1	⊖
14	*S.* Infantis	+	+	0	-	⊖
15	*S.* sp.	+	++	5	-	⊕
16	*Campylo-bacter jejuni*	u.	++	1	1	⊕
17	*Citrobacter freundii*	u.	+++	0	0	⊕
18	PSA	++ rote KBE	++	5	4	⊖
19	*Shigella sp.*	+ rote KBE	++	0	0	⊕
20	PYD	u.	+++	0	0	⊕
21	PYD	u.	++	1	0	⊕
22	PYD	u.	+++	1	1	⊕
23	PYD	u.	+++	0	0	⊕
24	PYD	u.	+++	1	1	⊕
25	PYD	u.	++	1	2	⊕
26	PYD	u.	+	0	0	⊕
27	PYD	u.	+++	1	1	⊕
28	PYD	u.	+++	1	1	⊕
29	PYD	+ rote KBE	+++	0	2	⊕
30	PYD	u.	+++	1	1	⊕
31	PYD	u.	++	1	1	⊕
32	PYD	u.	++	0	0	⊕
33	PYD	u.	+++	1	1	⊕
34	PYD	u.	+++	4	3	⊖
35	PYD	u.	+++	0	0	⊕
36	PYD	u.	+++	3	3	⊖
37	PYD	u.	+++	1	1	⊕
38	PYD	u.	+++	1	0	⊕

39	PYD	u.	+++	1	0	⊕
40	PYD	u.	++	3	3	⊖
41	PYD	u.	+	1	1	⊕
42	PYD	u.	+	4	1	⊖
43	PYD	u.	+++	0	0	⊕

In der zweiten Spalte steht die in der konventionellen Routinediagnostik bestätigte Bakterienspezies, in der dritten Spalte, die kulturelle Auswertung auf den gebräuchlichen Agarmedien. Hierbei ist besonders das Selektivmedium XLD-Agar von Bedeutung, bei welchem sich Salmonellen als schwarze H_2S+-KBE darstellen. In der vierten Spalte ist die Fluoreszenzintensität der FISH mit den zwei verwendeten Spezies-spezifischen Sonden dargestellt. Diese ist aber nicht mit der Keimmenge zu verwechseln. Die Werte reichen dabei von 0 (keine Fluoreszenz) bis 5 (beste Fluoreszenz). In der fünften Spalte ist dargestellt, ob die Resultate der konventionellen Routinediagnostik mit der FISH übereinstimmen. ⊕ steht für eine Übereinstimmung, ⊖ zeigt Diskrepanzen zwischen den unterschiedlichen Nachweismethoden auf. San: *Salmonella* Enteritidis, *S.*: *Salmonella,* sp.: Spezies; PSA: Pseudomonas aeruginosa, PYD: Physiologische Darmflora, XLD: Xylose-Lysin-Desoxycholat, u.: unbewachsen, H_2S: Schwefelwasserstoff, KBE: Kolonie bildende Einheiten, FISH: Fluoreszenz in situ Hybrdisierung, Komp.: Kompetitor. Die Patientennummern wurden aus Gründen des Datenschutzes weggelassen.

Insgesamt konnten beim Direktnachweis 67 % der positiven Salmonellenstühle auch durch die FISH eindeutig identifiziert werden. 33 % wurden jedoch durch die FISH nicht nachgewiesen.

82 % der *Salmonella*-negativen Ergebnisse (XLD-Agar unbewachsen) konnten auch durch die FISH bestätigt werden. 18 % wurden durch die FISH fälschlicherweise als *Salmonella* spp. identifiziert.

Abb. 16 stellt dieses Ergebnis graphisch dar.

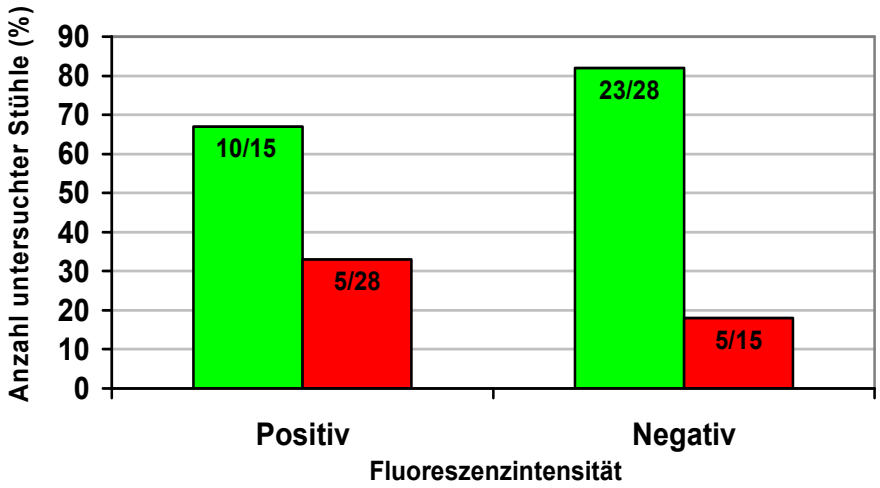


Abb.16: Auswertung des Direktnachweises. Grüne Balken demonstrieren ein richtiges Bindungsverhalten, rote ein falsches. Die Zahlen in den Balken geben die Anzahl der positiv oder negativ gebunden Bakterien im Verhältnis zur Gesamtanzahl der untersuchten Bakterien wieder. Der Bewertungsmaßstab der Fluoreszenzintensität reicht von 0 (keine Fluoreszenz) bis 5 (beste Fluoreszenz).

3.6. Direktnachweis von Salmonella enterica aus positiven Blutproben

Da sich die Salmonellen bei den typhösen Erkrankungen in der ersten Krankheitswoche nur im Blut und nicht im Stuhl nachweisen lassen, wurde der Versuch unternommen, diese auch direkt aus Blut nachzuweisen. Hierfür wurden Blutkulturen von Patienten nach dem im Methodenteil unter 2.2.12. beschriebenen Verfahren aufbereitet und danach direkt auf die Objektträger aufgetragen. Anschließend wurde nach dem herkömmlichen Schema die FISH mit der Sonde SalYer 1705 und Kompetitor durchgeführt. Insgesamt wurden 207 Blutkulturen untersucht. Hierbei kam es nur in einem Fall mit einer *Serratia sp.* zu einer Kreuzbindung. Alle fünf *Salmonella* spp. wurden auch als solche identifiziert.
Insgesamt ergab sich für diese Versuchsreihe eine Spezifität und Sensitivität von nahezu 100 %. In Tab. 22 sind die getesteten Bakterienspezies aufgelistet.

Tab.22: Bindungsverhalten der Sonde SalYer 1705 + Kompetitor an den jeweiligen Bakterienspezies.

		SalYer 1705+Komp. an Blutkultur nativ
Anzahl	**Bakterienspezies**	**Bindungsverhalten**
3	*Salmonella* Entertidis	⊕
1	*Salmonella* Bredeney	⊕
1	*Salmonella* Typhi	⊕
105	*Escherichia coli*	⊖
12	*Enterobacter cloacae*	⊖
7	*Enterobacter aerogenes*	⊖
1	*Enterobacter amnigenus*	⊖
1	*Enterobacter homachei*	⊖
1	*Morganella morganii*	⊖
4	*Citrobacter freundii*	⊖
3	*Citrobacter spezies*	⊖
22	*Klebsiella pneumoniae*	⊖
8	*Klebsiella oxytoca*	⊖
22	*Pseudomonas aeruginosa*	⊖
2	*Stenotrophomonas maltophilia*	⊖
6	*Acinetobacter spezies*	⊖
3	*Serratia marcescens*	⊖
1	*Serratia liquefaciens*	⊕
1	*Brevundimonas diminuta*	⊖
1	*Comamonas acidovorans*	⊖
1	*Flavimonas oryzihabitans*	⊖
1	*Moraxella osloensis*	⊖
207		

⊕ bedeutet ein positives Bindungsverhalten, ⊖ ein negatives. ⊕ bedeutet, dass die Sonde falsch positiv gebunden hat. Bei der Sonde SalYer 1705 handelt es sich um eine Spezies-spezifische Sonde. Der Kompetitor wurde zur Verminderung einer Kreuzreaktion mit anderen Enterobakterien entwickelt.

4. Diskussion

4.1. Auswahl und Evaluierung der Sonden

Die FISH-Technik wurde bereits für den Nachweis von Salmonellen aus Lebensmitteln beschrieben [16, 37, 51]. Die entsprechenden Sonden wurden bisher aber nicht für die Identifizierung von Patientenisolaten eingesetzt und Angaben zur Sensitivität und Spezifität fehlten. Ziel dieser Arbeit war es also, die FISH für die Identifizierung von *Salmonella enterica* aus humanen Isolaten einzusetzen.

Da die Enterobakterien in ihrer Basensequenz sehr nah verwandt und Kreuzreaktionen damit wahrscheinlich sind, wurde von vornherein eine ganze Palette Sonden getestet, um die am Besten geeigneten auszuwählen. Zusätzlich zu den bereits publizierten, aber nicht ausreichend evaluierten 23S rRNA Sonden Sal 1 [51], Sal 3 [37] und Sal 544 [16] wurden in dieser Arbeit 6 neue Sonden entwickelt und die Spezifität und Sensitivität dieser 9 Sonden durch Hybridisierung an Ziel- und Nichtzielorganismen ermittelt. Dabei zeigte sich, dass die Sonde Sal 3 und die zwei neu entwickelten 23S rRNA-Sonden Sal 331 und SalYer 1705 sehr sensitiv und spezifisch für *Salmonella enterica* waren. Die anderen 6 Sonden wurden wegen geringer Sensitivität und Spezifität aus dem Sondenschema entfernt.

4.1.1. Falsch positive Ergebnisse durch Kreuzreaktionen

Die Bindung von Sonden an Nicht-Zielorganismen ist eines der Hauptprobleme bei der FISH. Die Enterobakterien sind sehr nahe verwandt. Die Basenzusammensetzung der *Salmonella*-DNA ist z. B. mit 50 - 53 % GC-Gehalt der Basenzusammensetzung der am nächsten verwandten Spezies wie *Escherichia*, *Shigella* und *Citrobacter* [12] sehr ähnlich. Vergleiche von 16s rRNA und 23S rRNA Sequenzen haben *Escherichia*, *Shigella* und *Citrobacter* auch als nächstverwandte Spezies bestätigt [10].

Kreuzreaktionen sind daher sehr wahrscheinlich und kaum zu vermeiden. Eine Salmonellen-spezifische Sonde muss diese Spezies aber sicher unterscheiden können.

Dieses Problem wurde durch die 3 folgenden Maßnahmen in Angriff genommen:

1. Es wurden viele Sonden mit Hilfe des ARB-Software-Package (TU München) entwickelt und diese zusätzlich mit den in der Genbank gespeicherten Sequenzen verglichen, um die am Besten geeigneten Sonden zu finden und diese zur weiteren Erhöhung der Spezifität kombinieren zu können.
2. Die Kreuzbindung konnte durch die Erhöhung der Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer weiter reduziert werden. Allerdings muss man dabei beachten, dass sowohl die Kreuzbindung als auch die Bindung an die Zielorganismen dadurch abnimmt. Für die Sonden Sal 331 und SalYer 1705 erwiesen sich 30 % Formamidkonzentration (FA) als optimal.
3. Zum anderen wurde diese Kreuzbindung durch die Entwicklung von Kompetitoren minimiert. Hierbei handelt es sich um nicht fluoreszenzmarkierte Sonden, die spezifisch an die RNA-Sequenzen der Nicht-Zielorganismen binden und somit diesen Basenabschnitt blockieren. Damit sind diese Basenabschnitte nicht mehr für die spezifischen Salmonellensonden zugänglich.

Durch die Kombination dieser Maßnahmen konnte bei den zwei Hauptsonden Sal 331 und SalYer 1705, die Spezifität auf 99 % bzw. 97 % angehoben werden. Diese zwei neu entwickelten Sonden können zusätzlich kombiniert und damit die Spezifität (unter Verlust an Sensitivität) gesteigert werden, da beide Sonden an unterschiedlichen Nichtzielorganismen kreuzgebunden haben (3.4.2.).

Die Sonde Sal 3 [37] wies zwar eine Spezifität von 99 % auf, ist den anderen zwei Sonden aber durch den Einsatz bei einer optimalen Formamidkonzentration von 10 % unterlegen. Sie ist dadurch nicht mit den anderen beiden Sonden kombinierbar, da diese bei einer Formamidkonzentration von 30 % eingesetzt werden.

Ein von allen drei Sonden zunächst als falsch positiv erkannter *Citrobacter sp.* erwies sich in der biochemischen Differenzierung als *Salmonella* enteritidis aus, was eindrucksvoll belegt, dass die FISH der herkömmlichen Diagnostik in einigen Fällen sogar überlegen sein kann.

Die Sonden Sal 1 [51], Sal 263 und Sal 821 wiesen alle eine Spezifität < 55% auf, die sich weder durch Erhöhung der Formamidkonzentration, noch durch die Einführung eines Kompetitors erhöhen ließ. Sie wurden daraufhin aus dem Sondenschema entfernt.

Durch die Austestung mehrere Sonden gelang es also, die drei besten *Salmonella*-Sonden herauszufiltern. Das Vorgehen, von Anfang an mit vielen Sonden zu starten, hat sich bewährt.

4.1.2. Falsch negative Ergebnisse durch mangelnde Sensitivität

Bei der FISH spielt nicht nur die starke Kreuzbindung einzelner Sonden eine entscheidende Rolle (falsch positive Ergebnisse), sondern auch die unzureichende Bindung an den Zielorganismus (falsch negative Ergebnisse).

Die Sensitivität wurde zum einen durch die optimale Einstellung der Hybridisierungsbedingungen, zum anderen durch eine Optimierung der Fixierungsbedingungen der Präparate erhöht. Auch hier schnitten die oben genannten Sonden Sal 3 [37], Sal 331 und SalYer 1705 mit Sensitivitäten ≥ 97% am besten ab. Somit sind diese drei Sonden auch im Hinblick auf ihre hohe Sensitivität sehr gut in der Routinediagnostik als Kulturbestätigungstest einsetzbar.

Allerdings konnten alle drei Sonden ein Isolat einer *Salmonella* Typhimurium nicht erfassen. Dieser Stamm konnte auch nicht mehr angezüchtet werden, um Kontrollexperimente durchzuführen. Somit bleibt unklar, ob es sich wirklich um eine *Salmonella* sp. gehandelt hat, ob die Zielsequenz nicht mehr für die Sonden zugänglich [2] oder ob eine zu niedrige Menge an Zielsequenz vorhanden war.

4.1.3. Bedeutung der FISH als Kulturbestätigungstest

Insgesamt wurden zwei neu entwickelte und eine bereits publizierte Sonde an Ziel- und Nichtzielorganismen evaluiert. Mit Sensitivitäten und Spezifitäten zwischen 97 % und 99 % weisen diese Sonden ähnlich gute Werte wie die konventionelle kulturelle Diagnostik [14] auf. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, die beiden neu entwickelten und evaluierten Sonden Sal 331 und SalYer 1705 in direkter Kombination unter Standardbedingungen einzusetzen. Dadurch kann die Spezifität (unter Verlust von Sensitivität) auf nahezu 100 % gesteigert werden. Damit sind sie als Kulturbestätigungstest hervorragend geeignet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zusätzlich gezeigt, dass die zwei bereits an Lebensmitteln publizierten Sonden Sal 544 [16] und Sal 1 [51] zum Nachweis von Salmonellen aus Patientenmaterialien nicht geeignet sind, da sie zum einen eine sehr geringe Sensitivität und zum anderen eine sehr geringe Spezifität aufweisen.

Die zwei neu entwickelten Sonden Sal 331 und SalYer 1705 sind hingegen aufgrund ihrer sehr hohen Sensitivität und Spezifität vorraussichtlich auch im Lebensmittelbereich einsetzbar, da humane Stämme über Lebensmittel erworben werden und sie damit die gleiche Sequenz haben müssten.

Es wurden bereits diverse weitere FISH-Sonden publiziert [44, 60, 61], die je nach Einsatzgebiet gemeinsam mit den neu evaluierten Salmonellensonden eingesetzt werden könnten.

Die FISH kann wie am Beispiel des Citrobacters auch Fehlidentifikationen verhindern.

Allerdings kann die FISH die Kultur nicht ersetzen, da Serotypisierung und Resistenztestung sehr wichtig sind. Die FISH kann aber, da das Verfahren leicht durchführbar und kostengünstig ist, als Ergänzungsverfahren zum konventionellen biochemischen Nachweis eingesetzt werden.

Auch wenn die FISH-Methode nur zum Nachweis von Salmonellen direkt von der Agar-Platte verwendet wird, kann dies zu einer Zeitersparnis von bis zu drei Tagen im positiven Fall führen (Tab. 23). Diese Zeitersparnis hat nicht nur wirtschaftliche Bedeutung, auch im Rahmen einer schnellen Therapie und Einleitung von weiteren Hygienemaßnahmen kann dieser Tatsache eine erhebliche Bedeutung zukommen.

Tab.23: Zeitvergleich der kulturellen und der FISH-Methode für eine qualitative Untersuchung

Methoden	**Erforderliche Zeit**					
	Voranreicherung/ Selektive Anreicherung	Fixierung	Subkultur v. Selenit-boullion	Hybridisierung und Waschung	Positives Ergebnis	Negatives Ergebnis
Kultur	24 h	-	24 h	-	2 - 5 d	2 - 3 d
FISH	24 h	0,5 - 1h	-	1,5 - 2 h	1,5 d	1,5 d

FISH: Fluoreszenz in situ Hybridisierung, h: Stunde(n), d: Tag(e)

4.2. Entwicklung spezifischer Salmonellensonden

Da das Erkrankungsspektrum der verschiedenen Salmonellenspezies von Durchfällen bis hin zu lebensbedrohlichen Typhuserkrankungen reicht, die eine unterschiedliche Therapie nach sich ziehen, erscheint es äußerst sinnvoll, verschiedene Sonden zur Unterscheidung der verschiedenen Subspezies zu entwickeln.

Die Salmonellen lassen sich in zwei Spezies unterteilen, die humanpathogene Spezies *Salmonella enterica* und die *Salmonella bongerie* [34].

Die weiteren Subspezies ähneln sich in ihrer Basensequenz so sehr [10] und sind so nah verwandt [12], dass keine spezifische Sonde für die einzelnen Subspezies entwickelt werden kann, die nicht mit den anderen Subspezies eine Kreuzbindung eingeht.

Es kann nur anhand der Untersuchungsmaterialien weiter differenziert werden, da sich eine Typhusinfektion, wie in 1.3.3. beschrieben, ab der ersten Krankheitswoche nur im Blut und

erst ab der zweiten Krankheitswoche auch im Stuhl nachweisen lässt, während eine Infektion mit *Salmonella* Enteritidis bereits ab der ersten Woche im Stuhl nachweisbar ist. Hierdurch wird die Limitation der FISH zum Nachweis von Salmonellen aufgezeigt.

4.3. Nachweis von *Salmonella* spp. in positiven Stuhlproben

Die Diagnostik bei Verdacht auf eine Salmonelleninfektion nimmt mehrere Tage in Anspruch. Für den behandelnden Arzt und Mikrobiologen wäre aber ein schnellerer Nachweis erstrebenswert, bei welchem der aufwändige Schritt der Kultur übersprungen und die Salmonellen direkt aus Patientenmaterialien nachgewiesen werden könnten. Dies würde nicht nur zu einer Zeitersparnis, sondern auch zu einer Reduktion der Kosten führen. Den ersten Verdacht könnte man schon nach wenigen Stunden stellen und weitere wichtige Therapieschritte einleiten. Dabei wäre folgender Ablauf wünschenswert:

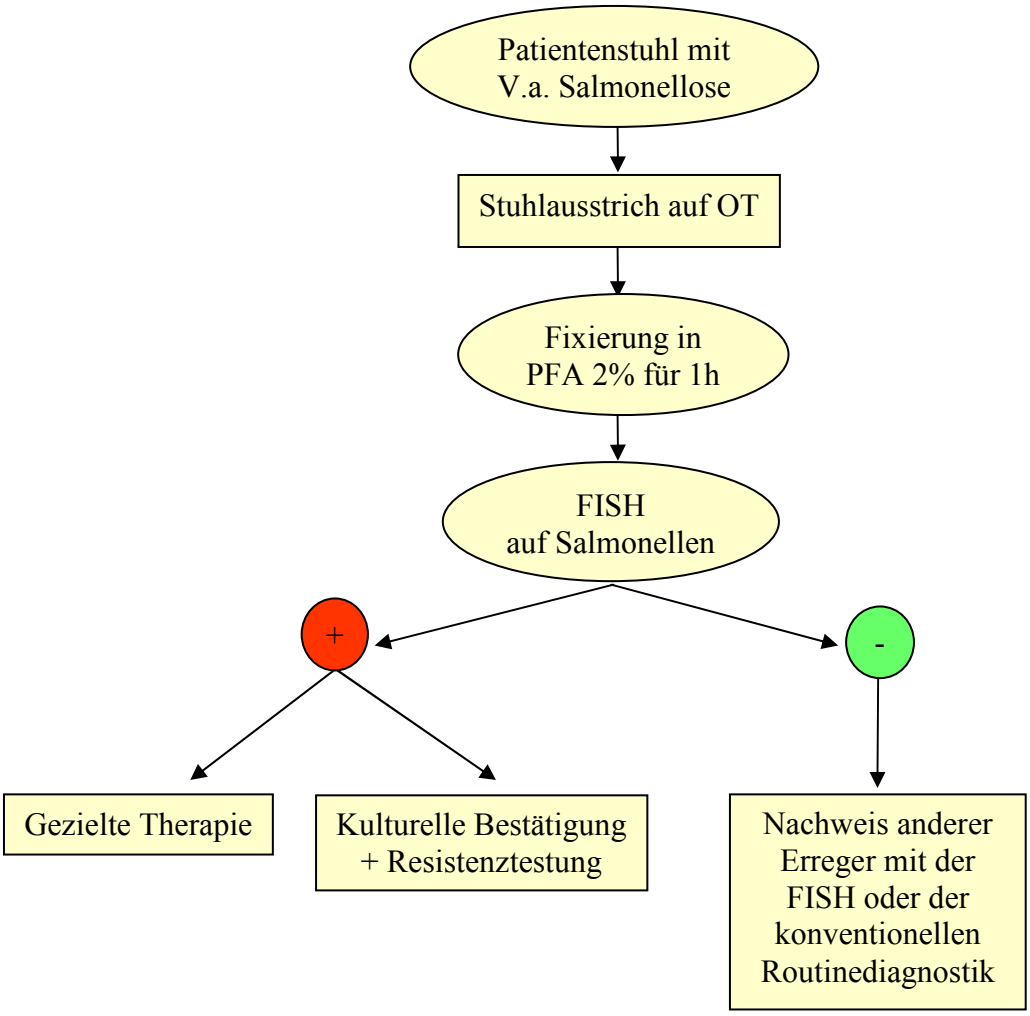


Abb. 17:Wünschenswerter Ablauf eines Salmonellennachweises bei V. a. Salmonellose.
OT: Objektträger, PFA: Paraformaldehyd, FISH: Fluoreszenz in situ Hybridisierung.

4.3.1. Stuhlaufbereitung

Es wurden bereits diverse Verfahren der Stuhlaufbereitung zum Direktnachweis von Enterobakterien aus dem Stuhl beschrieben [6, 17, 19 - 21, 26, 32, 46, 57, 68]. Allerdings fehlen publizierte Daten zum Direktnachweis von Salmonellen aus dem Stuhl.

Auf Basis der publizierten Methodik, wurde versucht ein optimales Verfahren zur Stuhlaufbereitung zu entwickeln. Ziel dabei war es, Salmonellen anzureichern und gleichzeitig störende Artefakte und Schmutzpartikel zu reduzieren. Bei diesen Versuchen wurden die optimalen Zentrifugationszeiten und -geschwindigkeiten, sowie die ideale Stuhlkonsistenz und Bakterienmenge ermittelt.

Dennoch wurden Salmonellen nur in seltenen Fällen nachgewiesen. Es gibt mehrere mögliche Ursachen für diese geringe Sensitivität:

Um standardisierte Bedingungen zu haben, wurde Stuhl von gesunden Probanden verwendet, der sehr dickflüssig und bakterienreich war. Physiologischerweise ist der Stuhl von Patienten mit Salmonellosen aber dünnflüssiger und es fehlt die Normalflora. Die physiologische Normalflora könnte die dem Probandenstuhl zugegebenen Salmonellen schon beim suspendieren zerstört haben, sodass man auf den Objektträgern nur zerstörte Keime gesehen hat, die nicht als Salmonellen identifiziert werden konnten.

Außerdem lagen die Bakterien oftmals so übereinander, dass keine morphologische Differenzierung mehr möglich war. Durch die Erhöhung der Zentrifugationsgeschwindigkeit gelang es zwar, die Präparate von anderen Bakterien und Begleitflora zu reinigen, allerdings waren dadurch auch keine Salmonellen mehr auffindbar.

Es konnte somit kein optimales Verfahren etabliert werden, bei welchem sowohl genügend Salmonellen auf dem Objektträger auffindbar, als auch eindeutig differenzierbar waren.

4.3.2. Analytische Sensitivität und Spezifität

Um die FISH- Technik mit der konventionellen Routinediagnostik vergleichen zu können, ist die Ermittlung der analytischen Sensitivität und Spezifität notwendig. Diese Versuche wurden unter standardisierten Bedingungen (wie im Methodenteil unter 2.2.10. beschrieben) durchgeführt.

In dieser Versuchsreihe zeigte sich, dass die konventionelle Routinediagnostik der FISH-Technik zum Direktnachweis deutlich überlegen war. Dabei ließen sich Salmonellen auch noch in um mindestens zwei Zehnerpotenzen größeren Verdünnungsstufen nachweisen.

Es gibt mehrere mögliche Ursachen für die geringe Sensitivität der FISH-Technik:

1. Salmonellen wurden erst nachträglich zu dem Durchfallstuhl hinzugefügt. Es kann dadurch zu einem mangelhaften Homogenisierungsverhältnis gekommen sein.
2. In den ersten 5 Versuchsabläufen wurde Stuhl von gesunden Probanden verwendet. Dieses spiegelt nicht das physiologische Bakterienverhältnis eines Patientenstuhles mit Salmonellose wieder.
3. Bei der konventionellen Routinediagnostik werden die Bakterien erst auf Agarplatten kultiviert, bevor sie nachgewiesen werden können. Dadurch ist die Keimmenge zum Beginn des Nachweises deutlich höher als bei der FISH-Technik.

In Zukunft würde es sich anbieten, die Versuche unter variierten Bedingungen noch einmal durchzuführen.
Zum einen besteht die Möglichkeit, mehrere Sonden zu kombinieren und objektivere Salmonellenwerte festzulegen. Zum anderen würde sich auch die Durchflusszytometrie anbieten (FACS = fluorescence activated cell sorting). Das Prinzip hierbei beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert. Die Zellen streuen einen Teil des Lichts, was mittels Detektoren nachgewiesen wird. Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit der Größe der Zelle und mit ihrer Komplexität. Zugleich mit dem gestreuten Licht kann man im Durchflusszytometer Fluoreszenzfarben messen. Durch Einsatz verschiedenfarbiger Laser kann die Anzahl der einsetzbaren Farbstoffe und damit die Informationsdichte erhöht werden. Bei Verwendung mehrerer Laser kann eine Vielzahl von Fluoreszenzfarben gleichzeitig gemessen werden [66]. Hierbei könnte man mehrere Sonden kombinieren und somit die Sensitivität erhöhen.
Da der Direktnachweis von Salmonellen aus Patientenmaterialien mittels FISH zu einer deutlichen Zeitersparnis führen würde, bietet es sich an, in diesem Bereich weitere Forschung zu betreiben.

4.3.3. Evaluierung des Direktnachweises von *Salmonella enterica* aus positiven Stuhlproben mittels FISH

Die Versuche zur analytischen Sensitivität zeigten, dass die FISH zum Salmonellen-Nachweis aus gespikten Stuhlproben nur eine geringe Sensitivität aufweist. Es lagen aber keine Daten zur tatsächlichen Keimmenge im Stuhl von an Salmonellose erkrankten Patienten vor. Diese Stuhlproben entsprachen zudem in ihrer Zusammensetzung nicht echten Salmonellenstühlen. Es schien also denkbar, dass in Salmonellenstühlen ausreichend große Keimmengen vorkommen und sich diese auch besser als in gespikten

Stuhlproben nachweisen lassen. Deshalb wurde darüber hinaus der Versuch unternommen, Salmonellen direkt in Durchfallstühlen von Kindern nachzuweisen. Dazu wurden in der Diagnostik 43 Kinderdurchfallstühle direkt auf Objektträger ausgestrichen. Anschließend wurden diese bis zur Durchführung der FISH im Gefrierfach bei -20°C konserviert.

Zur Verbesserung der Sensitivität und Spezifität wurden jeweils 2 Präparate mit den zwei unterschiedlichen Sonden Sal 331 und SalYer 1705 getestet. Zusätzlich wurde dokumentiert, wie viele Kolonien auf den Agarmedien Blutagar und XLD gewachsen sind, um im Zweifelsfall einen Zusammenhang von einem z. B. geringen Wachstum auf den Agarmedien mit einem falsch negativen Ergebnis zu finden.

Wie in 4.3.2. beschrieben ist die Sensitivität der FISH-Technik zum Direktnachweis von Salmonellen aus gespikten Stuhlproben begrenzt. Erstaunlicherweise konnten aber in dieser Versuchsreihe immerhin in 67 % der Fälle Salmonellen nachgewiesen werden und das trotz langer Lagerungszeiten und Kühlung. Zudem war die Stuhlmenge durch die kulturelle Austestung bereits so gering, dass eine eindeutige Identifizierung häufig nicht mehr möglich war. Es ist daher anzunehmen, dass die Sensitivität durch eine zügige Verarbeitung von frischem Durchfallstuhl noch weiter erhöht werden könnte.

Die Spezifität lag bei 82 %. Die Kreuzbindungen lassen sich dadurch erklären, dass zu den falsch positiven Resultaten auch diejenigen gezählt wurden, bei welchen die Fluoreszenzintensität mit 3 grenzwertig war und bei welchen auch nur eine der zwei Sonden positiv reagiert hat. Das Ergebnis wurde als positiv gewertet, auch wenn nur sehr wenige fluoreszierende Bakterien auffindbar waren.

Für die Fixierung von mehreren Präparaten wurde eine 2 % PFA-Fixierung wiederholt verwendet. Dadurch könnte es zu den falsch positiven Ergebnissen gekommen sein, da Salmonellen auf andere Objektträger übertragen wurden. Negative und positive Präparate wurden zudem oftmals miteinander fixiert, wodurch es auch zu einer Keimverschleppung gekommen sein könnte. Zudem wurden Salmonellen-negative Stühle verworfen. Eine Bestätigung durch eine PCR wäre im Zweifelsfall nötig gewesen, um das FISH-Ergebnis zu bestätigen oder zu korrigieren.

Die Ergebnisse waren besser als nach den Versuchen zur analytischen Sensitivität und Spezifität anzunehmen war. Eine Nachweisrate von 63% könnte bereits von Nutzen sein, um bei diesen Patienten entsprechende Maßnahmen zu ergreifen. Die geringe Spezifität von 82% ist aber relativ schlecht, angesichts des Risikos, unnötiger Therapie- und Hygienemaßnahmen und der Verunsicherung von Patienten und Klinikpersonal.

Derzeit ist das hier vorgestellte Verfahren der herkömmlichen Routinediagnostik unterlegen, da die Kultur zusammen mit den biochemischen Differenzierungsschritten weitaus bessere Sensitivitäten und Spezifitäten aufweist. In Zukunft sollten die einzelnen Variablen wie z. B. das Fixierungsmittel und die Frische des Stuhles noch verbessert werden, um die FISH mit ihren geschilderten Vorteilen in die Salmonellendiagnostik zu integrieren.

4.4. FISH in positiven Blutkulturen

Durch die Salmonella Serovare *S.* Typhi, *S.* Paratyphi A, B und C können lebensbedrohliche typhöse Salmonellosen [38] ausgelöst werden. Diese unterscheiden sich von den enteritischen Salmonellosen nicht nur durch ihren charakteristischen Krankheitsverlauf, sondern auch durch den primären Nachweis im Blut. Erst nach 2 bis 3 Wochen sind die Bakterien im Stuhl nachweisbar. Daher wurde die FISH-Technik zum Direktnachweis von Salmonellen auch aus Blutkulturen evaluiert. 207 Blutproben mit mikroskopischem Nachweis von gram-negativen Stäbchen wurden, wie in 2.2.12. beschrieben, aufgearbeitet [28, 61, 62]. Es wurden mit diesem Verfahren 5 von 5 *Salmonella* spp. identifiziert. Die Spezifität und Sensitivität war mit 100 % optimal.

Limitiert ist dieses Verfahren dadurch, dass die Sonden, die für die Studie verwendet wurden, keine Unterscheidung auf der Ebene der Serovare erlauben, wie es für epidemiologische Fragestellungen wichtig sein kann. Für diesen Zweck muss zurzeit noch auf herkömmliche Serotypisierung, z. B. mittels Widal Agglutination [56], zurückgegriffen werden.

Bei den typhösen Salmonellosen ist aber eine rasche Therapieeinleitung sehr wichtig und die FISH-Technik ist eine schnelle Methode, um eine Verdachtsdiagnose zu erhärten und zu bestätigen. Zudem ist jede *Salmonella* sp. in der Blutkultur therapiebedürftig.

Die FISH wurde schon sinnvoll für die Blutkulturdiagnostik eingesetzt [25, 28, 61]. In Zukunft wäre ein „2-Schritt-Verfahren“ in der Blutkulturdiagnostik erstrebenswert.

Dieses könnte folgendermaßen ablaufen:

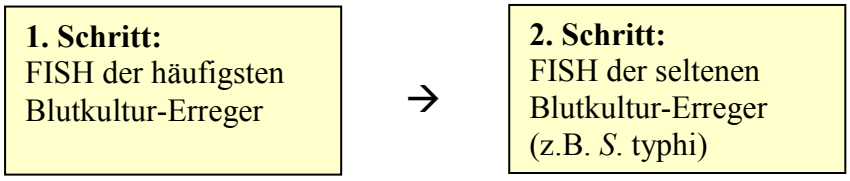


Abb.18: „2-Schritt-Verfahren“ zum Direktnachweis von Bakterien aus Blutkulturen mittels FISH. FISH: Fluoreszenz in situ Hybridisierung, *S.: Salmonella*.

Hierbei können bereits publizierte Sonden für den Nachweis von Blutkulturerregern [25, 28, 61] mit den neu entwickelten und evaluierten Salmonellensonden kombiniert werden.

4.5. Bedeutung der FISH für die mikrobiologische Diagnostik

In Deutschland gehören die Salmonellosen zu den am meist verbreiteten Infektions-Erkrankungen [48]. Der Nachweis stützt sich in der Regel auf klassische mikrobiologische Anreicherungs- und anschließende biochemische Differenzierungsverfahren. Diese kulturellen Verfahren sind zwar sehr spezifisch, aber auch sehr zeit- und materialaufwändig. Die Notwendigkeit der Entwicklung und Etablierung schnellerer und gleichzeitig zuverlässiger Methoden ist für eine frühe und adäquate Therapie und Hygiene von Bedeutung. Die Vorteile der FISH liegen hierbei in der Schnelligkeit gegenüber der herkömmlichen Diagnostik, in der Einfachheit und auch in dem geringen Materialeinsatz der für die Durchführung einer FISH notwendig ist. Allerdings muss man bei der FISH wissen, nach welchem Keim man sucht und kann mit der Durchführung einer FISH nur den untersuchten Keim bestätigen oder ausschließen. Dadurch ist sie dem kulturellen Verfahren in dieser Hinsicht unterlegen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch diese Versuchreihe eine bereits publizierte Sonde und zwei neu entwickelte Sonden evaluiert wurden, die jetzt zur Verbesserung der Salmonellendiagnostik eingesetzt werden können.

In Zukunft könnte man diese zwei neu evaluierten Sonden auch an weiteren Materialien, wie z. B. Lebensmittel anwenden und mit bereits publizierten Sonden kombinieren.

5. Zusammenfassung

Salmonellen sind die wichtigsten bakteriellen Durchfallerreger beim Menschen. Zudem spielen sie eine bedeutende Rolle als Erreger der lebensbedrohlichen Typhus- und Paratyphuserkrankungen.

Eine exakte und schnelle Detektion und Identifikation der humanpathogenen Keime ist sowohl für die Lokalisation der Infektionsquelle zur Vermeidung von Übertragungen, als auch für eine rechzeitige Therapie der Patienten von hoher Bedeutung.

Der Nachweis der Salmonellen aus dem Stuhl erfolgt derzeit noch durch ein material- und zeitintensives kulturelles Verfahren, dem sich im positiven Fall ein aufwändiges Identifizierungsverfahren anschließt.

Zur Vereinfachung des Nachweises von Salmonellen bietet sich besonders die schnelle und zuverlässige Methode der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) an. Bei dieser richten sich Fluoreszenz-markierte Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Sonden auf spezifische Basensequenzen der Salmonellen, die dann im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden können.

Die FISH wurde bereits zuvor für den Nachweis von Salmonellen aus einer begrenzten Zahl an Lebensmittelproben eingesetzt, nicht allerdings für die Identifizierung von Salmonellen aus Stuhlproben.

Als Zielsetzung der vorliegenden Promotionsarbeit galt es also einerseits zu ermitteln, in wie weit die FISH als Kulturbestätigungstest eingesetzt werden und anderseits ob die FISH auch für den Direktnachweis von Salmonellen aus Patientenmaterialien wie Stuhl und Blut verwendet werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Spezifität und Sensitivität von drei bereits publizierten und sechs neu entwickelten Sonden ermittelt. Dabei erwiesen sich eine der publizierten Sonden und zwei der neu entworfenen Sonden als hoch sensitiv und spezifisch. Die zwei neu entworfenen Sonden hatten zusätzlich noch den Vorteil, dass sie unter Standardbedingungen eingesetzt und kombiniert werden konnten.

Anhand mehrerer Publikationen wurde ein Verfahren zur Stuhlaufbereitung für den Direktnachweis von Salmonellen aus dem Stuhl mittels FISH entwickelt. Dieses wurde mit konventionellen kulturellen Methoden verglichen. Dabei erwies sich die FISH-Technik für den Nachweis von Salmonellen aus gespikten Stuhlproben um mehr als zwei Zehnerpotenzen weniger sensitiv als die Kultur.

Da ein positiver Salmonellennachweis Hygiene- und Therapiemaßnahmen nach sich zieht, ist eine Verkürzung der Nachweiszeit sehr erstrebenswert. Aus diesem Grund wurde weiter getestet, inwieweit die FISH-Technik für den Direktnachweis von Salmonellen aus Patientenmaterialien verwendet werden kann.

Beim Einsatz der FISH für den Direktnachweis von Salmonellen aus Patientenstühlen wurden eine Sensitivität von 67% und eine Spezifität von 82% ermittelt.

Für den Nachweis von Salmonellen aus der Blutkultur mittels FISH-Technik wurde im Rahmen dieser Arbeit für diese Untersuchung eine Sensitivität und Spezifität von nahezu 100% erzielt.

Abschließend lässt sich als Ergebnis dieser Promotionsarbeit herausstellen, dass das FISH-Verfahren besonders als Kulturbestätigungstest von *Salmonella* spp. eingesetzt werden kann, was deutlich zur Verbesserung und Beschleunigung der Diagnostik beiträgt.

Die FISH-Technik ist zum Direktnachweis von Salmonellen aus dem Stuhl dem konventionellen kulturellen Nachweis noch unterlegen. Zum Direktnachweis von Salmonellen aus der Blutkultur ist die FISH aufgrund ihrer hohen Spezifität und Sensitivität jedoch hervorragend geeignet.

6. Literaturverzeichnis

1 **Allen, G., Bruce, V. R., Stephenson, P., Satchell, F. B. and Andrews, W. H. (1991):** Recovery of *salmonella* from high-moisture foods by abbreviated selective enrichment. J. Food Prot. 54, 492-495

2 **Amann, R. (1995):** Fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes in the study of microbial ecology. Mol. Ecol. 4, 543-544

3 **Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., Stahl, D. A. (1990):** Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. Appl. Environ. Microbiol. 56, 1919-1925

4 **Amann, R., Glöckner, F.-O., Neef, A. (1997):** Modern methods in subsurface microbiology: in situ identification of microorganisms with nucleic acid probes. FEMS Microbiol. Rev. 20, 191-200

5 **Amann, R. I., Krumholz, L., Stahl, D. A. (1990):** Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. J. Bacteriol. 172, 762-770

6 **Apostolou, E., Pelto, L., Kirjavainen, P. V., Isolauri, E., Salminen, S. J., Gibson, G. R. (2001):** Differences in the gut bacterial flora of healthy and milk-hypersensitive adults, as measured by fluorescence in situ hybridization. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 30, 217-221

7 **Böhm, R. (1993):** Verhalten ausgewählter Salmonellen in der Umwelt. DTW 100, 275-278

8 **Brenner, F. W., Villr, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R. und Swaminathan, B. (2000):** *Salmonella* nomenclature. J. Clin. Microbiol. 38, 2465-2467

9 **Brown, A. R., Govan, J. R. (2007):** Assessment of fluorescent in situ hybridization and PCR-based methods for rapid identification of Burkholderia cepacia complex organisms directly from sputum samples. J. Clin. Microbiol. 45, 1920-1926

10 **Christensen, H., Nordentoft, S. und Olsen, J. E. (1998):** Phylogenetic relationships of *Salmonella* based on rRNA sequence. Int. J. Syst. Bacteriol. 48, 605-610

11 **Cooke, V. M., Miles, R. J., Price, R. G. and Richardson, A. C. (1999):** A novel chromogenic ester agar medium for detection of *salmonellae.* Appl. Environ. Microbiol. 65, 807-812

12 **Crosa, J. H., Brenner, D. J., Ewing, W. H. und Falkow, S. (1973):** Molecular relationships among the salmonellae. J. Bacteriol. 115, 307-315

13 **DeLong, E. F., Wickham, G. S., Pace, N. R. (1989):** Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. Science 243, 1360-1363

14 **Eriksson E., Aspan A. (2007):** Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for salmonella detection in faecal samples for cattle, pig and poultry. BMC Vet. Res. 22, 3-21.

15 **Fang, Q. (2002):** Beschleunigter Nachweis von Salmonellen in Lebensmitteln durch Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH) mit 23S rRNA Sonden, Inaugural-Dissertation, Tübingen

16 F**ang, Q., Brockmann, S., Botzenhart, K., Wiedenmann, A. (2002):** Improved Detection of *Salmonella* spp. in Food by Fluorescent In Situ Hybridization with 23S rRNA Probes: A Comparison with Conventional Culture Methods. J. Food Prot. 66, 723-731

17 **Green, G. A., Riot, B., Monteil, H. (1994):** Evaluation of an Oligonucleotide Probe and an Immunological Test for Direct Detection of Toxigenic *Clostridium difficile* in Stool Samples. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 13, 576-581

18 **Giovannoni, S. J., DeLong, E. F., Olsen, G. J., Pace, N. R. (1988):** Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotideprobes for identification of single microbial cells. J. Bacteriol. 170, 720-726

19 **Harmsen, H. J. M., Gibson, G. R., Elfferich, P., Raangs, G. C., Wildeboer-Veloo, A. C. M., Argaiz, A., Roberfroid, M. B., Welling, G. W. (1999):** Comparison of viable cell counts and fluorescence in situ hybridization using specific rRNA-based probes for the quantification of human fecal bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 183, 125-129

20 **Harmsen, H. J. M, Raangs, G. C., He, T., Degener, J. E. and Welling, G. W. (2002):** Extensive Set of 16S rRNA-Based Probes for Detection of Bacteria in Human Feces. Appl. Environ. Microbiol. 68, 2982-2990

21 **Harmsen, H. J. M., Wilderboer-Veloo, A. C. M., Grijpstra, J., Knol, J., Degener, J. E. and Welling, G. W. (2000):** Development of 16S rRNA-Based Probes for the *Coriobacterium* Group and the *Atopobium* Cluster and Their Application for Enumeration of *Coriobacteriaceae* in Human Feces from Volunteers of different Age groups. Appl. Environ. Microbiol. 66, 4523-4527

22 **Heizmann, W. R., Döller, P., Kropp, S. und Bleich, S.:** *Salmonella* spp. In: Heizmann, W. R., Döller, P., Kropp, S. und Bleich, S. (Hrsg), Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Immunologie, 1.Aufl., Schattauer, Stuttgart, New York, S. 48-51. (1997)

23 **Hingst, H. V. (1993):** Das Salmonellen-Problem aus medizinischer Sicht - Ursachen und Maßnahmen. DGS 30, 12-13

24 **Hof, H.:** Salmonella. In: Hof, H., Dörries, R. (Hrsg), Medizinische Mikrobiologie, 2. Aufl., Duale Reihe, MLP, Georg Thieme Verlag Stuttgart, S. 361 -369 (2002)

25 **Jansen, G. J., Mooibroek, M., Idema, J., Harmsen, H. J. M., Welling, G. W. and Degener, J. E. (1999):** Rapid Identification of Bacteria in Blood Cultures by Using Fluorescently Labeled Oligonucleotide Probes. J. Clin. Microbiol. 38, 814-817

26 **Jansen, G. J., Wildeboer-Veloo, A. C. M., Tonk, R. H. J., Franks, A. H., Welling, G. W. (1999):** Development and validation of an automated, microscopy-based method for enumeration of groups of intestinal bacteria. J.Microbiol. Methods 27, 215-221

27 **John, H., Birnstiel, M. und Jones, K. (1969):** RNA:DNA hybrids at the cytogenetical level. Nature 223, 582-587

28 **Kempf, V. A. J., Trebesius, K. and Autenrieth, I. B. (1999):** Fluorescent In Situ Hybridization Allows Rapid Identification of Microorganisms in Blood Cultures. J. Clin. Microbiol. 38, 830-838

29 **Koelbing, H. M. (1990):** Johann Lucas Schönlein (1793-1864), a researcher and clinician. Hautarzt 41, 174-7.

30 **Landegent, J. E., Jansen in de Wal, N., Baan, R. A., Hoeijmakers, J. H. J., van der Ploeg, M. (1984):** 2-Acetylaminofluorene-modified probes for the indirect hybridocytochemical detection of specific nucleic acid sequences. Exp. Cell Res. 153, 61-72

31 **Langer, P. R., Waldrop, A. A. and Ward, D. C. (1981):** Enzymatic synthesis of Biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6633-6637

32 **Langendijk, P. S., Schut, F., Jansen, G. J., Raangs, G. C., Kamphuis, G. R., M. H. F. and Welling, G. W. (1995):** Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with Genus-Specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. Appl. Environ. Microbiol. 61, 3069-3075

33 **Le Miror, L.:** The Genus *Salmonella.* In: Balows, A. (ed): The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications, Springer Verlag, New York (1992).

34 **Le Miror, L. und Pupoff, M. Y. (1987):** Designation of *Salmonella enterica* sp. Nov. Nom. Rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. Int. J. Syst. Bacteriol. 37, 465-468

35 **Miller, S. I. und Pegues, D. A.:** *Salmonella* species, including *salmonella typhi.* In: Gerald, L et al (eds): Principles and Practice of Infections Diseases (Fifth Edition, Volume 2) Charchill Livingstone Verlag (2000).

36 **Müller, E., Schade, M., Lemmer, H. (2007):** Filamentous scum bacteria in activated sludge plants: detection and identification quality by conventional activated sludge microscopy versus fluorescence in situ hybridization. Water Environ Res. 79, 2274-86

37 **Nordentoft, S., Christensen, H. und Wegener, H. C. (1997):** Evaluation of a fluorescence-labelled oligonucleotide probe targeting 23S rRNA for in situ detection of Salmonella serovars in paraffin-embedded tissue sections and their rapid identification in bacterial smears. J. Clin. Microbiol. 35, 2642-2648

38 **Olsen, S. J., Pruckler, J., Bibb, W. and Mintz, E. D. (2004):** Evaluation of Rapid Diagnostic Tests for Typhoid Fever. J. Clin. Microbiol. 42, 1885-1889

39 **Pardue M. L. und Gall, J. G. (1969):** Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 64, 600-604

40 **Pinkel, D., Straume, T., Gray, J. W. (1986):** Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity fluorescence hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 2934-2938

41 **Popoff, M. Y., Bockemühl, J. und Brenner, F. W. (2000):** Supplement 1998 (no. 42) to the kauffmann-white scheme. Res. Microbiol. 151, 63-65

42 **Poppert und Bayer (2003):** Standardarbeitsanweisung: Nachweis und Differenzierung von *Salmonella* spp. Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene. Universitätsklinikum Ulm.

43 **Poppert, S., Essig, A., Stoehr, B., Steingruber, A., Wirths, B., Juretschko, S., Reischl, U., Wellinghausen, N. (2005):** Rapid diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR and fluorescence in situ hybridization. J. Clin. Microbiol. 43, 3390-3397

44 **Poppert S.**, **Haas M., Yildiz T.**, **Alter T., Bartel E., Fricke U., Essig A. (2008):** Identification of thermotolerant *Campylobacter* species by fluorescence in situ hybridization. J. Clin. Microbiol. 46, 2133-2136.

45 **Rambach, A. (1990):** New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. and other enteric bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 56, 301-303

46 **Rigottier-Gois, L., Rochet, V., Garrec, N., Suau and A., Doré, J. (2002):** Enumeration of *Bacterioides* Species in Human Faeces by Fluorescent in situ Hybridisation Combined with Flow Cytometry Using 16S rRNA Probes. System. Appl. Microbiol. 26, 110-118

47 **Riyaz-UL-Hassan, S., Verma, V., Qazi, G. N. (2004):** Rapid detection of *Salmonella* by polymerase chain reaction. Mol. Cell Probes 18, 333-339

48 **Robert Koch Institut (Ausgabe 03/2008):** Epidemiologisches Bulletin: Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health, www.gpk.de/downloadp/STIKO_2008_Bulletin03_080118_Zur_Charakterisierung_von_C._diphtheriae_verdaechtigen_Isolaten.pdf

49 **Robert Koch Institut (Ausgabe 05/2007):** Ratgeber Infektionskrankheiten-Merkblätter für Ärzte. Typhus abdominalis, Paratyphus. www.rki.de/cln_091/nn_504582/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber__Mbl__Typhus__Paratyphus.html

50 **Robert Koch Institut (Ausgabe 07/2007):** Ratgeber Infektionskrankheiten-Merkblatt für Ärzte. Salmonellose. www.rki.de/cln_091/nn_504488/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Mbl__Salmonellose.html

51 **Rönner, S. G. E. und Stackebrandt, E. (1994):** Development of 23S rDNA-oligonucleotide probes for the identification of *Salmonella* species. System. Appl. Microbiol. 17, 257-264

52 **Salmon, D. E. and Smith, T. (1884-1886):** On a new method of producing immunity from contagious diseases. Proceedings of the Biological Society of Washington 3, 29-33.

53 **Selbitz, H.-J. (1989):** Entwicklung, Stand und Tendenzen der Taxonomie der Gattung *Salmonella*. Z. gesamte Hyg. 35, 679-681

54 **Selbitz, H.-J., Sinell, H.-J., Sziegoleit, A. und Kleer, J. (1995):** Das Salmonellen-Problem: Salmonellen als Erreger von Tierseuchen und Zoonosen. Fischer Verlag, Hena, Stuttgart, S. 13-183.

55 **Steffan, R. J. and Atlas, R. M. (1991):** Polymerase chain reaction: applications in environmental microbiology. Annu. Rev. Microbiol. 45, 137-161

56 **Taiwo S. S., Fadiora S. O., Oparinde D. P., Olowe O. A. (2007):** Widal Agglutination titres in the diagnosis of typhoid fever. West Afr. J. Med. 26, 97-101

57 **Tannock, G. W., Munro, K., Harmsen, H. J. M., Welling, G. W., Smart, J. and Gopal, P. K. (2000):** Analysis of the Fecal Microflora of Human Subjects Consuming a Probiotic Containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. Appl. Environ. Microbiol. 66, 2578-2588

58 **Tschäpe, H. und Kühn, H. (1995):** Salmonellosen des Menschen - Epidemiologische und ätiologische Aspekte. RKI Schriften 3, 5-18

59 **Ullmann, U. (1994):** Die Gattung Salmonella und Shigella; Thyphus, Parathyphus, Enteritis und Ruhr. In: Brandis, H., Köhler, W., Eggers, H. J. und Pulverer, G. (Hrsg): Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie; 7. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. Jene. New York.

60 **Wellinghausen N.**, **Essig A.**, **Bartel M.**, **Poppert S. (2007):** Rapid identification of clinically relevant *Enterococcus* species by fluorescence in situ hybridization. J. Clin. Microbiol., 45, 3424-3426

61 **Wellinghausen, N., Nöckler, K., Sigge, A., Bartel, M., Essig, A. and Poppert, S. (2006):** Rapid Detection of *Brucella spp*. in Blood Cultures by Fluorescence In Situ Hybridization. J. Clin. Microbiol. 44, 1828-1830

62 **Wellinghausen, N**., **Pietzcker, T**., **Poppert, S**., **Belak, S**., **Fieser, N**., **Bartel, M**., **Essig, A**. **(2006):** Evaluation of the Merlin MICRONAUT system for rapid direct susceptibility testing of gram-positive cocci and gram-negative bacilli from positive blood cultures. J. Clin. Microbiol. 45, 789-795

63 **Widal, F. (1896):** Serodiagnostique de la fievre typhoide. Semaine Med. 16, 259.

64 **Wieler, L. H. und Bauernfeind, R. (1999):** *Salmonella*-Infektionen beim Tier und deren Bedeutung für die Human- und Tiergesundheit. Vet. Med. Labor Fortbildungsveranstaltung „Zoonosen“

65 **WWW(2001):**http://www.gesetze-xxl.de/gesetze/ifsg/ifsg.htm

66 **WWW(2008):**http://www.mpi-dortmund.mpg.de/dokumente/zfs_Unterpunkte/Durchflusszytometrie/index.html

67 **Zimmer, C., Wähnert, U. (1986):** Nonintercalating DNA-binding ligands: specificity of the interaction and their use as tools in biophysical, biochemical and biological investigation of the genetic materials. Prog. Biophys. Mol. Biol. 74, 31-112

68 **Zoetendal, E. G., Ben-Amor, K., Harmsen, H. J. M., Schut, F., Akkermans, A. D. L. and de Vos, W. M. (2002):** Quantification of Uncultured *Ruminococcus obeum*-Like Bacteria in Human Fecal Samples by Fluorescent In Situ Hybridization and Flow Cytometry Using 16S rRNA-Targeted Probes. Appl. Environ. Microbiol. 68, 4225-4232

7. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt all denen, die mich während der Erstellung dieser Dissertation auf vielfältige Weise unterstützt und motiviert haben:

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater Professor Dr. med. S. Stenger, in dessen Abteilung diese Promotionsarbeit angefertigt wurde, meinen besonderen Dank aussprechen. Durch fortwährende, konstruktive Kritik und motivierende Unterstützung trug er wesentlich zu einem erfolgreichen Abschluss der Arbeit bei.

Dr. med. Sven Poppert danke ich für seine stets hilfsbereite und kompetente Betreuung während aller Phasen der Promotionsarbeit. Ihm verdanke ich nicht nur die Themenfindung, er stand mir auch in ernüchternden Phasen der Dissertation immer mit Rat und Tat zur Seite.

Ursula Fricke und Olivia Trunk danke ich für die ausgezeichnete Einarbeitung in die Methodik der FISH. Für die kompetente und zuverlässige Unterstützung, sowie freundschaftliche Zusammenarbeit während der experimentellen Phase dieser Dissertation danke ich Ursula Fricke im Besonderen.

Ebenfalls herzlich danken möchte ich Professor Dr. med. Andreas Essig, der mir dieses interessante Thema überlassen und mich während der experimentellen Phase bestens betreut hat.

Dem gesamten Laborteam der Medizinischen Mikrobiologie und den Mitarbeitern der konventionellen Routinediagnostik möchte ich für die freundliche Aufnahme und die äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre während meiner Laborzeit danken. Simone Qualdi ist hierbei besonders hervorzuheben, da sie mich auf sehr nachvollziehbare und hilfsbereite Weise in die konventionelle Stuhldiagnostik eingeführt und auch in meiner Abwesenheit Präparate für mich gesammelt hat.

Meinem Freund Stefan und seiner Schwester Heike danke ich für ihr offenes Ohr und ihre große Hilfe beim Korrekturlesen.

Abschließend danke ich meinen Eltern, denen diese Promotionsarbeit auch gewidmet ist. Neben der materiellen Unterstützung in der Zeit des Studiums und während der Erstellung dieser Arbeit standen sie mir immer verständnisvoll und motivierend zur Seite. Sie ermutigten und trösteten zugleich und gaben mir immer die Kraft, die ich brauchte. Insbesondere aber glaubten sie an mich!