

**Aus dem Institut für Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene
der Universität Tübingen**

Direktor: Professor Dr. K. Botzenhart

**Beschleunigter Nachweis von Salmonellen in
Lebensmitteln durch Fluoreszenz *In Situ*
Hybridisierung (FISH) mit 23S rRNA Sonden**

INAUGURAL-DISSERTATION

**zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Qiang Fang
aus Chengdu, Sichuan, CHINA**

2002

Dekan:
1.Berichterstatter:
2.Berichterstatter:

Professor Dr. C. D. Claussen
Professor Dr. K. Botzenhart
Professor Dr. G. Jahn

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

List der wichtigsten Abkürzungen

16S	16 Svedberg (S^{-1})
23S	23 Svedberg (S^{-1})
Abb.	Abbildung
ALM	Reference Materials for Food Microbiology. Bilthoven, Holland
ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, USA
bp	Basenpaare
BPW	Buffered Peptone Water (gepuffertes Pepton-Wasser)
°C	Grad Celsius
CCD	Ladungsgekoppelter Bildsensor
Cy3	5,5'-Disulfo-1,1'-di (X-Carbopentynyl)-3,3,3',3'-tetramethyindolocarbo- cyanin-N-hydroxy-succimidester
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytidintriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur, Braunschweig
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent-assay
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und Mitarbeiter)
FAT	Fluoreszenz-Antikörper-Technik
FG	Freiheitsgrad einer Verteilung
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
g	Gramm
×g	× Erdbeschleunigung
HCl	Salzsäure
H ₂ O _{bidest}	Vollentsalztes Reinstwasser
ISO	International Organization for Standardization
KBE	Koloniebildende Einheiten
kbp	Kilobasenpaar
L	Liter

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Leif.-Agar	Leifson-Agar (Desoxycholat-Citrat Agar nach Leifson)
LGA	Landsgesundheitsamt Baden-Württemberg, Stuttgart
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände Gesetz
m	Meter
M	Molar
mg	Milligramm
Min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NaCl	Natriumchlorid
NCTC	National Collection of Type Cultures, London, England
o.g.	Oben genannt
PBS	Phosphatgepufferte Saline (Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
Ramb.-Agar	Rambach [®] -Agar
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
S.	<i>Salmonella</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
spp.	Spezies
Std.	Stunden
Tab.	Tabelle
Tm	Schmelztemperatur
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
VBNC	Viable but nonculturable
VE-Wasser	Vollentsalztes Reinstwasser

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Problemstellung	1
1.2	Zielsetzung	2
2	Literaturübersicht	3
2.1	Genus <i>Salmonella</i>	3
2.1.1	Morphologie und biochemische Eigenschaften	3
2.1.2	Taxonomie und Nomenklatur	4
2.1.3	Wachstumseigenschaften	5
2.1.4	Tenazität von Salmonellen	5
2.2	Epidemiologie	6
2.2.1	Infektionsquellen und Infektketten	6
2.2.2	Epidemiologie der Salmonellose beim Menschen	7
2.2.3	Pathogenität und klinisches Bild	8
2.2.4	Die Entwicklung der Salmonellosen in Deutschland	9
2.2.4.1	Typhus und Paratyphus in Deutschland	9
2.2.4.2	Salmonellen-Enteritiden in Deutschland	10
2.2.4.2.1	Jährliche Morbidität von Salmonellen-Enteritiden in Deutschland	10
2.2.4.2.2	Die häufigsten Serovare in Deutschland	11
2.2.5	Vorkommen und Bedeutung von Salmonellen in Lebensmitteln	12
2.2.6	Zusammenfassung der Epidemiologie	13
2.3	Prävention, Prophylaxe gegen die Salmonellose	14
2.4	Übersicht über Nachweisverfahren	15
2.4.1	Kultureller Nachweis	15
2.4.1.1	Nicht-selektive Voranreicherung	15
2.4.1.2	Selektive Anreicherung	16
2.4.1.3	Ausstrich auf Selektivmedien	17
2.4.1.4	Biochemische und serologische Differenzierung	18
2.4.1.5	Schnellkultur Technik und kommerzielle Nachweissysteme	19
2.4.2	Immunologische Nachweisverfahren	19
2.4.2.1	Immunfluoreszenz	19

INHALTSVERZEICHNIS

2.4.2.2	ELISA-Technik	20
2.4.2.3	Immunodiffusionstest	21
2.4.3	Molekularbiologische Nachweisverfahren	22
2.4.3.1	Hybridisierung	22
2.4.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	23
2.4.4	Antikörper-Nachweis	24
2.4.5	Weitere Nachweisverfahren	25
2.4.5.1	Immunoseparation	25
2.4.5.2	Bakteriophagen	25
2.5	Zusammenfassung der Nachweisverfahren	26
2.6	<i>In situ</i> Hybridisierung (ISH) und Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	28
2.6.1	Begriff von ISH und FISH	28
2.6.2	Grundlagen der ISH	28
2.6.3	Der allgemeine Prozeß der <i>in situ</i> Hybridisierung	29
2.6.4	Hybridisierungskinetik und deren Parameter	30
2.6.4.1	Sonde	30
2.6.4.2	Temperatur	33
2.6.4.3	Ionenstärke	33
2.6.4.4	Organische Lösungsmittel	34
2.6.5	FISH-Technik mit rRNA-gerichteten Oligonukleotid Sonden	34
3	Material	38
3.1	Verwendete Mikroorganismen	38
3.2	Herkunft der Lebensmittelproben	38
3.3	Allgemein verwendete Lösungen	38
3.4	Reagenzien, Medien und Nährböden für die Standard Kultur Methoden	38
3.5	Medium für Anzucht der Referenzstämmen	41
3.6	Reagenzien, Medien für FISH	41
3.7	Sonde	43
3.8	Verbrauchsmaterial	43
3.9	Geräte	43
3.10	Software	44

INHALTSVERZEICHNIS

4	Methoden	45
4.1	Entnahme und Bearbeitung der Proben	45
4.2	Verlauf der kulturellen Untersuchung	45
4.2.1	Voranreicherung	45
4.2.2	Selektive Anreicherung und Ausstreichen auf Selektivmedien	46
4.2.2.1	Rappaport-Vassiliadis-Bouillon (RV-Medium)	46
4.2.2.2	Selenit-Cystin-Bouillon (SC-Medium)	46
4.2.3	Isolierung der Salmonellen auf Leifson- und Rambach-Agar	46
4.2.4	Auswertung	46
4.2.5	Biochemische Überprüfung und Antigennachweis	47
4.2.5.1	Beimpfen der Kligler mod.-Schräg-Nähragar	47
4.2.5.2	Beurteilung des Kligler-Schrägagar	47
4.3	FISH-Methode zum Nachweis von <i>Salmonella</i> . spp	50
4.3.1	Sonden-Design	50
4.3.1.1	Konstruktion und Vergleich der Sequenzanalysen von rRNA gerichteten Oligonukleotid Sonden	50
4.3.1.2	Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen	51
4.3.1.3	Verwendete 23S rRNA gerichtete Oligonukleotid Sonden	51
4.3.2	Verlauf der FISH-Methode	51
4.3.2.1	Zellfixierung mit Formaldehyd	51
4.3.2.1.1	Referenzkulturen	51
4.3.2.1.2	Lebensmittel	53
4.3.2.2	Hybridisierung	53
4.3.2.2.1	Ermittlung von Hybridisierungs- und Waschbedingungen	53
4.3.2.2.2	Hybridisierung ganzer Zellen auf Objektträgern und Waschen	54
4.3.2.3	Detektion fluoreszenzmarkierter Zellen durch die Epifluoreszenz-mikroskopie	55
4.4	Spezifitätsnachweis der <i>Salmonella</i> Sonden	55
4.4.1	Anzucht der verwendeten Referenzstämme	55
4.4.2	<i>In situ</i> Hybridisierung	55
4.5	Bestimmung der Voranreicherungszeit für FISH-Methode	57
4.6	Versuche zu Einflußfaktoren auf FISH	57
4.6.1	Ermittlung der Autofluoreszenz und unspezifischer Bindung von Lebensmitteln	57

INHALTSVERZEICHNIS

4.6.2	FISH bei hoher Konzentration an Begleitflora	57
4.6.3	FISH bei unterschiedlichen Lebensmitteln	58
4.6.4	Einfluß von verschiedenen NaCl-Konzentration, pH-Wert und Temperatur auf FISH	58
4.7	Anwendung für Lebensmittelproben	58
4.7.1	Isolierung und Nachweis von Salmonellen aus nicht-gespikten Lebensmittelproben	58
4.7.2	Nachweis der Salmonellen aus Voranreicherung (16Std), Selektiv-anreicherung Passage I (24 Std.) und Passage II (48 Std.) durch FISH-Methode	59
4.8	Statistische Auswertung	59
5	Ergebnisse	60
5.1	Sonden-Sequenzanalyse	60
5.2	Ergebnisse der Bestimmung der Sondenspezifität	60
5.3	Optimierung der FISH-Methode	67
5.3.1	Bestimmung der Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer	67
5.3.2	Bestimmung der Voranreicherungszeit für FISH	67
5.4	Einfluß-Faktoren auf FISH	72
5.4.1	Einfluß von Autofluoreszenz und unspezifischer Bindung	72
5.4.2	Einfluß der Begleitflora	72
5.4.3	Effizienz bei unterschiedlichen Lebensmittelarten	73
5.4.4	Einfluß von NaCl-Konzentration, pH-Wert und Temperatur auf die FISH-Methode	74
5.5	Nachweis von Salmonellen in Lebensmittelproben	77
5.5.1	Ergebnisse der kulturelle Methode und der FISH-Methode	77
5.5.2	Vergleich zwischen Salmonellanachweis aus der Voranreicherung (16 Std.), Selektivanreicherung Passage I (24Std.) und Passage II (48Std.) durch FISH	79
6.	Diskussion	80
6.1	23S rRNA als Hybridisierungsziel	80
6.1.1	rRNA als Gold-Standard für die definitive Identifikation von Bakterien	80
6.1.2	Warum wird 23S rRNA als Hybridisierungsziel zur Identifizierung	81

INHALTSVERZEICHNIS

	von <i>Salmonella</i> verwendet?	
6.2	Spezifität der Sonden für <i>Salmonella</i>	82
6.2.1	Wie hoch muß die Spezifität der Sonden für <i>Salmonella</i> sein?	82
6.2.2	Nachweis der Spezifität der Sonden für <i>Salmonella</i> spp.	83
6.2.3	Einflußfaktoren auf die Sondenspezifität	84
6.3	Sensitivität der FISH	85
6.3.1	Theoretische Sensitivität der FISH	85
6.3.2	Die Mengen von rRNA in der Zellen als entscheidender Faktor für die Sensitivität	86
6.3.3	Andere Einflussfaktoren auf die Sensitivität	87
6.3.4	Einflüsse der Begleitflora	88
6.3.5	Bedeutung der Autofluoreszenz und unspezifischer Bindung	89
6.4	<i>In situ</i> Detektion von Salmonellen in Lebensmitteln und Vergleich mit Kulturmethode.	90
6.5	<i>In situ</i> Nachweisverfahren von Salmonellen im medizinischen Bereich	92
6.6	Zusammenfassung der Diskussion	92
7.	Zusammenfassung	94
8.	Literaturverzeichnis	96
9	Anhang	110

Danksagung

Lebenslauf

1 Einleitung

1.1 Problemstellung

Seit mehr als 100 Jahren gehören Salmonellen zu den intensiv erforschten pathogenen Bakterien. In den vergangenen Jahren haben sie wieder verstärkte Aufmerksamkeit auf sich gezogen. Lebensmitteln, die mit Salmonellen belastet sind, spielen im Rahmen von Humaninfektionen die entscheidende Rolle^[120,173]. In Deutschland gehören die Salmonellosen zu den am meisten verbreiteten bakteriellen Infektionskrankheiten [81,84,205]. Sie treten als sporadische Fälle, im Familienkreis oder als epidemische *Salmonella*-Ausbrüche auf.

Der Nachweis von Salmonellen in Lebensmitteln ist eine der Voraussetzungen für den effektiveren Schutz des Menschen vor Salmonelleninfektionen. Die kulturelle Salmonellen-Diagnostik gilt hierbei als Standardmethode^[11]. Aber kulturelle Methoden erfordern 4-7 Tage zum weitgehend sicheren Nachweis von Salmonellen mittels biochemischer oder serologischer Methoden in Lebensmitteln. Derart lange Diagnosezeiten wirken sich besonders im Verkehr mit rasch verderblichen Lebensmitteln nachteilig aus. Andererseits ist erschwerend für ihren Nachweis in Lebensmitteln der Umstand, daß die Salmonellen durch Einwirkung von Hitze, Trockenheit, Speisesalz oder durch Tierarzneimittel geschädigt und ihrer Vitalität eingeschränkt sein können. Zusätzliche Probleme erwachsen aus der Neigung der Salmonellen, ungleichmäßig verteilt in Nestern aufzutreten und sich so der Stichprobenentnahme zu entziehen. Deshalb werden für Lebensmittels höchste Anforderungen an die Empfindlichkeit der diagnostischen Methode gestellt. Es ist vorteilhaft über eine schnelle, sensitive und Spezifität Nachweismethode zu verfügen.

Um lange Nachweiszeiten zu verkürzen und eine schnelle Untersuchung einer großen Probenanzahl zu ermöglichen wird in den letzten Jahren international intensiv gearbeitet. Hierbei wurden viele immunologische Nachweisverfahren und molekulabiologische Nachweisverfahren wie DNA-DNA Hybridisierung und PCR insbesondere in dem Bereich der Lebensmittelmikrobiologie entwickelt^[22].

Im Vergleich zur kulturellen Methode haben solchen alternativen Nachweisverfahren gewisse Nachteile (siehe Kapitel **2.6.5**)

Vor ungefähr 10 Jahren haben Delong et al.^[51] und Amann et al.^[4] die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) mit rRNA-gerichteten Oligonucleotid-Sonde zum unmittelbaren Nachweis oder Identifizierung einzelner Zelle entwickelt. Zahlreiche Studien^[27, 43, 47, 69, 77, 78, 115, 124, 139, 154, 158, 179, 188, 199] haben belegt, daß die FISH-Technik ein wirkungsvolles Werkzeug zur Erforschung der Diversität, Häufigkeit und räumlichen Verteilung von Mikroorganismen in ihren natürlichen Habitaten darstellt (Review siehe Amann 1995^[6]).

Diese FISH-Technik ist ein kulturunabhängiges Verfahren mit hoher Spezifität und Sensitivität; außerdem ist sie relativ einfach anzuwenden und aufgrund des geringen Materialverbrauchs und den kurzen Untersuchungszeiten kostengünstig.

Sie wurde schon zum Nachweis von verschiedenen Krankheitserregern z.B. *Candida* spp.^[109], *Cryptosporidium parvum*^[51,108], *E. coli*^[70], *Helicobacter pylori*^[152], *Legionella pneumophila*^[79], *Mycobacterium*^[169], *Salmonella* spp.^[105,127], *Staphylococcus aureus*^[96] und *Yersinia* spp.^[178] entwickelt, aber bisher noch nicht routinemäßig in die Praxis wie Lebensmittelmikrobiologie umgesetzt.

1.2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Studien war die Entwicklung einer Nachweismethode für Lebensmittelprobe, die bei mindestens gleicher Sensitivität über eine höhere Spezifität verfügt und dabei schneller ist als die kulturelle Methode.

Um dieses Ziel zu erreichen wurde die *in situ* Fluoreszenz Hybridisierung mit rRNA-gerichteten Oligonucleotid-Sonden als Technik eingesetzt. Hierbei wurden nach einer 16-18 Stunden Voranreicherung Salmonellen in Lebensmittelproben nachgewiesen.

2 Literaturübersicht

2.1 Genus *Salmonella*

2.1.1 Morphologie und biochemische Eigenschaften

Salmonella spp., die nach dem amerikanischen Bakteriologen Daniel E. Salmon (1850-1914) benannt^[204] sind, sind gerade, sporenlose, plumpe und gram-negativ Stäbchenbakterien von 0.7-1.5×2.0-5.0 µm Größe^[120]. Sie gehören zur Familie *Enterobacteriaceae* die sich sowohl aerob, als auch anaerob vermehren können^[183]. Mit Ausnahme von *S. Gallinarum pullorum* sind alle Salmonellen peritrich begeißelt und beweglich. Salmonellen sind morphologisch von anderen Enterobakterien nicht zu unterscheiden.

Biochemische Merkmale für das Genus *Salmonella* sind in Tabelle 1 dargestellt. Durch die große Zahl an *Salmonella*-Serovaren weichen allerdings einzelne Serovare von diesem Reaktionsmuster ab.

Tab. 1: Unterschiedliche Charakteristika des Genus *Salmonella*^a.^[104]

	Subspezies						VI
	I	II	IIIa	IIIb	IV	V	
β-galactosidase (ONPG) Test	-	- or x	+	+	-	+	d
Säurebildung aus:							
Lactose	-	-	+ or x	+ or x	-	-	- or +
Dulcitol	+	+	-	-	-	+	d
Mucate	+	+	+	d	-	+	+
Galacturonate	-	+	-	+	+	+	+
Salicin	-	-	-	-	+	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	-
γ-Glutamyltransferase	+ ^b	+	-	+	+	+	+
β-Glucuronidase	d	d	-	+	-	-	d
Verwendung von							
Malonate	-	+	+	+	-	-	-
D-Tartrate	+	-	-	-	-	-	-
Gelatine hydrolyse(Film Methode)	-	+	+	+	+	-	+
Wachstum in Anwesenheit von KCN	-	-	-	-	+	+	-
Habitat der Stämme:							
Warmblütige Tiere	+	-	-	-	-	-	-
Kaltblütige Tiere und Umwelt	-	+	+	+	+	+	+
Phage O1(lysis)	+	+	-	+	-	+	+

+ or -: positive oder negativ für 90% oder mehr von Stämmen in 1-2 Tage,

d: positive oder negative Reaktion nach Stämmen

x: späte oder irrelevant positive

^a: Alle Reaktionen finden bei 37°C statt

^b: ser. Typhimurium: d; ser. Enteritidis: +; ser. Dublin: -

2.1.2 Taxonomie und Nomenklatur

Die Historie der *Salmonella*-Taxonomie ist lang, viel Mikrobiologen schlugen bis 1980 unzählige Speziesnamen vor^[29,159]. Diese taxonomischen Probleme wurden jedoch durch DNA-Homologie-Studien gelöst^[159]. Auf der Basis neuerer taxonomischer Untersuchungen wurden Bakterien der Gattung *Salmonella* in zwei Spezies (*Salmonella enterica* und *S. bongori*) und mehrere Subspezies untergliedert^[103]. Die in Tab. 2 dargelegte Untergliederung ist nicht nur von taxonomischem Interesse, sondern reflektiert infektiobiologische Unterschiede zwischen den verschiedenen Salmonellen und hat daher auch praktische Bedeutung. Die Subspezies I (*S. enterica* Subspezies *Enterica*) umfaßt diejenigen *Salmonella*-Serovare, die überwiegend bei warmblütigen Wirbeltieren inklusive dem Menschen gefunden werden, während Stämme der Subspezies II-VI von *S. enterica* und Stämme von *S. bongori* vor allem bei poikilothermen und kaltblütigen Wirbeltieren vorkommen und dort auch Erkrankungen verursachen können. Die Subspezies II-VI wurden häufig für Warmblüter als nicht bzw. wenig Pathogen eingestuft^[197].

Tab 2. *Salmonella* Spezies, Subspezies, Serotypen und das normal Habitat, Kauffman-White Schema^[29]

<i>Salmonella</i> Spezies und Subspezies		Nr. des Serotyp in Subspezies	Habitat
<i>S. enterica</i> subsp. <i>Enterica</i>	(I)	1454	Warmblütige Tiere
<i>S. enterica</i> subsp. <i>Salamae</i>	(II)	489	Kaltblütige Tiere und in der Umwelt
<i>S. enterica</i> subsp. <i>Arizonae</i>	(III _a)	94	Kaltblütige Tiere und in der Umwelt
<i>S. enterica</i> subsp. <i>Diarizonae</i>	(III _b)	324	Kaltblütige Tiere und in der Umwelt
<i>S. enterica</i> subsp. <i>Houtenae</i>	(IV)	70	Kaltblütige Tiere und in der Umwelt
<i>S. enterica</i> subsp. <i>Indica</i>	(VI)	12	Kaltblütige Tiere und in der Umwelt
<i>S. bongori</i>	(V)	20	Kaltblütige Tiere und in der Umwelt
Total		2463	

Bei Salmonellen lassen sich auch somatische (O-Ag), Geißel-(H-Ag), Kapsel-(K-Ag) und Fimbrien-Antigene (F-Ag) unterscheiden^[161]. Von besonderer diagnostischer Bedeutung sind die O- und H-Ag, auf denen das Kaufmann-White-Schema aufbaut. Das Kaufmann-White-Schema stellt eine diagnostische Antigentabelle von ca. 2500 bekannten Salmonellen Serovaren dar und ist die Grundlage der kulturellen Salmonellen-Diagnostik^[137].

2.1.3 Wachstumseigenschaften

Die Züchtung von Salmonellen gelingt auf einfachen Nährböden (Fleischwasseragar, Nährbouillon) ohne Schwierigkeit. Sie vermehren sich gut, sowohl aerob als auch anaerob auf gebräuchlichen Nährböden. Sie bilden runde, glänzende Kolonien mit einem Durchmesser von 2-4 mm^[104,170]. Bei Temperaturen zwischen +7 und +40 °C können sich Salmonellen bei ausreichendem Nährstoffangebot (ca. 60mg Protein/L) vermehren^[26]. Zu ihrer Isolierung aus menschlichem Untersuchungsmaterial (wie Blut, Stuhl, Urin) und Lebensmittelproben, müssen zur Unterdrückung der Begleitflora jedoch spezielle Selektiv-Nährmedien verwendet werden^[183].

2.1.4 Tenazität von Salmonellen

Salmonellen besitzen eine hohe Tenazität, die es ihnen ermöglicht in der kontaminierten Umwelt, in Lebens- und Futtermitteln über Wochen, z.T. auch über Monate und Jahre zu überleben- und infektionstüchtig zu bleiben (Tabelle 3). Sie können sich in und auf organischen Substanzen unter bestimmten Bedingungen (Wärme, Feuchtigkeit, pH-Wert, Verfügbarkeit von Nährstoffen) exzessiv vermehren^[23]. Gegenüber dem Einfrieren, der Gefrierlagerung und der Lagerung um der Gefrierpunkt sind die Salmonellen empfindlich. Sie werden jedoch auch bei längerer Einwirkung dieser Temperaturen häufig nur sublethal geschädigt^[95]. Die Abtötung der Salmonellen erfolgt bei Kerntemperaturen im Lebensmittel von 70 °C über eine Dauer von 10 Minuten. Eine Vermehrung der Salmonellen wird bei Temperatur unter 6°C unterbunden. Auch eine Säureeinwirkung vermindert das Risiko der Vermehrung. Das Salmonellenendotoxin dagegen ist hitzebeständig.

Tab. 3. Überlebenszeiten von Salmonellen in verschiedenen Substraten bzw. Lebensmitteln^[1]

Substrat bzw. Lebensmittel	Nachweisbarkeit (Tage)	Substrat bzw. Lebensmittel	Nachweisbarkeit (Tage)
Abwasser	500-1000	Milch	60-140
Butter	105	Milchpulver (Schokolade)	590
Einstreu	160	Quark/Käse	35-270
Erde	360-480	Pflanzen	30
Fleisch (-20°C)	>1500	Rinderkot	930
Fliegen	60	Seewasser	60
Frischfleisch (-1 bis 3°C)	14	Süßwaren	196

Fischmehl	360	Speiseis	2500
Gefieder	1200	Volleipulver	4700
Gülle	1.8-180	Wasser	20-200
Klärschlamm	504	Trockenkot	240-720

2.2 Epidemiologie

Salmonellen sind weit verbreitet. Sie sind als wichtige Erreger von Infektionskrankheiten bei Mensch und Tier bekannt. Obwohl eine fast unübersehbare Vielzahl (ca. 2500 Serovare^[137]) von Salmonellen bekannt geworden ist^[98], sind nur ca. 120 als Krankheitserreger bei Menschen von Bedeutung^[75, 87].

Die Salmonellose des Menschen werden klinisch in zwei große Gruppen unterteilt, nämlich die typhösen Formen (ausgelöst durch *S. Typhi*, *S. Paratyphi* A, B, C) und die gastroenteritischen Formen (ausgelöst durch die Vielzahl der übrigen Serovare)^[184]. Während früher und wie heute noch in den Entwicklungsländern der Typhus und Paratyphus dominieren und das Infektionsgeschehen bestimmten, tritt gegenwärtig besonders in den Ländern mit hochentwickelter Landwirtschaft die Enteritis-Salmonellose auf, die uns als Gastroenteritis mit unterschiedlicher klinischer Schwere, aber nur selten mit systematischen und typhoiden Krankheitsbildern begegnet^[161]. Diese Entwicklung verläuft in fast allen hoch entwickelten Ländern ähnlich, ohne daß die Gründe für die Zunahme der Erkrankungshäufigkeit und für die Verschiebung zu *Salmonella* Enteritidis im einzelnen bekannt sind^[23].

2.2.1 Infektionsquellen und Infektketten

Salmonellen kommen im Intestinaltrakt von Menschen und Tieren vor. Die wichtigste Infektionsquelle sind infizierte Nahrungsmittel und Abwasser, insbesondere eiweißreiche Lebensmittel wie Fleisch, Milch und Eier bieten den Salmonellen bei mangelhaften hygienischen Bedingungen ausgezeichnete Vermehrungsbedingungen^[204].

Im epidemischen Prozeß der *Salmonella*-Lebensmittelvergiftung steht der Übertragungsweg Tier-Lebensmittel-Mensch absolut im Vordergrund (Abb.1). In wenigen Fällen kann auch der salmonellaausscheidende Mensch- insbesondere durch hygienisches Fehlverhalten- als Infektionsquelle via Lebensmittel dienen oder bei Kleinkindern und abwehrgeschwächten Personen auf oral-fäkalen Wege zu Kontaktinfektionen führen. Weniger als 10% der Infektionen kommen durch eine direkte Übertragung von Menschen

auf diese Weise mit dem zum Verzehr bestimmten Fleisch durch den Menschen aufgenommen.

Hinsichtlich der minimalen Infektionsdosis bestehen nach bisheriger Ansicht grundsätzliche Unterschiede zwischen *Salmonella Typhi* und *Paratyphi*, für der wenigen Erreger genügen um eine Erkrankung auszulösen, und den Enteritis-Salmonellen, bei denen höhere Keimzahlen von 10^5 - 10^6 als minimale Infektionsdosis gelten^[104]. Jedoch gibt es Hinweise, daß auch von den Enteritis-Salmonellen schon wenige Erreger pro Gramm Lebensmittel genügen können um eine Infektion hervorzurufen, wenn sehr viele Personen exponiert werden. So erkrankten zum Beispiel Kinder nach dem Genuß von einzelnen Paprikachips. Die hier errechnete Erregerdosis lag bei ungefähr 10^1 ^[24,49].

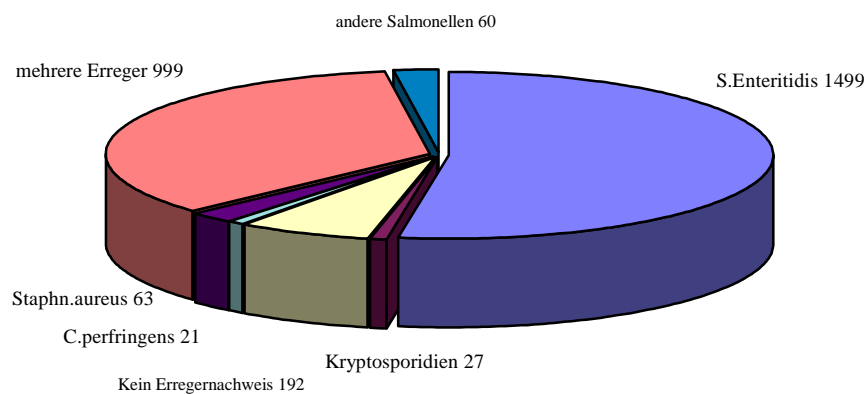
2.2.3 Pathogenität und klinisches Bild

Die genetischen und pathogenetischen Ursachen der Erkrankung sind noch nicht genau bekannt^[180]. Die Erreger gelangen mit den infizierten Nahrungsmitteln in den Magen. Der saure Magensaft hat bakterizide Wirkung, daher sind, wie erwähnt, für eine Erkrankung hohe Keimzahlen notwendig. Personen mit wenig Magensäure, z.B. alte Menschen oder Kinder oder solche die Säureblocker einnehmen, sind in diesem Zusammenhang besonders gefährdet^[183]. Die Enteritis-Salmonellen verursachen eine lokale Infektion des Dünndarmes und des oberen Dickdarmes. Sie dringen in die Zellen der Darmschleimhaut ein und schädigen diese durch die Freisetzung von Toxinen. Nach einer Infektion mit einem Stamm von *Salmonella enterica* (meist durch Serovarianten der Unterart I) trete beim Menschen nach einer mittleren Inkubationszeit von 12-72 h Erbrechen und wäßriger Durchfall auf^[188]. Die Schwere der Symptome hängt dabei stark vom Erregertyp, der physischen Konstitution, des Alters der Infizierten und der Dosis ab. In der Regel sind diese Enteritiden selbstlimitierend und dauern etwa ein bis vier Tage an. Sie können aber in seltenen Fällen von schweren Komplikationen wie Sepsis, Meningitis oder einer Osteomyelitis begleitet werden und sogar zum Tode führen. Die Inkubationszeit bei einer Infektion mit *Salmonella Typhi* beträgt etwa 2 Wochen. Diese Allgemeinerkrankung ist charakterisiert durch einen hochfieberhaften Verlauf.

2.2.4 Die Entwicklung der Salmonellosen in Deutschland

Die Salmonellose gilt als häufigste Ursache bakterieller Lebensmittelvergiftungen in Deutschland^[81,84,205] (Abb2). Von 1980 bis 1992 war es zu einer stark steigende Tendenz von Salmonellen-Enteritiden in Deutschland gekommen. Die Gründe liegen in der Tierzucht und an Hygienemängeln bei der Zubereitung sowie ungenügende Kühlung, unzureichenden Temperaturen bei der Lagerung und nicht ausreichender Hitzebehandlung der Speisen^[195].

Abb.2: Lebensmittelinfektionen in Deutschland: Erregertypen und ihre Häufigkeit im Jahre 1995 [197]



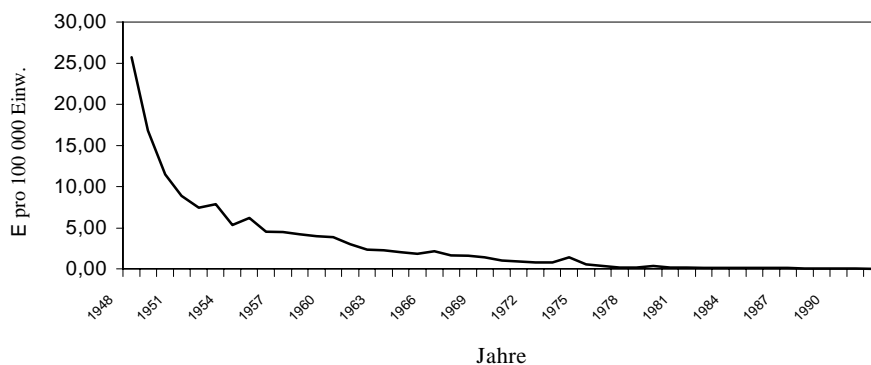
2.2.4.1 Typhus und Paratyphus in Deutschland

Beim Typhus und Paratyphus, den beiden einzigen nur beim Menschen vorkommenden systematischen Salmonellosen, war es nach dem zweiten Weltkrieg im Zusammenhang mit den verschlechterten allgemeinen Lebensbedingungen und den eingetretenen erheblichen Bevölkerungsbewegungen zu einem beachtlichen Wiederaufstieg der Morbidität gekommen (Abb.3). Mit der Verbesserung der hygienischen Verhältnisse und der Lebensmittelversorgung der Bevölkerung, unterstützt durch seuchenhygienische Maßnahmen und Schutzimpfungen, ging diese hohe Morbidität laufend zurück und erreichte in den 60er Jahren bereits wieder Werte von unter 5:100 000 Einwohner^[135].

2.2.4.2 Salmonellen-Enteritiden in Deutschland

Durch den Verzehr von Lebensmitteln erkranken in Deutschland pro Jahr mehrere hunderttausend Menschen an einer Enteritis, die meist durch Bakterien verursacht wird, aber auch von Viren und Protozoen ausgelöst werden kann. Hauptauslöser dieser Enteritiden sind unterschiedliche Stämme von *Salmonella enterica*^[12].

Abb 3: Erkrankungen an Typhus - jährliche Inzidenzraten, alte Bundesländer

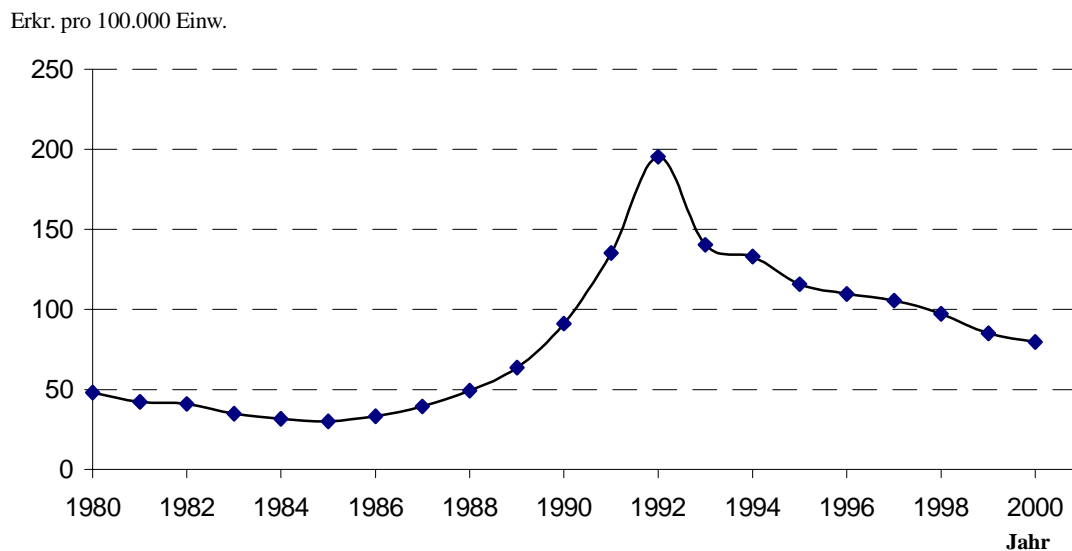


2.2.4.2.1 Jährliche Morbidität von Salmonellen-Enteritiden in Deutschland

Obwohl *Salmonella*-Ausbrüche meistens in den öffentlichen Medien Schlagzeilen machen und große Aufmerksamkeit finden, sind doch ca. 90% der Salmonelleninfektionen in Deutschland sporadische Fälle^[180]. Nach allgemeiner Auffassung unter Ärzten und Epidemiologen muß bei den Enteritis-Salmonellen von einer Dunkelziffer ausgegangen werden, deren Größenordnung den Faktor „10“ betragen dürfte. Jährlich werden 100.000 Salmonellen gemeldet. Bei dem Faktor 10 wären das 1000.000 Erkrankungen jährlich. Die Ursachen dafür, daß der weit überwiegende Teil der Erkrankungsfälle nicht der amtlichen Meldestatistik zugeführt werden kann, sind vielschichtig und überwiegend in der weitgehend gutartigen Prognose der salmonellenbedingten Durchfallerkrankungen begründet^[87]. Die Gesamtmorbidität durch diese Infektion hat jedoch eine sehr große Bedeutung, ist aber nie genau berechnet worden. Nachdem ab 1990 eine fast epidemische Entwicklung der Salmonellose-Fälle in Deutschland stattfand, kamen 1999 mit 85.146 gemeldeten Erkrankungen zur Meldung (104 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner). Somit hat sich der seit 1992 rückläufige Trend fortgesetzt [Abb.4].

Gegenüber 1999 haben die gemeldeten Erkrankungen in Jahr 2000^[145] insgesamt um rund 12,3% abgenommen. Die Salmonellose bleibt aber weiterhin eine bedeutende Infektionskrankheit. Besonders bei alten Menschen, Immunsupprimierten, Kindern und Säuglingen stellt sie eine besondere Gefährdung dar. Die jährliche Inzidenzrate einer Salmonelleninfektion ist zum Beispiel für HIV-Positiver und AIDS-Kranke 20 mal so hoch wie für Männer vergleichbarer Altersgruppen^[34]. Die Letalität der Infektion wird immer noch mit zwischen 0.5 und 1.4% angegeben. Diese Untersuchungen beruhen jedoch auf einer Langzeitstudie der 40er und 50er Jahre^[12]. Nach neuen Schätzungen aus den USA beträgt die Letalität 0,0078%^[118].

Abb. 4: Gemeldete Salmonellosen (Jährliche Inzidenzraten) in Deutschland 1980-2000 [145,146]



(ohne Typhus und Paratyphus)

2.2.4.2.2 Die häufigsten Serovare in Deutschland

In der Bundesrepublik haben jedoch nur etwa 20 der ungefähr 2500 verschiedene Serovarianten klinische Bedeutung; Am häufigsten ist hierbei die Isolation von *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium*^[87,145]. In den 70er Jahren bis 1985 dominierte in Deutschland das Serovar *S. Typhimurium*, es wurde im Jahr 1985 von *S. Enteritidis* abgelöst^[98]. Die beiden häufigsten Serovare hatte 1999 einen Anteil von über 85%, andere Serovare haben weithin quantitativ kaum eine Bedeutung. Lediglich die Serovare *Infantis* (1%), *Hadar* (0,7%), *Derby* (0,7%), *Virchow* (0,5%), *Brandenburg* (0,4%) und *Bovismorbificans*

(0,4%) wurden noch regelmäßig nachgewiesen^[145]. Die Tabelle 4 zeigt die häufigsten Serovare in Deutschland und den USA.

Tab. 4: Die häufigsten Serovare aus Humanisolaten in Deutschland und USA für das Jahr 1999^[33,145]

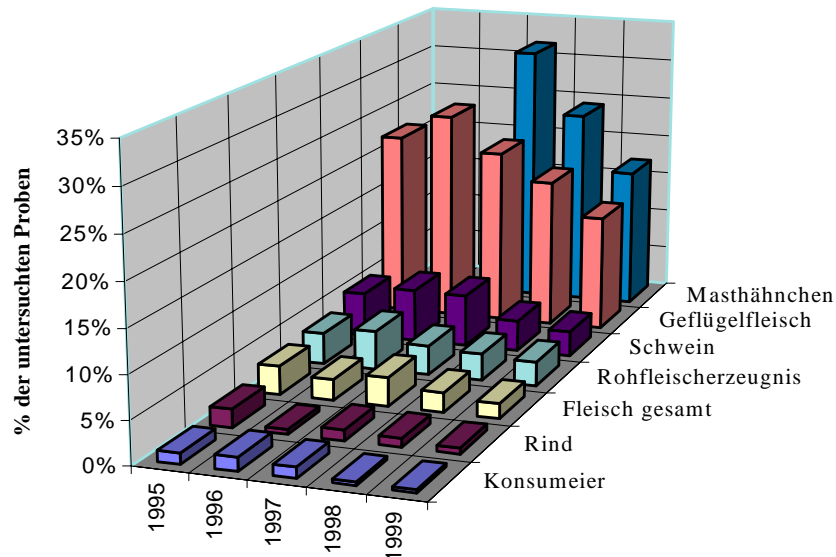
Rangstufe	Deutschland	USA
1	S. Enteritidis	S. Typhimurium
2	S. Typhimurium	S. Enteritidis
3	S. Infantis	S. Newport
4	S. Hadar	S. Heidelberg
5	S. Derby	S. Muenchen
6	S. Virchow	S. Javiana
7	S. Brandenburg	S. Montevideo
8	S. Bovismorbificans	S. Infantis
9	S. Agona	S. Braederup
10	S. Saintpaul	S. Schwarzengrund
11	-	S. Thompson
12	-	S. Hadar
13	-	S. Mbandka
14	-	S. Mississippi
15	-	S. Agona
16	-	S. Sainpaul
17	-	S. Oranienburg
18	-	S. Paratyphi B
19	-	S. Hartford
20	-	S. Typhi

2.2.5 Vorkommen und Bedeutung von Salmonellen in Lebensmitteln

Salmonella enterica-Enteritiden werden hauptsächlich durch den Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln, die einen tierischen Ursprung haben, übertragen^[80,119]. Obwohl die Salmonellen vom Tier über sehr verschiedenartige Lebensmittel auf Menschen übertragen werden können, gelten insbesondere Fleisch und Fleischerzeugnisse sowie Geflügel und Eier als Risikolebensmittel, denen eine besondere hygienische Aufmerksamkeit geschenkt wird. In Abbildung 5 sind die wichtigen Lebensmittelgruppen in Bezug auf Salmonellenkontaminationen (1995 bis 1999) dargestellt^[84].

Salmonellen haben in Deutschland außer der großen epidemiologischen Bedeutung auch eine große wirtschaftliche Bedeutung. Durch die Salmonellose entstehen in der Bundesrepublik Deutschland jährlich wirtschaftliche Schäden von 1 bis 2 Mrd. DM^[87].

Abb.5: Übersicht über *Salmonella* in wichtigen Lebensmittelgruppen 1995-1999



2.2.6 Zusammenfassung der Epidemiologie

Die epidemiologischen Besonderheiten der Salmonellose sind:^[23,180]

- Es existiert nicht nur ein bekanntes Reservoir der Salmonellen, sondern sie sind weit verbreitet in der belebten und unbelebten Umwelt des Menschen, was ein „Anpacken des Problems an der Wurzel“ objektiv erschwert.
- Die genetischen und pathogenetischen Ursachen dafür sind nicht genau bekannt.
- Obwohl viele Serovare bei *Salmonella enterica* spp. Enterica bekannt sind, treten nur wenige Serovare und innerhalb dieser wenige Klone epidemiologische und klinisch in den Vordergrund. Hier nehmen die *Salmonella*-Serovare *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis* eine besondere pathogenetische und damit epidemiologische Rolle ein. Sie sind Alleskönner und vermehren sich in der ökologischen Nische Tier (Invasion und Überleben) und transient beim Menschen (Adhäsion und Toxinbildung).
- Salmonellen verfügen nicht nur über eine hohe Tenazität (Widerstandsfähigkeit), die ihnen ein langes Überleben außerhalb der Wirtsorganismen ermöglicht, sondern sie können sich in und auf organischen Substanzen unter bestimmten Bedingungen (Wärme und Feuchtigkeit) exzessiv vermehren. Hierdurch spielt die Salmonellenkontamination

von Lebensmitteln eine für die menschliche Gesundheit wesentlich relevantere Rolle als z. B. die Verunreinigung von Nahrungsmitteln mit *Campylobacter*-Bakterien.

e). Eine Konzentration auf Infektketten bei den Salmonellen wird deren Epidemiologie bei weitem nicht gerecht, daher geht es viel mehr um die Analyse der Kausalketten der Salmonellenperpetuierung bzw. um die Kausalzusammenhänge des potentiellen Eintrags von Salmonellen in die Lebensmittelkette. Die Ursachen der epidemiologischen Hochs und Tiefs bleiben immer noch unbekannt. Sie lassen sich allein nicht durch molekulare und Epidemiestämme aufklären, sind aber wesentlich Voraussetzungen für alle weiteren Forschungen.

2.3 Prävention, Prophylaxe gegen die Salmonellose

Die zur Zeit gängige Bekämpfungsstrategie für Salmonellen ist ihre Überwachung und ein sich daraus ergebendes schnell funktionierendes Monitoring-System. Daraus leiten sich Maßnahmen ab, die auf die Unterbrechung der Infektionsketten und der „Austrocknung“ der Infektionsquellen hinzielen.

Die Bekämpfung und Verhütung der Salmonellose wird in erst Linie durch Tiere erschwert, die Krankheitserreger ausscheiden, ohne erkennbar erkrankt zu sein. Während die Übertragung von *Salmonella* Typhi und Paratyphi durch eine konsequente Kontrolle der Wasserversorgung weitgehend unterbunden werden kann, ist die Übertragung von Salmonellen, die eine Enteritide hervorrufen, nicht vollständig zu vermeiden, da dies die vollständige Eliminierung des Tieres aus der Übertragungskette Tier-Futtermittel-Tier-Lebensmittel-Mensch erfordern würde. Möglich sind jedoch Maßnahmen zur Eindämmung, zu denen gehören:

- Maßnahmen, die ein einwandfreies Futtermittel für die Tierproduktion gewährleisten
- Schaffung von salmonellenfreien Nutztierbeständen
- Maßnahmen bei der Verarbeitung der Lebensmittel, insbesondere die Kontaminationsverhütung durch Reinigung und Desinfektion der Gerätschaften sowie eine Trennung von reinen und unreinen Arbeiten bei der Verpackung und Weiterverarbeitung der Lebensmittel. Eine zentrale Bedeutung hat die Küchenhygiene, insbesondere auch im privaten Haushalt, wo die allbekannten Regeln der Hygiene nicht selten gedankenlos vernachlässigt werden.

2.4 Übersicht über Nachweisverfahren

Um *Salmonella* - Erkrankungen zu verhindern bzw. aufgetretene Erkrankungen zu diagnostizieren, müssen diese Bakterien aus dem jeweiligen Untersuchungsmaterial wie z. B. Stuhlproben, Lebensmittel, Abstriche, angezüchtet und identifiziert werden. Aber die konventionellen kulturellen Methoden sind sehr zeitaufwendig und erfassen nicht sicher geringe Keimzahlen geschädigter Salmonellen. Daher sind alternative Methoden neben den konventionellen kulturellen Methode zur Identifizierung entwickelt worden. Ihr Ziel ist in der Regel eine Zeitverkürzung und Vereinfachung des Arbeitsaufwandes. Für die Salmonellen-Diagnostik zeichnen sich international hauptsächlich folgende Strategien ab^[97]:

- a). Die Verbesserung der kulturellen Methoden.
- b). Der Anwendung gentechnischer Prinzipien.
- c). Die Anwendung immunchemischer Methoden, insbesondere in Form des Enzymimmunoassays.

2.4.1 Kultureller Nachweis

Die Kultivierungstechniken zählen in der heutigen *Salmonella* Diagnostik zu den meist verwendeten Nachweisverfahren. Seit ca. 80 Jahren werden dafür diagnostische Medien entwickelt, die laufend verändert, modifiziert und verbessert werden^[3,42,48,134,136,140]. Die kulturelle Salmonellen-Diagnostik gilt als Standardmethode, an der sich alle alternativen Methoden messen und durch die sie bestätigt werden müssen. Gegenwärtig erfolgt die Isolierung und Identifizierung der Salmonellen aus Lebensmitteln nach standardisierten Verfahren, z.B. Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG; ISO. Sie beinhalten normalerweise folgende Schritte:

2.4.1.1 Nicht-selektive Voranreicherung

Der Zweck der nicht-selektiven Voranreicherung besteht darin, durch das Angebot optimaler Nährstoffbedingungen die Salmonellen wieder zu aktivieren und zu stabilisieren, so daß sie bei nachfolgendem selektivem Anreicherungsmedium durch die toxischen Zusätze nicht in ihrem Wachstum beeinträchtigt oder eventuell sogar abgetötet werden. Günstig wirkt sich die Voranreicherung bei der kulturellen Untersuchung von tiefgefrorenen oder getrockneten Proben aus, ferner bei Proben mit erfahrungsgemäß subletal geschädigten Salmonellen (niedriger pH-Wert, nach Hitze oder

Strahleneinwirkung, Abwasser), bei denen man neben einer ausgeprägten Begleitflora nur relativ wenig Salmonellen erwartet.^[148,160]

Für die Auffrischung geschädigter Salmonellen hat sich das in dieser Arbeit verwendete gepufferte Pepton-Wasser (BPW) nach ISO 6579^[11] bewährt. Durch die nährstoffreiche und hemmstofffreie Bouillon erzielt man eine hohe Wiederbelebungsrate subletal geschädigter Salmonellen und ein intensives Wachstum auch bei in sehr geringer Zahl vorhandenen Salmonellen. Durch den Phosphat-Puffer wird bakterienschädigenden pH-Wert-Schwankungen vorgebeugt^[133,148,160].

Einen Überblick über die international gängigen Voranreicherungsmedien - Laktose-Bouillon, Brillantgrün-Wasser, Tryptikase-Brühe, gepufferte Milch mit Brillantgrün, Nährlösung, gepuffertes Pepton-Wasser und Ringerlösung mit Brillantgrün - gibt D'Aoust^[48]. Daraus geht hervor, daß die Dauer der Inkubation für die Isolierung der Salmonellen eine größere Bedeutung besitzt als das eingesetzte Voranreicherungsmedium.

2.4.1.2 Selektive Anreicherung

Bei der selektiven Anreicherung werden die Begleitkeime durch bestimmte Zusätze im Anreicherungsmedium (beispielsweise durch Gallensalz, Farbstoffe, Antibiotika) in ihrem Wachstum gehemmt. Dabei sind die gram-positiven Keime leichter in ihrer Vermehrung zu unterdrücken, während die gram-negative Begleitflora in ihrer Vermehrung nur schwerer zu hemmen ist, um nicht gleichzeitig das Wachstum der Salmonellen zu beeinträchtigen. Durch die Bebrütung der Anreicherungsmedien bei 43 °C kann eine weitere Hemmung der Begleitflora, insbesondere auch eine Unterdrückung des Proteus-Schwärmens, erreicht werden^[133,148,160].

Das leistungsstarke RVS (Rappaport Vassiliadis) -Medium nach Bager und Petersen (1991)^[14] beruht zum einen auf der Fähigkeit der Salmonellen sich bei einem hohen osmotischen Druck und einem niedrigen pH-Wert zu vermehren und zum anderen auf ihrer Resistenz gegenüber Malachitgrün. Zusätzlich erfolgt die Inkubation bei 42-43°C. Ein kritischer Punkt ist das geringe inokulierte Volumen, das bei diesem Medium in einem Verhältnis von 1:10 zugesetzt wird, da größere Inokula die Selektivität und Sensitivität des Medium herabsetzen. Weitere flüssige Anreicherungsmedien sind die Tetrathionat-Bouillon und die Selenit-Bouillon mit ihren verschiedenen Modifikationen.

2.4.1.3 Ausstrich auf Selektivmedien

Die an die selektive Anreicherung anschließende Kultivierung erfolgt auf Selektiv-Nährböden. Diese sollen wie die flüssigen Anreicherungsmedien die Begleitflora weitgehend hemmen (zum Beispiel durch Gallensalze, Farbstoffe, Antibiotika) und das Wachstum und die Vermehrung der Salmonellen begünstigen. Sie deuten auf Grund von Farbumschlägen, der im Nährboden enthaltenen Indikatoren oder auf Grund von Schwärzung (Sulfidausfällung) auf das Vorhandensein von Salmonellen hin^[50,160]. Die Farbumschläge der Indikatoren resultieren aus pH-Wert Änderungen der Nährböden infolge der biochemischen Umsetzung von Laktose, Saccharose, Xylose und anderen Substraten. Allerdings darf man nicht vernachlässigen, daß diese Farbreaktionen auch durch andere Keime hervorgerufen werden können. Daher müssen die verdächtigen Kolonien serologisch und biochemisch identifiziert werden. Die Bebrütung der selektiven Nährböden erfolgt in der Regel bei 35 bis 37 °C für 18 bis 24 Stunden. Für die weitere Differenzierung positiver Isolate in Serovare bedient man sich serologischer Verfahren. Eine Auswahl von gebräuchlich Nährböden gibt die Tabelle 5 wieder.

Tab. 5: Selektive Nährböden

Selektivplatten	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Kohlenhydratquellen												
<i>Laktose</i>	X	X	X	X	X	X				X	X	X
<i>Propylenglykol</i>									X			
<i>Saccharose</i>		X		X		X					X	X
<i>Salicin</i>						X						
<i>Glukose</i>							X					
Indikator/Hemmstoff												
<i>Brillantgrün</i>	X	X								X		
<i>Bromkresolpurpur</i>							X					
<i>Bromthymolblau</i>						X						
<i>Eisen(III)-citrat</i>			X ¹⁾	X		X ¹⁾	X ¹⁾			X ¹⁾	X ¹⁾	X ¹⁾
<i>Gallensalze</i>						X				X		
<i>Malachitgrün</i>								X				
<i>Matachromgelb</i>					X							
<i>Natriumcitrat</i>			X	X						X		
<i>Natriumdesoxycholat</i>			X						X		X	
<i>Natriumthiosulfat</i>			X	X		X	X			X	X	X
<i>Neutralrot</i>			X	X					X	X		
<i>NIAPROOF4</i>												X
<i>Phenolrot</i>	X	X									X	X
<i>Säurefuchsin</i>						X						
<i>Wasserblau</i>					X							

Antibiotika												
<i>Novobiocin</i>						(X)		X				
Nachweis von												
<i>Lysindecaboxylase</i>							X				X	
<i>H₂S-Bildung</i>							X				X	
<i>Xyloseverwertung</i>											X	
<i>Beweglichkeit</i>								X				

X¹⁾ Eisen(III)-ammoniumcitrat

(x) Modifikation

1. Brillantgrün-Phenolrot-laktose (BPL)-Agar nach Kauffmann (Oxoid, Wesel)
2. Brillantgrün-Phenolrot-laktose-Saccharose (BOLS)- Agar (Oxoid, Wesel)
3. Desoxycholat-Citrat-Agar nach LEIFSON (Merck, Darmstadt)
4. Desoxycholat-Citrat-Laktose-Saccharose-Agar (Oxoid, Wesel)
5. Gassner-Agar (Oxoid, Wesel)
6. Hektoen-Enteric-Agar (Oxoid, Wesel)
7. Lysin-Eisen-Agar (Oxoid, Wesel)
8. Rappaport-Vassiliadis (MRSV)-Halbfest-Nährboden-Basis, mod. (Oxoid, Wesel)
9. Rambach-Agar (Merck, Darmstadt)
10. Salmonella-Shigella-Agar, mod. (Oxoid, Wesel)
11. Xylose-Lysin-Desoxycholat (XLD)-Agar (Oxoid, Wesel)
12. Xylose-Lysin-Tergitoe 4 (XLD4)-Agar (Merck, Darmstadt)

2.4.1.4 Biochemische und serologische Differenzierung

Wenn man eine morphologisch verdächtige Kolonie auf Nährbodenplatten findet, untersucht man weiter mit Hilfe biochemischer und serologischer Methoden, um die Kolonie den verschiedenen Subspezies zuzuordnen zu können. Hierzu orientiert man sich am einfachsten an den Vorgaben und Auswerteschemata in §35 LMBG (Dreizucker-Eisen-Agar; Harnstoff-Agar; Lysindecaboxylase-Nährmedium; Voges-Proskauer-Medium; Indol-Reaktion). Bewährt haben sich auch z.B. biochemische Testsysteme wie API 20 E; Enterotube II; Biotest ID-GN.

Die serologische Identifizierung wird bei den auf selektiven Nährboden salmonellenverdächtig erscheinende Kolonien durchführt, nachdem sie auf weniger oder nicht-selektiven Nährböden vorkultiviert worden sind. Die *Salmonella*-Serovare werden nach ihrem Haupt-O-Antigen in Gruppen eingeteilt (A-Z, 51-67). Zur Zeit beinhaltet das Kauffman-White-Schema 51 Serogruppen. Durch die Verwendung von Poly- oder monovalenten O-Antiseren und Antiseren gegen H-Antigene bei der Objektträger-schnellagglutination ist es möglich, die Isolate bestimmten Serovaren zuzuordnen. Die serologischen Reaktion wird in 0.85%iger NaCl-Lösung, dann mit einem omnivalenten *Salmonella*-Serum und anschließend mit den amtlich geprüften *Salmonella*-Faktoren-Seren (O- und H- Antigene) ausgeführt. Schwer identifizierbare Salmonellen können

z.B. an das Landesgesundheitsamt oder das Nationale Referenzzentrum für Salmonellen (NRZ) gesandt werden.^[133,148,160]

2.4.1.5 Schnellkultur Technik und kommerzielle Nachweissysteme

Die konventionelle kulturelle Methode dauert 4-7 Tage. Zahlreiche Tests versuchen die Phase der Voranreicherung und der selektiven Anreicherung auf 6-8 Std. zu kürzen, aber dadurch erhöht sich auch die Rate der falsch negativen Ergebnisse^[3,10,48]. Entis et al.^[57] entwickelte eine Membranfiltrationstechnik nach 6 Std. selektiver Anreicherung und man kann so 18-42 Std. Stunden im Vergleich zur konventionellen kulturellen Methode sparen, ohne signifikante Unterschiede in der Spezifität hinnehmen zu müssen.

Um den Zeitaufwand zu verringern, wurden kommerzielle Verfahren entwickelt die auf der Basis von kombinierten Anreicherungs- und Nachweisverfahren beruhen und häufig einfach durchzuführen sind. Dazu gehört zum Beispiel der *Salmonella*-Schnelltest (Osrt, Oxoid *Salmonella* Rapid Test, Oxoid, Wesel) und der Salmosyst[®]-Test (Merck, Darmstadt).

2.4.2 Immunologische Nachweisverfahren

Das Prinzip aller immunologischen Methoden zum Nachweis von Salmonellen besteht in einer diagnostisch verwertbaren Reaktion zwischen dem zu ermittelnden *Salmonella*-Antigen und einem dazu passenden komplementären Antikörper.

2.4.2.1 Immunfluoreszenz

Die Fluoreszenz-Antikörper-Technik (FAT) setzt Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome) ein, die kurzwelliges Licht oder UV-Strahlen absorbieren und dabei langwelliges Licht emittieren. Sie lassen sich an Immunglobulinmoleküle, also an Antikörper koppeln, ohne deren spezifische Bindungsfähigkeit an das Antigen zu beeinträchtigen. Mit der Fluoreszenztechnik können in Ausstrich- oder Schnittpräparaten schnell und spezifisch Mikroorganismen als Antigen nachgewiesen werden. Bei der direkten Methode wird das Präparat mit Immuns serum überschichtet, dessen fluorochrommarkierte Antikörper sich mit dem Antigen verbinden. Nach Abspülen der ungebundenen Antikörper lassen sich die Mikroorganismen als Antigen-Antikörper-Komplex im Fluoreszenzmikroskop darstellen. Bei der indirekten Methode erfolgt die Durchführung in zwei Arbeitsgängen. Zunächst kommt es zur Einwirkung eines nicht markiertes antikörperhaltigen Immuns serum auf das

homologe Antigen im Präparat. Anschließend wird ein gegen die gleiche Serum-spezies gerichtetes und markiertes anti-Antikörper Immenserum aufgebracht. Diese nachträgliche Fluoreszenzmarkierung spart die Vielzahl von konjugierten Immunsereinen ein, wie sie für die direkte Methode erforderlich sind.

Die Fluoreszenz-Antikörper-Technik (FAT) wurde vor allem im Bereich der Lebensmittelhygiene entwickelt und angewendet^[74,147]. Cloak et al.^[39] berichten über eine Immuno fluoreszenz-Technik, bei der durch eine Polycarbonat-Membranadhäsion in Anreicherungsmedien Salmonellen in Lebensmitteln nachgewiesen werden. Die Nachweisempfindlichkeit steigert sich auf $10^{3.5}$ KBE/ml, und keine falsche positiven sowie negativen Ergebnisse. Andere Autoren fanden jedoch Kreuzreaktionen mit anderen Enterobakterien bei den Geißeln mit konjugierten O-Seren bzw. polyvalenten O-Seren.

2.4.2.2 ELISA-Technik

Radioimmunologische Methoden wurden für Nachweis von Salmonellen in Lebensmitteln benutzt^[90], aber wegen den Nachteilen in der Anwendung von radioaktiven Stoffen sind sie für umfangreiche Anwendung nicht geeignet.

Das Grundprinzip enzymimmunologischer Verfahren beruht auf der spezifischen Antigen-Antikörper-Bindung, die durch eine enzymatische Umsetzung eines Substrates meßbar oder als Farbreaktion visuell ausgewertet wird. Die ELISA-Technik besitzt eine größere Sensitivität als FAT für Nachweis von Salmonellen, speziell in Fleisch und Geflügel^[22].

Swaminathan und Ayres^[171] entwickelte eine Methode, die der Fluoreszenz-Antikörper-Technik ähnlich ist, aber einen enzymatisch markierten Antikörper benutzt. Diese Methode heißt Enzymimmunologischer Assay (EIA). Mattingly und Gehle^[117] verbessern den EIA durch Anwendung eines Sandwich-Verfahrens mit polycarbonat-beschichteten Metallkugeln, wobei störende Effekte, verursacht durch kompetitive Mikroorganismen, relativiert werden. Die Nachweisempfindlichkeit steigert sich dadurch auf 10^5 KBE/ml. An die nach der Inkubation vorliegende Immunkomplexe lagern sich im nächsten Schritt enzymmarkierte Antigen-Antikörper an (Sandwich-Technik). Nach Zusatz eines chromogenen Substrates können die an die Antigen-Antikörper-Komplexe gebundenen Enzym-Substrat-Komplexe beziehungsweise die Antigenkonzentration mittels einer

photometrischen Messung und Vergleich mit Standards bekannter Enzymaktivität bestimmt werden.

Auf dieser Basis wurde ein kommerziell erhältliche ELISA (Bio-Enzabead™ Screen Kit) der ersten Generation entwickelt. Im Vergleich zu konventionellen kulturellen Methoden erreicht dieser ELISA Bio-Enzabead™ Screen Kit (Organon Diagnostika, Heidelberg) der zweiten Generation bei der Untersuchung von einer Vielzahl von Lebensmitteln^[55, 64,176] dieselbe Sensibilität.

Der zweite kommerziell erhältliche Test ist der ELISA *Salmonella* Tek (Organo Teknika Corp., Durham, USA). Bei experimentellen Vergleichen von Curiale et al^[45] wies dieser ELISA sogar eine höhere Sensitivität (10^3 KBE/ml) auf. In einer Studie von St.Clair und Klenk^[167] führte der *Salmonella* Tek jedoch bei Proben von rohem Hühnerfleisch zu falsch-positiven Raten von 43.2% und zu falsch-negativen Raten von 8.4%.

2.4.2.3 Immunodiffusionstest

Bei diesem Verfahren erfolgt der Nachweis des Antigens mittels einer sichtbaren Präzipitationsreaktion von Immunkomplexen. Dabei erfolgt die Diffusion des Antigens aus einer Lösung (beispielsweise eine Bouillon) in ein Gelmillieu, in dem sich die Antikörper befinden. Bei dem Aufeinandertreffen von Antigen und Antikörper kommt es zur Ausbildung von Antigen-Antikörper Komplexen, die sich in Form einer Präzipitationsbande makroskopische sichtbar darstellen.

Der 1-2 Test[®] wird in einem Kunststoffreaktionsgefäß durchgeführt, das aus zwei miteinander in Verbindung stehenden Kammern aufgebaut ist. Die kleinere Kammer ist die Anreicherungskammer und enthält eine Tetrathionat-Bouillon, die mit Brillantgrün und L-Serin angereichert ist. Die größere Kammer ist die Schwärmkammer, die mit einem nicht-selektiven, halbfesten Medium auf Peptonbasis gefüllt ist. Vor Untersuchungsbeginn wird die Verbindung zwischen den Kammern geöffnet und auf das Pepton-Medium (Vertiefung) in der Schwärmkammer ein Tropfen eines speziellen, polyvalenten H-Anti-Serums aufgetropft. Wenn es in der Anreicherungskammer zur Vermehrung von Salmonellen kommt, gelangen diese über die Verbindungsöffnung auch in die Schwärmkammer und bilden dort bei Zusammentreffen mit dem H-Antiserum eine sichtbar Immunpräzipitationsbande aus.

2.4.3 Molekularbiologische Nachweisverfahren

Klassische Methoden dafür sind die Bio-, Sero- und Phagentypisierung, die alle auf der Expression bestimmter genetischer Eigenschaften der Bakterien beruhen. Diese kann durch bestimmtes Milieu Faktoren beeinflusst werden^[62]. Deshalb haben genetische Verfahren große Vorteile im Vergleich zu immunologischen Verfahren.

Aufgrund der Entwicklung von molekularbiologischen Techniken besteht inzwischen die Möglichkeit, Bakterienstämme anhand ihres Genmaterials zu differenzieren. Beim Nachweis von Salmonellen mittels genetischer Methoden kann man die Hybridisierung und die Polymerase Kettenreaktion (PCR) unterscheiden.

2.4.3.1 Hybridisierung

Die molekulare Hybridisierung beruht darauf, daß z. B. die zu untersuchende DNA denaturiert wird und dann die zuvor *in vitro* markierte komplementäre Einzelstrang- DNA oder RNA, die sogenannte Gensonde, zugegeben wird. Die Gensonde bildet nun bei geeigneten Reaktionsbedingungen mit dem komplementären Einzelstrang der Ziel-DNA ein Hybrid. Durch die Markierung kann dieses Ereignis nachgewiesen werden.

Eine Hybridisierung kann zwischen DNA und DNA, DNA und RNA als auch zwischen RNA und RNA erfolgen. Als Sonde kann entweder DNA oder RNA eingesetzt werden. Zielsequenz kann sowohl DNA als auch RNA (mRNA, rRNA) sein. In der Bakteriologie dient die DNA-Hybridisierung Diagnostik hauptsächlich zum Nachweis von pathogenen Keimen, da mit Gensonden eine sehr hohe Spezifität erzielt wird. Zusätzlich kann die Spezifität in Abhängigkeit von der gewählten Sonde und den gewählten Hybridisierungsbedingungen so variiert werden, daß sowohl eine genus- als auch ein speziesspezifischer Nachweis möglich wird^[186].

Die Methoden der DNA Hybridisierung können in ein-Phasen Hybridisierungstechnik und zwei-Phasen unterscheiden werden. Im zweiphasigen System ist die Ziel-DNA an einen Träger gebunden, während sich die Gensonde in der Hybridisierungslösung befindet. Die zwei-Phasen Hybridisierungstechnik sind heute die häufiger verwendete Hybridisierungstechnik. Hierbei unterscheidet man weiter in Spot-Hybridisierung^[92], Southern-blot-Hybridisierung^[166], Colony-blot-Hybridisierung^[82,106], *in situ* Hybridisierung^[72], und Sandwich-Hybridisierung^[142].

Salmonella-DNA-Sonden bestehen aus Gensequenzen von 300-1500^[155] Basenpaaren (bp) oder aus teilweise synthetischen Oligonukleotiden von 15-30 bp^[129,181]. Diese sind zum Nachweis der Hybridisierung mit der Zielsequenz mit unterschiedlichen Nachweisgruppen "beladen". Da die radioaktiven Verfahren^[62,106] verständlicherweise im Routinelaboratorium nicht favorisiert werden, wurden nicht-radioaktive DNA-Hybridisierungstests^[150,200] entwickelt.

Flowers et al.^[65] konnten in einer Untersuchung von insgesamt 1609 Lebensmittelproben zeigen, daß der DNA-Hybridisationstest für den Nachweis von Salmonellen genauso erfolgreich eingesetzt werden kann wie die kulturelle Standardmethode und bei bestimmten Lebensmitteln sogar signifikant bessere Ergebnisse bringt. Auch die Untersuchungen von Emswiler-Rose et al.^[56] zeigten, daß die DNA-Hybridisation eine zuverlässige Methode für den Salmonellen-Nachweis ist. Gegenwärtig existiert nur ein kommerziell verfügbarer Test, der auf der Nukleinsäuretechnologie beruht. Der Gene-Trak[®] Salmonella (Gene-Trak[®] -Systems, Framingham, USA) dient zum Nachweis von Salmonellen in Lebensmitteln. Die Aufarbeitung des Probenmaterials erfolgt bei diesem Testsystem zunächst wie bei dem kulturellen Nachweis mit Voranreicherung (Laktose-Bouillon) und Selektiv-anreicherungen (Tetrathionat-Brillantgrün- und Selenit-Cystin-Bouillon), auf die dann eine Anreicherung in GN-Bouillon (gramnegativ Bouillon) folgt. Dieses System stellt schon die zweite Generation dar. Die erste Generation arbeitete auf der Basis von radioaktiv markierten chromosomal-gerichteten DNA-Fragment Sonden^[65,167]. Die zweite Generation verwendet fluoreszenzmarkierte, rRNA-gerichtete Oligonucleotide-Sonden zu Nachweis^[150,200]. Diese Hybridisierung-Technik (GENE-TRAK[®]) besitzt eine niedrige falsch-positiv und falsch-negativ Rate, ist aber der von der aufwendigsten Test für die Durchführung im Labor^[15].

2.4.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die durch den Primer vermittelte enzymatische Amplifizierung der Ziel-DNA kann theoretisch ein einzelnes Gen millionenfach amplifizieren^[168]. Bei diesem Verfahren werden zuerst durch Hitzebehandlung die gesamte DNA des Probenmaterials in Einzelstränge zerlegt. Danach werden Primer (kurze, einzelsträngige, synthetische Oligonukleotide, die zur gesuchten DNA-Sequenz homolog sind) in einem 10^8 bis 10^{12} Fache stöchiometrischem Überschuß hinzugegeben. Durch den Überschuß wird auch die Wiederaneinanderlagerung der einzelsträngigen DNA verhindert. Die Reaktionslösung

enthält die Primer, die DNA-Polymerase und die vier Desoxyribonukleoside (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) in einem Puffer gelöst. Die Primer binden an die Salmonella- DNA und es folgt die DNA- Neusynthese der zwischen einem Primer-Paar gelegenen DNA-Sequenz durch eine hitzeresistente DNA-Polymerase. Somit kommt es zur Neubildung einer doppelsträngigen DNA. Diese Schritte werden mehrfach (20-35 Zyklen) wiederholt, wobei die einzelnen Schritte bei unterschiedlichen Temperaturen ablaufen. Durch die exponentielle Anreicherung der DNA-Abschnitte werden diese auch ohne Voranreicherung nachweisbar^[40,41], zum Beispiel mittels Gensonden. Es könne bei dieser Methode sowohl chromosomale als auch Plasmid abgeleitete Sequenzen verwendet werden^[18,36].

In mehreren Publikationen wurde die Eignung der PCR –Technik zum Nachweis geringster Mengen Salmonellen nachgewiesen^[16,19,66,86,107,164,175,187]. Aber die der Methode innewohnenden Fehlermöglichkeiten(z.B. Amplifizierung auch von Genen toter Zellen), die in den Proben vorhandenen Verunreinigungen und aufwendige Protokolle sowie der große Materialaufwand haben bisher noch kaum zur Einführung eines kommerziell verfügbaren PCR-Tests für Salmonellen geführt.

2.4.4 Antikörper-Nachweis

Spezifische Anti-*Salmonella*-Antikörper werden im wesentlichen nur noch bei Typhus oder Paratyphus (A,B,C) bestimmt; man benutzt noch immer die WIDAL-Reaktion (H-, O- und Vi-Agglutination).

Andere serologische Teste wurden für die Diagnostik von Salmonellen in Geflügel entwickelt. Der Ganz-Blut-Test (WBT), der z.B. mit Kristallviolett gefärbte Antigene verwendet, wird seit mehr als 50 Jahren erfolgreich zum Nachweis von *S. Pullorum*/*S. Gallinarum* bei infizierten Hühnerbeständen eingesetzt^[161]. Der WBT-Test sowie der Serumagglutinationstest (SAT) und ELISA-Tests wurden auch für *S. Enteritidis*-Infektionen entwickelt.

Zwei Hauptsysteme für den ELISA-Test liegen vor: der indirekte ELISA und der Sandwich-ELISA. Bei dem indirekten ELISA sind die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit *Salmonella*-Antigenen beladen, die aus LPS, Geißeln, SEF14-Fimbrien, Außenmembranproteinen und Rohantigen bestehen. In dem Sandwich-ELISA werden zunächst monoklonale Antikörper gegen LPS, Geißeln und SEF14-Fimbrien vorgelegt,

die dann mit Antigen abgesättigt werden. Erste Methode ist einfacher, der Sandwich-ELISA spezifischer.

Serologische positive Geflügelbestände müssen kulturell nachuntersucht werden. Es ist aber bekannt, daß der serologische Anti-*Salmonella*-Antikörper-Nachweis nicht immer kulturell bestätigt werden konnte und umgekehrt. Die Gründe dafür liegen in der Dynamik der Antikörperbildung unterschiedlicher Methodenempfindlichkeit u. a.^[203]

2.4.5 Weitere Nachweisverfahren

2.4.5.1 Immunoseparation

Die immunomagnetische Separation ist eine elegante und effektive Konzentrationsmethode^[113]. Hierbei werden spezifische, poly- und monoklonale *Salmonella*-Antikörper an supermagnetische Polystyrol-Perlen (Dynabeads[®]) kovalent gebunden. Sie können mit mehr als 1400 *Salmonella*-Stämmen aus 200 verschiedene Serovaren agglutinieren, das entspricht 99,4% der Isolate bei Mensch und Tier in Europa und den USA. Die Polystyrol-Perlen werden in das Voranreicherungsmedium gegeben und unter ständigem Schütteln für die Dauer von 10 Minuten kommt es zur Antigen-Antikörper-Reaktion. Danach erfolgt die Separation über drei Minuten in einem Magnetpartikel-Konzentrierer, durch den die Dynabeads[®] an der Gefäßwand festgehalten werden und so das Voranreicherungsmedium abpipetiert werden kann. Es folgt ein zweimaliges Waschen der *Salmonella*-Bead-Komplexe mit PBS-Tween unter Anwendung des Magneten und anschließende Resuspension in PBS. Die so angereicherten Salmonellen können kulturell oder biochemisch oder durch ELISA nachgewiesen werden^[59,86].

Durch die Kopplung von immunomagnetischer Separation und PCR im Anschluß an eine Voranreicherung erhält man ein schneller (Gesamtdauer der Verfahrens inklusive Voranreicherung 24 Stunden) und sensitiver Nachweisverfahren für Salmonellen^[59]

2.4.5.2 Bakteriophagen

Die Einführung des gattungsspezifischen O-Phagen Felix O-1 in die Salmonellen-Diagnostik zum Nachweis einer Lysosensibilität erfolgt durch Cherry et al.^[35]. Die Spezifität und Anwendbarkeit in der Diagnostik sind seither mehrfach untersucht worden^[25,61,192]. Salmonellenstämme bestimmter O-Gruppen (z.B. Gruppe E) zeigen aber eine gehäufte Resistenz und Stämme der Subspezies IIIa und IV werden grundsätzlich

nicht lysiert. Damit eignet sich der Phage Felix O1 mehr für die Subspezies-Differenzierung als für die allgemeine Differenzierung von Salmonellen^[25].

2.5 Zusammenfassung der Nachweisverfahren

Zusammenfassend sind die Arbeitsschritte für einige Methoden in Tabelle 6 aufgelistet. In Deutschland wird nur eine kulturelle Bestätigung nach §35 LBMG gefordert, die alternative Methoden dürfen bisher nur zur Verdachtsdiagnose eingesetzt werden. Der Material- und Zeitaufwand für den gesicherten *Salmonella* - Nachweis in Lebensmitteln ist daher immer noch hoch. Weitere Anstrengungen müssen unternommen werden, um Salmonellen schneller und sensitiv identifizieren zu können und Kosten zu senken.

LITERATURÜBERSICHT

Tab. 6: Konventionelle und Alternative Methoden zur Isolierung und Identifizierung von Salmonellen–Arbeitsschritte^[144]

Methoden	Voranreicherung	Selektive Anreicherung	Nachanreicherung	Selektivmedien/methode
ISO, §35 LMBG	BPW	RV, SC	-	BSA, XLD, DCA
AOAC	-/Lactosebouillon	TTBG, SC	-	BSA, XLD, HE
„motility enrichment“	BPW	und/oder SC, RV, TT	-	MSRV, DIASSALM
OSRT	-	RV und Brillantgrün-Nährböden	OSRT-Test	
1-2 Test	BPW	TTBG	-x1-2 Test	
Immuno-chromatographie	BPW	RV	BPW	LUMAC-Test
Immunomagnetic separation (IMS)	BPW	IMS (Dynabeads®-Anti-Salmonella)	-	XLD, ELISA u.a.
ELISA–Techniken Tecra Tecra unique VIDAS EIA foss	BPW BPW BPW -	RV, SC - RV, SC -	M-Bouillon M-Bouillon M-Bouillon M-Bouillon	Tecra ELISA Tecra unique ELISA VIDAS- ELISA EIA foss ELISA
Impedanz-Messung	-	-	-	Impedanz-Messung
DNA/DNA-Sonden	BPW	RV, SC	z.B. GN-Bouillon Hajna	DNA-DNA-Hybridisierung
PCR	BPW	-	-	PCR

AOAC: Association of Official Agricultural chemists (USA) **BPW:** Buffered Peptone Water . **BSA:**Bismut-Sufit-Agar nach Wilson-BLAIR **DCA:** Desoxycholat-Citrat-Agar. **DIASSALM:** Diagnostic Salmonella semi-Solid Rappaport Vassiliadis Medium. **HE:** Hektoen-Enteric-Agar **M-Bouillon:** Mannaose-Bouillon. **MSRV:** Rappaport-Vassiliadis-Halbfest-Nährboden-Basis, (mod) **RV:** Rappaport-Vassiliadis-Anreicherungsbouillon. **SC:** Selenit-Cystin-Anreicherungsbouillon. **TT:** Tetrathionat-Anreicherungsbouillon. **TTBG:** Tetrathionat-Brilliantgrün-Galle-Anreicherungsbouillon(Mod.) **XLD:** Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar.

2.6 *In situ* Hybridisierung (ISH) und Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

In dieser Studie wurde eine auf der Basis der *in situ* Hybridisierung (ISH) entwickelte Verfahren benutzt: die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH). Hier wird zunächst die Technik auf theoretischer Grundlage, die Einflußfaktoren und die Entwicklung vorgestellt.

2.6.1 Begriff von ISH und FISH

Die *in situ* Hybridisierung (ISH) ist eine aussagekräftige Methode, welche die Möglichkeit eröffnet, Nukleinsäuresequenzen (also RNA- sowie DNA-Sequenzen) in Geweben, Zellen, Zellkernen und Chromosomen sichtbar zu machen^[102]. Damit läßt sich eine Nukleinsäure direkt im biologischen Präparat "*in situ*", also vor Ort, lokalisieren. Diese Technik wurde erstmals von Pardue und Gall^[131] sowie von John *et al.*^[91] unabhängig voneinander beschrieben. Sie eignet sich zur Identifizierung und Charakterisierung viraler und bakterieller Sequenzen, zur Geschlechtsbestimmung, für die Lokalisierung transformierender Sequenzen und die Analyse von Neurotransmittertranskripten. Mit dieser Technik lassen sich nicht nur grundlegende biologische Fragen angehen; *in situ* Hybridisierung spielen auch in der medizinischen Diagnostik und in Pflanzenzüchtungsprogrammen eine wichtige Rolle^[102].

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) gehört zu einer technischen Art der *in situ* Hybridisierung. Hier werden die Sonden mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und nach Hybridisierung können Zellen (z.B. angefärbte Zellen) im Epifluoreszenz-Mikroskop sichtbar gemacht werden.

2.6.2 Grundlagen der ISH

Die *In situ* Hybridisierung macht sich die Reassoziationskinetik doppelsträngiger Nukleinsäuremoleküle zunutze. Doppelsträngige Nukleinsäuren entstehen, indem sich zwei komplementäre Einzelstränge über Wasserstoffbrückenbindungen zusammenlagern. Jeder Nukleinsäureeinzelstrang ist ein lineares unverzweigtes Polymer mit einem Zucker-Phosphat-(Phosphodiester-) Rückgrat, das an jedem Zuckerrest eine Base (Purin oder Pyrimidin) trägt. Die Wasserstoffbrücken bilden sich zwischen Aminogruppen (NH₂) und Ketogruppen (C=O) komplementärer Basen. In der DNA-Doppelhelix paart Adenin (A, eine Purinbase) über Wasserstoffbrücken mit Thymin (T, in DNA, eine Pyrimidinbase),

im gegenüberliegenden Polynucleotidstrang und Guanin (G, eine Purinbase) mit Cytosin (C, eine Pyrimidinbase). In RNA-Strängen ersetzt Uracil (U, in RNA, eine Pyrimidinbase) Thymin (siehe Abb 6 a). Einige Sequenzen von Nukleinsäuren können deshalb spezifisch durch eine Sonde, welche die umgekehrt komplementäre Sequenzen hat, nachgewiesen werden^[102].

2.6.3 Der allgemeine Prozeß der *In situ* Hybridisierung

Die *in situ* Hybridisierung beinhaltet normalerweise folgende Arbeitsschritte (Abb.6.b)

- a) Bestimmen einer spezifische Sonde, und Markierung um sie nachher detektieren zu können. (siehe 2.6.4.1)
- b) Fixierung der Zellen oder des Gewebes, um Zugang zur Nukleinsäuren zu erhöhen. Die Fixierung konserviert die Zellen- oder Gewebestruktur und begrenzt den weiteren Verlust von Nukleinsäuren. Der Grad der Fixierung ist umgekehrt proportional zur Durchlässigkeit des Gewebes. Das heißt, ein übermäßig stark fixiertes Gewebe mag zwar sehr gut konserviert sein, ist aber möglicherweise für Sonde und Nachweisreagenzien nicht genügend permeabel. Die Wahl des Fixiermittels hängt vom Material, von der Sonde, von dem für den Nachweis der Hybridisierung benutzten bildgebenden (z. B. Licht- oder Elektronenmikroskop) System und der gewünschten Sensitivität ab. Vor jeder neuen Anwendung soll man Art und Dauer der Fixierung sorgfältig austesten.
- c) Hybridisierung mit markierten Sonden. Vor der Hybridisierung wird die Zellsuspension auf den Objektträger in einer Ethanolreihe entwässert und an der Luft getrocknet. Das Trocknen ist nicht unbedingt notwendig, stellt aber sicher, daß die Sonde nicht mit Resten der Prähybridisierungslösung verdünnt wird. Die Hybridisierung wird von Schmelztemperatur (T_m), Hybridisierungstemperatur, Ionenstärke und organischen Stoffen in der Hybridisierungslösung beeinflusst. Die Geschwindigkeit der Hybridisierung hängt von der Sondenlänge, der Komplexität der Sequenz und ihrer Konzentration ab.
- d) Waschen, um unhybridisierte Sonden zu entfernen. Die Waschschritte nach der Hybridisierung erfolgen meist unter etwas Stringenteren-Bedingungen als die Hybridisierung, damit locker gebundene Sonden entfernt werden und nur perfekt oder nahezu perfekt gepaarte Hybridmoleküle übrig bleiben.

- e) Detektion von markierten Sonden. Sie zeigen das Nukleinsäureziel in Zellen oder in Gewebe. Die Methoden zum Nachweis und zur Visualisierung der Signale richten sich nach der Art der Markierung der Sonde.

Die genauen Arbeitsschritte des Nachweisverfahrens von Salmonellen mittels der FISH Technik sind in Kapitel 4. „Methoden“ ausführlich dargestellt.

2.6.4 Hybridisierungskinetik und deren Parameter

Bei der Reassoziaton von Nukleinsäuren werden einzelsträngige Moleküle unter solchen Salz- und Temperaturbedingungen inkubiert, die die Bildung von basengepaarten Doppelsträngen begünstigen. Das Experiment ist dabei die Denaturierung und anschließende Reassoziaton einer gereinigten und völlig komplementären DNA/RNA. Die Wasserstoff-Brückenbindung zwischen den Paaren G-C und A-T ist ein entscheidender Faktor bei der Assoziations- und Dissoziationskinetik. Zunehmende Länge von komplementären Nukleinsäuren bewirkt eine Erhöhung der Doppelstrangstabilität und favorisiert somit die Assoziaton zu Basenpaaren.

Variationen in der Temperatur und in der Salz- und Sondenkonzentration beeinflussen die Hybridisierungsreaktion.

2.6.4.1 Sonden

Welche Sonde man auswählt, hängt von der gewünschten Sensitivität, Spezifität, Auflösungsvermögen, Hybridisierungsziel, Bequemlichkeit und Sicherheit ab^[198]. Für viele Alternativen sind Sonden- Typen vorhanden, z. B. RNA Sonden, Lange DNA Sonden (Einzigestränge oder Doppelstränge), oder Oligonukleotide (kurz Oligos) (siehe Tab.7). Am meisten verwendet man Oligonukleotide als Sonde^[9], die kurze Abschnitte von spezifischen Einzelbausteinen der Nukleinsäuren sind. Oligonucleotid-Sonden zur Identifizierung spezifischer DNA- oder RNA- Sequenzen werden in der Regel chemisch nach der Phosphoramidit-Methode synthetisiert.

Der Vorgang der Hybridisierung ist abhängig von der Konzentration der eingesetzten Ziel-DNA/RNA und der Konzentration der Sonden. Auch die Länge der Sonde ist wichtig.

Tab 7: Vor- und Nachteile von RNA- und DNA-Sonden für *In situ* Hybridisierung ^[102]

	Vorteile	Nachteile
Einzelsträngige RNA-Sonde	<p>Sonde frei von Vektorsequenzen.</p> <p>Nach der Hybridisierung entfernt man nicht hybridisierte einzelstränge RNA-Sonde mit RNase A, um unspezifische Hintergrundsignale zu vermeiden.</p> <p>RNA:RNA-Hybride sind sehr stabil.</p>	<p>Man muß die Sequenz in einen geeigneten (Ribosonden) Transkriptionsvektor klonieren.</p> <p>Da RNA sehr schnell zerfällt, sind besondere Vorsichtsmaßnahmen erforderlich.</p> <p>RNA-Sonden binden unter Umständen fester als DNA-Sonden und erzeugen ein starkes Hintergrundsignal.</p>
DNA-Sonden		
a) Klonierte DNA-Sonden	<p>Vektor läßt sich über Netzwerke vervielfältigen.</p> <p>Kein Subklonieren erforderlich.</p> <p>Einfache Handhabung und Lagerung.</p>	<p>Sonde muß denaturiert werden.</p> <p>DNA:DNA- und DNA:RNA-Hybride sind weniger stabil als RNA:RNA-Hybride.</p> <p>Die doppelsträngige Sonde kann mit sich schnell selbst hybridisieren.</p>
b) Mit PCR hergestellte DNA-Sonden	<p>Sonde frei von Vektorsequenzen.</p> <p>Vervielfältigung und Markierung in derselben Reaktion möglich.</p>	<p>Wenn keine sequenzspezifischen Primer vorhanden sind, muß die Sequenz in einen Vektor mit geeigneten Primerbindungsstellen kloniert werden.</p> <p>DNA:DNA- und DNA:RNA-Hybride sind weniger stabil als RNA:RNA nur für Sequenzen von weniger als 4 kbp Länge geeignet Permeabilitätsprobleme bei Sonden über 1 kbp Länge.</p>
c) Synthetische Oligonukleotid-Sonde	<p>Sonde kann maßgeschneidert werden.</p> <p>Sonde dringt aufgrund ihrer geringen Länge (10-50bp) gut in Präparat ein. Kein klonieren erforderlich.</p>	<p>DNA-Syntheseautomat erforderlich.</p> <p>Die geringe Länge begrenzt die Zahl der einbaubaren Markermoleküle. Bereits wenige fehlgepaarte Nucleotide können die Stabilität der Doppelhelix erheblich beeinträchtigen.</p>

2.6.4.2 Temperatur

Die wichtigste Kenngröße bei Hybridisierungsreaktionen ist die Schmelztemperatur T_m . Dies ist die Temperatur, bei der die Hälfte aller Nukleinsäuren-Moleküle in einer Lösung in der doppelsträngigen Form, die andere als Einzelstrang-Molekül vorliegt. Das Aufschmelzen von Nukleinsäuren ist ein reversibler Prozeß. T_m wird durch folgende Faktoren beeinflusst^[198]

- (a) Eigenschaft der Sonde und Hybridisierungsziel. RNA:RNA Hybride sind stabiler als RNA:DNA Hybride, diese sind stabiler als DNA:DNA Hybride.
- (b) Länge der Sonde. Längere Sonden bilden stabilere Hybride.
- (c) Basenpaarungen der Sonde. GC-Paare (3 Wasserstoffbrücken) sind stabiler als AT-Paare (2 Wasserstoffbrücken).
- (d) Größe der Identitäts-Sequenz zwischen Sonde und Ziel. Nicht passende Basenpaar-Mismatches- in nicht perfekt komplementären DNA-Strängen reduzieren die thermische Stabilität der DNA-Duplexmoleküle.
- (e) Komposition der Hybridisierung-/Waschlösung. Hohe Konzentration von monovalenten Kationen, z.B. Na^+ .

Zur Erhöhung der Reassoziationsrate muß die Hybridisierungstemperatur gesenkt werden (reduzierte Stringenz). Hybridisierung mit kürzeren Oligonucleotid-Sonden werden in der Regel bei einer Temperatur durchgeführt, die um 5°C niedriger liegt als der T_m -Wert. Für jede nicht komplementäre Base wird die Hybridisierungstemperatur um weitere 5°C reduziert, so daß die Stabilität des Hybrids erhalten bleibt. Für Oligonucleotid-Sonden <20 bp kann der T_m -Wert in $^\circ\text{C}$ nach folgender Formel berechnet werden: $T_m=4(G+C)+2(A+T)$ wobei G, C, A und T die Anzahl der jeweiligen Basen der Sonde darstellen.

2.6.4.3 Ionenstärke

Ein enger Bezug der Hybridisierungstemperatur besteht auch zur Ionenkonzentration des verwendeten Puffersystemes^[30]. Monovalente Kationen, meist Na^+ , schwächen die intermolekulare Abstoßung der negativ geladenen Einzelstränge und erhöhen so die Stabilität und den Schmelzpunkt der DNA^[54]. Divalente Kationen wie Mg^{2+} , Mn^{2+} stabilisieren einen Doppelstrang. Durch eine erhöhte Ionenkonzentration wird eine Beschleunigung der Hybridisierung erreicht^[116].

Ein wichtiger bei der Hybridisierung von Nukleinsäuren zu berücksichtigender Faktor, ist die Stringenz der Reaktion. Stringente Bedingungen, wie hohe Temperaturen und niedrige Ionenstärke, erhöhen die Spezifität bei gleichzeitig sinkender Sensitivität, da nur komplementäre DNA- Sequenzen hybridisieren. Umgekehrt entstehen bei niederen Temperaturen und hoher Ionenkonzentration labilere, unspezifische Hybride^[172]. Diese Faktoren gelten auch für die Waschvorgänge innerhalb von Hybridisierungsexperimenten.

2.6.4.3 Organische Lösungsmittel

Für die meisten Nukleinsäuren liegt die optimale Hybridisierungstemperatur in wässrigen Salzlösungen zwischen 60-75°C. Da diese Temperatur für *in situ* Hybridisierung zu hoch ist und es außerdem zu thermisch bedingten Strangsnitten kommen kann, wird die Hybridisierungstemperatur durch Zugabe denaturierender Substanzen wie Formamid erniedrigt^[92].

Zur Steigerung der Hybridisierungssignale werden häufig reaktionslose Polymere wie Dextransulfat^[111,121] oder Polyethylenglycol^[32,46] in der Hybridisierungslösung eingesetzt. Der Effekt wird darauf zurückgeführt, daß die inerten Polymer-Moleküle die an der Hybridisierung beteiligten Nukleinsäure-Moleküle aus der Reaktionslösung verdrängen und so die effektive Nukleinsäurekonzentration erhöhen^[194]. In Abwesenheit von Formamid haben RNA/RNA-Doppelstränge eine Schmelztemperatur, die um 10°C höher liegt, als die von vergleichbaren DNA/DNA Hybriden. DNA/RNA-Hybride liegen in ihrer Stabilität dazwischen. Bei einem Formamid-Gehalt von 80% liegen die Schmelztemperaturen von RNA/DNA-Hybriden bis 10°C höher als die von entsprechenden DNA/DNA-Komplexen. Somit ändern sich auch die Hybridisierungsbedingungen und die Reaktionsbedingung können entsprechend variiert und angepaßt werden.

2.6.5 FISH-Technik mit rRNA-gerichteten Oligonukleotid-Sonden

Neben den erwähnten klassischen Kultivierungsverfahren zum Nachweis von *Salmonella* werden hauptsächlich immunologische, kombiniert immunologischbiochemische und PCR-gestützte Nachweissysteme für *Salmonella* verwendet.

Diese kultivierungsabhängigen Nachweisverfahren haben den großen Vorteil, nur lebensfähige Keime nachzuweisen. Dem gegenüber stehen z. B. PCR-gestützte

Nachweisverfahren für Salmonellen. PCR-Verfahren können nicht nur DNA-Abschnitte von lebenden, sondern auch von toten Organismen, ja sogar extrazellulär vorliegende DNA zu Amplifikationsprodukten richtiger Größe führen. In komplexen Umweltproben können inhibierende Stoffe vorhanden sein, die eine erfolgreiche Amplifikation der gewünschten DNA-Abschnitte bei PCR Verfahren unterbinden^[18,66,196]. Ein weiterer Vorteil der klassischen Kultivierungsmethode ist das geringe Inokulum, das zum positiven Nachweis nötig ist. Theoretisch würde das Vorhandensein einer Zelle in der Probe zu einem positiven Nachweis führen. Diese hohe Sensitivität zur Detektion lebender Keime ist von anderen Nachweismethoden unerreicht. Auch subletal geschädigte Zellen erhalten durch die relativ langen Inkubationszeiten die Möglichkeit zur Rekonvaleszenz. Darum beinhalten auch moderne molekularbiologische Nachweisverfahren oft einen selektiven oder nicht-selektiven Voranreicherungsschritt.

Immunologische Verfahren, die auf die Detektion der O-, H-, und Vi-Antigene von Salmonellen durch Antikörper beruhen wie ELISA oder „sandwich“-ELISA Systeme, zeichnen sich vor allem durch ihre leichte Automatisierbarkeit und die Durchführung der Reaktionen in Mikrotiterplatten aus. Jedoch liegt bei dieser immunologischen Methode die Detektionsgrenze bei 10^5 bis 10^6 Zellen/ml^[83,125,132]. Noch ein Problem stellen Kreuzreaktionen der Anti-Salmonella-Seren mit anderen *Enterobacteriaceae* dar, die zu falsch-positiven Ergebnissen führen, wodurch eine kulturelle Überprüfung jedes positiven Ergebnisse auf Selektiv-/Differentialnährböden erforderlich ist. Dies setzt entweder sehr hohe Zellzahlen in der Probe oder abermals einen primären Anreicherungsschritt voraus. Aufgrund der über 2.500 *Salmonella* Serovarianten können nur Spezial- und Referenzlabors eine präzise Salmonellen Diagnostik durchführen. Diese aufwendige Diagnostik ist jedoch nur bei klinischen oder epidemiologischen Untersuchungen gerechtfertigt, während im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur die Ab- bzw. Anwesenheit von Salmonellen, unabhängig von ihrem Serotyp, nachgewiesen werden sollte.

Die oben angesprochenen Nachteile von PCR-gestützten Detektionsverfahren und von immunologischen sowie kultivierungsabhängigen Nachweisverfahren für Salmonellen können durch fluoreszierende *in situ* Hybridisierung mit salmonellaspezifischen Sonden weitgehend unterbunden werden.

Die Anwendung der *in situ* Hybridisierung zur Identifizierung von Mikroorganismen hat schon Olsen et al.^[128] vorgeschlagen. Die mikroskopische Identifizierung von einzelnen Zellen mit rRNA-gerichteten Sonden wurde zunächst mit radioaktiv markierten Oligonucleotiden ausgeführt^[76]. Delong et al.^[52] und Amann et al.^[6] haben die FISH-Technik zur Identifizierung einzelner Zellen entwickelt. Die FISH-Technik ist ein kulturunabhängiges Verfahren. Sie basiert auf der Hybridisierung einer kleinen spezifischen fluoreszenz-farbstoff-gekoppelten Oligonukleotidsonde mit einer Zielnukleinsäurefraktion. Nach Hybridisierung könne einzelne Bakterien durch Epifluoreszenz-Mikroskop identifiziert werden. Als Hybridisierungsziel wird die ribosomale RNA(rRNA), meist die 16S-rRNA verwendet. Zunehmend wird auch die 23S-rRNA verwendet, da sie ungefähr doppelt so viele Nukleotide enthält. Hierdurch lassen sich Unterschiede zu sehr nahen Verwandten besser darstellen.

Diese Technik wurde sehr erfolgreich für die phylogenetische Identifizierung von einzelnen Zellen aus unterschiedlichen Umweltmilieus angewendet. Die vielseitige Anwendung der Technik wurde kontinuierlich entwickelt, einschließlich der Identifizierung und Quantifizierung von spezifischen Zellen aus Plankton^[3,94,191], Sediment^[110,163,188], und Boden^[38]; Beurteilung von physiologischer Aktivität durch von rRNA-Nachweis in Zellen^[93,100,138], räumliche Lokalisierung von Mikroorganismen entlang von Umwelt-Gradienten^[60,141,158] usw.. Die Methode zur Detektion werden Epifluoreszenz-Mikroskop, Laser Scanning Confocal Mikroskop^[115,189], und Flow cytometry^[4,162,188] verwendet.

Es gibt verschiedene Hybridisierungstechniken, welche mit Nukleinsäuresonden arbeiten. Dot-Blot Hybridisierung und *in situ* Hybridisierung sind zwei häufige Verfahren zum rRNA basierten Studium der mikrobiellen Ökologie. Aber die beiden Techniken besitzen einen wesentlichen Unterschied^[7]. Für Dot-Blot Hybridisierung müssen die Nukleinsäuren zuerst aus Reinkultur, Anreicherungsproben oder direkt aus Umweltproben extrahiert werden. Alle Zellen müssen lysiert werden. Danach sind die Nukleinsäuren auf einer Membran immobilisiert und mit radioaktiven oder nicht radioaktiven Sonden hybridisiert. Die Ergebnisse werden von dem Verhältnis der spezifischen rRNA zur gesamten extrahierten rRNA Mengen entschieden.

Bei der *in situ* Hybridisierung werden die Nukleinsäuren hingegen direkt in der Zelle nachgewiesen. Die Sonde kann nach dem Zellfixierungsprozeß frei zum Hybri-

disierungsziel gelangen, gleichzeitig bewahren die Zellen ihre morphologische Struktur. Deswegen werden die Ergebnisse im wesentlichen von der erfolgreichen Zellfixierung abhängig sein (der Hauptfaktor ist die Penetration der Zellmembran) und der Menge von rRNA in der Zelle. Gram-positiv Bakterien sind schwerer zu durchdringen als gram-negative^[20,58].

Nicht jede rRNA Position kann als Hybridisierungsziel für die FISH Technik benutzt werden (z. B. *Escherichia Coli* Position 640^[31], aber die gleiche Sonde für Dot-Blot Hybridisierung ist kein Problem). Die FISH-Technik eignet sich sehr gut für die Bestimmung der genauen Anzahl an spezifischen Zellen in der untersuchten Probe. Bei der Dot-Blot Hybridisierung kann nur eine grobe Aussage getroffen werden, weil eine bestimmte Anzahl von rRNA aus vielen Zellen mit niedriger rRNA Menge oder wenigen Zellen mit hoher rRNA Menge stammen kann. Die FISH Methode hat noch einen Vorteil, nämlich kann man mit verschiedenen Sonden, die mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert sind, verschiedene Arten von Mikroorganismen in einer Probe nachweisen.

3 Material

3.1 Verwendete Mikroorganismen

Die im Rahmen der Arbeit untersuchten Stämme (Salmonellenstämme und andere *Enterobacteriaceae*) wurden aus verschiedenen Stammsammlungen (ATCC, ALM, DSM, LGA und NCTC) erlangt. Sie umfassen die 10 häufigsten *Salmonella*-Serovare Deutschlands und die 20 häufigsten der USA (Tab.4) sowie die Bakterien, der nächsten verwandeten Genera wie *Escherichia*, *Shigella* und *Citrobacter*. Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterien, ihre Kulturbedingungen sowie ihre jeweilige Herkunft sind in Tabelle 8 aufgeführt.

3.2 Herkunft der Lebensmittelproben

Die Probenahmen wurden vom LGA durchgeführt. Einige Proben stammen vom Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Fellbach (CVUA) und wurden im Rahmen der amtlichen Lebensmittelüberwachung gewonnen.

3.3 Allgemein verwendete Lösungen

Azeton	Merck
Ethanol 96%: (C ₂ H ₅ OH)	Uniapotheke
Natronlauge (NaOH): 1M, 2M	Merck
Physiologische Kochsalzlösung: 0.9%(W/V) NaCl mit NaOH auf pH 7 einstellen und 15 min bei 121°C autoklavieren	Merck
Salzsäure (HCl): 1M, 2M	Merck
Vollentsalztes Reinstwasser (H ₂ O _{bidest}) Leitfähigkeit: ca. 0,055µS/cm (bei 25°C)	VE-Wasser nach Passage der Ionenaustauscheranlage Seralpur 90 CN

3.4 Reagenzien, Medien und Nährböden für die Standard Kultur Methode

Gepuffertes Pepton Wasser	Heipha Diagnostika
Pepton aus Fleisch	10,0g
Natriumchlorid (NaCl)	5,0g
Di-Natriumhydrogenphosphat Dodekahydrat (Na ₂ HPO ₄ . 12 H ₂ O)	9,0g
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	-
Aqua dest.	1 L
pH 7.2 ± 0.1	

Tab.8: Bakterienstämme für FISH

Organismus	T_{Opt.} °C	Medium	Herkunft
<i>S. Agona</i>	37	Medium1	LGA
<i>S. Anatum</i>	37	Medium1	LGA
<i>S. Arizonae</i>	37	Medium1	LGA, DSM, NCTC
<i>S. Bovismorbificans</i>	37	Medium1	LGA
<i>S. Braenderup</i>	37	Medium1	LGA
<i>S. Brandenburg</i>	37	Medium1	LGA
<i>S. Choleraesuis</i>	37	Medium1	DSM
<i>S. Daressalaam</i>	37	Medium2	DSM
<i>S. Derby</i>	37	Medium1	LGA
<i>S. Diarizonae</i>	37	Medium1	LGA
<i>S. Dublin</i>	37	Medium1	ATCC
<i>S. Enteritidis</i>	37	Medium2	LGA, ATCC, DSM, NCTC
<i>S. Gallinarum</i>	37	Medium1	DSM
<i>S. Hadar</i>	37	Medium1	LGA
<i>S. Heidelberg</i>	37	Medium1	DSM
<i>S. Houtenae</i>	37	Medium2	DSM
<i>S. Indica</i>	37	Medium1	ATCC
<i>S. Infantis</i>	37	Medium1	LGA
<i>S. Paratyphi B (+)</i>	37	Medium1	LGA
<i>S. Javiana</i>	37	Medium1	LGA
<i>S. Liandoff</i>	37	Medium1	LGA
<i>S. Litchfield</i>	37	Medium1	LGA
<i>S. London</i>	37	Medium1	LGA
<i>S. Mbandaka</i>	37	Medium1	LGA
<i>S. Mgulani</i>	37	Medium1	LGA
<i>S. Montevideo</i>	37	Medium1	LGA
<i>S. München</i>	37	Medium1	LGA
<i>S. Newport</i>	37	Medium1	LGA
<i>S. Obogu</i>	37	Medium1	LGA
<i>S. Oranienburg</i>	37	Medium1	LGA
<i>S. Panama</i>	37	Medium1	ALM
<i>S. Paratyphi A</i>	37	Medium1	LGA
<i>S. Paratyphi B</i>	37	Medium1	LGA, NCTC
<i>S. Poona</i>	37	Medium1	LGA
<i>S. Richmond</i>	37	Medium1	LGA
<i>S. Saintpaul</i>	37	Medium1	LGA
<i>S. Schwarzengrund</i>	37	Medium1	DSM
<i>S. Senftenberg</i>	37	Medium2	LGA
<i>S. Stanley</i>	37	Medium1	LGA
<i>S. Thompson</i>	37	Medium1	LGA
<i>S. Typhi</i>	37	Medium1	LGA, NCTC
<i>S. Typhimurium</i>	37	Medium2	LGA, NCTC, DSM
<i>S. Virchow</i>	37	Medium 1	LGA
<i>S. Wien</i>	37	Medium1	LGA

MATERIAL

40

Organismus	T_{Opt.} °C	Medium	Herkunft
<i>Citrobacter freundii</i>	37	Medium1	ATCC, DSM, NCTC
<i>Citrobacter koseri</i>	37	Medium1	DSM
<i>Edwardsiella tarda</i>	37	Medium1	
<i>Enterbacter aerogenes</i>	37	Medium1	
<i>Enterobacter cloace</i>	37	Medium1	DSM
<i>Enterobacter agglomerans</i>	26	Medium1	ATCC
<i>Escherichia coli</i>	37	Medium2	ATCC, DSM, LGA
<i>Hafnia alvei</i>	37	Medium1	DSM, LGA
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	37	Medium1	DSM, ATCC
<i>Morganella morganii</i>	37	Medium1	DSM, LGA
<i>Proteus mirabilis</i>	37	Medium1	ATCC, LGA
<i>Proteus penneri</i>	37	Medium1	ATCC
<i>Proteus rettgeri</i>	37	Medium1	NCTC
<i>Proteus vulgaris</i>	37	Medium1	DSM
<i>Serratia marcescens</i>	26	Medium1	
<i>Shigella boydii</i>	37	Medium1	DSM, ATCC
<i>Shigella dysenteriae</i>	37	Medium1	ATCC, NCTC
<i>Shigella flexneri</i>	37	Medium1	DSM, LGA, NCTC
<i>Shigella sonnei</i>	37	Medium1	DSM, NCTC
<i>Yersinia enterocolitica</i>	37	Medium1	ATCC, DSM
<i>Yersinia kristensenii</i>	37	Medium1	LGA
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	37	Medium1	DSM, LGA
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	37	Medium1	ATCC
<i>Acinetobacter wolfii</i>	37	Medium2	ATCC
<i>Alcaligenes faecalis</i>	37	Medium1	ATCC
<i>Bacillus cereus</i>	30	Medium1	DSM
<i>Bacillus subtilis</i>	30	Medium1	ATCC
<i>Bacillus pumilus</i>	30	Medium1	ATCC
<i>Enterococcus faecium</i>	37	Medium2	ATCC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37	Medium1	ATCC
<i>Burkholderia cepacia</i>	30	Medium1	ATCC
<i>Staphylococcus aureus</i>	37	Medium2	ATCC

Rambach [®] Agar	Merck
Pepton	8,0g/L
Natriumchlorid	5,0g/L
Natriumdesoxycholat	1,0g/L
Chromogen-Mischung	1,5g/L
Propylenglycol	10,5g/L
Agar-Agar	15,0g/L
Leifson Agar (Desoxycholat-Citrat-Agar nach Leifson, modifiziert)	Merck
Fleischextrakt	5,00g/L
Pepton aus Fleisch	5,00g/L
Lactose	10,00g/L

Natriumthiosulfat	5,40g/L
Ammoniumeisen(III)-Citrat	1,00g/L
Natriumcitrat	6,00g/L
Natriumdesoxycholat	3,00g/L
Neutralrot	0,02g/L
Agar-Agar	12,00g/L
 Selenit-Cystin-Anreicherungsbouillon	 Merck
Pepton aus Caesin	5,00 g/L
L(-)-Cystin	0,01g/L
Lactose	4,00g/L
Phosphatpuffer	10,00g/L
Natriumhydrogenselenit	4,00g/L
pH:7.0±0,2 bei 25°C	
 Rappaport-Vassiliadis-Bouillon	 Merck
Pepton aus Sojamehl	4,50g/L
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	29,00g/L
Natriumchlorid	8,00g/L
Di-Kaliumhydrogenphosphat	0,40g/L
Kaliumdihydrogenphosphat	0,60g/L
Malachitgrün	0,036g/L
pH:5,2±0,2 bei 25°C	

3.5 Medium für Anzucht der Referenzstämmе

Medium 1:

Bacto Nutrient Agar	DIFCO
Pepton	5,00g
Fleisch Extrakt	3,00g
Agar-Agar	15,00g
Aqua. Dest.	1,00L
pH 7.0 ± 0,2 bei 25°C, 15 min bei 121°C autoklavieren	

Medium 2:

Caso-Agar (Trypticase Soy Agar)	Merck
----------------------------------	-------

Pepton aus Casein	15,00g
Pepton aus Sojamehl	5,00g
Natriumchlorid	5,00g
Agar-Agar	15,00g
Aqua. Dest.	1,00L

pH $7.3 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ bei 25°C , 15 min bei 121°C autoklavieren

3.6 Reagenzien, Medien für FISH

PBS: (Phosphate Buffered Saline) 10×Konzentrierte Lösung

NaCl	8,50g(Merck)
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	14.23g(Merck)
KH_2PO_4	1.35g(Merck)
TWEEN20	1.00ml

Mit NaOH auf pH 7,4 einstellen, mit VE Wasser auf 1 Liter auffüllen und 15 min bei 121°C autoklavieren

10% SDS: Serva

10g in 90ml VE Wasser bei ca 70°C lösen, 15 min bei 121°C autoklavieren

1M Tris pH8 :

Tris-HCl Merck

mit HCl auf pH 8 einstellen und autoklavieren

5M NaCl:

292g in 708 ml VE Wasser, 15min bei 121°C autoklavieren

Formamid: (HCONH_2) Merck

3.7% Formaldehyd Lösung Merck

37% Formaldehyd 1:10 mit PBS verdünnen. Bei 4°C aufbewahren

$1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) Roth GmbH

$200\mu\text{g}/\text{ml}$ 1:200 mit VE Wasser verdünnen. Bei 4°C aufbewahren

Antibleichmittel

50%(v/v) PBS pH8

50%(v/v) Glycerin

0.1%(w/v) Ascorbinsäure (Vitamin C)

bei 4°C aufbewahren

3.7 Sonden

Die Oligonukleotid Sonden wurden von den Firmen MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und mit den Fluoreszenz-Farbstoffen Cy3 am 5'-Ende markiert. Dann wurden die Sonden in 100 pmol/ μ l eingesetzt und im -20°C Kühlschrank aufbewahrt. Die Arbeitslösungskonzentration der Sonden beträgt 8 pmol/ μ l.

3.8 Verbrauchsmaterial

Bunsenbrenner

Probegefäße (Röhrchen, 15ml, 50ml) Beckton Dickinson

Glasflaschen mit Deckel (250ml, 0,5L, 2L)

Glas- Objektträger (24 mm \times 60 mm) Roth GmbH Nürnberg

Teflonbeschichtete Objektträger für FISH (mit 10 oder 12 Aussparungen) Roth GmbH Nürnberg

Glaskammer für Objektträger

Glas Spirale

Impfösen

Mehrwegpipetten (Glas, 1ml, 5ml und 10ml)

Pipettenspitzen (10, 100, 1000 μ l) Eppendorf

Reaktionsgefäße, 1,5ml Eppendorf

Sterile Babyfläschchen (200ml, Schott)

3.9 Geräte

Folgende Geräte wurden eingesetzt:

Autoklav KSG Sterilisatoren GmbH

Brutschränke (30 $^{\circ}\text{C}$, 37 $^{\circ}\text{C}$, 46 $^{\circ}\text{C}$) Heraeus Instruments

Bildanalysesystem SONY 3CCD-Kamera und der KS300, Digital, Image Processing System (Kontron Elektronik GmbH, Deutschland)

Dampftopf Gössner GmbH

Eismaschine Scotsman AF-1D

Epifluoreszenz Mikroskopie Zeiss, Oberkochen mit Filtersystem

Feinwaagen bis 300g Chyo MP300 ASA Wissenschaftliche Geräte

Hybridisierungsöfen Hybaid[®] Mini 10 (MWG-Biotech, Deutschland)

Koloniezählgerät	Boskamp Placont
Kühlschrank: -20°C und 4°C	Kirsch, Liebherr
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Heidolph
Mikroprozessor-pH-Meter	WTW
Photoprinter	Digital Color Printer Mavigraph Sony
Reinstwasseranlage Seralpur pro90CN	Seral Reinstwasser-Systeme
Vortexgeräte, Vortex Genie 2 TM	Bender und Hobein AG
Zentrifugen:	
Centrifuge 5415	Eppendorf
Laborzentrifuge GR412 für große Probenmengen bis 750ml bis 4500u/min	Jouan IG 150

3.10 Software

Betriebssystem	Microsoft Windows NT 4.0, Windows 98
Textverarbeitung	Word for Windows, Version 1997
Tabellenverarbeitung	Excel for Windows, Version 1997
Bildverarbeitungsprogramm	Kontron KS 300 Version 1.2
Graphikprogramm	Corel Draw Version 8.0
rRNA-Sequenzenvergleiche	ARB Programmpaket von TU München

4 Methoden

4.1 Entnahme und Bearbeitung der Proben

Die Probenentnahmen der Fleischproben erfolgte durch Kauf im Handel. Das Chemische und Veterinäruntersuchungsamt Fellbach (CVUA) stellte einige Proben, die im Rahmen der amtlichen Überwachung erhoben wurden, zur Verfügung. Die 25 g des zu prüfenden Lebensmittels wurde gemäß der PV240100 des LGA (Vorbereiten der Lebensmittelprobe und Herstellen der Erstverdünnung) aufbereitet, um dann in die Voranreicherungsbouillon (BPW) überführt zu werden. 25 g Fleischprobe ohne Knochen wurde hierbei mit sterilem Messer abgenommen. Geflügelproben wurden auch mit Haut angelegt. Danach wurden die 25 g Lebensmittel mit BPW in 1:10-Verdünnung angelegt und mit einem Stomacher Gerät für 3 min homogenisiert. Andere Lebensmitteln wie Salat oder Eierschale wurden nur in 1:10 Verdünnungen ohne Homogenisierung angelegt.

4.2 Verlauf der kulturellen Untersuchung

Die konventionelle kulturelle Methode wurde nach dem Prüfverfahren (Nachweis von Salmonellen in Lebensmitteln) des LGA in Stuttgart (Code:PV240801) durchgeführt (akkreditiertes Labor). Das Vorhandensein von Salmonellen wird durch Anreicherung auf nicht-selektiven und selektiven Medien sowie anschließender biochemischer Differenzierung und Serotypisierung geprüft. Als Positivkontrolle in allen Versuchen diente der Stamm *Salmonella enterica* spp. Enteritidis (LGA).

4.2.1 Voranreicherung

25g Probenmaterial wurden in 225 ml BPW überführt. Dann wurden die homogenisierten Lebensmittel 16 bis 18 Std. bei 37°C ohne Schütteln mikroaerophil bebrütet. Im Anschluß an die Voranreicherung wird ein Teil – ca. 10 ml (siehe unter 4.2.2) der Bouillon in Selektivmedien überführt. Bei einem pH-Wert der Bouillon <4 nach Bebrütung wird der Ansatz wiederholt und schon nach 6 Std. in die Selektivmedien überführt. Das BPW wird nicht auf 37°C angewärmt, bevor es dem Prüfmaterial zugegeben wird, da das BPW bei Raumtemperatur gelagert wird und diese stets >20°C liegt.

4.2.2 Selektive Anreicherung und Ausstreichen auf Selektivmedien

Nach dieser Voranreicherung wurde die Suspension erneut gründlich aufgeschüttelt und eine Subkultur in „Rappaport-Vassiliadis-Bouillon“ und „Selenit-Cystin-Bouillon“ durchführt.

4.2.2.1 Rappaport-Vassiliadis-Bouillon (RV-Medium)

1 ml Voranreicherung-Nährmedium wird zu 9 ml Rappaport-Vassiliadis-Bouillon hinzugefügt und 24 Std. bei 42°C mikroaerophil bebrütet (**Passage I**). Die Selektiv-Nährbouillon wird nochmals 24 Std. bei 42°C mikroaerophil bebrütet (**Passage II**). Aus der bebrüteten Selektiv-Nährbouillon (vorher aufgeschüttelt) erfolgt nach 24 Std. (**Passage I**) und nach 48 Std. (**Passage II**) ein fraktionierter Verdünnungsausstrich mit Öse auf Rambach und Leifson Platten und Bebrütung für 24 Std. bei 37°C aerob. Negative Platten werden weitere 24 Std. bebrütet.

4.2.2.2 Selenit-Cystin-Bouillon (SC-Medium)

10 ml Voranreicherung-Nährmedium zu 90 ml Selenit-Cystin-Bouillon hinzufügen und 24 Std. bei 37°C mikroaerophil bebrüten (**Passage I**). Die Selektiv-Nährbouillon wird nochmals 24 Std. bei 37 °C mikroaerophil bebrütet (**Passage II**). Aus der Selektiv-Nährbouillon (vorher aufgeschüttelt) erfolgt nach 24 Std. (**Passage I**) und nach 48 Std. (**Passage II**) ein fraktionierter Ausstrich mittels Öse auf Rambach und Leifson-Platten und diese werden bei 24 Std. und 37°C aerob bebrütet. Negative Platten werden weitere 24 Std. bebrüten.

4.2.3 Isolierung der Salmonellen auf Leifson- und Rambach-Agar

Aus den Anreicherungsbouillons erfolgt mit einer sterilen Impföse jeweils ein fraktionierter Ausstrich der Mikroorganismen auf Desoxychlat-Citrat-Agar (Leifson, Mod.) und Rambach-Agar, Bebrütung 24 Std. bei 37 °C aerob.

4.2.4 Auswertung

Präsumptive *Salmonella*-Kolonien wachsen auf Leifson (mod.) honigfarben mit einem schwarzen Punkt im Zentrum der älteren Kolonien.

Präsumptive *Salmonella*-Kolonien wachsen auf Rambach-Agar als pinkfarbene Kolonien mit einer leichten Aufhellungszone um die Kolonien.

4.2.5 Biochemische Überprüfung und Antigennachweis

4.2.5.1 Beimpfen der Kligler mod.-Schräg-Nähragar

1 präsumptive *Salmonella*-Kolonie von Leifon mod.-Agar bzw. Rambach-Agar wird mit einer sterilen Impföse auf Kligler-Schrägagar überimpft und bei 37°C, 24 Std. aerob inkubiert. Das beimpft bzw. inkubiert Glasröhrchen wird zur weiteren Differenzierung gebracht.

4.2.5.2 Beurteilung des Kligler-Schrägagar

Nach Bebrütung erfolgt die Beurteilung der biochemischen Reaktionen des Kligler-Schrägagar (mod. mit Harnstoff) nach folgendem Schema:

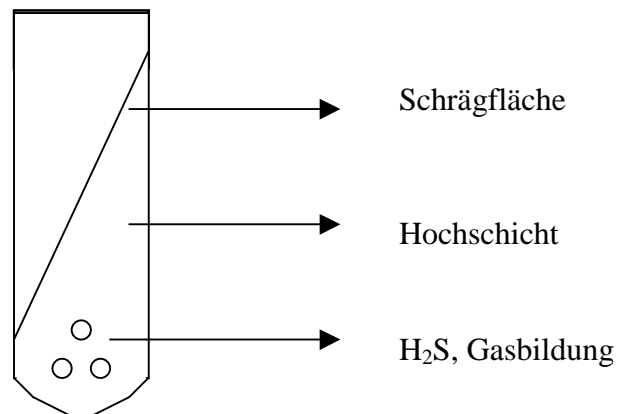


Abb.7 : Kligler Schrägagar

Tab.9: Biochemische Reaktionen auf Kligler-Medium/ bzw. Eisen-Harnstoff Substrat

	Schrägfläche	Hochschicht	Gas	H ₂ S
<i>S. Typhi</i>	Rot	Gelb	-	+/- *
<i>S. Paratyphi</i>	Rot	Gelb	+	(-)
Übrige Salmonellen	Rot	Gelb	+	+
Shigellen	Rot	Gelb	-**	-
<i>Proteus vulgaris/ mirabilis</i>	Rot	Rot	(+)	+
<i>Escherichia coli</i>	Gelb	Gelb	+	-
<i>Pseudomonas Gr.</i>	Rot	Rot	-	-

* Meist nur grau-schwärzlicher Ring an der Rot-Gelb-Grenze, schwache H₂S Bildung

** Ein Teil der *Shigella flexneri* Typ-6-Stämme bildet Gas

Sofern die typisch biochemischen Reaktionen für Salmonellen sind:

Schrägfläche : rot

Hochschicht : gelb

Gas : positiv

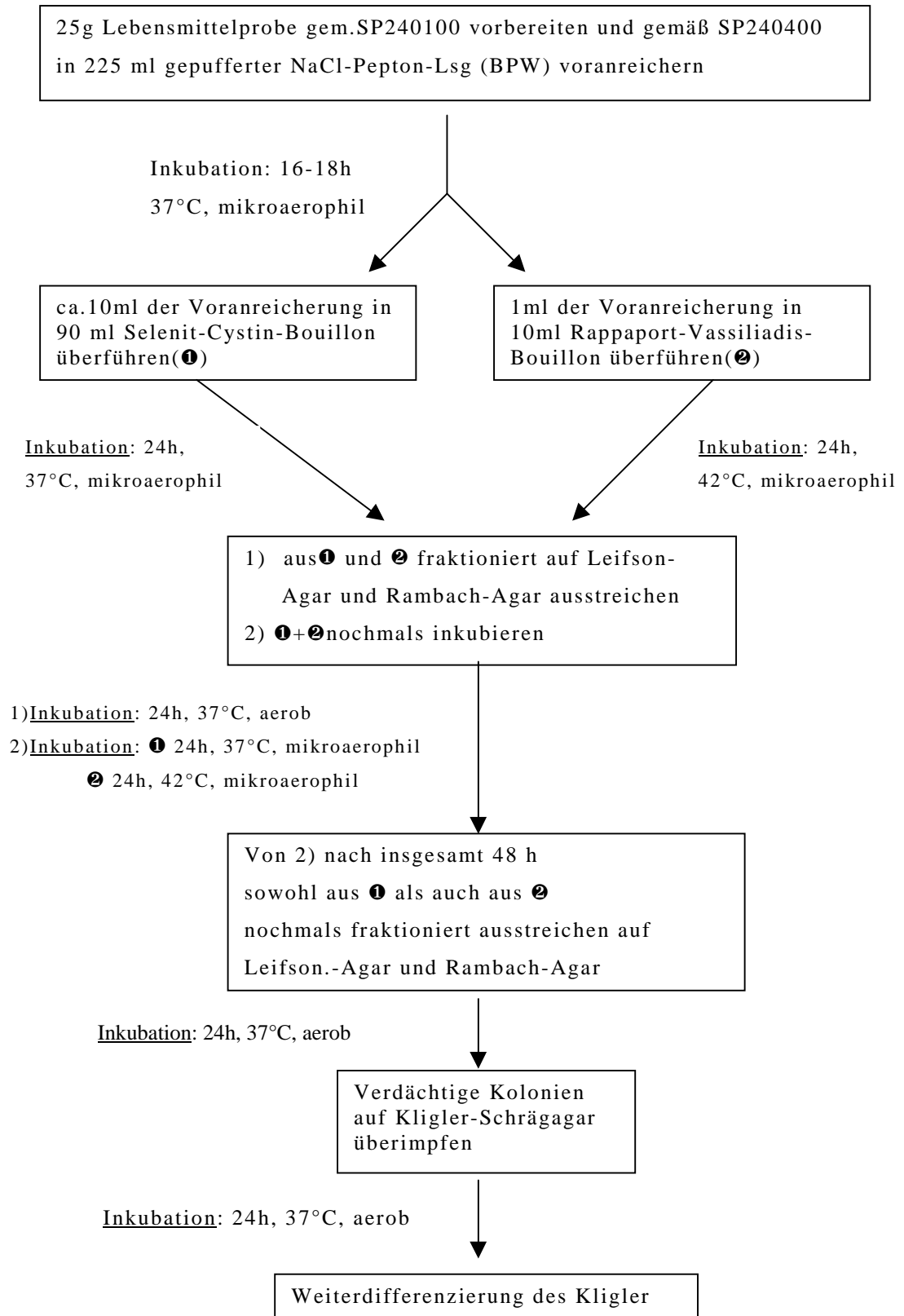
H₂S : positiv / schwach positiv s.o.

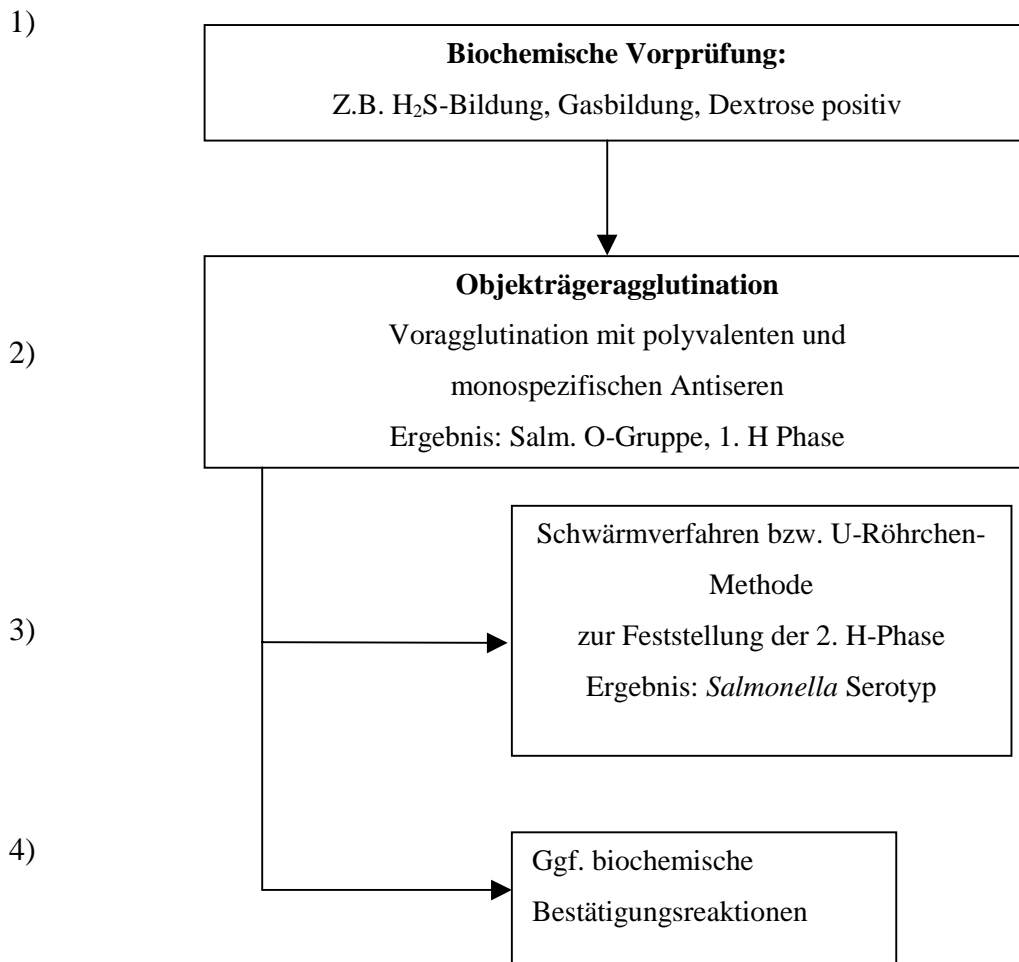
schießt sich die serologische Identifizierung an. Die Voragglutination auf Objektträger mit O-Antiseren und H-Antiseren zur Bestimmung der Salmonellen O-Gruppe und der vorliegenden H-Phasen erfolgt unter Zuhilfenahme des Antigenschemas nach Kaufmann-White^[137].

Bei nicht eindeutigen Agglutinationsergebnisse oder Verdacht auf *S. Typhi* und *S. Paratyphi A, B, C* erfolgen weitere Bestätigungsreaktionen (Beweglichkeit, sowie eine biochemische Überprüfung durch Vitek GNI, API-System oder Flüssig-„Bunte-Reihen“).

Der ganze Prozeß des kulturellen Nachweis von Salmonellen wird in der Abb. 8 gezeigt.

Qualitatives Prüfverfahren für *Salmonella* spp.





Ende des Prüfverfahren

Abb.8: Fließschema zum Nachweis und Identifizierung von *Salmonella*–Prüfverfahren von LGA Baden-Württemberg (Code 240801)

4.3 FISH-Methode zum Nachweis von *Salmonella* spp.

4.3.1 Sonde-Design

4.3.1.1 Konstruktion und Vergleich der Sequenzanalysen von rRNA gerichteten Oligonukleotid-Sonden

Die 16S und 23S rRNA Sequenzen, die für das Design von *Salmonella*-spezifischen Sonden im Rahmen der Studie benötigt wurden, konnten in der GenBank (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) gefunden werden. Neue 23S rRNA-gerichtete Oligonukleotid-Sonden (Sonden Sal-544 und Helfer-Oligos) wurden von J. Bohnert (Hygiene Institut Universität Tübingen) mittels vergleichender Sequenzanalyse der in der Datenbank der TU München enthaltenen rDNA-Sequenzen durch das Programmpaket ARB^[13] (URL: <http://www.biol.chemie.tu-muenchen.de/pub/ARB>)

entwickelt. Die andere Sonden wurden aus verschiedenen Literaturstellen übernommen (siehe Tab. 10). Mittels der Funktion „*Probe-Match*“ des ARB Programmpaketes konnte die Spezifität der Sonden auch gegenüber anderen Organismen überprüft werden. Die Sonden Sal-1, Sal-3, Sal-544 wurden mit dem Werkzeug von NCBI BLAST gegen alle gegenwärtig bekannten bakteriellen rRNA Sequenzen geprüft.

4.3.1.2 Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen

Alle für die FISH eingesetzten Oligonukleotid-Sonden wurden vom Hersteller (MWG-Biotech, Ebersberg) am 5'-Ende markiert bezogen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff Cy3 verwendet. Das Absorbptionsmaximum von Cy3 ist 554 nm, das Emissionsmaximum ist 570 nm, und der molare Extinktions-Koeffizient beträgt $\epsilon=1.3 \times 10^5/\text{mol.cm}$.

4.3.1.3 Verwendete 23S rRNA gerichtete Oligonukleotid-Sonden

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten fluoreszenzmarkierten und unmarkierten Oligonukleotid-Sonden sind in Tabelle 10 zusammengefaßt.

4.3.2 Verlauf der FISH-Methode

Die FISH-Methode wurde nach dem Protokoll von Bohnert et al. ^[27] ausgeführt. Die einzelnen Arbeitsschritte sind in Abbildung 9 dargestellt.

4.3.2.1 Zellfixierung mit Formaldehyd

4.3.2.1.1 Referenzkulturen

Jeweils 1 ml der Zellsuspension der Referenzbakterienkultur wurde in ein Reaktionsgefäße (1,5 ml) pipettiert. Anschließend bei 13000×g für 2 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Überstand ausgekippt, und 1 ml 3,7% Formaldehyd-Lösung zugegeben. Da die 37% Formaldehyd-Lösung giftig ist, muß man die Zellsedimente im Abzug und unter Tragen von Handschulen suspendieren. Nachfolgend gut schütteln und 1 Std.-4 Std. bei 4°C lagern. Danach wurde die Suspension bei 13000×g für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wird in eine Flasche für Formaldehyd gekippt. Je nach Größe des Pellets (Zellsediment) wurde mit 1×PBS Lösung 1-2 mal gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (13000×g für 2 min) wurde das Zellsediment in 1×PBS:96% Ethanol [1:1] (100µl-1 ml, je nach Pelletgröße) aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Tab.10: Oligonukleotid-Sonden für FISH in diese Studie

Sonden	Sequenz(5´- 3´)	Nukleotide	T_m (°C)	<i>E. coli</i> Position	rRNA Ziel	Formamid Konzentration	Referenz
Sal-1	ACAGCACATGCGCTTTTGTG	20	57,3	341-360	23S	10%	Rönner 1994
Sal-3	AATCACTTCACCTACGTG	18	51,4	1713-1730	23S	10%	Nordentoft1997
Sal-544	GCAGTCACACAGGTAAAC	18	53,7	544-562	23S	10%	Diese Studie
Helfer-Oligo Eco524	TGCTCCCACTGCTTGTAC	18	56,0	524-542	23S	10%	Diese Studie
Helfer-Oligo Eco561	CCATTATACAAAAGGTAG	18	58,2	561-579	23S	10%	Diese Studie
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	18	60,5	338-356	16S	40%	Amann 1990

- 1) Sal-1, Sal-3 und Sal-544, EUB338 sind 5´-Fluoreszenzstoff Cy3 markierte *Salmonella*-Sonden.
- 2) Helfer-Oligo Eco524 und 561 sind unmarkierte Sonden, um die *Salmonella*-Sonden die Zielsequenz zu erleichtern.
- 3) EUB338 ist eine universelle 16S rRNA gerichtete Sonde für alle Bakterien^[4], und dient hier als Positivkontrolle

4.3.2.1.2 Lebensmittel

Jeweils 5 ml der Voranreicherungsbouillon wurde in ein konisches 15 ml Röhrchen pipettiert. Anschließend bei 3500×g, 15 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Überstand ausgekippt, und 1 ml 3,7% Formaldehyd-Lösung zugegeben, nachfolgend gut schüttelt und 1 Std.-4 Std. bei 4°C gelagert. Danach wurde die Suspension in ein 1,5ml Röhrchen pipettiert. Danach wurde diese Suspension bei 13500×g für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wird in eine Flasche für Formaldehyd gekippt. Je nach Größe des Pellets (Zellsediment) wurde mit 1× PBS Lösung 1-2 mal gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (13000×g, 2 min) wurde das Zellsediment in 1xPBS:96% Ethanol [1:1] (100µl- 1 ml, je nach Pelletgröße) aufgenommen und bei – 20°C gelagert.

4.3.2.2 Hybridisierung

4.3.2.2.1 Ermittlung von Hybridisierungs- und Waschbedingungen

In der vorliegenden Arbeit wurden Oligonukleotid-Sonden zum spezifischen Nachweis von rRNA eingesetzt. Alle Hybridisierungen mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid-Sonden wurden bei 46°C, alle Waschschrte ebenfalls bei 46°C durchgeführt.

Die Stringenz im Hybridisierungspuffer wurde durch Zugabe unterschiedlicher Mengen an Formamid eingestellt (Tab.11). Die benötigte Stringenz wurde im Waschpuffer zur Vermeidung großer Formamid Abfallmengen durch Variation der NaCl Konzentration eingestellt (Tab12).

Tab.11: Formamidkonzentrationen im Hybridisierungspuffer bei 46°C

Stringenz	10%	20%	30%	35%	40%	50%	60%
H ₂ O _{bidest}	700µl	600µl	500µl	450µl	400µl	300µl	200µl
Formamid	100µl	200µl	300µl	350µl	400µl	500µl	600µl
5M NaCl			180µl				
1M Tris pH 8			20µl				
10% SDS			1µl				

Tab.12: Konzentrationen an NaCl im Waschpuffer bei Hybridisierung

Stringenz	10%	20%	30%	35%	40%	50%	60%	
5M NaCl	5 ml	2.5ml	1,25ml	880µl	624µl	312µl	156µl	
1M Tris pH8			1ml					
			H ₂ O _{bidest} bis 50 ml hinzufügen					
10% SDS			50µl					

4.3.2.2.2 Hybridisierung ganzer Zellen auf Objektträgern und Waschen

Für Hybridisierungen ganzer Zellen auf Objektträgern wurden teflonbeschichtete Objektträger mit 12 Aussparungen (Roth GmbH, Deutschland) verwendet. Die 10 µl auf den Objektträger aufgebraute Zellsuspension wurde durch Abflammen schnell angetrocknet, um eine Immobilisation zu erreichen. Anschließend wurden sie zur Dehydratisierung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (je 3 min 50%, 80% und 100% Ethanol-Lösung) bei Raumtemperatur behandelt.

In die Aussparungen der Objektträger mit den fixierten und vorbehandelten Zellen wurden 9 µl Hybridisierungspuffer und je 1 µl Fluoreszenzfarbstoffe markierte (Cy3)-Oligonukleotid-Sonden (in einer Konzentration von 8 eingesetzt) aufgetropft und gut vermischt, ohne die Oberfläche zu verkratzen oder Zellen abzulösen. Aber für Sal-544 Sonde wurde 7µl Hybridisierungspuffer und 1 µl Sal-544, 1 µl Eco524 und 1 µl Eco561 aufgestropft und gut vermischt. Anschließend wurde der Objektträger in eine feuchte Kammer (50ml-Probengefäß mit in Hybridisierungspuffer getränktem Zellstoff) überführt. Der Hybridisierungsgemischung wird mindestens 1.5 Std. und maximal 12Std. bei 46°C im Hybridisierungsöfen inkubiert.

Im anschließenden Waschschrift wird die überschüssige Sonde mit Waschpuffer abgeschwemmt (20min bei 46°C). Danach werden die Waschpuffer und Salze durch vorsichtiges Spülen mit H₂O_{bidest.} entfernt. Nach Lufttrocknung werden in jede Objektträger-Aussparung 10 µl Fluoreszenzfarbstoffe DAPI mit einer Konzentration von 2 µg/ml pipettiert und 5 min bei Raumtemperatur abgefärbt. Anschließend wird der Objektträger wieder mit H₂O_{bidest.} gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet.

4.3.2.3 Detektion fluoreszenzmarkierter Zellen durch die Epifluoreszenzmikroskop

Um Ausbleichungseffekte während der mikroskopischen Auswertung zu verhindern, wurden die hybridisierten Zellen in Antibleichmitteln eingebettet, der Objektträger mit einem Deckglas versehen und unter dem Mikroskop (Axioplan, Zeiss) mit einer 50-W Hochdruckbirne durch Vergleich des Fluoreszenzbildes ausgewertet. Es wurden Plan-Neofluar Objektive mit 200, 400, und 1000-facher Vergrößerung verwendet. Das Mikroskop ist mit folgenden Filtern ausgestattet: Zeiss Licht-Filter Serien Nr. 2 für DAPI (Exkzitation 450-490 nm, Dichroic mirror 510nm, Suppression 420nm) und HQ Licht-Filter F41-007 (AF Analysentechnik, Tübingen, Deutschland) für Cy3 markiert Sonden (Exkzitation 530-545nm, Dichroic mirror 565nm, Suppression 610-675nm).

Somit konnte unter dem DAPI-Filter blau gefärbte Bakterien gesehen werden und unter dem Cy3-Filter konnte man rot gefärbte Bakterien als *Salmonella*-Bakterien sehen. Fluoreszenzbilder wurden mit eine Sony 3CCD Kamera und der KS300 (digital image processing system) Software dokumentiert.

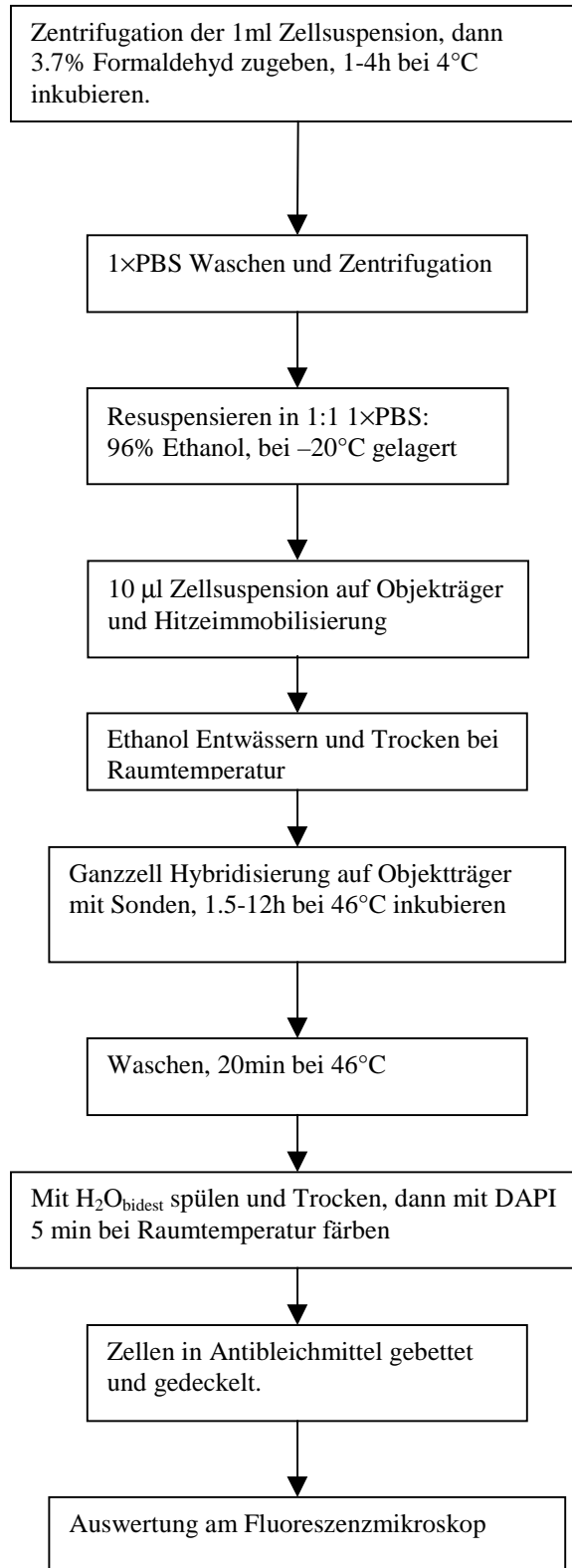
4.4 Spezifitätsnachweis der *Salmonella* Sonden

4.4.1 Anzucht der verwendeten Referenzstämm

Alle Organismen aus Tab.8 wurden mit den in den entsprechenden 50 ml Medium (1 oder 2, Kapitel 3.5) bei 37°C (oder 30°C, 26°C) bis zur optische Dichte ($OD_{600}=0.1$) kultiviert. Die optische Dichte der Bakterienkulturen wurde in Kunststoffküvetten mit 1:100-Verdünnungen im Spektralfotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) gemessen. Dabei gilt für die Salmonellen folgender Richtwert: $OD_{600}=0,1$ entspricht 10^8 Bakterien/ml. Der jeweilige Blindwert wurde durch eine Messung mit dem für die Verdünnung verwendeten sterilen Medium bzw. in VE-Wasser. ermittelt.

4.4.2 *In situ* Hybridisierung

1ml Zellsuspension wurde in einem Reaktionsgefäß (1,5ml) pipettiert und die in Abb. 9 gezeigten Arbeitsschritten durchgeführt. Als Nachweis der Hybridisierung mit der jeweiligen Sonde galt der mikroskopischen Nachweis von rot fluoreszierenden stäbchenförmigen Bakterien unter Cy3 Filter. Fehlende rot-Fluoreszenz von Stäbchenbakterien wurde als fehlende Hybridisierung mit dieser Sonde interpretiert.



Ende der Prüfverfahren

Abb. 9: Fließschema der *in situ* Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierter gegen rRNA gerichteter Oligonukleotid-Sonde.

4.5 Bestimmung der Voranreicherungszeit für FISH-Methode

Zur Bestimmung der Voranreicherungszeit wurden 1× und 2× *S. Panama* (ALM 41, Bilthoven, Holland) Kapseln, die 2-5 KBE pro Kapsel enthalten, sowie selbst hergestellte Verdünnungsreihen von 10 bis 10⁴ KBE/ml aus einer Reinkultur von *S. Enteritidis* verwendet. Die Verdünnungsreihe aus einer mit *S. Enteritidis* bewachsenen Peptonbouillon eingestellt auf McFarland 0,5 entspricht etwa 1,5×10⁸ KBE/ml.

Mit der Verdünnungsreihe wurden 3 verschiedene Lebensmitteln (jeweils 10g sterile Geflügel-Babynahrung, Geflügel und Salat) künstlich beimpft und bei 37°C bis 24 Std. in Voranreicherungsbouillon bebrütet.

Zu den Bebrütungszeiten 6 Std., 8 Std., 10 Std., 12 Std., 16 Std., 18 Std., 24 Std. wurde alle zwei Stunden jeweils 100 µl auf Rambach-Agar und Leifson. (Mod.)-Agar ausgespatelt und jeweils 5ml für FISH-Methode entnommen. Die Zellsuspension für FISH nach Zellfixierung wurde nach dem oben genannten Protokoll mit der Sonde Sal-1 hybridisiert. Die Sonde EUB338 galt als Positivkontrolle.

4.6 Versuche zu Einflußfaktoren auf FISH

4.6.1 Ermittlung der Autofluoreszenz und unspezifischer Bindung von Lebensmitteln

Um die Autofluoreszenz von Lebensmittelproben zu ermitteln, wurde nach dem Protokoll hybridisiert jedoch ohne eine fluoreszierende Sonde zuzugeben. Durch die Epifluoreszenz-Mikroskop konnte so eine Autofluoreszenz ausgeschlossen werden.

Unspezifische Bindungen konnten dadurch ermittelt werden, daß eine Lebensmittelprobe ohne Salmonellen mit Sal-1 Sonde hybridisiert wurde

4.6.2 FISH bei hoher Konzentration an Begleitflora

Die meisten Lebensmitteln sind nicht steril wenn sie im BPW bebrütet werden. Die Begleitflora stellt eine Nahrungskonkurrenz für Salmonellen bei der nicht selektiven Anreicherung dar. Um den Einfluß der Begleitflora zu ermitteln wurden der Lebensmittel Bakterien zugesetzt. Hierzu wurden *S. Panama* (ALM41), *E. coli* (ATCC11229) und *Enterococcus faecium* (ATCC6057) vorbebrütet. Zunächst wird eine Mischkultur von *E. coli* und *Enterococcus faecium* aufgelegt, dann wurde 1 Kapsel von *S. Panama* ins 50ml zwei Ausgangskonzentrationen von Mischkultur (10⁶ KBE/ml und

10^2 KBE/ml) von weitere 18 Std. bebrütet, als Parallel wurde eine Reinkultur von *S. Panama* (1 Kapsel) untersucht. Anschließend wurden diese Proben ebenfalls mit FISH untersucht.

4.6.3 FISH bei unterschiedlichen Lebensmitteln

Unterschiedliche Lebensmitteln enthalten verschiedene chemische Stoffe oder Hemmstoffe. Um diese Einflüsse auf die FISH-Methode zu ermitteln, wurden 18 unterschiedliche Lebensmitteln mit 2 Kapseln *S. Panama* (ALM 41) künstlich beimpft und 18 Std. bei 37°C im BPW bebrütet und anschließend durch FISH-Methode untersucht.

4.6.4 Einfluß von verschiedenen NaCl Konzentration, pH-Wert und Temperatur auf FISH

Lebensmittel werden häufig bei hoher NaCl Konzentration, niedriger pH-Wert oder bei niedriger Temperatur gelagert um Haltbarkeit zu erlangen. Um diese Einflüsse auf die FISH-Methode zu ermitteln, wurden je 5 ml Zellsuspension von *S. Panama* (Ausgangskonzentration 10^7 KBE/ml) ins 45 ml VE-Wasser mit verschiedenen NaCl Konzentrationen (0%, 5%, 15%, 25%), und 45ml VE-Wasser mit pH-Werten (3.33; 4.05; 4.55; 5.01; 5.65; 6.08; 6.88; 7.35) beimpft, dann in Raumtemperatur bis 60 Tage aufbewahrt, für der Test der Einflüssen der Temperatur wurde 5 ml Zellsuspension in 45 ml BPW bei Temperatur von -20°C, 4°C bis 60 Tage aufbewahrt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde jeweils eine Probenahme von 1 ml für FISH-Methode und 100 µl für Rambach-Agar zu Nachweis von *S. Panama* vorgenommen.

4.7 Anwendung für Lebensmittelproben

4.7.1 Isolierung und Nachweis von Salmonellen aus nicht-gespikten Lebensmittelproben

Zur Untersuchung von Originalproben wurden Lebensmittelproben (hauptsächlich Geflügel) aus dem Handel untersucht sowie einige Restproben Geflügel aus dem CVUA. Hierzu wurden nach den konventionellen kulturellen Methoden 25g Lebensmittelprobenmaterial in 225 ml BPW vorangereichert (siehe Abbildung 8). Nach 16-18 Std. Bebrütungszeit wurde 5 ml für FISH in ein konisches 15 ml Probegefäße pipettiert und anschließend nach oben aufgeführtem Protokoll mit 3 *Salmonella*-Sonden hybridisiert.

4.7.2 Nachweis der Salmonellen aus Voranreicherung (16 Std.) und Selektivanreicherung Passage I (24 Std.) und Passage II (48Std.) durch FISH-Methode

Die 1ml Proben-Suspensionen aus Voranreicherung (18 Std.) und Selektivanreicherung Passage I (24 Std.) und Passage II (48Std.) wurden durch FISH-Methode mit drei *Salmonella*-Sonden nachgewiesen. Dann wurden die Ergebnisse verglichen.

4.8 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurden die Kultur-Ergebnisse und FISH-Ergebnisse einbezogen, die statistische Analyse wurde durch den McNemar modifizierte Vorzeichentest ^[153] gemacht.

$$X^2 = \frac{(|b - c| - 1)^2}{b + c + 1}$$

(FG = 1)

Wenn $X^2 < 3.84$ (bei 5%-Niveau) P Wert > 0.05 , zeigen die beide Ergebnisse keinen signifikanten Unterschied. Wenn der Wert $P < 0.05$, zeigen die beide Ergebnisse einen signifikanten Unterschied. Auch die Ergebnisse mit verschiedene Sonden wurden statistisch verglichen. Zuerst wurden die Ergebnisse je nach Versuchsdurchgang tabellarisch erfaßt. Die unter 5% ($P < 0,05$) liegenden Differenzen wurden als statistisch signifikant, und über 5% ($P \geq 0,05$) als statistisch nicht signifikant bezeichnet.

5 Ergebnisse

5.1 Sonden-Sequenzanalyse

Für die *in situ* Detektion von *Salmonella* spp. wurden in der vorliegenden Arbeit drei gegen die 23S-rRNA gerichtete Sonden verwendet. In der Literatur sind zwei Oligonukleotid-Sonden beschrieben (Sal-1^[149] und Sal-3^[127]), die nahezu alle Arten der *Salmonella* spp. erfassen. Anhand eines Vergleichs mit den in der Datenbank ARB^[13] der TU München gespeicherten Sequenzen, wurde zudem eine neue Sonde Sal-544 entworfen (siehe Tabelle 10). Die drei Sondensequenzen für *Salmonella* wurden mit Hilfe eines BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) nochmals auf ihre Spezifität überprüft (<http://www.Ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>). Der Vergleich basierte auf einer Analyse von kompletten oder fast kompletten 23S rRNA-Sequenzen von *Salmonella* Subspezies (I-VI) und einigen 23S rRNA Sequenzen von anderen Bakterien aus der Familie *Enterobacteriaceae*. Die Ergebnisse des Vergleichs sind in Tabelle 13 dargestellt. Die Sequenzanalyse der Sondenbindungsregion der 23S-rRNA zeigte bei Verwendung der Sonde Sal-544 bei sechs (außer Subspezies VI) von sieben *Salmonella* Unterarten keine Basenfehlpaarungen. Die Sonde Sal-1 zeigte eine Basenfehlpaarung mit Subspezies II und drei Basenfehlpaarungen mit Subspezies IIIb. Die Sonde Sal-3 zeigte je eine Basenfehlpaarung mit den Subspezies II und IV und zwei Basenfehlpaarungen mit der Subspezies IIIa. Zudem weisen die beiden Sonden Sal-1 und Sal-3 mindestens 3 Basenfehlpaarungen mit *S. bongori* (Subspezies V) auf. Die Sequenzen der nicht zur Gattung *Salmonella* gehörenden *Enterobacteriaceae* haben mit allen 3 getesteten Sonden mindestens zwei Mismatches.

5.2 Ergebnisse der Bestimmung der Sondenspezifität

Um die Spezifität sowie die Zugänglichkeit der rRNA-Zielregion zu testen, wurden Reinkultur von insgesamt 118 bakteriellen Isolaten hybridisiert. Die Ergebnisse der Hybridisierung mit *Salmonella* Isolaten und nicht-*Salmonella* Isolaten sind in Tabelle 14 und 15 dargestellt. Die Universalsonde Eub338, die auf die 16S rRNA gerichtet ist, wurde als positive Kontrolle verwendet. Außer zwei Isolaten von *Staphylococcus aureus* konnten alle mit der Sonde Eub338 hybridisiert werden. Nach Optimierung der Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer haben die Sonden Sal-1 und Sal-3 ein

sehr starkes Fluoreszenzsignal mit alle 51 Isolaten aus 39 *Salmonella enterica* Subspezies Enterica (I) gezeigt. Bei Verwendung der Sonde Sal-544 konnte trotz Optimierung der Formamidkonzentration mit einigen Isolaten nur ein schwaches Fluoreszenzsignal erzielt werden. Um das Fluoreszenzsignal zu steigern, wurden für die Sonde Sal-544 zwei unmarkierte Helfer-Oligos (Helfer-Oligo Eco524 und Helfer-Oligo Eco561) konstruiert (nach Fuchs, 2000^[71]). Durch den Einsatz der Helfer-Oligos konnte mit der Sonde Sal-544 bei Isolaten, die zuvor nur ein schwaches Signal zeigten eine deutlich stärkeres Signal erzielt werden. Jedoch lag die Fluoreszenzstärke noch immer unter der, die mit den Sonden Sal-1 bzw. Sal-3 erreicht wurde.

Bei der Untersuchung von *Salmonella* Subspezies Arizonae (IIIa) war das Hybridisierungsergebnis mit den Sonden Sal-1 und Sal-544 bei manchen Isolaten positiv und manchen Isolaten negativ. Mit der Sonde Sal-3 konnte für keines des Isolate von *Salmonella* Subspezies Arizonae (IIIa) ein positives Hybridisierungsergebnis gezeigt werden. Mit der Sonde Sal-1 konnte keine positive Hybridisierung mit Isolaten von *S.* Subspezies IIIb durchgeführt werden. Die Subspezies V konnte nicht getestet werden da keine Stämme zur Verfügung standen.

Bei der Verwendung eines gemischs unterschiedlicher Isolate von *Salmonella* (z.B. Mischung von *S. Typhi*, *S. Typhimurium* und *S. Enteritidis*) wurde keine Verstärkung des Fluoreszenzsignals beobachtet. Auch kann man die verschiedenen Unterarten fluoreszenzmikroskopisch nicht unterscheiden.

Mit der 45 nicht-*Salmonella* Isolaten aus der Familie der *Enterobacteriaceae*, welche die mit *Salmonella* eng verwandten Arten wie *Escherichia coli*, *Citrobacter* spp, und *Shigella*. spp enthalten, konnte keine Kreuzhybridisierung nachgewiesen werden. Auch konnte keines der anderen 14 bakteriellen Isolaten, die zu anderen Familien gehören aber ebenfalls als Humanpathogene in Lebensmitteln nachgewiesen werden können, mit einer der 3 *Salmonella*-Sonden hybridisiert werden.

ERGEBNISSE

Tab.13: Sequenz-Variation der 23S rRNA von verschiedenen Spezies aus der Familie der *Enterobacteriaceae*

Spezies und Serovar	Genbank Accession Nr.	Sequenzen		
		Sonde Sal-1	Sonde Sal-3	Sonde Sal-544
		3'-GTG TTT TCG CGT ACA CGA CA-5'	3'-GTG CAT CCA CTT CAC TAA-5'	3'-CAA ATG GAC ACA CTG ACG-5'
<i>S. enterica</i>				
<i>S. Typhimurium</i> (I)	U88706, U77920	5'-CAC AAA AGC GCA TGT GCT GT-3'	5'-CAC GTA GGT GAA GTG ATT-3'	5'-GTT TAC CTG TGT GAC TGC-3'
<i>S. Typhi</i> (I)	U04734	--- --- --- --- ---	--- --- --- --- ---	--- --- --- --- ---
<i>S. Dublin</i> (I)	U77919	--- --- --- --- ---	--- --- --- --- ---	--- --- --- --- ---
<i>Salmonella</i> Subspezies (II)	U77921	--- --- --- --- --- -T- --	--- --- --- --- --- G--	--- --- --- --- ---
<i>S. Arizonae</i> (III _a)	U77923, U77924	--- --- --- --- ---	--- --- --- --- --- -C- G--	--- --- --- --- ---
<i>Salmonella</i> Subspezies (III _b)	U77922	--- --- --- --- yA- -Y- --	--- --- --- --- ---	--- --- --- --- ---
<i>S. Houten</i> (IV)	U77926	--- --- --- --- ---	--- --- --- --- --- G--	--- --- --- --- ---
<i>S. Ferlac</i> (VI)	U77929	--- --- --- --- ---	--- --- --- --- ---	nnn nnn nnn --- --- ---
<i>S. bongori</i> <i>S. Brookfield</i> (V)	U77927	--- G-- -AT --- CC- --- ---	--T --- --- --- -C- G--	--- --- --- --- ---
<i>E. coli</i>	J01695	--- --- -AT --- CA- --- ---	T-T --- --- --- --- CCC	-C- --G GC- --- --- ---
<i>Citrobacter freundii</i>	U77928	--- --- -AT --- CAG -T- --	T-T --- --- --- --- -G-	TAC -TG T-A G-- --- ---
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	U88707	T-- CCC -AA C-G ACA CAG--	T-T --- --- --- --- -C ---	CG- ATA -G- --- --- GC-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X87284	--- C -- -AT --- CAG --- ---	TGT --- --- --- -CC CC-	ACC -T- GG- --- --- ---
<i>Proteus mirabilis</i>	U88708	--- -GG T-G T- - G- - AGA -A	--Y --- --- -A- --- CCC	CG- ATC CG- --- --- GC-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	U77925	--- --- -AT --- -A- -T- --	--- --- --- --- -C- G--	AC- -CG TG- --- --- ---

y = C oder T

n= A, C, G, T

Tab. 14: Ergebnisse des Spezifität-Test für drei *Salmonella*-Sonden mit *Salmonella*-Isolaten aus Reinkultur

Spezies	Subspezies	Serovare	Isolaten	Nachweis positiv (+) oder negativ (-)			
				Sal-1	Sal-3	Sal-544	Eub338
<i>S. enterica</i>	Enterica (I)	<i>S. Agona</i>	aus LGA	+	+	+	+
		<i>S. Anatum</i>	aus LGA	+	+	+	+
		<i>S. Bovismorbificans</i>	aus LGA	+	+	+	+
		<i>S. Braenderup</i>	aus LGA	+	+	+	+
		<i>S. Brandenburg</i>	aus LGA	+	+	+	+
		<i>S. Choleraesuis</i>	DSM554	+	+	+	+
		<i>S. Derby</i>	aus LGA	+	+	+	+
		<i>S. Dublin</i>	ATCC15480	+	+	+	+
		<i>S. Enteritidis</i>	ATCC13076	+	+	+	+
			DSM9898	+	+	+	+
			NCTC5188	+	+	+	+
			aus LGA	+	+	+	+
			aus LGA	+	+	+	+
		<i>S. Gallinarum</i>	DSM4883	+	+	+	+
		<i>S. Hadar</i>	aus LGA	+	+	+	+
		<i>S. Heidelberg</i>	DSM9379	+	+	+	+
		<i>S. Infantis</i>	aus LGA	+	+	+	+
		<i>S. Paratyphi B (+)</i>	aus LGA	+	+	+	+
		<i>S. Javiana</i>	aus LGA	+	+	+	+
		<i>S. Liandoff</i>	aus LGA	+	+	+	+
		<i>S. Litchfield</i>	aus LGA	+	+	+	+
			aus LGA	+	+	+	+
		<i>S. London</i>	aus LGA	+	+	+	+
		<i>S. Mbandaka</i>	aus LGA	+	+	+	+
		<i>S. Mgulani</i>	aus LGA	+	+	+	+
		<i>S. Montevideo</i>	aus LGA	+	+	-	+
		<i>S. München</i>	aus LGA	+	+	+	+
		<i>S. Newport</i>	aus LGA	+	+	+	+
		<i>S. Obogu</i>	aus LGA	+	+	+	+
		<i>S. Oranienburg</i>	aus LGA	+	+	+	+
		<i>S. Panama</i>	ALM41	+	+	+	+
		<i>S. Paratyphi A</i>	aus LGA	+	+	+	+
		<i>S. Paratyphi B</i>	aus LGA	+	+	+	+
NCTC5704	+		+	+	+		
<i>S. Poona</i>	aus LGA	+	+	+	+		
<i>S. Richmond</i>	aus LGA	+	+	+	+		
<i>S. Saint Paul</i>	aus LGA	+	+	+	+		
<i>S. Schwarzengrund</i>	aus LGA	+	+	+	+		

ERGEBNISSE

		<i>S. Senftenberg</i>	DSM10062	+	+	+	+
		<i>S. Stanley</i>	aus LGA	+	+	+	+
		<i>S. Thomopson</i>	aus LGA	+	+	+	+
		<i>S. Typhi</i>	NCTC8385	+	+	+	+
			aus LGA	+	+	+	+
		<i>S. Typhimurium</i>	DSM5569	+	+	+	+
			DSM11320	+	+	+	+
			NCTC74	+	+	+	+
			NCTC3048	+	+	+	+
			aus LGA	+	+	+	+
			aus LGA	+	+	+	+
		<i>S. Virchow</i>	aus LGA	+	+	+	+
		<i>S. Wien</i>	aus LGA	+	+	+	+
	Salmonae (II)	<i>S. Daressalaam</i>	DSM9220	-	+	+	+
	Arizonae (IIIa)	<i>S. Arizonae</i>	DSM9386	-	-	+	+
			NCTC7355	-	-	+	+
			aus LGA	+	-	+	+
			aus LGA	-	-	-	+
	Diarizonae (IIIb)	<i>S. Diarizonae</i>	ATCC43973	+	+	+	+
	Houtenae (IV)	<i>S. Houtenae</i>	DSM9221	+	+	+	+
	Indica (VI)	<i>S. Indica</i>	ATCC43976	+	+	-	+
<i>S. bongori</i>	(V)	-	-	-	-	-	-
Total	-	44	59	56	55	58	59

Universal-Sonde Eub338 wurde als Positivkontrolle verwendet.

Tab.15: Ergebnisse des Spezifität-Test für *Salmonella*-Sonden mit nicht *Salmonella*-Isolaten aus der Familie der *Enterobacteriaceae* und einiger anderer Familien

Spezies	Isolaten	Nachweis positiv (+) oder negativ (-)			
		Sal-1	Sal-3	Sal-544	Eub338
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC8090	-	-	-	+
	ATCC33128	-	-	-	+
	DSM4595	-	-	-	+
	DSM30039	-	-	-	+
	NCTC9750	-	-	-	+
	aus LGA	-	-	-	+
<i>Citrobacter koseri</i>	DSM4595	-	-	-	+
<i>Enterbacter aerogenes</i>	aus LGA	-	-	-	+
<i>Enterbacter cloace</i>	DSM30045	-	-	-	+
<i>Enterobacter agglomerans</i>	ATCC29919	-	-	-	+
<i>Escherichia coli</i>	ATCC8739	-	-	-	+
	ATCC11229	-	-	-	+
	ATCC11370	-	-	-	+
	ATCC23631	-	-	-	+
	DSM613	-	-	-	+
	DSM1576	-	-	-	+
	aus LGA	-	-	-	+
	aus LGA	-	-	-	+
<i>Hafnia alvei</i>	DSM30163	-	-	-	+
	aus LGA	-	-	-	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC13882	-	-	-	+
	DSM30104	-	-	-	+
<i>Morganella morgii</i>	DSM30164	-	-	-	+
	aus LGA	-	-	-	+
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC14153	-	-	-	+
	aus LGA	-	-	-	+
<i>Proteus penneri</i>	ATCC33519	-	-	-	+
<i>Proteus rettgeri</i>	NCTC10377	-	-	-	+
<i>Proteus vulgaris</i>	DSM30118	-	-	-	+
<i>Serratia marcescens</i>	aus LGA	-	-	-	+
<i>Shigella boydii</i>	ATCC9207	-	-	-	+
	DSM7532	-	-	-	+
<i>Shigella dysenteriae</i>	ATCC9361	-	-	-	+
	NCTC4837	-	-	-	+
<i>Shigella flexneri</i>	DSM4782	-	-	-	+
	NCTC5	-	-	-	+
	aus LGA	-	-	-	+

ERGEBNISSE

<i>Shigella sonnei</i>	DSM5570	-	-	-	+
	NCTC9774	-	-	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC9610	-	-	-	+
	aus LGA	-	-	-	+
<i>Yersinia kriskensenii</i>	aus LGA	-	-	-	+
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	DSM8992	-	-	-	+
	DSM9676	-	-	-	+
	aus LGA	-	-	-	+
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ATCC19606	-	-	-	+
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	ATCC15309	-	-	-	+
<i>Alcaligenes faecalis</i>	ATCC8750	-	-	-	+
<i>Bacillus cereus</i>	DSM508	-	-	-	+
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC6633	-	-	-	+
<i>Campylobacter jejuni</i>	aus LGA	-	-	-	+
<i>Clostridium perfringens</i>	ALM	-	-	-	+
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC6057	-	-	-	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	aus LGA	-	-	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC9027	-	-	-	+
	ATCC10145	-	-	-	+
<i>Burkholderia cepacia</i>	ATCC25416	-	-	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC6538	-	-	-	-
	ATCC25923	-	-	-	-
Total(33)	59	59	59	59	57

Universal-Sonde Eub338 wurde als Positivkontrolle verwendet.

5.3 Optimierung der FISH-Methode

Gram-negative Bakterien und damit auch Bakterien der Gattung *Salmonella* sind aufgrund ihrer Zellwandstruktur relativ leicht für Sonden zugänglich. Es war daher keine speziellen Vorbehandlungen für die *in situ* Hybridisierung notwendig.

5.3.1 Bestimmung der Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer

Für den optimalen Einsatz der Sonden für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung wurde durch das Anlegen von Formamidreihen zunächst die optimale Formamidkonzentration bestimmt. Dazu wurden die Stämme *S. Enteritidis* (ATCC13076), *E. coli* (ATCC11229) und *Citrobacter freundii* (DSM30039) als Zielorganismen verwendet. Die besten Ergebnisse wurden bei 0% und 10% Formamid erreicht. Hier war das Fluoreszenzsignal mit allen drei Sonden für den verwendeten *S. Enteritidis* Stamm am stärksten (Abb.10). Die nicht-*Salmonella*-Stämme zeigten keinerlei Reaktion. Bei höheren Formamidkonzentration war die Fluoreszenz der Sonden mit dem hybridisierten *S. Enteritidis*-Stamm etwas schwächer. Die optimale Stringenz bei 46 °C Hybridisierungstemperatur wurde daher mit 10 % Formamid im Hybridisierungspuffer ermittelt.

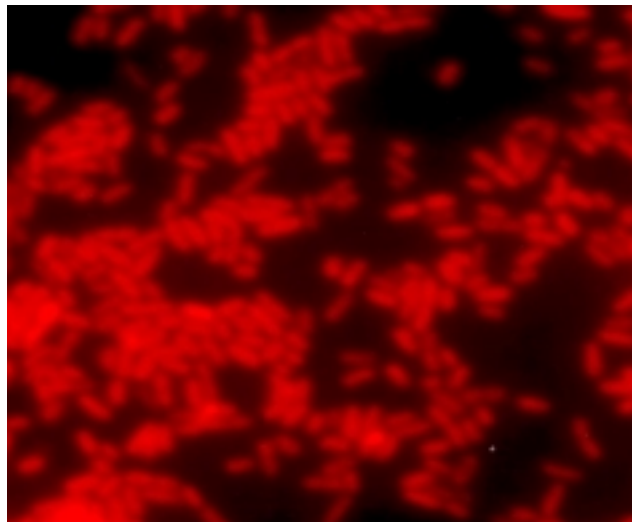


Abb.10: Das Fluoreszenzsignal aus *Salmonella Enteritidis* mit Sonde Sal-1

5.3.2 Bestimmung der Voranreicherungszeit für FISH

Um die minimale Voranreicherungszeit zu bestimmen, die es erlaubt, Salmonellen durch fluoreszierende *in situ* Hybridisierung zu detektieren, wurde für dieses Experiment ein Isolat von *S. Enteritidis* (LGA) und der Stamm *S. Panama* (ALM41) verwendet. 10g Lebensmittel (sterile Geflügel-Babynahrung, Geflügel und Salat) wurden mit verschiedenen Verdünnungsstufen von *S. Enteritidis* und mit Kapseln von *S. Panama* (2-5 KBE/Kapsel) beimpft und bei 37°C bebrütet. Zur Überprüfung der Abwesenheit von Salmonellen in den Lebensmitteln wurde parallel eine unbeimpfte Probe untersucht. In der Negativkontrolle konnten nach dem kompletten Anreicherungsprozeß keine Salmonellen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Tab.17 dargestellt. Es ist zu sehen, daß bei einer Ausgangsmenge von 2-5 KBE in zwei den untersuchten Lebensmitteln schon nach 10 Stunden Salmonellen *in situ* nachgewiesen werden konnten. Nach 12 Std. konnten mit der FISH-Methode in allen 3 Lebensmitteln Salmonellen nachgewiesen werden. Jedoch lagen die Salmonellen in nur geringer Zahl vor, so dass die mikroskopische Auswertung relativ lange dauerte. Nach 16 Stunden Bebrütung konnte mit der FISH-Methode unabhängig von der Ausgangsmenge an Salmonellen eine schnelle Detektion durchgeführt werden. Abbildung 11 zeigt das Ergebnis der Hybridisierung mit der Sonde Sal-1 (1000-fache Vergrößerung) nach 16 h Anreicherung in Salat-Peptonwasser (Ausgangsmengen 2-5 KBE).

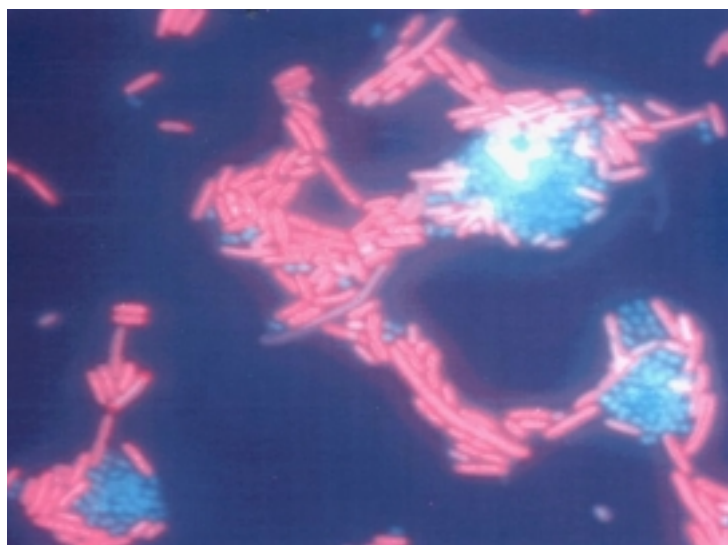


Abb.11: *S. Panama* (rote Stäbchen) nach 16-stündiger Bebrütung in Salat-Peptonwasser.

Abgebildet ist das Überlagerungsbild (dargestellt mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms KS300) der DAPI-Färbung (Bakterien erscheinen blau) und der Färbung mit Cy3 (Bakterien erscheinen rot). Die rote Färbung überdeckt die blaue Färbung

Aus Tab17. kann man noch ablesen, dass nach 8-stündiger Bebrütung bei der Salatprobe (mit hoher Begleitflora) und bei der sterilen Kindernahrung der Nachweis von Salmonellen bei niedriger Ausgangskonzentration mit der FISH-Methode möglich war. Der Nachweis aus der Fleischprobe war erst nach 10-stündiger Bebrütung möglich.

In Tabelle 16 sind die optimalen Arbeitsbedingungen für maximale Sensitivität und Spezifität zum Nachweis von Salmonellen durch FISH zusammengefaßt.

Tab.16 Optimale Behandlung und Konditionen sowie die notwendige Arbeitszeit für die FISH Methode zum Nachweis von *Salmonella* in Lebensmitteln

Untersuchungs-Schritte	Reagenzien	Arbeitszeit	Behandlung-Temperatur
Voranreicherung	Gepuffertes Peptonwasser	16-18 Stunden	37 °C
Zellfixierung	3.7% Formaldehyd	1 Stunde	4 °C
	1×PBS	Kurze Zeit (Waschen)	Raumtemperatur ⁽¹⁾
	1:2 PBS:Ethanol ⁽²⁾	Kurze Zeit	- 20 °C (bis zu 6 Monaten haltbar)
Hitze-Fixierung		Kurze Zeit	Bunsenbrenner-Flammen-Temperatur
Entwässerung	50%, 80%, 96% Ethanol	Jeweils 3 Minuten	Raumtemperatur
Hybridisierung	Hybridisierungspuffer (Tab.12)	1.5 Stunden	46 °C
Waschen	Waschpuffer (Tab. 13)	20 Minuten	46 °C
DAPI Färben	DAPI (1µg/ml)	5 Minuten	Raumtemperatur
Epifluoreszenz - Mikroskopie	Antibleichmittel	-	Raumtemperatur
Zeit für eine Probe		Ca. 4 Std. nach Voranreicherung⁽³⁾	

1) Raumtemperatur: entspricht 20-25°C

2) Mischung von 1×PBS und 96% Ethanol

3) Wenn mehr Proben untersucht werden, verlängert sich nur die Zeit zum Pipettieren

ERGEBNISSE

Tab.17: Ergebnisse von Bestimmung von Voranreicherungszeit mit einer Verdünnungsreihe von *S. Enteritidis* (LGA) und *S. Panama* Kapsel (ALM 41) durch kulturelle Methode und FISH-Methode.

Voranreicherungszeit bei 37 °C	Ausgangsverdünnung	Nährböden	Kindernahrung		Salat		Putenschnitzel		
			Kultur	FISH	Kultur	FISH	Kultur	FISH	
6 h	-4	Rambach	n.c.	++	n.c.	+++	n.c.	++	
		Leifson	n.c.		n.c.		n.c.		
	-5	Rambach	136	+	150	++	117	+	
		Leifson	145		156		132		
	-6	Rambach	52	+	48	+	37	-	
		Leifson	33		55		41		
	-7	Rambach	4	-	2	-	-	-	
		Leifson	-		2		1		
	2× <i>S. Panama</i> Kapsel	Rambach	3	-	1	-	1	-	
		Leifson	1		5		-		
	1× <i>S. Panama</i> Kapsel	Rambach	-	-	-	-	-	-	
		Leifson	-		-		-		
	8h	-4	Rambach	n.c.	+++	n.c.	++++	n.c.	+++
			Leifson	n.c.		n.c.		n.c.	
-5		Rambach	n.c.	++	n.c.	+++	n.c.	+++	
		Leifson	n.c.		n.c.		n.c.		
-6		Rambach	156	++	174	++	133	++	
		Leifson	147		166		135		
-7		Rambach	60	+	24	+	18	-	
		Leifson	62		14		19		
2× <i>S. Panama</i> Kapsel		Rambach	21	+	26	+	9	-	
		Leifson	15		13		15		
1× <i>S. Panama</i> Kapsel		Rambach	-	-	-	-	-	-	
		Leifson	-		-		-		
10h		-4	Rambach	n.c.	+++	n.c.	++++	n.c.	++++
			Leifson	n.c.		n.c.		n.c.	
	-5	Rambach	n.c.	++	n.c.	+++	n.c.	++++	
		Leifson	n.c.		n.c.		n.c.		
	-6	Rambach	n.c.	++	n.c.	+++	n.c.	+++	
		Leifson	n.c.		n.c.		n.c.		
	-7	Rambach	175	+	165	++	134	+	
		Leifson	187		145		161		
	2× <i>S. Panama</i> Kapsel	Rambach	137	++	103	++	122	++	
		Leifson	156		139		115		
	1× <i>S. Panama</i> Kapsel	Rambach	4	+	-	+	3	-	
		Leifson	3		-		-		
	12h	-4	Rambach	n.c.	++++	n.c.	++++	n.c.	++++
			Leifson	n.c.		n.c.		n.c.	
-5		Rambach	n.c.	+++	n.c.	+++	n.c.	++++	
		Leifson	n.c.		n.c.		n.c.		
-6		Rambach	n.c.	+++	n.c.	+++	n.c.	+++	
		Leifson	n.c.		n.c.		n.c.		
-7		Rambach	n.c.	++	n.c.	++	n.c.	+++	
		Leifson	n.c.		n.c.		n.c.		
2× <i>S. Panama</i> Kapsel		Rambach	n.c.	++	n.c.	++	n.c.	++	
		Leifson	n.c.		n.c.		n.c.		
1× <i>S. Panama</i> Kapsel		Rambach	55	+	35	+	50	+	
		Leifson	75		43		36		

ERGEBNISSE

71

16h	-4	Rambach	n.c.	++++	n.c.	++++	n.c.	++++
		Leifson	n.c.		n.c.		n.c.	
	-5	Rambach	n.c.	++++	n.c.	++++	n.c.	++++
		Leifson	n.c.		n.c.		n.c.	
	-6	Rambach	n.c.	+++	n.c.	++++	n.c.	++++
		Leifson	n.c.		n.c.		n.c.	
	-7	Rambach	n.c.	+++	n.c.	+++	n.c.	+++
		Leifson	n.c.		n.c.		n.c.	
	2×S. Panama Kapsel	Rambach	n.c.	+++	n.c.	+++	n.c.	+++
		Leifson	n.c.		n.c.		n.c.	
	1×S. Panama Kapsel	Rambach	n.c.	++	n.c.	++	n.c.	++
		Leifson	n.c.		n.c.		n.c.	
18h	-4	Rambach	n.c.	++++	n.c.	++++	n.c.	++++
		Leifson	n.c.		n.c.		n.c.	
	-5	Rambach	n.c.	++++	n.c.	++++	n.c.	++++
		Leifson	n.c.		n.c.		n.c.	
	-6	Rambach	n.c.	+++	n.c.	++++	n.c.	+++
		Leifson	n.c.		n.c.		n.c.	
	-7	Rambach	n.c.	+++	n.c.	++++	n.c.	+++
		Leifson	n.c.		n.c.		n.c.	
	2×S. Panama Kapsel	Rambach	n.c.	+++	n.c.	+++	n.c.	++
		Leifson	n.c.		n.c.		n.c.	
	1×S. Panama Kapsel	Rambach	n.c.	++	n.c.	+++	n.c.	++
		Leifson	n.c.		n.c.		n.c.	
24h	-4	Rambach	n.c.	++++	n.c.	++++	n.c.	++++
		Leifson	n.c.		n.c.		n.c.	
	-5	Rambach	n.c.	++++	n.c.	++++	n.c.	++++
		Leifson	n.c.		n.c.		n.c.	
	-6	Rambach	n.c.	++++	n.c.	++++	n.c.	++++
		Leifson	n.c.		n.c.		n.c.	
	-7	Rambach	n.c.	++	n.c.	++++	n.c.	+++
		Leifson	n.c.		n.c.		n.c.	
	2×S. Panama Kapsel	Rambach	n.c.	+++	n.c.	+++	n.c.	++
		Leifson	n.c.		n.c.		n.c.	
	1×S. Panama Kapsel	Rambach	n.c.	++	n.c.	++	n.c.	+
		Leifson	n.c.		n.c.		n.c.	
Negativkontrolle	-		-	-		-		

Ausgangsverdünnung: -4 entspricht 10^4 KBE/ml ++++ entspricht sehr viele Zellen

-5 entspricht 10^3 KBE/ml +++ entspricht viele Zellen

-6 entspricht 10^2 KBE/ml ++ entspricht 10-100 Zellen

-7 entspricht 10^1 KBE/ml + entspricht < 10 Zellen

„-“ entspricht keine Zellen nachweisbar

1 Kapsel von S. Panama entspricht 2-5 KBE

„n.c.“ entspricht not countable (zu viele Zellen, nicht auszahlbar)

5.4 Einfluß-Faktoren auf FISH

5.4.1 Einfluß von Autofluoreszenz und unspezifischer Bindung

Die Autofluoreszenz von Fleischproben erscheint relativ schwach, großflächig und ohne spezifische Form (Abb.12a). Die Autofluoreszenz von Salatproben war weniger ausgeprägt (nicht dargestellt).

Unspezifische Bindungen traten unregelmäßig auf (Abb.11b). Manchmal war das Signal sehr stark, aber die Form der Objekte war in der Regel nicht stäbchenförmig, so dass man sie leicht von Salmonellen unterscheiden kann.

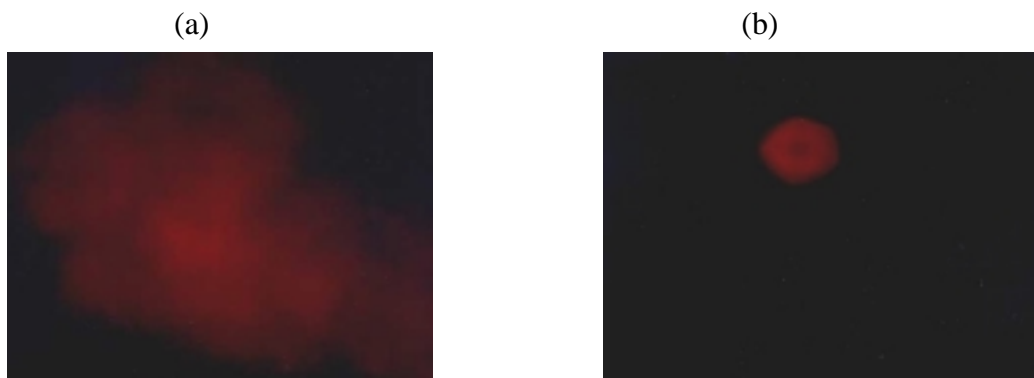


Abb.12 Autofluoreszenz (a) und unspezifischer Bindung (b) mit Sonde Sal-1 von Geflügelproben

5.4.2 Einfluß von Begleitflora

Bei diesen Versuchen wurden zwei Mischkulturen mit unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen an Begleitflora (*E. coli* und *Enterococcus faecium*) mit je einer Kapsel *S. Panama* und eine Reinkultur von *S. Panama* (1 Kapsel) parallel untersucht. Nach 6 Stunden Bebrütungszeit zeigten die Mischkulturen bereits eine Trübung, die Reinkultur war erst nach 10-stündiger Bebrütung getrübt. Anschließend wurden die Anreicherungskulturen auf Rambachagar ausgestrichen. Aus der Mischkultur mit hoher Ausgangskonzentration zeigten die Kolonien von *S. Panama* keine typische pinke Färbung, was auf eine Störung durch die hohen Konzentrationen an *E. coli* und/oder *Enterococcus faecium* zurückzuführen ist. Das Ergebnis der Hybridisierung von *S. Panama* aus der Mischkultur mit hoher Ausgangskonzentration ist in Abb.13 dargestellt. Anhand der in dieser Untersuchung erzielten Ergebnisse kann man sehen,

dass *S. Enteritidis* aus Mischkulturen mit hoher und niedriger Ausgangskonzentration an Begleitflora spezifisch erkannt werden kann. Aber die Anzahl und rRNA Menge von *S. Enteritidis* ist aufgrund der Konkurrenz während des Wachstums der Keime in der Bouillon geringer, so daß nicht die gleichen starken Fluoreszenzsignal erreicht werden können wie in der Reinkultur. Man kann sie jedoch deutlich sehen.

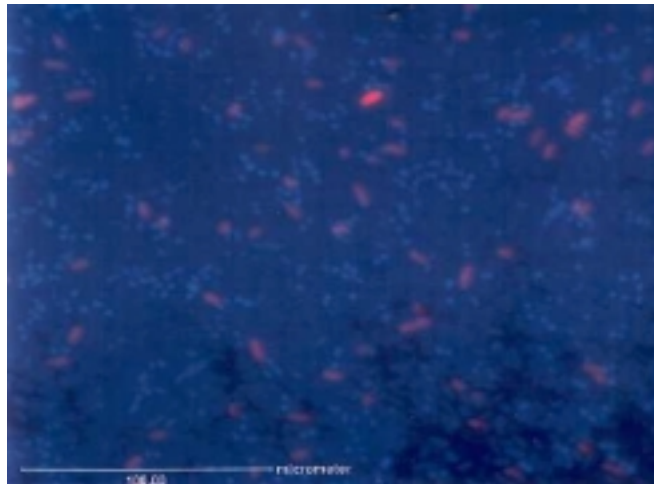


Abb.13 *S. Panama* (rote Stäbchen) aus einer Mischkultur (Ausgangskonzentration an Begleitflora: 10^7 KBE/ml)

5.4.3 Effizienz bei unterschiedlichen Lebensmittelarten

Die Ergebnisse von Versuchen mit unterschiedlichen Lebensmitteln sind in Tabelle 18 dargestellt. Außer Eierschalen-Proben, an denen noch etwas Eiweiß war, konnte *S. Panama* in alle anderen Proben durch Kultur und FISH nachgewiesen. Da in der Eierschalen-Probe mit der Sonde Eub338, die fast alle Bakterien hybridisieren kann, Bakterien nachgewiesen werden konnten, mit der Sonde Sal-1 jedoch keine Salmonellen nachgewiesen werden konnten, ist das negative Ergebnis von *S. Panama* in diesem Versuch auf eine Hemmung des Wachstums und nicht auf eine Unzulänglichkeit bei der Hybridisierung zurückzuführen. Bei allen anderen Lebensmitteln konnte *S. Panama* kulturell und mit FISH nachgewiesen werden.

Tab. 17: Ermittlung der Matrix-Effizienz für den Nachweis mit FISH und der kulturellen Methode durch künstliche Beimpfung verschiedener Lebensmitteln mit 2 Kapseln von *S. Panama* (ALM41) (18 Std. bei 37°C)

Arten von Lebensmittel (25g)	Ergebnisse von Kultur	Ergebnisse von FISH	
		Sal-1	Eub338
Geflügel (Hähnchenschnitzel)	+	+	+
Tiefgefrorenes Geflügel (Suppenhuhn)	+	+	+
Eier	+	+	+
Eierschale mit wenig Eiweiß	-	-	+
Rindfleisch (Hackfleisch)	+	+	+
Schweinefleisch (Hackfleisch)	+	+	+
Salami	+	+	+
Innereien (Hühnermagen)	+	+	+
Milch	+	+	+
Milchpulver	+	+	+
Käse	+	+	+
Wurst	+	+	+
Fisch	+	+	+
Butter	+	+	+
Paprika	+	+	+
Salat	+	+	+
Pudding	+	+	+
Sojabohnensprossen	+	+	+

5.4.4 Einfluß von NaCl-Konzentration, pH-Wert und Temperatur auf die FISH-Methode

Die Ergebnisse des Einflusses unterschiedlicher Konzentrationen von NaCl auf den Nachweis von Salmonellen mit FISH und mit der kulturellen Methode sind in Tab.19 darstellt. Nach 5-tägiger Aufbewahrung bei Raumtemperatur in VE-Wasser, nahmen die Zellen von *S. Panama* eine runde und kleine Form an und das Fluoreszenzsignal wurde schwächer. Bei Aufbewahrung in unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen änderte sich die Form der Salmonellen nicht. Nach 15-tägiger Aufbewahrung in VE-Wasser konnte *S. Panama* nicht mehr kulturell nachgewiesen werden. Mit der FISH-Methode war das Ergebnis nach 15 Tagen noch positiv, nach 30 Tagen jedoch ebenfalls negativ. Nach Aufbewahrung der Salmonellen in 2% und 5% NaCl konnten Salmonellen kulturell und mit FISH über 60 Tage nachgewiesen werden, wobei sich die Anzahl an Zellen stark senkte und auch das Fluoreszenzsignal etwas schwächer wurde. Bei Aufbewahrung von

S. Panama in 15-prozentiger NaCl konnten kulturell bereits nach 10 Tagen keine Zellen mehr nachgewiesen werden, mit der FISH-Methode hingegen gelang der Nachweis über 30 Tage. Aus diesen Versuchen kann man schließen, daß die NaCl-Konzentration nur einen Einfluß auf die Bakterien hat, jedoch nicht auf die FISH-Methode.

Bei Aufbewahrung von *S. Panama* (vor der Zellfixierung) bei niederen Temperaturen (4°C und -20°C) konnte über 60 Tage kein negativer Einfluß auf die FISH-Methode beobachtet werden, d.h. das Fluoreszenzsignal wurden nicht abgeschwächt. Bei Aufbewahrung von bereits fixierten Zellen und einer Lagerung bei -20°C konnten selbst nach 12 Monaten noch Fluoreszenzsignal generiert werden.

Die Aufbewahrung der Zellen (bis 60 Tage) bei pH-Werten zwischen 4,05 und 7,35 zeigte keinen negativen Einfluß für den Nachweis von Salmonellen mittels FISH-Methode (Tabelle20). Bei einem pH-Wert von 3,33 konnten kulturell bereits nach 2 Tagen keine Salmonellen mehr nachgewiesen werden. Mit der FISH-Methode hingegen gelang der Nachweis über 30 Tage.

Tab.19: Die Ergebnisse zur Ermittlung des Einflusses von verschiedenen NaCl-Konzentration auf den kulturellen Nachweis von *S. Panama* und den Nachweis mittels FISH.

NaCl Konzentration	Kulturelle Methode								FISH-Methode							
	18 Std.	2T ⁽¹⁾	5T	10T	15T	30T	40T	60T	18 Std.	2T	5T	10T	15T	30T	40T	60T
VE-Wasser (0%)	++++	+++	++	+	-	-	-	-	++++	+++	+++	++	+	-	-	-
2%	++++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	++++	++++	++++	+++	+++	++	++	++
5%	++++	+++	+++	+++	++	++	+	+	++++	++++	++++	+++	+++	+	+	+
15%	+++	++	+	-	-	-	-	-	++++	++++	++++	++	++	+	-	-

1) Ausgangskonzentration von *S. Panama*: 1×10^7

2) T= Tag

Tab.20: Die Ergebnisse zur Ermittlung des Einflusses von verschiedenen pH-Werten in VE-Wasser auf den kulturellen Nachweis von *S. Panama* und den Nachweis mittels FISH.

pH-Wert	Kulturelle Methode								FISH-Methode							
	18 Std.	2T	5T	10T	15T	30T	40T	60T	18 Std.	2T	5T	10T	15T	30T	40T	60T
3.33	+ ³	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	++	+	+	-	-
4.05	+++	+++	+++	++	++	++	+	-	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
4.55	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+	+	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
5.01	++++	++++	+++	+++	+++	+++	++	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
5.65	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
6.08	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
6.88	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
7.35	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

1) Ausgangskonzentration von *S. Panama*: 1×10^7

2) T= Tag

3) Bei pH-Wert 3.33 war BPW noch klar, bei anderen pH-Werten kam es zur Trübung der Bouillon.

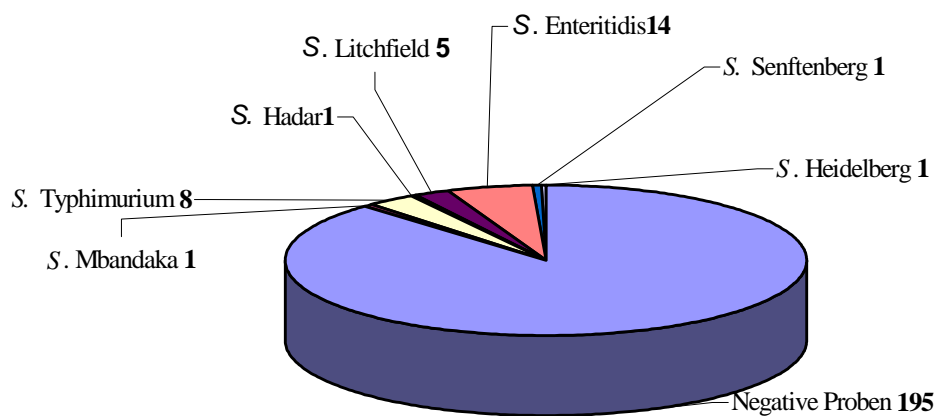
5.5 Nachweis von Salmonellen in Lebensmittelproben

5.5.1 Ergebnisse der kulturelle Methode und der FISH-Methode

225 Lebensmittelproben wurden zum Nachweis von Salmonellen mit der kulturellen Methode und der FISH-Methode untersucht. Von den jeweiligen Voranreicherungskulturen wurden 5ml Proben entnommen und mit 3,7%-iger Formaldehydlösung fixiert. Anschließend wurden sie mit spezifischen Sonden hybridisiert. Durch fluoreszierende *in situ* Hybridisierung mit drei Sonden konnten Salmonellen nach Voranreicherung in einigen Lebensmittel nachgewiesen werden (Tab.25 in Anhang).

Die Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse der kulturellen Methode. 30 Proben waren *Salmonella* positiv. Am häufigsten wurde das Serovar *S. Enteritidis* nachgewiesen. In einer Probe konnten 2 unterschiedliche Serovare nachgewiesen.

Abb.14 : Die Ergebnisse von Lebensmittelproben durch Kulturelle Methode



Die Ergebnisse der FISH-Methode sind im Anhang in Tabelle 26 dargestellt. Mit der FISH-Methode waren 53 der Proben mit der Sonde Sal-1 positiv, 56 der Proben waren positiv mit der Sonde Sal-3 und 35 Proben waren positiv mit der Sonde Sal-544. Tabelle 21 zeigt eine Vierfeldertafeln, anhand derer der durch **McNemar** modifizierte Vorzeichentest^[153] durchgeführt wurde (siehe Methoden, Kapitel 4.8). Zwischen der kulturellen Methode und der FISH-Methode mit den Sonden Sal-1 oder Sal-3 konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Mit der FISH-Methode gibt es mehr positive Ergebnisse als mit der kulturellen Methode. Die Unterschiede zwischen der

kulturellen Methode und der FISH-Methode mit Sonde Sal-544 sind statistisch nicht signifikant. Nach Tabelle 23 kann man keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Ergebnissen feststellen, die mit den Sonden Sal-1 und Sal-3 erzielt wurden. Signifikante Unterschiede hingegen zeigen die Ergebnisse der Sonde Sal-544 und Sal-1 oder Sonde Sal-544 und Sal-3.

Eine interessante Beobachtung war die Untersuchung von Verpackungseinheiten. Manchmal hatte man mehrere Proben aus einer Packung (siehe Tabelle 26 im Anhang). Wenn eine Packung (z. B. 4-6 Hähnchenschlegel) als eine Probeneinheit berechnet wurden und aus dieser Packung eine Probe positiv war, wurde die ganze Packung als positiv bezeichnet. Die Neuberechneten Ergebnisse sind in Tabelle 22 dargestellt. Nach der statistischen Analyse konnte man bei dieser Art der Betrachtung keinen statistisch signifikant Unterschied zwischen der kulturellen Methode und der FISH-Methode mit den Sonden Sal-1, Sal-3 oder Sal-544 feststellen.

Tab.21: Ergebnisse für Lebensmittelproben mit der kulturellen und der FISH-Methode.

Sonde		FISH-Methode					
		Sal-1		Sal-3		Sal-544	
		positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
Kultur Methode	positiv	28(a)	2(b)	28(a)	2(b)	27	3(b)
	negativ	25(c)	171(d)	28(c)	167(d)	8(c)	187(d)
Total		53	173	56	169	35	190

(1) Vergleichen zwischen Kultur und FISH mit Sal-1: $X^2 = 17,28$ $p < 0,05$

(2) Vergleichen zwischen Kultur und FISH mit Sal-3: $X^2 = 20,16$ $p < 0,05$

(3) Vergleichen zwischen Kultur und FISH mit Sal-544: $X^2 = 1,3$ $p > 0,05$

a; b; c und d: siehe Formel in Kapitel 4.8 (Methoden)

Tab.22: Ergebnisse der kulturellen und der FISH-Methode mit Packungen als berechnete Einheit.

Sonde		FISH-Methode					
		Sal-1		Sal-3		Sal-544	
		positiv	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
Kultur Methode	positiv	22(a)	2(b)	23(a)	1(b)	21(a)	3(b)
	negativ	5(c)	63(d)	6(c)	62(d)	4(c)	64(d)
Total		27	65	29	63	25	67

(1) Zwischen Kultur und FISH mit Sal-1: $X^2 = 0,5$ $p \geq 0,05$

- (2) Zwischen Kultur und FISH mit Sal-3: $X^2 = 2.5$ $p \geq 0,05$
 (3) Zwischen Kultur und FISH mit Sal-544: $X^2 = 0$ $p \geq 0,05$
 a; b; c und d: siehe Formel in Kapitel 4.8 (Methoden)

Tab 23 Ergebnis-Vergleich zwischen Sonde Sal-1, Sal-3 und Sal-544

		Sal-1		
		positiv	negativ	
Sal-3	positiv	53(a)	3(b)	$X^2=1,00$ $P \geq 0,05$
	negativ	0(c)	169(d)	
Total		53	172	
		Sal-1		
		positiv	negativ	
Sal-544	positiv	34(a)	1(b)	$X^2=13,76$ $P < 0,05(d)$
	negativ	19(c)	171(d)	
Total		53	172	
		Sal-3		
		positiv	negativ	
Sal-544	positiv	34(a)	1(b)	$X^2=16,67$ $P < 0,05$
	negativ	22(c)	168(d)	
Total		56	169	

5.5.2 Vergleich zwischen Salmonellanachweis aus der Voranreicherung (16Std.) und der Selektivanreicherung Passage I (24Std.) und Passage II (48Std.) durch FISH

Die Ergebnisse sind in Tabelle 27 (Anhang) dargestellt. Nach statistischer Analyse zeigten die Ergebnisse aus der Voranreicherung verglichen mit denen aus der Selektivanreicherung mit allen drei Sonden keinen signifikanten Unterschied.

6. Diskussion

Um Salmonelleninfektionen zu verhindern, schreibt der Gesetzgeber strenge hygienische Vorschriften für die Herstellung von Lebensmitteln vor. So dürfen in verzehrfertigen Lebensmitteln keine *Salmonella* spp. mehr nachweisbar sein. Diese Kontrollen stützen sich in der Regel auf klassische mikrobiologische Anreicherungs- und anschließende biochemische Differenzierungsverfahren. Aber der Zeit- und Materialaufwand der konventionellen kulturellen Methode ist für die Anwendung von großen Probevolumina wie sie z.B. in der industriellen Lebensmittelherstellung anfallen, nicht besonders geeignet. Die Notwendigkeit der Entwicklung und Etablierung schnellerer und gleichzeitig zuverlässiger Methoden ist immer einleuchtend.

Die FISH-Verfahren, die mit ganzen Zellen mittels rRNA-gerichteten Oligonukleotid-Sonden arbeitet wird bereits in großem Umfang als Werkzeug für die spezifische Detektion von Mikroorganismen verwendet (siehe **Kapitel 1.1**). Bisher wurde die FISH-Verfahren jedoch noch nicht im Bereich der Lebensmittelmikrobiologie für den Nachweis von Salmonellen eingesetzt.

Ziel der Arbeit war es spezifische Sonden (Sal-1, Sal-3 und Sal-544) zu erproben, die mit einer Cy3-Markierung und 23S rRNA als Hybridisierungsziel, zur routinemäßigen Identifikation von Salmonellen in Lebensmittelproben verwendet werden können.

6.1 23S rRNA als Hybridisierungsziel

6.1.1 rRNA als Gold-Standard für die definitive Identifikation von Bakterien

Man unterscheidet drei verschiedene RNA-Sorten: Messenger-RNA (mRNA), Transfer-RNA (tRNA) und ribosomale RNA (rRNA). Die ribosomale RNA (rRNA) bildet zusammen mit einer Gruppe von Proteinen die Ribosomen, sozusagen die Proteinfertigungsmaschinen, die die Zusammenarbeit von mRNA, tRNA und den Proteinen so koordinieren, daß die Bauanleitung der DNA am Ende tatsächlich in das richtige Protein umgesetzt wird. Alle Ribosomen bestehen aus einer großen und einer kleinen Untereinheit^[126]. Sie werden bei den Bakterien 50S und 30S genannt. Diese Untereinheiten können noch weiter in ihre Bestandteile aufgespalten werden: in Proteine und RNAs. Die 30S-Untereinheit besteht aus 21 verschiedenen Proteinen (S1

bis S21) und einem RNA-Molekül: 16S rRNA genannt. Die 50S-Untereinheit besteht aus 31 verschiedenen Proteinen (L1 bis L31) und zwei RNA-Molekülen: 5S und 23S rRNA genannt ^[126].

Vergleiche von konservativen rRNA Sequenzen sind Grundlage zur Analyse der phylogenetischen Verwandtschaft^[122]. Die Analyse von rRNA^[128] kann darüber hinaus auch zur Identifizierung von nicht kultivierbaren Mikroorganismen herangezogen werden^[8].

Die rRNA als Zielmolekül für eine Identifizierung von Mikroorganismen weist entscheidenden Vorteil auf:

- 1) rRNA ist als Protein-Fertigungsmaschine in allen lebenden Zelle vorhanden. Die meisten bakteriellen Zellen haben etwa zwischen 10^3 und 10^5 Ribosomen, die Kopien von 5S, 16S, und 23S rRNA enthalten. Diese natürliche Häufigkeit führt zu einer ausgezeichneten Sensitivität der FISH-Methode^[7], künstliche Amplifikationen (wie für die PCR nötig) sind damit überflüssig.
- 2) Die rRNA weist viele einzelsträngige Abschnitte auf, so daß teilweise auf eine Denaturierung (wie bei DNA nötig) verzichtet werden kann.
- 3) Die Variabilität des rRNA-Mengen in der Zelle. Aufgrund der Funktion als Protein-Fabrik gibt es eine direkte Wechselbeziehung zwischen rRNA-Gehalt und allgemeiner Stoffwechselaktivität oder Wachstumsrate^[105]. Je größer die Wachstumsrate, desto höher ist der rRNA Gehalt in der einzelnen Zelle.
- 4) Die rRNA enthält variable Regionen, die höhere oder niedrigere evolutionäre Informationen konservieren. Bestimmte Eigenschaften der rRNA werden gerne als molekulare Chronometer verwendet^[112]. Viele Sequenzen der rRNA sind höchst-konserviert^[202], so kann man Informationen über Phylogenie gewinnen und Bakterien zu Genus, Spezies oder sogar Subspezies zuordnen ^[6].

6.1.2 Warum wird 23S rRNA als Hybridisierungsziel zur Identifizierung von *Salmonella* verwendet?

Da der Informationsgehalt der vergleichsweise kurzen 5S rRNA sehr gering ist, sind die 16S rRNA und 23S rRNA typische Zielobjekt der FISH-Methode^[6].

Es wurden schon einige 16S oder 23S rRNA-gerichteten Oligonukleotidesonden entwickelt, die spezifisch für *Salmonella* sind.

Wilson et al. ^[200] haben eine Sonde für rRNA-gerichtete Hybridisierung (nicht in situ Hybridisierung) konstruiert, leider war die Sonden-Sequenz und die Zielsequenz nicht ausreichend beschrieben (16S rRNA oder 23S rRNA). Licht et al. ^[105] haben eine 16S rRNA gerichtete Sonde benutzt. Die Spezifität von dieser Sonde wurde jedoch nur mit einem „Check-Probe-Programme“ getestet. Lin und Tsen ^[106] haben drei 16S rRNA gerichtete Sonden entwickelt, die jedoch mit *Klebsiella* spp und *Citrobacter* spp. kreuzhybridisieren. Die Gründe hierfür sind in der schlechten Trennung der Taxonomie auf oder unterhalb der Speziesebene für 16S rRNA Sequenzen zu suchen^[67]. Die 23S rRNA Sequenzen erlauben eine phylogenetische Analyse die aufgrund fast doppelter Länge und Vorhandensein von mehreren Variablen auch auf Subspezies-Ebene benutzt werden kann^[101].

Röner und Stackebrandt^[149] sowie Nordentoft et al.^[127] haben zwei 23S rRNA gerichtete Sonden (Sal-1 und Sal-3) konstruiert, welche Salmonellen der Spezies *S. enterica* ohne Kreuzhybridierung identifizieren können. Die Spezifität der radioaktiv markierten Sal-1 Sonde wurde nur durch Dot-Blot Hybridisierung für Reinkultur-Stämme getestet. Manchmal können Sonden jedoch in einer Dot-Blot Hybridisierung gut funktionieren während sie für die FISH-Methode nicht funktionieren. Die Sonde Sal-3 wurde für die FISH-Methode bereits für die Anwendung auf Gewebeschnitte von klinischen Proben getestet. Die beiden Sonden wurden bisher jedoch noch nicht im Bereich der Lebensmittelmikrobiologie verwendet.

In der vorliegenden Arbeit sollte ebenfalls eine 16S rRNA gerichtete Sonden konstruiert werden. Aber eine für *Salmonella enterica* spezifische, gegen die 16S rRNA gerichtete Sonde wurde aufgrund der sehr hohen Sequenzähnlichkeit von Salmonellen zu anderen Vertretern der Familie der *Enterobacteriaceae*^[37] nicht gefunden. So zeigte die 16S rRNA von *Salmonella enterica* zu *Escherichia coli* 99% Sequenzähnlichkeit, und zu *Salmonella bongori* 96.5-97.2%. Daher kann eine für *Salmonella* spezifische Sonde nur gegen die 23S rRNA gerichtet sein.

6.2 Spezifität der Sonden für *Salmonella*

6.2.1 Wie hoch muß die Spezifität der Sonden für *Salmonella* sein?

Die Basenzusammensetzung der *Salmonella*-DNA ist mit 50-52% GC-Gehalt ähnlich der Basenzusammensetzung der am nächsten verwandten Genera wie *Escherichia*,

Shigella und *Citrobacter* ^[44]. Vergleiche von 16S rRNA und 23S rRNA Sequenzen haben die am nächsten verwandten Genera auch als *Escherichia*, *Shigella* und *Citrobacter* bestätigt ^[37]. Daher muß eine spezifische Sonde mindesten *Escherichia coli*, *Shigella* spp. und *Citrobacter* spp. von Salmonellen unterscheiden können. Andererseits stellen Salmonellen der Subspezies I die größte Gruppe mit etwa 59% aller bekannten *Salmonella* Serovare dar. Sie enthält ebenfalls die meisten klinisch relevanten Serovare ^[127]. Nur einige wenige gehören zur Subspezies IIIa (Arizonae Gruppe) ^[174]. Deshalb sollte die Spezifität der Sonde Salmonellen dieser Subspezies (I und IIIa) 100%ig einschließen. Eine Sonde die alle Salmonellen (100%) der Subspezies I-VI identifizieren kann, ist aufgrund fehlender klinischer Relevanz nicht notwendig. Andererseits können in einem evolutionären Prozeß durch Insertion und / oder Deletion ^[112] variable Regionen hervorrufen werden. Wenn eine solche Sequenz-Veränderung im Hybridisierungsziel von irgend einem Stamm liegt, kann die FISH-Methode diesen Stamm nicht mehr sicher identifizieren.

6.2.2 Nachweis der Spezifität der Sonden für *Salmonella* spp.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Methoden für die Beurteilung der Sonden-Spezifität verwendet.

Um einen bestimmten Mikroorganismus durch Hybridisierung mit Gensonden nachweisen zu können, ist der erste Schritt der Entwurf einer spezifischen Sonde. Die Spezifität der Sonden wurde zunächst durch den Vergleich mit einer umfassenden Datenbank von 23S rRNA Sequenzen bestätigt. Die Sequenzen stammten aus dem ARB-Software-Package (TU München) und wurden zusätzlich mit den in der Genbank gespeicherten Sequenzen verglichen. Es zeigte sich (Tab.13), daß jede Sonde mindestens 2 Basenpaar-Mismatches zu anderen Genera hat. Solche zwei Basenfehlpaarungen führen bei der Hybridisierung von Nicht-Zielorganismen mit der Gensonde zur Ausbildung von zwei Schmelzdomänen, was offensichtlich ausreicht, um die Nicht-Zielorganismen gegenüber den Zielorganismen zu diskriminieren. Mit dieser Computer-basierenden spezifischen Analyse kann man Sequenzen einer Großzahl von Organismen in weniger Minuten vergleichen.

Desweiteren wurde die Spezifität der Cy3-markierten Sonden durch Hybridisierung von Ziel- und Nicht-Zielorganismen ermittelt. Die Hybridisierungsbedingungen wurden so

eingestellt, daß bei Vorhandensein eines einzelnen Mismatches zwischen Sonde und Organismus noch eine Hybridisierung stattfinden kann. Die Ergebnisse haben gezeigt, daß die 23S rRNA-gerichteten Oligonukleotidesonden (Sal-1, Sal-3 und Sal-544) spezifisch mit rRNA von 59 getesteten *Salmonella* Stämmen hybridisierten und mit anderen Vertretern aus der Familie der *Enterobacteriaceae* nicht kreuz hybridisierten.

Eine Spezifität von 100% konnte jedoch nicht erzielt werden. Sal-1 kann die Subspezies IIIb und einen Teil der Subspezies IIIa nicht identifizieren, Sal-3 kann die Subspezies IIIa nicht identifizieren und Sal-544 kann die Subspezies VI und einen Teil der Subspezies IIIa nicht identifizieren.

6.2.3 Einflußfaktoren auf die Sondenspezifität

Immunologische Methoden sind von spezifischen Antigenen abhängig. Diese Phentypen (Antigene) können aufgrund von Umweltfaktoren oder Evolution geändert werden, deshalb können immunologische Methoden nicht immer stabil funktionieren^[28,62]. Diese Faktoren führen bei der auf rRNA gerichteten FISH-Methode nicht zu Problemen^[28], da die rRNA-Sequenzen relativ stabil sind^[201]. Die Stabilität des ribosomalen Ziels erlaubt den Nachweis von Salmonellen aus Lebensmittelproben genauso wie den Nachweis von Salmonellen aus Reinkultur, obwohl die physikalischen und chemischen Faktoren von Lebensmitteln große Unterschiede zeigen können. In der vorliegenden Arbeit wurden zudem noch die Matrix-Effizienz von 18 unterschiedlichen Lebensmitteln getestet. Dabei zeigte sich kein Unterschied in der Anwendbarkeit der FISH-Methode auf die verschiedenen Proben. Der Grund für das negative FISH-Ergebnis aus der Eierschale-Probe liegt nicht an der FISH-Methode, sondern daran, daß die Salmonellen in dieser Probe nicht wuchsen. Andere Bakterien, die in dem Eierschalen-Voranreicherungs-Medium wuchsen, konnten durch die Sonde Eub338 nachgewiesen werden.

Die Sequenzähnlichkeit zwischen rRNA-Zielregion und spezifischer Sonde entscheidet über die Spezifität der FISH-Methode. Ein weiterer wichtiger Spezifitätsfaktor ist die Stringenz der Reaktionsparameter. Deshalb müssen Parameter wie Hybridisierungstemperatur, Ionenstärke und organische Lösungsmittel im Hybridisierungspuffer exakt für jede Sonde eingestellt werden (siehe Kapitel 2.6.4). Eine wichtige Rolle spielt dabei

die Konzentration von Formamid. Bei nicht stringenten Reaktionsbedingungen kann eine Hybridisierung auch noch bei Sequenzunterschieden zwischen der Sonde und der Zielsequenz von 2 Basen erfolgen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zudem noch Faktoren untersucht, die sich in Lebensmittelproben auf das Wachstum von *Salmonella* ungünstig auswirken können. Solche Faktoren sind z. B. Hemmstoffe, Nahrungsmangel oder Konkurrenz mit anderen Bakterien, niedrige Temperatur, niedriger pH-Wert, hohe NaCl-Konzentration usw.. Es konnte gezeigt werden, dass diese Faktoren die Sensitivität der FISH-Methode in einem bestimmten Umfang beeinflussen, die Zuverlässigkeit der FISH-Methode zum Nachweis von *Salmonella* spp. wurde jedoch nicht beeinflusst.

Das Spezifitätsproblem der Sonden für *Salmonella* spp, welche eine nicht 100%-ige Spezifität für alle *Salmonella* erzielen, kann durch das gemeinsame Verwenden von zwei oder mehreren Sonden gelöst werden^[6]. Theoretisch können durch die Kombination von Sal-1 und Sal-544 alle Salmonellen nachgewiesen werden.

6.2 Sensitivität von FISH

6.2.1 Theoretische Sensitivität der FISH

Die Sensitivität einer Methode sagt normalerweise aus, wie viele Zellen oder KBE/ml minimal durch diese Methode nachgewiesen werden (Nachweisgrenze). Die theoretische Nachweisgrenze der FISH-Methode beträgt eine Zelle^[25]. Da bei der Methode normalerweise 10µl der Fixierungszellsuspension hybridisiert werden (siehe Methoden Kapitel 4.3.2), muß mindestens eine *Salmonella*-Zelle in 10µl vorhanden sein. Das heißt, wenn mindestens eine *Salmonella*-Zelle in 10µl der Fixierungszellsuspension vorhanden sein muß, muß mindestens eine *Salmonella*-Zellen in 5ml Voranreicherungs-medium der Lebensmittelprobe enthalten sein. Die 5ml Voranreicherungsmedium stammen aus 225ml BPW+25g Lebensmittel, somit müssen mindestens 45 *Salmonella*-Zellen in den gesamten 225ml Voranreicherungsmedium enthalten sein und dort gleichmäßig verteilt sein. Wenn eine Probe wirklich positiv ist, d.h. wenn mindestens eine *Salmonella* in der Probe enthalten ist, können unter normalen Bedingungen so geringe Zellen leicht durch 16-stündige Bebrütung der Proben erreicht werden (die Generationszeit von *Salmonella* beträgt 20 min bei 37 °C^[123]). Aber das ist nur eine theoretische Nachweisgrenze.

Man sagt auch, daß 1 *Salmonella*-Zelle in 25 g Lebensmittelprobe der theoretischen Nachweisgrenze der kulturellen Methode ist ^[22]. Bedingt durch den Arbeitsprozeß der kulturellen Methode müssen nach einer 16-stündigen Voranreicherung mindestens 23-225 Zellen in 250ml BPW enthalten sein und die Zellen in Voranreicherungsbouillon regelmäßig verteilt sein. Dann können positive Ergebnisse mit der kulturellen Methode erzielt werden. Ein weiterer Faktor, der bei der kulturellen Methode bedacht werden muß, ist die Hemmwirkung von selektiven Medien auf die Salmonellen^[185]. Theoretisch besteht kein Unterschied in der Nachweisgrenze der 2 Methoden.

6.2.2 Mengen von rRNA in der Zelle als entscheidender Faktor für die Sensitivität

Ein positives Ergebnis der FISH-Methode wird durch ein sichtbares Fluoreszenzsignal beurteilt. Die Stärke des Fluoreszenzsignals hängt zuerst von der Menge an Sonden-rRNA-Hybriden ab. Je höher die Menge an rRNA ist, desto mehr Sonden-rRNA-Hybride können entstehen und um so stärker wird das Fluoreszenzsignal^[188]. Deshalb ist der Gehalt von rRNA in Zellen ein entscheidender Faktor für die Sensitivität der FISH-Methode. Im normalen Zustand haben die meisten lebenden bakteriellen Zellen etwa zwischen 10^3 und 10^5 Ribosomen. Diese natürliche Häufigkeit führt zu einer ausgezeichneten Sensitivität der FISH-Methode^[7]. Deswegen ist eine vorherige Kultivierung der Zielzellen nicht nötig. In toten Zellen wird die rRNA rasch abgebaut.

Aber praktisch ist der Gehalt von rRNA in Salmonellen, die in Lebensmitteln vorhanden sind, nicht immer gleich, da sich solche Salmonellen oft in einen subletal vorgeschädigten Zustand befinden. Zu diesem Zustand kann es beispielsweise aufgrund zu niedriger Temperatur, durch zu hohe Salzkonzentration, zu niedrigem pH-Wert oder durch Hitze kommen. Bakterien in diesem Zustand werden auch als „*viable but not culturable*“ (VBNC) bezeichnet^[182]. Solche Bakterien enthalten normalerweise niedrige Mengen an rRNA. Durch eine ausgiebige, nicht selektive Voranreicherung können solche Zellen wieder genügend Zielmoleküle für die FISH-Detektion bilden.

Andererseits steht die Menge an rRNA in der Zelle in unmittelbarem Zusammenhang mit der Wachstumsrate der Zelle^[21,105]. Daher hat die Voranreicherung bei der FISH-Methode zwei Funktionen. Zum einen läßt sie die Anzahl der Salmonellen Zellen über die Nachweisgrenze ansteigen, zum anderen läßt sie die Zellen hohen Menge an rRNA bilden, was die Empfindlichkeit der FISH-Methode erhöht.

Um subletal vorgeschädigte Bakterien „wiederzubeleben“, braucht man längere Voranreicherungszeiten als bei nicht vorgeschädigten Bakterien. Um falsch negative Ergebnisse zu vermeiden, wurde die Voranreicherungszeit daher bis auf 16 Std. verlängert, obwohl nach unseren Versuchen eine Voranreicherungszeit von 12 Std. eine ausreichende Sensitivität lieferte. Ein weiterer Vorteil der 16-stündigen Bebrütung ist, daß mehr Bakterien wachsen können. Die Methode ist dann nicht mehr so sehr von der gleichmäßigen Verteilung der Bakterien in der Anreicherungssuspension abhängig, d. h. die Wahrscheinlichkeit steigt, daß man beim Pipettieren auch ein Bakterium aus der Suspension der Lebensmittelprobe herausnimmt.

6.2.3 Andere Einflussfaktoren auf die Sensitivität

Die Stärke des Fluoreszenzsignals entscheidet über den Erfolg der FISH-Methode. Ein schwaches Fluoreszenzsignal kann unterschiedliche Gründe haben^[6]. Hauptsächlich verantwortlich dafür sind: Die Permeabilität der Zelle, der Zugang zu den Zielstellen, die Mengen an rRNA in der Zelle und die Auflösung des Mikroskops.

Die Permeabilität stellt durch die Fixierung mit Formaldehyd bei gram-negativen Bakterien keine große Schwierigkeit dar^[20,114]. Ein Mikroskop mit hoher Auflösung kann auch schwache Signale unterscheiden, dies ist besonders hilfreich bei subletal geschädigten Zellen. Gelegentlich ist bei vorgeschädigten Zellen nach 16h Voranreicherung nur relativ wenige rRNA in der Zellen.

Bestimmte Regionen der rRNA haben sich in früheren Versuchen für Hybridisierungen unzugänglich herausgestellt^[6]. Fuchs et al.^[70] haben gezeigt, daß ungefähr 1/3 von 200 untersuchten Sonden einen Fluoreszenzsignal-Intensitätswert von weniger als 20% des maximalen Signalintensitätswertes eines monomarkierten Oligonukleotides für die 16S rRNA von *Escherichia coli* haben. Die Gründe sind die dreidimensionale Struktur von Ribosomen und / oder die Interaktion zwischen rRNA – rRNA. Auch Interaktion zwischen rRNA und ribosomalen Proteinen^[17,70] können dazu führen, daß die Bindung zwischen Sonde und Hybridisierungszielstelle erschwert wird.

Manchmal besitzen solche rRNA-Regionen einen hohen Wert für den Entwurf von Sonden auf der Genus-, Spezies- oder Subspezies-Ebene^[70]. Das Problem kann in einem bestimmten Ausmaß gelöst werden, indem man unmarkierte Helfer-Oligos einsetzt^[71]. Durch die Verwendung einer unmarkierten Oligonukleotidsonde, die komplementär zur

nächsten Nachbar-Regionen der rRNA-Zielstelle ist, kann die Bindung der spezifischen Sonde zur rRNA-Zielstelle erhöht werden, ohne die Sondenspezifität zu beeinflussen.

In der Literatur sind verschiedene Methoden beschrieben worden, die die Signal-Intensitätswert der Ganz-Zelle in situ Hybridisierung erhöhen können:

- (1) Sonde mit multiplen Fluorochromen ^[4, 156],
- (2) Gleichzeitige Anwendung mehrerer Sonden ^[4, 100],
- (3) Anreicherung der Probe ^[188],
- (4) Verhinderung des Abbaus der rRNA durch Antibiotika wie z.B. Chloramphenicol ^[130],
- (5) Erhöhen der Zugängigkeit zum Hybridisierungsziel mit unmarkierten Helfer-Oligo ^[71].

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Probenanreicherung für alle drei Sonden und Helfer-Oligo für die Sonde Sal-544 erfolgreich verwendet.

6.2.4 Einflüsse der Begleitflora

Eine wichtige Rolle spielt auch die Zusammensetzung der Begleitkeimflora, da sich die Bakterien während des Wachstums in der Voranreicherungsbouillon in einer Konkurrenzsituation befinden. Gelangen nun sehr wenige subletal geschädigte Salmonellen in die Anreicherung, wenn sie durch die Begleitkeimflora im Wachstum gehemmt werden. Dies führt dazu, daß prozentual weniger Salmonellen rRNA in der Zelle zur Verfügung stehen. Diese führt zu einer Verminderung der Sensitivität des Nachweises. Wenn man in der Voranreicherungsphase direkt eine selektive Bouillon (Rappaport-Vassiliadis-Bouillon, Selenit-Cystin-Bouillon) verwendet, kann diese zwar das Wachstum von Begleitflora hemmen, aber in gewissem Ausmaß hemmt sie auch das Wachstum von *Salmonella*-Zellen. Zudem sind diese Bouillons sind nicht optimal um vorgeschädigte *Salmonella*-Zellen zu rekonstruieren, sie können die Sensitivität der FISH-Verfahren nicht deutlich erhöhen und außerdem sind sie sehr teuer. In dieser Arbeit wurde BPW deshalb weiterhin als Voranreicherungsmedium verwendet.

In Versuchen zur Bestimmung der Voranreicherungszeit wurden sterile Kindernahrung und unsterile Fleischproben, die künstlich mit Salmonellen beimpft wurden, verglichen. Es zeigte sich, dass die Sensitivität der FISH-Methode ohne Begleitflora (d. h. in der sterilen Probe), höher ist als in der unsterilen Fleischprobe.

Der Nachweis von Salmonellen aus der 2-ten Passage (24h und 48h) der Selektiv-anreicherung (Rappaport-Vassiliadis-Bouillon und Selenit-Cystin-Bouillon) von Lebensmittelsproben zeigte bei der Anwendung der FISH-Methode keine besseren Ergebnisse, obwohl das Selektivnährmedium in starkem Maße das Wachstum anderer Begleitflora hemmt und die Anzahl an Salmonellen in der Bouillon stark erhöht wird. Das kann man damit erklären, daß die Anzahl an Salmonellen keine wichtige Rolle für Sensitivität der FISH-Methode spielt. Hohe Anzahlen an *Salmonella*-Zellen können falsch-negative Ergebnisse verringern aber die Sensitivität der Methode wird dadurch nicht erhöht.

Bei der Dot-blot Hybridisierungs-Technik spielt die Anzahl der Zellen eine sehr wichtige Rolle für die Sensitivität. Hier kann man durch Extraktion von rRNA aus mehreren Zellen die Sensitivität erhöhen, auch wenn jede einzelne Zelle nur wenig rRNA enthält ^[7].

6.3.5 Bedeutung von Autofluoreszenz und von unspezifischer Bindung

Die Autofluoreszenz sowie unspezifische Bindungen beeinflussen die Sensitivität der FISH-Methode, weil sie die Fluoreszenzsignale stören können. Hohe Hintergrund-Autofluoreszenz kann durch anorganische Partikel und zerbrochene organische Substanz hervorgerufen werden^[115]. Sie kann das Auflösungsvermögen von Mikroskopen senken. Die Abb. 12a zeigt die Autofluoreszenz einer Lebensmittelprobe (Fleisch). Unterschiedliche Lebensmittel haben verschieden ausgeprägte Autofluoreszenz. Die getesteten Salatproben und Eierproben haben eine niedrigere Autofluoreszenz als Fleischproben gezeigt. Die FISH-Methode zeigt für solche Proben eine relativ höhere Sensitivität als für Fleischproben.

Die ermittelten Fluoreszenzintensitätswerte bei Hybridisierungen von Nicht-Zielorganismen waren mit den Autofluoreszenzwerten vergleichbar. Unspezifische Bindung wird durch Hybride von Sonden mit Partikeln oder Nucleinsäuren von eukaryontischen Zellen aus Lebensmittelproben begründet. Bei höheren Konzentrationen der Sonde kann die Geschwindigkeit der Hybridisierung steigen, aber gleichzeitig auch die unspezifische Bindung zunehmen^[188].

Der Fluoreszenzfarbstoff Cy3 kann das Signal-Rausch-Verhältnis des Fluoreszenz-Versuches erkennbar verbessern^[193]. So ist es möglich, bestimmte Einschränkung der FISH Methode zu überwinden, nämlich schwächere Fluoreszenzsignale bei der

Detektion von Zellen mit niedriger Menge an rRNA. Aber die Verwendung eines Leistungsfluoreszenz-Farbstoffes wird die Signale aus unspezifischen Bindungen immer erhöhen, so daß dies gelegentlich zu falsch positiven Ergebnissen führen kann.

Eine Vorhybridisierung mit 1ml 10% Skim-Milk für 45 min kann ebenfalls die Hintergrund-Autofluoreszenz vermindern (Bohnert, persönlich Mitteilung). Amann et al.^[5] zeigten, daß die Verwendung von Enzyme-markierten, rRNA-gerichteten Oligonukleotid-Sonden für Ganzzelle-Hybridisierung die Probleme der unspezifischen Bindung und nachfolgen Autofluoreszenz lösen können.

6.4 *In situ* Detektion von Salmonellen in Lebensmitteln und Vergleich mit der Kulturmethode

Salmonellen werden in fast allen Lebensmitteln nachgewiesen, sie sind aber überwiegend in tierischen Produkten, wie Geflügel und Eier, enthalten. Als Untersuchungsziel wurden unterschiedliches Fleisch, Geflügel, geflügelfleischhaltige Babynahrung, Salat und Eier bzw. Eierschalen ausgewählt.

Durch die Kombination von nicht selektive Voranreicherung (16 Std.) und der FISH-Technik konnte in der vorliegenden Arbeit eine Kontamination mit 2-5 KBE Salmonellen in 25 g Proben mit hoher Sensitivität nachgewiesen werden.

Von insgesamt 225 untersuchten Lebensmittelproben waren 25 mit Sonde Sal-1, 28 mit Sonde Sal-3 und 5 mit Sonde Sal-544 positiv mit der FISH-Methode, während die kulturelle Methode negativ war. Dieser Widerspruch kann vielleicht mit dem Vorhandensein von vorgeschädigten Bakterien oder Hemmfaktoren in den Lebensmitteln erklärt werden. Theoretisch ist die FISH-Technik ein kultur-unabhängige Verfahren. *Salmonella*-Zellen in Lebensmittelproben sind jedoch nicht gleichmäßig verteilt. Um solche Probenahmeabweichungen zu vermeiden und die Menge von rRNA in Zellen zu erhöhen, ist ein nicht selektiver Anreicherungsprozeß die geeignetste Methode. Bei der Herstellung und Lagerung von Lebensmitteln gibt es jedoch viele schädliche Faktoren, die *Salmonella*-Zellen in ihrer Kultivierbarkeit einschränken, z B Hemmstoffe, niedrige Temperatur, niedriger pH-Wert, höher Salz-Konzentration oder sogar Licht. Solche Faktoren können die Zellen in einen *viable but nonculturable state* (VBNC) versetzen^[73,95]. VBNC-Bakterien haben große Bedeutung, weil sie nicht durch kulturelle Routinen-Methode nachweisbar sind,

jedoch bleiben sie noch in niedriger metabolischer Aktivität und Virulenz bestehen^[88]. Solche VBNC-Bakterien zeigen negative Ergebnisse in kulturellen Verfahren, aber durch die FISH-Verfahren können positive Ergebnisse erzielt werden^[94,164,194]. Das heißt, die Zellen waren wahrscheinlich unkultivierbar, jedoch reichte der rRNA-Gehalt an Zelle noch aus, um mit der FISH-Methode nachgewiesen werden zu können (obwohl die *Salmonella*-Zellen vielleicht nur wenig rRNA enthielten).

Die unspezifische Bindung durch Hybride von Sonden mit Partikeln oder Nukleinsäuren von eukaryontischen Zellen aus Lebensmittelproben können manchmal auch zu falsch positiven Ergebnissen führen, aber meisten kann man solche unspezifische Bindung durch die Formen und Helligkeit von Fluoreszenzsignal nach Erfahrung unterscheiden.

Aber die Ergebnisse der FISH-Methode mit den Sonden Sal-1 und Sal-3 auch signifikant häufiger positiv als die Ergebnisse, die mit der Sonde Sal-544 erzielt werden konnten. Wie oben gesagt, ist für die Sensitivität der FISH-Methode die Stärke des Fluoreszenzsignals entscheidend. In der vorliegenden Arbeit war das Fluoreszenzsignal von Sonde Sal-544 aufgrund der schlechteren Zugänglichkeit zur Zielsregion schwächer als das der Sonden Sal-1 und Sal-3. Das heißt, die Sensitivität der Sonde Sal-544 ist niedriger als die der Sonden Sal-1 und Sonde Sal-3, bei Benutzung des gleichen Mikroskops.

Bei der Untersuchung von Lebensmittelproben gab es 2 Proben, die sowohl mit der Sonde Sal-1 und Sal-3, bzw. 3 Proben, die mit der Sonde Sal-544 ein negatives Ergebnis mit der FISH-Methode zeigten, während die Kultur positiv war. Der Grund liegt möglicherweise darin, daß zu geringe Mengen an rRNA in diesen Zellen nach der 16 Std. Voranreicherung vorhanden waren. Die Sensitivität der FISH-Methode reicht dann nicht aus, um so geringe Mengen an rRNA identifizieren zu können. Ein Pipettierfehler kann auch nicht ausgeschlossen werden.

Ein wirtschaftlich bedeutender Vorteil ist die Zeitersparnis, die man bei der Detektion von Mikroorganismen mit FISH gegenüber den kulturellen Methoden und anderen molekularbiologischen Nachweistechiken hat. Sollen Proben nur auf die Anwesenheit von Salmonellen untersucht werden, ist die FISH-Technik in Kombination mit einer Primäranreicherung am sinnvollsten. Sind genauere Subtypisierungen verlangt, besitzen

die oben erwähnten immunologischen Techniken und auf PCR basierende Nachweisverfahren einen Vorteil gegenüber der Gensondentechnik. Beim Vergleich der benötigten Arbeitszeit für die FISH-Methode und die kulturelle Methode (Tab.22) kann man eine deutliche Zeitersparnis durch die FISH-Methode bei höherer Spezifität und mindestens gleicher Sensitivität sehen.

Tab.22: Zeitvergleich der kulturellen und der FISH-Methode für eine qualitative Untersuchung (positiv oder negativ)

Methoden	Erforderlich Zeit						
	Voranreich- erung	Selektive Anreicher- ung	Fixierung	Subkultur und Isolation	Hybridisier- ung und Waschen	positives Ergebnis	negatives Ergebnis
Kultur	16-18h	24-48h	-	24-48h	-	~72h	~120h
FISH	16-18h	-	1-4h	-	1.5-12h	<24h	<24h

6.5 *In situ* Nachweisverfahren von Salmonellen im medizinischen Bereich

Das *in situ* Nachweisverfahren von Salmonellen wurde bereits im medizinischen Bereich eingesetzt^[127]. Die Vorteile sind, daß man schnell entscheiden kann, ob eine diagnostizierte Enteritis durch Salmonellen oder andere Keime hervorgerufen wurden. Da die Kenntnis der Erreger für die Wahl der geeigneten Antibiotika wichtig ist, ist eine möglichst rasche Identifizierung für den Patienten z. T. lebensnotwendig. Die beschriebene *in situ* Technik erlaubt im Vergleich zu der kulturelle Methode eine Identifizierung mit einem erheblichen Zeitvorteil (FISH dauert ohne Voranreicherung nur etwa 4 Stunden).

6.6 Zusammenfassung der Diskussion

Die FISH-Methode zum Nachweis von *Salmonella* in Lebensmittelproben wurde im Vergleich zur konventionellen kulturellen Methode unter Routine-Arbeitsbedingung durchgeführt. Die FISH-Methode hat folgende Vorteile gezeigt:

- 1) Hohe Spezifität. Die Versuche zeigten, daß die spezifischen Sonden Salmonellen gut von anderen *Enterobacteriaceae* abgrenzen.
- 2) Mindersten gleiche Sensitivität: Mit der FISH-Methode können auch noch solche Salmonellen nachweisen werden, die zwar lebend aber unkultivierbar sind. Lebende

können also unabhängig von der Wachstumsrate und metabolischen Aktivität mit der FISH-Methode identifiziert werden. Tote Zellen, die auch keine hygienische Bedeutung haben, können aufgrund ihres geringen Gehaltes an rRNA (wird nach dem Absterben schnell abgebaut) nicht nachgewiesen werden

- 3) Die physikalischen und chemischen Faktoren wie Temperatur, pH-Wert, NaCl-Konzentration usw. haben keinen großen Einfluß auf die Zuverlässigkeit der FISH-Methode.
- 4) Die Arbeitszeit zur Durchführung der FISH-Methode ist deutlich kürzer als die der kulturellen Methode. Die Zeit zur Identifizierung von *Salmonella* in Lebensmittelproben kann mit FISH innerhalb 24h erfolgen. Die Zeitersparnis hat nicht nur die wirtschaftliche Bedeutung, auch im Rahmen der amtlichen Lebensmittelüberwachung kann dieser Tatsache eine erhebliche Bedeutung zukommen.
- 5) Die Kosten für die FISH Methode sind geringer als für die kulturelle Methode.

Die Sonden, die für das Studie verwendet wurden, erlauben keine Unterscheidung auf der Ebene der Serovare, wie es für epidemiologische Fragestellungen wichtig sein kann. Für diesen Zweck muss man zur Zeit noch auf die herkömmliche Serotypisierung zurückgreifen. Für die Zukunft ist der Aufbau eines neuen Typisierungsschemas auf der Basis von rRNA Sonden vorstellbar.

7. Zusammenfassung

Salmonella spp. ist weltweit verbreitet. Salmonellose spielen im Rahmen von Humaninfektionen durch Lebensmittel die entscheidende Rolle. Der Nachweis der Salmonellen in Lebensmittelproben erfolgt zur Zeit noch durch ein material- und zeitaufwendiges kulturelles Verfahren. Eine exakte und schnelle Detektion und Identifikation der humanpathogenen Keime ist sowohl für die Lokalisierung der Infektionsquelle als auch für eine rechtzeitige Therapie der Patienten von großer Bedeutung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine schnelle und zuverlässige Methode im Vergleich zur konventionellen kulturellen Methode zum Nachweis von *Salmonella* in Lebensmitteln, basierend auf der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) entwickelt. Mit Hilfe der FISH-Technik wurden Salmonellen auf der Basis ihrer genetischen Substanz, der 23S rRNA, innerhalb kurzer Zeit (4 Stunden gegenüber 3-6 Tage mit der kulturellen Methode) aus der Voranreicherung von Lebensmittelproben nachgewiesen. Die markierten rRNA-Hybride werden über ein Fluoreszenzmikroskop-System in Form von sichtbaren Signalen nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit für FISH-Verfahren wurden drei Sonden (Sal-1, Sal-3 und Sal-544), basierend auf der Sequenzanalyse, eingesetzt. Die Untersuchungen beschäftigten sich zunächst mit der Abklärung der Spezifität der Sonden bei der *in situ* Hybridisierung aus einer Reinkultur. Die drei Sonden erwiesen sich als gattungsspezifisch und erkannten alle getesteten *Salmonella enterica* Subspezies Enterica (I), welche fast alle Stämme mit medizinischer Bedeutung enthält. Nicht *Salmonella*-Referenzstämme hybridisierten nicht mit den drei Sonden. Zur Determinierung der Sensitivität wurde in der vorliegenden Arbeit nicht direkt die Nachweisgrenze festgestellt, sondern durch unterschiedliche Versuche wurde bewiesen, daß die Sensitivität der FISH-Verfahren höher ist als die der kulturellen Methode. In den Vorversuchen wurden eine Optimierung der Hybridisierungsbedingungen und der Voranreicherungszeit durchgeführt.

Die Sensitivität der FISH-Technik ist von der Menge an rRNA in den Zellen abhängig. Um die Menge an rRNA in *Salmonella*-Zellen zu erhöhen, ist die nicht-selektive Voranreicherung ein wichtiges Verfahren.

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Sonde Sal-544 zudem zwei unmarkierte Helfer-Oligonukleotide verwendet, um die Zugänglichkeit der rRNA-Zielregion für die Sonde zu erhöhen.

Einige Faktoren (hohe Begleitflora, die Änderung von physikalischen und chemischen Faktoren), welche die Wachstumsrate von *Salmonella* Bakterien beeinflussen können, können aufgrund der Verringerung der Mengen an rRNA in den Zellen die Sensitivität beeinflussen. Die Zuverlässigkeit der FISH-Verfahren selbst wird aber nicht verringert. Mit der FISH-Verfahren konnten auch lebendige aber nicht-kultivierbare (VBNC) Salmonellen detektiert werden.

Die Anwendung der drei Sonden wurde auch für natürlich kontaminierte Lebensmittelproben erfolgreich durchgeführt. Von insgesamt 225 Proben konnten 52 positive Proben mit der Sonde Sal-1, 56 positive Proben mit der Sonde Sal-3 und 35 positive Proben mit der Sonde Sal-544 durch die FISH-Verfahren nachgewiesen werden. Mit der kulturellen Methode wurden nur 30 positive Proben nachgewiesen und bestimmt. Die FISH-Verfahren mit der Sonden Sal-1 oder Sal-3 war signifikant häufiger positiv als die kulturelle Methode, mit der Sonde Sal-544 konnte eine solche Signifikanz nicht festgestellt werden.

Beim Vergleich der Ergebnisse zwischen Voranreicherung und Selektivanreicherung zeigten sich mit der FISH-Verfahren keine statistisch signifikanten Unterschiede. Das Ergebnis ist ein Beweis dafür, daß für die FISH-Verfahren die Menge an rRNA in der Zelle und nicht die Anzahl an Salmonellen entscheidend für die Sensitivität ist.

Die FISH-Technik und die kulturelle Methode haben beide den Vorteil, daß die lebende Salmonellen nachgewiesen werden. Der Vorteil der FISH-Technik gegenüber der kulturellen Methode ist jedoch noch, daß sie einfacher, spezifischer, sensitiver und mit weniger Material- und Zeitaufwand durchgeführt werden kann.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, daß es möglich sein dürfte, eine für *Salmonella* spp (auch *Salmonella* Typhi und Paratyphi) sensitive FISH-Verfahren zu entwickeln, die aus lebensmittelhygienischer Sicht fast alle Anforderungen an ein Untersuchungsverfahren für Lebensmittelproben erfüllt. Die FISH-Verfahren ist besonders geeignet für die Anforderungen an Lebensmittelunternehmen, für die ein qualitatives Ergebnis ausreicht.

8 Literaturverzeichnis

1. **Akcan, M. (1998):** Untersuchungen zur Mikroflora von Geflügeleinstreu unterschiedlicher Beschaffenheit unter Berücksichtigung des Auftretens von Keimen der Gattung *Salmonella*. Dissertation, Tierärztlichen Hochschule Hannover
2. **Alfreider, A., Perthaler, J., Aman, R., Sattler, B., Gloeckner, F. O., Wille, A. und Psenner R. (1996):** Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake by in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2138-2144
3. **Allen, G., Bruce, V. R., Stephenson, P., Satchell, F. B. und Andrews, W. H. (1991):** Recovery of *salmonella* from high-moisture foods by abbreviated selective enrichment. *J. Food Prot.*, 54, 492-495
4. **Amann, R. I., Krumholz, L. und Stahl, D. A. (1990):** Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriology*, 172, 762-770
5. **Amann, R., Zarad, B., Stahl, D. A. und Schleifer, K-H. (1992):** Identification of individual prokaryotic cells by using enzyme-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3007-3011
6. **Amann, R., Ludwig, W und Schleifer, K.-H. (1995):** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59, 143-169
7. **Amann, R. (1995):** Fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes in the study of microbial ecology. *Molecular Ecology* 4, 543-554
8. **Amann, R. (1996):** In situ-Identifizierung von Mikroorganismen mit rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden. *Biospektrum*, 1/96 (2), 27-31
9. **Amann, R., Glöckner, F.-O. und Neef, A. (1997):** Modern methods in subsurface microbiology: in situ identification of microorganisms with nucleic acid probes *FEMS Microbiology Reviews*, 20, 191-200
10. **Andrews, W. H. (1985):** A review of culture methods and their relation to rapid methods for the detection of *Salmonella* in food. *Food Technology* 39, 77-82
11. **Anonym (1993):** International organization for standardization. microbiology-general guidance on methods for the detection of *Salmonella*. ISO 6579
12. **Brockmann, S. (2000):** Gruppenerkrankungen von *Salmonella* Enteritidis in Baden-Württemberg 1999 Prepared for publication
13. **ARB:** A software environment for sequence data on world wide web. URL: <http://www.mikro.biologie.tu-muenchen.de/pub/comp/ARB>
14. **Bager, F. und Petersen, J.(1991):** Sensitivity and specificity of different methods for the isolation of *Salmonella* from pigs. *Acta Vet Scand.* 32, 473-481.
15. **Bailey, J. S., Cox, N. A. und Blankenship, L. C. (1991):** A comparison of an enzyme immunoassay, DNA hybridization, antibody immobilization, and conventional methods for recovery of naturally occurring salmonellae from processed broiler carcasses. *J. Food Prot.* 54, 354-356
16. **Bailey, J. L. (1998):** Detection of *salmonella* cells within 24 to 26 hours in poultry samples with the polymerase chain reaction BAX-system. *J. Food Prot.* 61, 792-795

17. **Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Capel, M., Moore, P. B. und Steitz, T. A. (1999):** Placement of protein and RNA structure into 5 Å-resolution map of the 50S ribosomal subunit. *Nature* 400, 841-847
18. **Bäumler, A. J., Heffron, F. und Reissbrodt, R. (1997):** Rapid detection of *Salmonella enterica* with primers specific for *iroB*. *J. Clinical Microbiol.* 35, 1224-1230
19. **Bej, A. K. Mahbubani, M. H., Boyce, M. J. und Atlas, R. M. (1994):** Detection of salmonella spp. in oysters by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 368-373
20. **Bidnenko, E., Mercier, C., Tremblay, J., Tailliez, P. und Kulakauskas, S. (1998):** Estimation of the state of the bacterial cell wall by fluorescent in situ hybridization. *Appl. Environ. Mikrobiol.* 64, 3059-3062
21. **Binder, B. J. und Liu, Y. C. (1998):** Growth rate regulation of rRNA content of a marine synechococcus (Cyanobacterium) strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3346-3351
22. **Blackburn, C. de W. (1993):** Rapid and alternative methods for the detection of salmonellas in foods (Review). *J. Appl. Bacteriol.* 75, 199-214
23. **Blaha, T. (1993):** Epidemiologische Grundlagen der Salmonellose. *Deutsch. Geflügelwirtsch. u. Schweiprod.* 3, 7-9
24. **Blaser, M. und Newman, L. (1982):** Review of human salmonellosis: infective dose. *Rev. infect. Dis.* 4, 1096-1106
25. **Bockemühl, J. (1972):** Die Lysosensibilität von Stämmen der Salmonellen Subgenese I-IV gegenüber dem Phagen O-1. Ihre mögliche Bedeutung für die Klassifikation des Genus *Salmonella*. *Med. Mikrobiol. Immunol.* 158, 44-53
26. **Böhm, R. (1993):** Verhalten ausgewählter Salmonellen in der Umwelt. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschrift* 100, 275-278
27. **Bohnert, J., Hübner, B. und Botzenhart, K. (2000):** Rapid identification of *Enterobacteriaceae* using a novel 23S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 203, 77-82
28. **Boye, M., Jensen, K., Møller, K., Leser, T. D. und Jorsal, S. E. (1998):** Specific detection of the genus *Serpulina*, *S. hyodysenteriae* and *S. pilosicoli* in porcine intestine by fluorescent rRNA in situ hybridization. *Mol. Cell. Probes* 12, 323-330
29. **Brenner, F. W., Villr, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R. und Swaminathan, B. (2000):** *Salmonella* nomenclature. *J. Clinical Microbiol.* 38, 2465-2467
30. **Britten, R. J., Graham, D. E. und Neufeld, B. R. (1974):** Analysis of repeating DNA sequences by reassociation, 363-418. In: *Methodes Enzymol.* 29E, Academic Press Inc.
31. **Brosius, J., Dull, T. J., Sleeter, D. D. und Noller, H. F. (1981):** Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 148, 107-127
32. **Cano, R. J., Torres, M. J., Klem, R. E., Palomares, J. C. und Casadesus, J. (1992):** Detection of salmonellas by hybridization with a fluorescent alkaline phosphatase substrate. *J. Appl. Bacteriol.* 72, 393-399

-
33. CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2000): *Salmonella* surveillance report, 1999 (http://www.cdc.gov/foodnet/annual/1999/pdf/99_annual_pdf.htm)
34. Celum, C. L., Chaisson, R. E., Rutherford, G.W., Barnhart, J. L. und Echenberg, D. F. (1987): Incidence of salmonellosis in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.* 156(6), 998-1002
35. Cherry, W. B., Davis, B. R., Edwards, P. R. und Hogan, R. B. (1954): A simple procedure for the identification of the genus *Salmonella* by means of a specific bacteriophage. *J. Lab. Clin. Med.* 44, 51-55
36. Chiu, C-H. und Ou, J. T. (1996): Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. *J. Clinical Microbiol.* 34, 2619-2622
37. Christensen, H., Nordentoft, S. und Olsen, J. E. (1998): Phylogenetic relationships of *Salmonella* based on rRNA sequence. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48, 605-610
38. Christensen, H., Hansen, M. und Sorensen, J. (1999): Counting and size classification of active soil bacteria by fluorescence in situ hybridization with an rRNA oligonucleotide probe, *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1753-1761
39. Cloak, O. M., Duffy, G., Sheridan, J. J., McDowell, D. A. und Blair, I. S. (1999): Development of a surface adhesion immunofluorescent technique for the rapid detection of *Salmonella* spp. from meat and poultry. *J. Appl. Microbiol.* 86, 583-590
40. Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C. und Comi, G. (1998): Use of polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis to directly detect and identify *Salmonella typhimurium* in food. *J. Appl. Microbiol.* 85, 637-677
41. Cohen, H. J., Mechanda, S. M. und Lin, W. (1996): PCR amplification of *fimA* gene sequence of *Salmonella typhimurium*, a specific method for detection of *Salmonella* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4303-4308
42. Cooke, V. M., Miles, R. J., Price, R. G. und Richardson, A. C. (1999): A novel chromogenic ester agar medium for detection of salmonellae. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 807-812
43. Cottrell, M. T. und Kirchman, D. L. (2000): Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5116-5122
44. Crosa, J. H., Brenner, D. J., Ewing, W. H. und Falkow, S. (1973): Molecular relationships among the salmonellae. *J. Bacteriol.* 115, 307-315
45. Curiale, M. S., Mciver, D., Weathersby, S. und Planer, C. (1990): Detection of salmonellae and other *Enterobacteriaceae* by commercial deoxyribonucleic acid hybridization and enzyme immunoassay kits. *J. Food Prot.* 53, 1037-1046
46. Dahlen, P. (1987): Detection of biotinylated DNA probes by using Eu-labeled streptavidin and time-resolved fluorometry. *Anal. Biochemistry* 164, 78-83
47. Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K.-H. und Wagner, M. (1999): The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *System. Appl. Microbiol.*, 22, 434-444

-
48. **D' Aoust, J-Y (1981)**: Update on pre-enrichment and selective enrichment conditions for detection of *Salmonella* in foods. *J. Food Prot.* 44, 369-374
49. **D' Aoust, J-Y. (1985)**: Infective dose of *Salmonella Typhimurium* in cheddar cheese. *Am. J. Epidemiol.* 122, 717-720
50. **Dedié, K., Bockemühl, J., Kühn, H., Volkmer, K-J. und Weinke, T. (1993)**: Bakterielle Zoonosen bei Tier und Mensch. Verlag Enke, Stuttgart, 295-329
51. **Deere, D., Vesey, G., Milner, M., Williams, K., Ashbolt, N. und Veal, D (1998)**: Rapid method for fluorescent in situ ribosomal RNA labelling of *Cryptosporidium parvum*. *J. Appl. Mikrobiol.* 85, 807-818
52. **DeLong, E. F., Wickham, G. S. und Pace, N. R. (1989)**: Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cell. *Science* 243, 1360-1363
53. **DeLong, E. F., Taylor, L. T., Marsh, T. L. und Preston, C. M. (1999)**: Visualization and enumeration of marine planktonic archaea and bacteria by using polyribonucleotide probes and fluorescent in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5554-5563
54. **Dove, W. F., und Davidson, N. (1962)**: Cation effects on the denaturation of DNA. *J. Mol. Biol.* 5, 467-478
55. **Eckner, K. F., Flowers, R. S., Robison, B. J., Mattingly, J. A., Gabis, D. A. und Silliker, J. H (1987)**: Comparison of Bio-EnzaBeadTM immunoassay method and conventional cultural procedure for detection of *Salmonella* in foods. *J. Food Prot.* 50, 379-385
56. **Emswiler-Rose, B., Bennett, B. und Okrend, A. (1987)**: Comparison of cultural methods and the DNA hybridization test for detection of salmonellae in ground beef. *J. Food Sci.* 52, 1726-1727
57. **Entis, P. Brodsky, M. H., Sharpe, A. N. und Jarvis, G. A. (1982)**: Rapid detection of *salmonella* spp. in food by use of the ISO-GRID hydrophobic grid membrane filter. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 261-268
58. **Erhart, R., Bradford, D., Seviour, E. M., Seviour, R. J., Amann, R., Blackall, L. L. (1997)**: Development and use of fluorescent *in situ* hybridization probes for the identification and enumeration of „*microthrix parvicella*“ in activated sludge. *Syst. Appl. Microbiol.* 20, 310-318
59. **Erol, I., Kleer, J., Hildebrandt, G. und Yurtyeri, A. (1999)**: Kopplung von immunomagnetischer Separation und Polymerase-Kettenreaktion zum Schnellnachweis von Salmonellen in Hackfleisch und Geflügelinnereien. *Berl. Münch. tierärztl. Wochenschr.* 112, 100-103
60. **Fenchel, T. und Ramsing, N. B. (1992)**: Identification of sulphate-reducing ectosymbiotic bacteria from anaerobic ciliates using 16S rRNA binding oligonucleotide probes. *Arch. Microbiol.* 158, 394-397
61. **Fey, H., Bürgi, E., Margadant, A. und Boller, E. (1978)**: An economic and rapid diagnostic procedure for the detection of *Salmonella/Shigella* using the polyvalent *salmonella* phage O-1. *Zbl. Bakt. Hyg. I Orig. A* 240, 7-15

-
62. **Fitts, R., Diamond, M., hamilton, C. und Neri, M. (1983):** DNA-DNA hybridization assay for detection of *salmonella* spp. In foods. Appl. Environ. Microbiol. 46, 1146-1151
63. **Fitts, R. (1985):** Development of a DNA-DNA hybridization test for the presence of *Salmonella* in food. Food Technology 39, 95-102
64. **Flowers, R. S., Chen, K. H., Robison, B. J., Mattingly, J. A., Gabis, D. A. und Sillker, J. H. (1987_a):** Comparison of *Salmonella* Bio-EnzaBead™ immunoassay method and conventional culture procedure for detection of *Salmonella* in crustaceans. J. Food Prot. 50, 386-389
65. **Flowers, R. S., Mozola, M. A., Curiale, M. S., Gabis, D. A. und Sillker, J. H. (1987_b):** Comparative study of a DNA hybridization method and the conventional culture procedure for detection of *Salmonella* in foods. J. Food Prot. 52, 781-785
66. **Fluit, A. C., Widjojoatmodjo, M. N., Box, A. T. A., Torensma, R. und Verhoef, J. (1993):** Rapid detection of salmonellae in poultry with the magnetic immunopolymerase chain reaction assay. Appl. Environ. Microbiol. 59, 1342-1346
67. **Fox, G. E., Wisotzkkey, J. D. und Jurtshuk, P. (1992):** How close ist close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. Int. J. Syst. Bacteriol. 42, 166-170
68. **Frischer, M. E., Floriani, P. J. und Nierzwicki-Bauer, S. A. (1996):** Differential snesitivity of 16S rRNA targeted oligonucleotide probes used for fluorecence in situ hybridization is a result of ribosomal higher order structure. Can. J. Microbiol., 42, 1061-1071
69. **Franks, A. H., Harmsen, H. J. M., Raangs, G. C., Jansen, G. J., Schut, F., und Welling, G. W. (1998):** Variation of bacterial populations in human feces measured by fluorecent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-trageted oligonucleotide Probes. Appl. and Environ. Microbiol., 64, 3336-3345
70. **Fuchs, B. M., Wallner, G., Beisker, W., Schwippl, I., Ludwig, W. und Amann, R. (1998):** Flow cytometric analysis of the in situ accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorecently labeled oligonucleotide probes. Appl. and Environ. Microbiol. 64, 4973-4982
71. **Fuchs, B. M., Glöchner, F. O., Wulf, J. und Amann, R. (2000):** Unlabeled helper oligonucleotides increase the in situ accessibility to 16S rRNA of fluorecently labeled oligonucleotide probes. Appl. Environ. Microbiol. , 66, 3603-3607
72. **Gall, J. G.und Pardue, M. L. (1969):** Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 378-383
73. **Gauthier, M. J. (2000):** Enviromental parameters associated with the viable but nonculturable State, 87-112. In: Colwell, R. R., Grimes, D. J.: Nonculturable Microorganisms in the Environment. ASM Press, Washington, DC.
74. **Georgala, D. L. und Boothroyd, M. (1964):** A rapid immunofluorescence technique for detecting salmonellae in raw meat. J. Hygiene, Cambridge 62, 319-327
75. **Gerigk, K. (1994):** Epidemiologische Aspekte der Salmonellose in Europa und in der Schweiz. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 85, 163-172

-
76. **Giovannoni, S. J., Delong, E. F., Olsen, G. J. und Pace, N. R. (1988):** Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.* 170: 720-726
77. **Glöckner, F. O., Amann, R., Alfreider, A., Pernthaler, J., Psenner, R., Trebesius, K. und Schleifer, K.-H. (1996):** An in situ hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.*, 19, 403-406
78. **Glöckner, F. O., Fuchs, B. M. und Amann, R. (1999):** Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 65, 3721-3726
79. **Grimm, D., Merkert, H., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Hacker, J. und Brand, B. C. (1998):** Specific detection of *Legionella pneumophila*: construction of a new 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *Appl. and Environ. Microbiol.* 64, 2686-2690
80. **Groisman, E. A. und Ochman, H. (1997):** How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol* 5, 343-349
81. **Grossklaus, D., Kolb, G. H. und Zastrow, K.-D. (1991):** Zur weltweiten Zunahme von Enteritis infectiosa-Fällen: Kritische Anmerkungen. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 42, 137-140
82. **Grunstein, M. und Hogness, D. S. (1975):** Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 3961-3965
83. **Hanai, K., Satake, M., Nakanishi, H. und Vankateswaran, K. (1997):** Comparison of commercially available kits with standard methods for detection of *Salmonella* strains in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 775-778
84. **Hartung, M (2000):** Vorkommen von Zoonosenerregern in Lebensmitteln: Mitteilungen der Länder über 1999. *Bundesgesundheitsbl.* 43, 1011-1014
85. **Head, I. M., Saunders, J. R. und Pickup, R. W. (1998):** Microbial, evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology*, 35, 1-21
86. **Helmuth, R. (1993):** Molekularbiologische Grundlagen der Virulenz von Salmonellen und daraus resultierende neuere Nachweisverfahren. *Dtsch. tierärztl. Wochenschrift* 100, 252-255
87. **Hingst, H. V. (1993):** Das Salmonellen-Problem aus medizinischer Sicht-Ursachen und Maßnahmen. *DGS.* 30, 12-13
88. **Hwang, M. Y. (1999):** Protect against *Salmonella*. *JAMA*, 128, 1866
89. **Huq, A., Rivera, I. N. und Colwell, R. R. (2000):** Epidemiological significance of viable but nonculturable mikroorganisms, 301-324. In: Colwell, R. R., Grimes, D. J.: *Nonculturable Microorganisms in the Environment*. ASM Press, Washington, DC.
90. **Ibrahim, G. F., Lyons, M. J., Walker, R. A. und Fleet, G. H. (1986):** Rapid detection of salmonellae in foods using immunoassay systems. *J. Food Prot.* 49, 92-98
91. **John, H., Birnstiel, M. und Jones, K. (1969):** RNA:DNA hybrids at the cytogenetical level. *Nature* 223, 582 - 587.

-
92. **Johnson, J. L. (1985):** DNA reassociation and DNA hybridization of bacterial nucleic acids. 33-74, In: Methods in Microbiology, Academic Press London
93. **Kafatos, F. C., Jones, C. W. und Efstradiatis, A. (1979):** Determination of nucleic acid sequences homologies and relative concentrations by a dot blot hybridization procedure. Nucl. Acid res. 7, 1541-1552
94. **Karner, M. und Fuhrman, J. A. (1997):** Determination of active marine bacterioplankton: a comparison of universal 16S rRNA probes, autoradiography, and nucleoid staining. Appl. Environ. Microbiol. 63, 1208-1213
95. **Krämer, J (1997):** Lebensmittelvergiftungen: *Salmonella*, 5-35. In: Krämer, J (eds): Lebensmittel-Mikrobiologie, 3 Auflage, Verlag Eugen Ulmer Stuttgart
96. **Krimmer, V., Merkert, H., Von Eiff, C., Frosch, M., Eulert, J., Löhr, J. F., Hacker, J. und Ziebuhr, W. (1999):** Detection of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in clinical samples by 16S rRNA-directed in situ hybridization. J. of Clin. Microbiol. 37, 2667-2673
97. **Krüger, G. (1989):** Der gegenwärtige Trend in der Entwicklung von Salmonella-Nachweisverfahren. Z. Gesamt Hyg. 35, 683-685
98. **Kühn, H., Rabsch, W., Gericke, B. und Reissbrodt, R. (1993):** Infektionsepidemiologische Analysen von Salmonellosen, Shigellosen und anderen Enterobacteriaceae-Infektionen. Bundesgesundhbl. 8: 324-333
99. **Kühn, H. (1995):** Vorkommen und epidemische Vorbereitung. In: Kühn, H., Tschäpe, H.: Salmonellose des Menschen - Epidemiologische und ätiologische Aspekte. Robert Koch Institut Schriften, 3/95: 19-35
100. **Lee, S., und Kemp, P. F. (1994):** Singel-cell rRNA content of natural marine planktonic bacteria measured by hybridization with multiple 16S rRNA-targeted fluorescent probes. Limnol. Oceanogr. 39, 869-879
101. **Leffers, H., Kjems, J., Ostergaard, L., Larsen, N. und Garrett, R. A. (1987):** Evolutionary relationships amongst *Archaeobacteria*. a comparative study of 23S ribosomal RNAs of a sulphur-dependent extreme thermophile, an extreme halophile and a thermophilic methanogen. J. Mol. Biol. 195, 43-61
102. **Leitch, A. R., Schwarzacher, T., Jackson, D. und Leitch, I. J. (1994):** *In situ*-Hybridisierung, 13-15. Spektrum Akademischer Verlag Heidelber. Belin. Oxford,
103. **Le Minor, L. und Popoff, M. Y. (1987):** Designation of *Salmonella enterica* sp. Nov. Nom. Rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. Int. J. Syst. Bact. 37, 465-468
104. **Le Minor, L. (1992):** The Genus *Salmonella*. In: Balows, A. : The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications, Springer Verlag, New York
105. **Licht, T. R., Krogfelt, K. A., Cohen, P. S., Poulsen, L. K., Urbance, J. und Molin, S. (1996):** Role of lipopolysaccharide in colonization of the mouse intestine by *Salmonella typhimurium* studied by in situ hybridization. Infection and Immunity, 64, 3811-3817

-
106. **Lin, C.-K. und Tsen, H.-Y. (1995):** Development and evaluation of two novel oligonucleotide probes based on 16S rRNA sequence for the identification of *Salmonella* in foods. *J. Appl. Bacteriology*, 78, 507-520
107. **Lin, J-S und Tsen, H-Y (1999):** Development und use of polymerase chain reaction for the specific detection of *Salmonella typhimurium* in stool and food samples. *J. Food Prot.* 62, 1103-1110
108. **Lindquist, H. D. A. (1997):** Probes for the spezific detection of *Cryptosporidium parvum*, *Wat. Res.* 31, 2668-2671
109. **Lischewski, A., Kretschmar, M., Hof, H., Amann, R. Hacker, J. und Morschhäuser, J. (1997):** Detection and identification of *Candida* species in experimentally infected tissue and human blood by rRNA specific fluorescent in situ hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2943-2948
110. **Llobet-Brossa, E., Rossello-Mora, R. und Amann, R. (1998):** Microbial community composition of wadden sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2691-2696
111. **Lonvaud-Funel, A., Gulloux, Y. und Joyeux, A. (1993):** Isolation of a DNA probe for identification of glucan-producing pediococcus damnosus in wines. *J. Appl. Bacteriol.* 74, 41-47
112. **Ludwig, W. und Schleifer, K.-H. (1994):** Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Reviews*, 15, 155-173
113. **Mansfield, L. P. und Forsythe, S. J. (1993):** Immunomagnetic separation as an alternative to enrichment broth for *Salmonella* detection. *Lett. Appl. Microbiol.* 16, 122-125
114. **Manz, W., Amann, R., Ludwig, W. und Wagner, M. (1992):** Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *System. Appl. Microbiol.*, 15, 593-600
115. **Manz, W., Wendt-Potthoff, K., Neu, T. R., Szewzyk, U. und Lawrence, J. R. (1999):** Phylogenetic composition, spatial structure, and dynamics of lotic bacterial biofilms investigated by fluorescent in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *Microb. Ecol.*, 37, 225-237
116. **Marmur, J. und Lane, D. (1960):** Strand separation and specific recombination in deoxyribonucleic acids: biological studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 46, 453-461
117. **Mattingly, J. A. und Gehle, W. D. (1984):** An improved enzyme immunoassay for the detection of *Salmonella*. *J. Food Sci.* 49, 807-809
118. **Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M. und Tauxe, R. V. (2000):** Food-related illness and death in the united states. *Emerging Infect. Dis.* 5(5), 1-37
119. **Meyer, H. (1999):** Animals as sources of infections in humans salmonellosis *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 106, 344-51
120. **Miller, S. I. und Pegues, D. A. (2000):** *Salmonella* species, including *salmonella typhi*. In: Gerald, L et al (eds): *Principles and Practice of Infecions Diseases* (Fifth Edition, Volumen 2) Charchill Livingstone Verlag,

-
121. **Mistele, K. (1992):** Untersuchung über die Verwendung der DNA-DNA Hybridisierungstechnik zum schnellen Nachweis von *Bacillus anthracis*. Vet. Med. Diss. Gießen
122. **Murray, R. G. E., Brenner, D. J. und Colwell, R. R. (1990):** International committee on systematic bacteriology. report of the ad hoc committee on approaches to taxonomy within the proteobacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 40, 213-215
123. **Muschkmitz, C. (1998):** Impedimetrische Bestimmung von Generationszeiten bei Stämmen lebensmittelhygienische relevanter Enterobacteriaceaespezies und – genera. Doktorarbeit. Institut für Lebensmittelhygiene der Fachbereiches Veterinärmedizin der Humboldt-Universität zu Berlin
124. **Neef, A., Amann, R. und Schleifer, K.-H. (1995):** Detection of microbial cells in aerosols using nucleic acid probes. System. Appl. Microbiol., 18, 113-122
125. **Ng, S. P. Tsui, C. O. Roberts, D., Chau, P. Y. und Ng, M. H. (1996):** Detection and serogroup differentiation of *Salmonella* spp. in food within 30 hours by enrichment-immunoassay with a T6 monoclonal antibody capture enzyme-linked immunoabsorbent assay. Appl. Environ. Microbiol. 62, 2294-2302
126. **Noller, H. F. und Nomura, M. (1996):** Ribosomes. In: Neidhardt, F. C. et al, (eds): *Escherichia Coli* and *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* and *Salmonella*-cellular and molecular biology (2nd), ASM Press. 167-186
127. **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. Clinical Microbiol., 35, 2642-2648
128. **Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Pace, N. R. und Stahl, D. A. (1986):** Mikrobial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. Annu. Rev. Microbiol. 40, 337-365
129. **Olsen, J. E., Aabo, S., Rasmussen, O. F. und Rossen, L. (1995):** Oligonucleotide probes specific for the genus *Salmonella* and for *Salm. Typhimurium*. Lett. Appl. Microbiol. 20, 160-163
130. **Ouverney, C. C. und Fuhrman, J. A. (1997):** Increase in fluorescence intensity of 16S rRNA in situ hybridization in natural sample treated with chloramphenicol. Appl. Environ. Microbiol. 63, 2735-2740
131. **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.
132. **Peplow, M. O., Correa-Prisant, M., Stebbins, M. E., Jones, F. und Davies, P. (1999):** Sensitivity, specificity, and predictive values of three *Salmonella* rapid detection kits using fresh and frozen poultry environmental samples versus those of standard plating. Appl. Environ. Microbiol. 65, 1055-60
133. **Pietzsch, O. (1981):** *Salmonella* . in: Blobel, H., und. Schlisser, T. (Hrsg.) Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren (Bd. III) Fischer Verlag, Jena
134. **Pignato, S., Marino, A. M., Emanuele, M. C., Iannotta, V., Caracappa, S. und Giammaanco, G. (1995):** Evaluation of new culture media for rapid detection and isolation of salmonellae in foods. Appl. Environ. Microbiol. 61, 1996-1999

135. **Pöhn, H.-P. (1983):** Salmonellose in der Bundesrepublik Deutschland. Ergebnisse des Zentralen Überwachungsprogrammes . Bundesgesundheitsbl. 26, 326-329
136. **Poisson, D. M. (1992) :** Novobiocin, brilliant green, glycerol, lactose agar: a new medium for the isolation of *Salmonella* strains. Res. Microbiol. 143, 211-216
137. **Popoff, M. Y., Bockemühl, J. und Brenner, F .W. (2000):** Supplement 1998(no.42) to the kauffmann-white scheme. Res. Microbiol. 151, 63-65
138. **Poulsen, L. K., Ballard, G., und Stahl, D. A. (1993):** Use of rRNA fluorescence in situ hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 59, 1354-1360
139. **Poulsen, L. K., Lan, F., Kristensen, C. S., Hobolth, P., Molin, S. und Kroghelt, K. A. (1994):** Spatial distribution of *Escherichia coli* in the mouse large intestine inferred from rRNA in situ hybridization. Infect. Immunity, 62, 5191-5194
140. **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
141. **Ramsing, N. B., Kühl, M. und Jorgensen, B. B. (1993):** Distribution of sulfate-reducing bacteria, O₂ and H₂S in photosynthetic biofilms determined by oligonucleotide probes and microelectrodes . Appl. Environ. Microbiol. 59, 3840-3849
142. **Ranki, M., Palva, A., Virtanen, M., Laaksonen, M und Söderlung, H. (1983):** Sandwich hybridization as a convenient method for the detection of nucleic acids in crude samples. Gen 21, 77-85
143. **Rasch, G. und Schrader, C. (1998):** Infektion mit Zoonosenerregern beim Menschen, 5-9. In: Deutscher Trendbericht über den Verlauf und die Quellen von Zoonosen-Infektionen nach der Zoonosen-RL (92/117/EWG) für 1997. 2 Aufl.
144. **Reissbrodt, R. (1996):** Alternative Methode der Isolierung und Identifizierung von Salmonellen, 105-117. In: Kühn, H. und Tschäpe, H.: Salmonellosen des Menschen- Epidemiologische und ätiologische Aspekte, RKI(3/95), MMV Medizin Verlag GmbH München.
145. **Robert Koch Institut (Aufgabe 23/2000):** Epidemiologisches Bulletin: Wichtige Infektionskrankheiten in Deutschland Jahrsbericht 1999- Teil 1: Darminfektionen
146. **Robert Koch Institut (Aufgabe 22/2001):** Epidemiologisches Bulletin: Jahrestatistik 2000: Enteritis infectosa nach wichtigen Erregern.
147. **Rodrigue, D. C., Tauxe, R.V. und Rowe, B.(1990):** International increase in *Salmonella* enteritidis: a new pandemic? Epidemiol. Infect. 105, 21-27
148. **Rolle, M. und Mayr, A. (1993):** Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre für Tierärzte, Biologen, Agrarwissenschaftler und Interessierte aus benachbarten Fachgebieten. 6 Aufl., Verlag Enke, Stuttgart, 596-628
149. **Rönner, S. G. E. und Stackebrandt, E. (1994):** Development of 23S rRNA oligonucleotide probes for the identification of *Salmonella* species. Syst. Appl. Microbiol., 17, 257-264

-
150. **Rose, B. E., Liabres, C. M. und Bennett, B. (1991):** Evaluation of a colorimetric DNA hybridization test for detection of salmonellae in meat and poultry products. *J. Food prot.* 54, 127-130
151. **Roszak, D. B., Grimes, D. J. und Colwell, R. R. (1984):** Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Can. J. Microbiol.* 30, 334-338
152. **Rüssmann, H., Kempf, V. A. J., Koletzko, S., Heesemann, J. und Autenrieth, I, B. (2001):** Comparison of fluorescent in situ hybridization and conventional culturing for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. *J. Clinical Microbiol.* 39, 304-308
153. **Sachs, L.(1999):** Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden (Neunte, überarbeitete Auflage). 467-473. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
154. **Santegoeds, C. M., Ferdelman, T. G., Muyzer, G. und De Beer, D. (1998):** Structural and functional dynamics of sulfate-reducing populations in bacterial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3731-3739
155. **Scholl, D. R., Kaufmann, C., Jollick, J. D., York, C. K., Goodrum, G. R. und Charache, P. (1990):** Clinical application of novel sample processing technology for the identification of salmonellae by using DNA probes. *J. Clini. Mikrobiol.* 28, 237-241
156. **Schönhuber, W., Zarda, B., Eix, S., Rippka, R., Herdman, M., Ludwig, W. und Amann, R. (1999):** In situ identification of cyanobacteria with horseradish peroxidase-labeled, rRNA-trageted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1259-1267
157. **Schramm, A., Larsen, L. H., Revsbech, N. P., Ramsing, N. B., Amann, R. und Schleifer, K. H. (1996):** Structure and function of a nitrifying biofilm as detemined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4641-4647
158. **Schramm, A., De Beer, D., Wagner, M. und Amann, R. (1998):** Identification and activities in situ of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. as dominant populatons in a nitrifying fluidized bed reactor. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3480-3485
159. **Selbitz, H-J. (1989):** Entwicklung, Stand und Tendenzen der taxonomie der Gattung *Salmonella*. *Z. gesamte Hyg.* 35(11), 679-681
160. **Selbitz, H-J. (1992):** Lehrbuch der veterinärmedizinischen Bakteriologie. 91-108. Fischer Verlag, Jena, Stuttgart,
161. **Selbitz, H-J., Sinell, H-J., Sziegleit, A. und Kleer, J (1995):** Das Salmonellen-Problem: Salmonellen als Erreger von Tierseuchen und Zoonosen. 13-183. Fischer Verlag, Hena, Stuttgart,
162. **Simon, N., Lebot, N., Marie, D., Partensky, F. und Vaultot, D. (1995):** Fluorecent in situ hybridization with rRNA-tageted oligonucleotide probes to identify small phytoplankton by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2506-2513
163. **Snaidr, J., Amann, R., Huber, I., Ludwig, W. und Schleifer, K.-H. (1997):** Phylohenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 2884-2896

-
164. **Soumet, C. Ermel, G., Fach, P und Colin, P. (1994):** Evaluation of different DNA extraction procedures for the detection of *Salmonella* from chicken products by polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 19, 294-298
165. **Southern, E. M. (1975):** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517
166. **Spring, S., Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K-H. und Peterson, N. (1992):** Phylogenetic diversity and identification of nonculturable magnetotactic bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 116-122
167. **St. Clair, V. J. und Klenk, M. M. (1990) :** Performance of three methods for the rapid identification of *Salmonella* in naturally contaminated foods and feeds. *J. Food Prot.* 53, 961-964
168. **Steffan, R. J. und Atlas, R. M. (1991):** Polymerase chain reaction: applications in environmental microbiology. *Annu. Rev. Microbiol.* 45, 137-161
169. **Stender, H., Lund, K., Petersen, K. H., Rasmussen, O. F., Hongmanee, P., Mjørner, H. und Godtfredsen, S. E. (1999):** Fluorescence in situ hybridization assay using peptide nucleic acid probes for differentiation between tuberculous and nontuberculous *mycobacterium* species in smears of mycobacterium cultures. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 2760-2765
170. **Stellmacher, W. und Schöll, W. (1987):** *Salmonella*-Infektionen. In: Beer, J (Hrsg.): *Infektionskrankheiten der Haustiere*. 3 Aufl. VEB Fischer Verlag, Jena, Teil II: 515-544
171. **Swaninathan, B. und Ayres, J. C. (1980):** A direct immunoenzyme method for the detection of salmonellae in food. *J. Food Sci.* 45, 352-355
172. **Syvänen, A-C.(1986):** Nucleic acid hybridization from research tool to routine diagnostic method. *Medical Biology* 64, 313-324
173. **Tauxe, R. V. (1991):** *Salmonella*: a postmodern pathogen. *J. Food Protect* 54, 563-568
174. **Tauxe, R. T. und Pavia, A. T. (1998):** Salmonellosis: nontyphoidal. In: Evans, A. S. und Brachman, P. S.(Eds): *Bacterial infections of humans: epidemiology and control* (Third edition), Plenum medical book company-New York and London, 613-630
175. **Thiele, D. (1990) :** The technique of polymerase chain reaction - a new diagnostic tool in microbiology and other scientific fields (review). *Zentralbl. Bakteriol.* 273, 431-454
176. **Todd, L. S., Roberts, D., Bartholomew, B. A. und Gilbert, R. J. (1987):** Assesment of enzyme immunoassay for the detection of salmonellas in foods and animal feeding stuffs. *Epidem. Infect.* 98, 301-310
177. **Tolker-Nielsen, T., Larsen, M. H., Kyed, H. und Molin, S. (1997):** Effect of stress treatments on the detection of *Salmonella typhimurium* by in situ hybridization. *Int. J. Food Mikrobiol.* 35, 251-258
178. **Trebesius, K., Harmsen, D., Rankin, A., Schmelz, J. und Heesemann, J. (1998):** Development of rRNA-trageted PCR and in situ hybridization with fluorescently labelled oligonucleotides for detection of *Yersinia* Species. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2557-2564

-
179. **Trbesius, K., Adler, K., Vieth, M., Stolte, M. und Haas, R. (2001):** Spezific detection and prevalence of *Helicobacter heilmannii* like organisms in the human gastric mucosa by fluorescent in situ hybridization and partial 16S ribosomal DNA sequencing. *J. Clinical Microbiol.* 39, 1510-1516
180. **Tschäpe, H., und Kühn, H. (1995):** Einleitung. In: Kühn, H., Tschäpe, H.: *Salmonellen des Menschen - Epidemiologische und ätiologische Aspekte.* Robert Koch Institut Schriften, 3/95: 5-18
181. **Tsen, H-Y, Wang, S-J, Roe, B. A. und Green, S. S (1991):** DNA sequence of a *Salmonella*-specific DNA fragment and the use of oligonucleotide probes for *Salmonella* detection. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35, 339-347
182. **Turpin, P. E., Maycroft, K. A., Rowlands, C. L. und Wellington, E. M. (1993):** Viable but non-culturable salmonellas in soil. *J. Appl. Bacteriol.* 74, 421-427
183. **Ullmann, U. (1994):** Die Gattung *Salmonella* und *Shigella*; Typhus, Paratyphus, Enteritis und Ruhr. In: Brandis, H., Köhler, W., Eggers, H. J. und Pulverer, G.: *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*; 7 Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. Jene. New York
184. **Uzzau, S., Brown, D. J., Wallis, T., Rubino, S., Leori, G., Bernard, S., Casadesus, J., Platt, D. J. und Olsen, J. E. (2000):** Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epid. Infect.* 125, 229-255
185. **Van der Zee, H. (1994):** Conventional methods for the detection and isolation of *Salmonella enteritidis*. *Int J Food Microbiol.* 21, 41-6
186. **Viscidi, R. P. und Yolken, R. G. (1987):** Molecular diagnosis of infectious diseases by nucleic acid hybridization (Review). *Mol. Cell. Probes* 1, 3-14
187. **Waage, A. S., Vardund, T., Lund, V. und Kapperud, G. (1999):** Detection of low numbers of *Salmonella* in environmental water, sewage and food samples by a nested polymerase chain reaction assay. *J. Appl. Microbiol.* 87, 418-428
188. **Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H. und Schleifer, K-H (1993):** Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Mikrobiol.* 59, 1520-1525
189. **Wagner, M., Assmus, B., Hartmann, A., Hutzler, P. und Amann, R. (1994):** In situ analysis of microbial consortia in activated sludge using fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal scanning laser microscopy. *J. Microsc.* 176, 181-187
190. **Wallner, G., Amann, R. und Beisker, W. (1993):** Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* 14, 136-143
191. **Weiss, P., Schweitzer, B. Aman, R. und Simon, M. (1996):** Identification in situ and dynamics of bacteria on limnetic organic aggregates (lake snow). *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1998-2005
192. **Welkos, S., Schreiber, M. und Baer, H. (1974):** Identification of *Salmonella* with the O-1 bacteriophage. *Appl. Microbiol.* 28, 618-622

-
193. **Wessendorf, M. W. und Brelje, T. C. (1992):** Which fluorophore ist brightest? a comparison of the staining obtained using fluorescein, tetramethylrhodamine, lissamine rhodamine, Texas Red. and cyanine. *Histochemistry* 98, 81-85
194. **Wetmur, J. G. (1975):** Acceleration of DNA renaturation rates. *Biopolymers* 14, 2517-2524
195. **WHO:** Foodborne infections and intoxications in europe. Fifth Report 1985-1989
196. **Widojoatmodjo, M. N., Fluit, A. C., Torensma, R., Verdonk, G. P. H. T. und Verhoef, J. (1992):** The magnetic immuno polymerase chain reaction assay for direct detection of salmonellae in fecal samples. *J. Clin. Microbiol.* 30, 3195-3199
197. **Wieler, L. H. und Bauerfeind, R. (1999):** *Salmonella*-Infektionen beim Tier und deren Bedeutung für die Human- und Tiergesundheit. Vet.Med.Labor-Fortbildungsveranstaltung „Zoonosen“
198. **Wilkinson, D. G. (1998):** The theory and practice of *in situ* hybridization, 1-22. In: Wilkinson, D. G.: *In situ* hybridization - a practical approach. Oxford University Press.
199. **Willams, S. C., Hong, Y., Danavall, D. C. A., Howard-Jones, M. H., Gibson, D., Frischer, M. E. und Verity, P. G. (1998):** Distinguishing between living and nonliving bacteria: evaluation of the vital stain propidium iodide and ist combined use with molecular probes in aquatic samples. *J. Microbiol. Methods*, 32, 225-236
200. **Wilson, S. G., Chan, S., Deroo, M. Vera, Garcia, M., Johnson, A. Lane, D. und Halbert, D. H. (1990):** Development of a colorimetric, second generation nucleic acid hybridization method for detection of *salmonella* in foods and a comparison with conventional culture procedure. *J. Food Sci.* 55, 1394-1398
201. **Woese, C. R., Gibson, J. und Fox, G. E. (1980):** Do genealogical patterns in purple photosynthetic bacteria reflect interspecific gene transfer? *Nature* 283, 212-214
202. **Woese, C. R. (1987):** Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221-271
203. **Wray, C. und Davies, R. H. (1994):** World health organization: Guidelines on detection and monitoring of *Salmonella* infected poultry flocks with particular reference to *Salmonella enteritidis*. Report of a WHO consultation on strategies for detection and monitoring of *Salmonella* infected poultry flocks. graz, Austria, WHO/Zoon. /94.173, 11-15
204. **WWW(2000):** [http:// www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonell_g.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonell_g.htm)
205. **Zastrow, K.-D und Schöneberg, I. (1994):** Lebensmittelbedingte Infektionen und Intoxikationen in der Bundesrepublik Deutschland - Ausbrüche 1992. *Bundesgesundheitsbl.* 37, 247-251

9 Anhang

9.1 Tab.25: Die Ergebnisse der kulturellen Methode für Lebensmittelproben.

Anzahl	LaborNr.	S.I		R.I		S.II		R.II		Diagnose	Produkt und PackungsNr.	Zustand
		Leifs.	Ramb	Leifs.	Ramb	Leifs.	Ramb	Leifs.	Ramb			
1.	11	0	0	0	0	1	0	0	0		Hähnchensch.(1)	tiefgek.
2.	12	0	0	2	1	0	0	2	1	S. Typhimurium	Hähnchensch.(1)	tiefgek.
3.	13	1	1	1	1	0	0	1	1		Hühnerklein(2)	tiefgek.
4.	14	1	1	1	1	1	1	1	1		Hühnerklein(2)	tiefgek.
5.	15	1	1	0	0	0	1	0	1		Hähnchenuntersch.(3)	gekühlt
6.	16	0	0	0	0	1	1	0	0		Hähnchenuntersch.(3)	gekühlt
7.	17	1	1	1	1	0	0	0	0		Hähnchenuntersch.(3)	gekühlt
8.	18	0	0	0	0	0	0	0	0		Hähnchenuntersch.(3)	gekühlt
9.	19	0	0	0	0	0	1	1	0		Hähnchenuntersch.(3)	gekühlt
10.	20	1	0	0	0	0	0	0	0		Hähnchenflügel (4)	gekühlt
11.	21	0	0	0	0	0	0	0	0		Hähnchenflügel (4)	gekühlt
12.	22	1	1	0	0	0	0	0	0		Hähnchenflügel (4)	gekühlt
13.	23	0	0	0	0	0	1	0	0		Hähnchenflügel (4)	gekühlt
14.	24	0	0	0	0	1	0	0	0		Hähnchenflügel (4)	gekühlt
15.	25	0	0	0	0	0	0	0	0		Hähnchensch.	gekühlt
16.	26	1	1	0	0	0	0	0	0		Hähnchensch.	gekühlt
17.	27	1	1	0	0	1	1	0	0		Hähnchenuntersch.	gekühlt
18.	28	0	0	0	0	0	0	0	0		Hähnchenuntersch.	gekühlt
19.	29	0	2	2	0	2	2	1	1	S. Typhimurium	Hähnchenuntersch.	gekühlt
20.	30	0	0	0	0	0	0	0	0		Hähnchenuntersch.	gekühlt
21.	31	1	1	0	0	1	0	1	1		Hähnchensch.	gekühlt
22.	32	0	0	0	0	0	0	0	0		Hähnchensch.	gekühlt
23.	33	0	1	0	0	1	1	0	0		Hähnchensch.	gekühlt
24.	34	0	1	0	1	0	1	0	0		Hähnchensch.	gekühlt
25.	35	0	0	0	0	0	0	0	0		Hähnchensch.	gekühlt
26.	36	0	0	0	0	0	0	0	0		Hähnchensch.	gekühlt
27.	37	0	0	0	0	0	0	0	0		Hähnchensch.	gekühlt
28.	38	0	0	0	0	0	0	0	0		Hähnchensch.	gekühlt

ANHANG

29.	39	0	0	0	0	0	1	0	0		Hähnchenflügel	gekühlt
30.	40	0	0	0	0	0	0	0	0		Hähnchenflügel	gekühlt
31.	41	0	1	0	0	0	0	0	0		Hähnchenflügel	gekühlt
32.	42	0	0	0	1	0	0	0	0		Hähnchenflügel	gekühlt
33.	43	0	0	2	0	0	1	0	0	S.Enteritidis	Hähnchenflügel	gekühlt
34.	44	0	0	0	0	1	0	0	0		Hähnchenflügel	gekühlt
35.	45	0	0	0	0	0	0	0	0		Hähnchenflügel	gekühlt
36.	46	0	0	0	0	0	0	0	0		Hähnchenflügel	gekühlt
37.	47	1	1	1	1	0	1	1	1		Hähnchenflügel	gekühlt
38.	48	1	1	0	0	0	0	0	0		Hähnchenflügel	gekühlt
39.	49	0	0	0	0	0	0	0	0		Hähnchensch.	gekühlt
40.	50	0	0	0	0	0	0	0	0		Hähnchensch.	gekühlt
41.	51	0	0	0	0	0	0	0	0		Hähnchenflügel	gekühlt
42.	52	1	1	0	0	1	0	0	0		Hähnchenflügel	gekühlt
43.	53	0	0	0	0	1	1	0	0		Hähnchenleber	gekühlt
44.	54	1	1	0	2	1	0	2	0	S.Enteritidis	Hähnchenleber	gekühlt
45.	55	0	0	0	0	0	0	0	0		Truthahnunterkeule	tiefgek.
46.	56	0	0	0	0	0	0	0	0		Truthahnunterkeule	tiefgek.
47.	57	0	0	0	0	0	0	0	0		Truthahnunterkeule	tiefgek.
48.	58	0	0	0	0	0	0	0	0		Truthahnunterkeule	tiefgek.
49.	59	0	0	0	0	0	1	0	0		Truthahnunterkeule	tiefgek.
50.	60	1	0	0	0	0	1	0	1		Truthahnunterkeule	tiefgek.
51.	61	0	0	0	0	0	1	0	1		Truthahnunterkeule	tiefgek.
52.	62	0	0	0	0	0	0	0	0		Truthahnunterkeule	tiefgek.
53.	63	0	0	0	0	0	0	0	1		Truthahnunterkeule	tiefgek.
54.	64	0	0	0	0	0	0	0	0		Truthahnunterkeule	tiefgek.
55.	65	0	0	0	0	0	0	0	0		Flugentenkeule	gekühlt
56.	66	1	1	0	0	0	0	0	0		Hähnchenbrustfilet	gekühlt
57.	67	0	1	0	0	0	0	0	0		Hähnchenbrustfilet	gekühlt
58.	68	0	0	0	0	0	0	0	0		Hähnchenkeule	gekühlt
59.	69	1	1	1	1	0	0	0	0		Hähnchenbrustfilet	gekühlt
60.	70	1	0	1	0	2	0	0	0	S.Enteritidis	Hähnchenbrustfilet	gekühlt
61.	71	1	0	1	0	1	0	1	0		Hähnchenbrustfilet	gekühlt
62.	72	1	1	1	0	0	0	0	0		Hähnchenbrustfilet	gekühlt

ANHANG

63.	73	0	1	0	0	0	0	0	0		Hähnchenuntersch.	gekühlt
64.	74	0	1	0	0	1	0	0	0		Hähnchenuntersch.	gekühlt
65.	75	0	1	0	0	0	0	0	0		Hähnchenuntersch.	gekühlt
66.	76	0	1	0	1	0	0	0	0		Hähnchenuntersch.	gekühlt
67.	77	1	1	0	0	0	1	0	0		Hähnchenuntersch.	gekühlt
68.	78	0	1	0	0	0	0	0	0		Flugentenkeule	gekühlt
69.	79	0	1	1	0	1	0	0	2	<i>S.Litchfield</i>	Hähnchensch.	gekühlt
70.	80	0	0	0	0	0	0	0	2	<i>S.Typhimurium</i>	Hähnchensch.	gekühlt
71.	81	0	0	0	0	0	0	1	1		Hähnchensch.	gekühlt
72.	82	3	3	2	2	2	2	0	2	<i>S.Enteritidis</i>	Suppenhuhn	tiefgek.
73.	83	0	2	2	0	1	1	0	0		Hähnchen	tiefgek.
74.	84	2	2	2	2	2	1	2	2	<i>S.Enteritidis</i>	Suppenhuhn	tiefgek.
75.	85	1	1	0	0	1	1	0	0		Hühnerklein	tiefgek.
76.	86	1	1	1	1	1	1	0	0		Hühnerklein	tiefgek.
77.	87	0	0	0	0	1	1	0	0		Hühnerklein	tiefgek.
78.	88	1	1	0	0	1	1	0	0		Hühnerklein	tiefgek.
79.	89	0	0	0	0	1	1	0	0		Hähnchensch.	gekühlt
80.	90	1	0	0	0	0	1	0	0		Hähnchensch.	gekühlt
81.	91	1	1	0	0	0	1	0	0		Hähnchensch.	gekühlt
82.	92	0	0	0	0	0	0	0	0		Hähnchensch.	gekühlt
83.	93	0	0	0	0	0	0	0	0		Hähnchensch.	gekühlt
84.	94	0	0	0	0	0	0	0	0		Hähnchensch.	gekühlt
85.	95	0	1	0	0	0	1	0	0		Hähnchensch.	gekühlt
86.	96	0	1	0	0	1	1	0	0		Hähnchensch.	gekühlt
87.	97	0	1	0	0	0	1	0	0		Hähnchensch.	gekühlt
88.	98	0	1	0	1	0	0	0	0		Truthahnunterkeule	gekühlt
89.	99	0	0	0	1	0	0	0	0		Truthahnunterkeule	gekühlt
90.	100	0	1	0	0	1	1	0	0		Truthahnleber	gekühlt
91.	101	0	1	0	0	0	1	0	0		Truthahnleber	gekühlt
92.	102	1	1	2	1	0	1	2	2	<i>S.Typhimurium</i>	Hähnchensch.	gekühlt
93.	103	0	0	0	0	0	0	0	0		Hähnchensch.	gekühlt
94.	104	0	0	0	0	0	0	0	0		Hähnchensch.	gekühlt
95.	105	0	1	0	0	0	0	0	0		Hähnchensch.	gekühlt
96.	106	0	0	0	0	0	0	0	1		Hähnchensch.	gekühlt

ANHANG

97.	107	0	0	0	0	0	1	0	0		Hähnchensch.	gekühlt
98.	108	0	0	0	0	1	1	0	1		Hähnchensch.	gekühlt
99.	109	0	1	0	1	0	0	0	0		Hähnchensch.	gekühlt
100	110	0	0	0	0	0	0	0	1		Hähnchensch.	gekühlt
101	111	0	0	0	0	0	1	0	1		Hähnchensch.	gekühlt
102	112	0	0	0	0	0	0	0	1		Hähnchensch.	gekühlt
103	113	0	1	2	2	0	1	2	2	<i>S. Typhimurium</i>	Hähnchensch.	gekühlt
104	114	0	0	0	0	0	0	0	0		Hähnchensch.	gekühlt
105	115	0	0	0	0	0	0	0	0		Hähnchenschlegel	gekühlt
106	116	0	0	0	1	0	0	0	0		Hähnchenschlegel	gekühlt
107	117	1	1	0	0	0	1	0	1		Hähnchenschlegel	gekühlt
108	118	0	1	1	0	0	1	0	0		Hähnchenschlegel	gekühlt
109	119	1	1	0	0	1	0	0	0		Truthahnmix	gekühlt
110	120	0	0	0	0	0	0	0	0		Truthahnmix	gekühlt
111	121	0	0	0	0	0	0	0	0		Truthahnmix	gekühlt
112	122	0	0	0	0	0	0	0	0		Truthahnmix	gekühlt
113	123	0	1	0	1	1	1	0	1		Hähnchensch.	gekühlt
114	124	0	0	0	0	0	0	0	0		Hähnchensch.	gekühlt
115	125	0	0	0	0	0	0	0	0		Hähnchensch.	gekühlt
116	126	0	0	0	0	0	0	0	0		Hähnchensch.	gekühlt
117	127	0	0	0	0	0	0	0	0		Suppenhuhn	tiefgek.
118	128	2	2	2	0	2	2	2	2		Suppenhuhn	tiefgek.
119	129	0	0	0	0	0	0	0	0		Hähnchen	tiefgek.
120	130	0	0	0	0	0	1	0	0		Hähnchenkeulen	gekühlt
121	131	0	0	0	0	0	0	0	0		nach Kasseler Art	gekühlt
122	132	1	1	0	0	1	1	0	1		Putenunterkeulen	tiefgek.
123	133	2	2	2	2	3	3	3	3	<i>S. Hadar</i>	Putenunterkeulen	tiefgek.
124	134	1	1	2	2	1	1	1	2	<i>S. Enteritidis</i>	Hähnchensch.	tiefgek.
125	135	2	0	2	2	3	3	3	3	<i>S. Enteritidis</i>	Hähnchensch.	tiefgek.
126	136	2	2	2	1	0	0	1	0	<i>S. Enteritidis</i>	Hähnchensch.	tiefgek.
127	137	1	1	2	1	0	0	3	3	<i>S. Enteritidis</i>	Hähnchensch.	tiefgek.
128	138	2	2	2	2	3	0	3	3	<i>S. Enteritidis</i>	Hähnchensch.	tiefgek.
129	139	1	1	0	1	0	1	0	1		Hähnchensch.	tiefgek.
130	140	1	1	0	1	0	1	0	1		Hähnchenrücken	gekühlt

ANHANG

131	141	1	1	0	1	1	1	0	1		Hähnchenrücken	gekühlt
132	142	0	1	0	1	0	0	0	0		Hähnchenrücken	gekühlt
133	143	1	1	0	1	0	1	0	0		Hähnchenrücken	gekühlt
134	144	0	1	0	0	0	1	0	0		Hähnchenobersch.	gekühlt
135	145	0	1	0	1	0	0	0	1		Hähnchenobersch.	gekühlt
136	146	0	1	1	1	0	1	0	1		Hähnchenobersch.	gekühlt
137	147	1	1	0	1	0	0	0	0		Hähnchenobersch.	gekühlt
138	148	0	1	0	0	1	1	0	0		Hähnchenobersch.	gekühlt
139	149	0	1	0	1	0	1	0	0		Hähnchenobersch.	gekühlt
140	150	0	1	0	1	0	1	0	0		Hähnchenobersch.	gekühlt
141	151	1	1	1	0	0	1	0	0		Hähnchenobersch.	gekühlt
142	152	0	1	1	0	0	0	0	0		Hähnchenobersch.	gekühlt
143	153	1	1	0	1	0	0	0	0		Hähnch.suppentopf	gekühlt
144	154	1	1	0	1	1	1	0	0		Hähnch.suppentopf	gekühlt
145	155	1	1	2	2	0	2	2	2	<i>S. Litchfield</i>	Hähnch.suppentopf	gekühlt
146	156	1	1	0	1	0	1	0	0		Hähnch.suppentopf	gekühlt
147	157	1	1	0	0	0	0	0	0		Hähnch.suppentopf	gekühlt
148	158	0	0	0	0	0	0	0	0		Hähnch.suppentopf	gekühlt
149	159	0	0	2	2	0	1	0	2	<i>S. Typhimurium</i>	Hähnchensch.	gekühlt
150	160	1	1	1	2	0	0	0	1	<i>S. Litchfield</i>	Hähnchensch.	gekühlt
151	161	1	0	0	0	1	1	0	1		Hähnchensch.	gekühlt
152	162	1	1	0	1	0	0	0	0		Hähnchensch.	gekühlt
153	163	0	1	1	1	0	0	1	1		Hähnchensch.	gekühlt
154	164	0	0	0	1	0	0	0	1		Hähnchensch.	gekühlt
155	165	1	1	0	0	1	1	0	0		Hähnchensch.	gekühlt
156	166	0	1	0	1	0	0	0	0		Hähnchenbrustfilet	gekühlt
157	167	1	1	0	1	0	1	0	1		Hähnchenbrustfilet	gekühlt
158	168	0	1	0	0	0	1	0	1		Hähnchenbrustfilet	gekühlt
159	169	1	1	0	0	0	0	0	0		Hähnchen	tiefgek.
160	170	1	1	0	1	1	1	0	0		Hähnchen	tiefgek.
161	171	2	2	2	1	1	2	2	0	<i>S. Enteritidis</i>	Suppenhuhn	tiefgek.
162	172	2	2	2	2	0	1	3	3	<i>S. Mbandaka</i>	Suppenhuhn	tiefgek.
163	173	0	0	0	1	0	0	0	0		Gänsekeulen	tiefgek.
164	174	0	1	0	1	0	0	0	0		Gänsekeulen	tiefgek.

ANHANG

165	175	0	1	0	0	0	1	0	0		Gänsekeulen	tiefgek.
166	176	0	1	0	0	0	0	0	1		Putenoberkeule	gekühlt
167	177	0	1	0	0	0	0	0	0		Putenoberkeule	gekühlt
168	178	0	1	0	1	0	1	1	0		Hähnchensch.	gekühlt
169	179	0	1	1	1	0	1	0	1		Hähnchensch.	gekühlt
170	180	3	3	2	1	4	2	4	2	<i>S. Typhimurium</i>	Hähnchensch.	gekühlt
171	181	0	0	0	0	0	0	0	0		Hähnchensch.	gekühlt
172	182	0	1	1	1	0	1	1	1		Hähnchensch.	gekühlt
173	183	1	1	1	1	0	0	2	1	<i>S. Litchfield</i>	Hähnchensch.	gekühlt
174	184	0	1	0	0	1	0	0	1		Hähnchensch.	gekühlt
175	185	0	1	1	0	0	1	1	1		Hähnchensch.	gekühlt
176	186	1	1	1	1	0	1	1	0		Hähnch.suppentopf	gekühlt
177	187	0	1	0	1	0	0	0	1		Hähnch.suppentopf	gekühlt
178	188	0	1	0	1	0	1	1	0		Hähnch.suppentopf	gekühlt
179	189	0	0	0	1	0	0	0	0		Hähnch.suppentopf	gekühlt
180	190	0	1	0	1	0	0	1	2	<i>S. Litchfield</i>	Hähnch.suppentopf	gekühlt
181	191	1	1	1	1	0	1	1	1		Hähnch.suppentopf	gekühlt
182	192	0	1	0	1	0	1	0	0		Hähnchenbrustfilet	gekühlt
183	193	0	1	0	1	0	0	0	1		Hähnchenbrustfilet	gekühlt
184	194	0	1	0	0	0	0	0	1		Hähnchenbrustfilet	gekühlt
185	195	0	1	0	1	0	1	0	0		Wildschw.gulasch	gekühlt
186	196	0	1	0	0	0	0	4	2	<i>S. Typhimurium</i>	Wildschw.gulasch	gekühlt
187	197	0	1	0	1	0	0	0	0		Wildschw.gulasch	gekühlt
188	198	0	1	0	0	0	0	0	0		Wildschw.gulasch	gekühlt
189	199	0	1	0	0	0	1	0	0		Wildschw.gulasch	gekühlt
190	200	0	0	0	0	0	0	0	1		Truthahnbrustschn.	gekühlt
191	201	0	0	0	1	1	1	0	1		Truthahnbrustschn.	gekühlt
192	202	0	1	0	1	0	0	0	1		Truthahnbratwurst-	gekühlt
193	203	0	1	2	2	2	1	2	0		schnecke	gekühlt
194	204	0	0	0	0	0	0	0	0		Truthahnmix	gekühlt
195	205	0	1	2	2	0	0	0	0	<i>S. Heidelberg</i>	Truthahnmix	gekühlt
196	206	0	0	0	0	0	1	0	0		Truthahnteewurst	gekühlt
197	207	0	0	0	0	0	0	0	0		Truthahnteewurst	gekühlt
198	208	0	0	0	0	0	0	0	0		Eigelb	gekühlt

ANHANG

199	209	0	0	0	0	0	0	0	0		Eiweiß	gekühlt
200	210	0	0	0	0	0	0	0	0		Eigelb	gekühlt
201	211	0	0	0	0	0	0	0	0		Eiweiß	gekühlt
202	212	0	0	0	0	0	0	0	0		Eigelb	gekühlt
203	213	0	0	0	0	0	0	0	0		Eiweiß	gekühlt
204	214	0	0	0	0	0	0	0	0		Eigelb	gekühlt
205	215	0	0	0	0	0	0	0	0		Eiweiß	gekühlt
206	216	0	0	0	0	0	0	0	0		Eigelb	gekühlt
207	217	0	0	0	0	0	0	0	0		Eiweiß	gekühlt
208	218	0	0	0	0	0	0	0	0		Eigelb	gekühlt
209	219	0	0	0	0	0	0	0	0		Eiweiß	gekühlt
210	220	0	0	0	0	0	0	0	0		Eigelb	gekühlt
211	221	0	0	0	0	0	0	0	0		Eiweiß	gekühlt
212	222	0	0	0	0	0	0	0	0		Eigelb	gekühlt
213	223	0	0	0	0	0	0	0	0		Eiweiß	gekühlt
214	224	0	0	0	0	0	0	0	0		Eigelb	gekühlt
215	225	0	0	0	0	0	0	0	0		Eiweiß	gekühlt
216	226	0	0	0	0	0	0	0	0		Eigelb	gekühlt
217	227	0	0	0	0	0	0	0	0		Eiweiß	gekühlt
218	228	0	0	0	0	0	0	0	0		Eigelb	gekühlt
219	229	0	0	0	0	0	0	0	0		Eiweiß	gekühlt
220	230	0	1	0	1	0	0	0	0		Suppenhuhn	tiefgek.
221	231	0	2	2	1	0	0	2	2	S. Senftenberg und. S. Enteritidis	Hähnchen	tiefgek.
222	232	0	0	0	0	0	0	0	0		Hähnchen	tiefgek.
223	233	0	1	0	1	0	0	0	0		Entenkeule	tiefgek.
224	234	0	1	0	0	0	0	0	0		Entenschenkel	tiefgek.
225	235	1	1	0	0	0	0	0	0		Entenschenkel	tiefgek.

0=negativ **1**=Kligler gemacht,negativ **2**=Kligler gemacht,positiv **3**=typische Kolonien auf Platte- jedoch kein Kligler gemacht
4=verd. Kolonien erst nach 72 h **SI**=Selenit-Cystin-Anreicherungsbouillon, 24 Std. Berütung. **RI**=Rappaport-Vassiliadis-Bouillon-Cystin-Anreicherungsbouillon, 24 Std. Berütung.
SII=Selenit-Cystin-Anreicherungsbouillon, 48 Std. Berütung.
RII=Rappaport-Vassiliadis-Bouillon-Cystin-Anreicherungsbouillon, 24 Std. Berütung. **Leifs.**=Leifson Agar.
Ramb.=Rambach Agar

9.2 Tab.26: Die Ergebnisse des Nachweises von Salmonellen in Lebensmittelproben durch FISH mit 3 *Salmonella*-Sonden

LaborNr	Anzahl	Packung-Nr ^a	FISH			Kulturelle Methode
			Sa-1 ^b	Sal-3 ^b	Sal-544 ^b	
11	1	1	- ^c	-	-	-
12	2	1	+ ^c	+	+	<i>S. Typhimurium</i>
13	3	2	-	-	-	-
14	4	2	+	+	+	-
15	5	3	-	-	-	-
16	6	3	-	-	-	-
17	7	3	-	-	-	-
18	8	3	-	-	-	-
19	9	3	-	-	-	-
20	10	4	-	-	-	-
21	11	4	-	-	-	-
22	12	4	-	-	-	-
23	13	4	-	-	-	-
24	14	4	-	-	-	-
25	15	5	-	-	-	-
26	16	5	-	-	-	-
27	17	6	-	-	-	-
28	18	6	-	-	-	-
29	19	6	+	+	+	<i>S. Typhimurium</i>
30	20	6	-	-	-	-
31	21	7	-	-	-	-
32	22	7	-	-	-	-
33	23	7	-	-	-	-
34	24	8	-	-	-	-
35	25	8	-	-	-	-
36	26	8	+	+	-	-
37	27	8	-	-	-	-
38	28	8	+	+	-	-
39	29	9	-	-	-	-
40	30	9	+	+	-	-
41	31	9	-	-	-	-
42	32	9	-	-	-	-
43	33	9	+	+	+	<i>S. Enteritidis</i>
44	34	9	-	-	-	-
45	35	9	-	-	-	-
46	36	9	-	-	-	-
47	37	9	-	-	-	-
48	38	9	+	+	-	-
49	39	10	-	-	-	-
50	40	10	-	-	-	-
51	41	11	-	-	-	-
52	42	11	-	-	-	-
53	43	12	-	-	-	-
54	44	12	-	-	-	<i>S. Enteritidis</i>
55	45	13	+	+	+	-
56	46	13	+	+	-	-
57	47	13	+	+	-	-
58	48	13	-	-	-	-

59	49	13	-	-	-	-
60	50	13	-	+	-	-
61	51	13	+	+	+	-
62	52	13	+	+	+	-
63	53	13	+	+	-	-
64	54	13	+	+	+	-
65	55	14	-	-	-	-
66	56	15	-	-	-	-
67	57	15	-	-	-	-
68	58	16	-	-	-	-
69	59	17	-	-	-	-
70	60	17	+	+	+	<i>S. Enteritidis</i>
71	61	17	+	+	-	-
72	62	17	-	-	-	-
73	63	18	-	-	-	-
74	64	18	-	-	-	-
75	65	18	-	-	-	-
76	66	18	-	-	-	-
77	67	18	-	-	-	-
78	68	19	-	-	-	-
79	69	20	+	+	+	<i>S. Litchfield</i>
80	70	20	+	+	+	<i>S. Typhimurium</i>
81	71	20	-	-	-	-
82	72	21	+	+	+	<i>S. Enteritidis</i>
83	73	22	+	+	+	<i>S. Enteritidis</i>
84	74	23	+	+	+	<i>S. Enteritidis</i>
85	75	24	-	-	-	-
86	76	24	-	-	-	-
87	77	25	-	-	-	-
88	78	25	-	-	-	-
89	79	26	-	-	-	-
90	80	26	-	-	-	-
91	81	26	-	-	-	-
92	82	27	-	-	-	-
93	83	27	-	-	-	-
94	84	27	-	-	-	-
95	85	28	-	-	-	-
96	86	28	-	-	-	-
97	87	28	-	-	-	-
98	88	29	-	-	-	-
99	89	29	+	+	+	-
100	90	30	-	-	-	-
101	91	30	-	-	-	-
102	92	31	-	-	+	<i>S. Typhimurium</i>
103	93	31	-	-	-	-
104	94	31	-	-	-	-
105	95	31	-	+	-	-
106	96	31	-	-	-	-
107	97	31	-	-	-	-
108	98	32	-	-	-	-
109	99	32	-	-	-	-
110	100	32	-	-	-	-
111	101	32	-	-	-	-

112	102	32	-	-	-	-
113	103	32	+	+	-	<i>S. Typhimurium</i>
114	104	32	-	-	-	-
115	105	33	-	-	-	-
116	106	33	-	-	-	-
117	107	33	-	-	-	-
118	108	33	-	-	-	-
119	109	34	-	-	-	-
120	110	34	-	-	-	-
121	111	35	-	-	-	-
122	112	35	-	-	-	-
123	113	36	-	-	-	-
124	114	36	-	-	-	-
125	115	37	-	-	-	-
126	116	37	-	-	-	-
127	117	38	-	-	-	-
128	118	39	+	+	+	<i>S. Enteritidis</i>
129	119	40	-	-	-	-
130	120	41	-	-	-	-
131	121	41	-	-	-	-
132	122	42	+	+	-	-
133	123	42	+	+	+	<i>S. Hadar</i>
134	124	43	+	+	+	<i>S. Enteritidis</i>
135	125	43	+	+	+	<i>S. Enteritidis</i>
136	126	43	+	+	+	<i>S. Enteritidis</i>
137	127	44	+	+	+	<i>S. Enteritidis</i>
138	128	44	+	+	+	<i>S. Enteritidis</i>
139	129	44	-	-	-	-
140	130	45	-	-	-	-
141	131	45	-	-	-	-
142	132	45	-	-	-	-
143	133	45	-	-	-	-
144	134	46	-	-	-	-
145	135	46	-	-	-	-
146	136	46	-	-	-	-
147	137	46	-	-	-	-
148	138	46	-	-	-	-
149	139	46	-	-	-	-
150	140	46	-	-	-	-
151	141	46	-	-	-	-
152	142	46	-	-	-	-
153	143	47	+	+	-	-
154	144	47	-	-	-	-
155	145	47	+	+	+	<i>S. Litchfield</i>
156	146	47	-	-	-	-
157	147	47	-	-	-	-
158	148	47	+	+	-	-
159	149	48	+	+	+	<i>S. Typhimurium</i>
160	150	48	+	+	+	<i>S. Litchfield</i>
161	151	48	-	-	-	-
162	152	48	-	-	-	-
163	153	48	-	-	-	-
164	154	48	-	-	-	-

165	155	48	-	-	-	-
166	156	49	-	+	-	-
167	157	49	-	-	-	-
168	158	49	-	-	-	-
169	159	50	-	-	-	-
170	160	51	-	-	-	-
171	161	52	+	+	+	<i>S. Enteritidis</i>
172	162	53	+	+	+	<i>S. Mbandaka</i>
173	163	54	-	-	-	-
174	164	55	-	-	-	-
175	165	56	-	-	-	-
176	166	57	-	-	-	-
177	167	57	-	-	-	-
178	168	58	-	-	-	-
179	169	58	-	-	-	-
180	170	58	+	+	+	<i>S. Typhimurium</i>
181	171	58	-	-	-	-
182	172	58	-	-	-	-
183	173	58	+	+	+	<i>S. Litchfield</i>
184	174	58	-	-	-	-
185	175	58	-	-	-	-
186	176	59	+	+	-	-
187	177	59	-	-	-	-
188	178	59	+	+	-	-
189	179	59	+	+	-	-
190	180	59	+	+	-	<i>S. Litchfield</i>
191	181	59	-	-	-	-
192	182	60	-	-	-	-
193	183	60	-	-	-	-
194	184	60	-	-	-	-
195	185	61	-	+	-	-
196	186	61	+	+	+	<i>S. Typhimurium</i>
197	187	61	+	+	-	-
198	188	61	+	+	-	-
199	189	61	+	+	+	-
200	190	62	-	-	-	-
201	191	62	-	-	-	-
202	192	63	-	-	-	-
203	193	63	-	-	-	-
204	194	64	+	+	-	-
205	195	64	+	+	+	<i>S. Heidelberg</i>
206	196	65	-	-	-	-
207	197	65	-	-	-	-
208	198	66	-	-	-	-
209	199	67	-	-	-	-
210	200	68	-	-	-	-
211	201	69	-	-	-	-
212	202	70	-	-	-	-
213	203	71	-	-	-	-
214	204	72	-	-	-	-
215	205	73	-	-	-	-
216	206	74	-	-	-	-
217	207	75	-	-	-	-

218	208	76	-	-	-	-
219	209	77	-	-	-	-
220	210	78	-	-	-	-
221	211	79	-	-	-	-
222	212	80	-	-	-	-
223	213	81	-	-	-	-
224	214	82	-	-	-	-
225	215	83	-	-	-	-
226	216	84	-	-	-	-
227	217	85	-	-	-	-
228	218	86	-	-	-	-
229	219	87	-	-	-	-
230	220	88	-	-	-	-
231	221	89	+	+	+	<i>S. Senftenberg</i> und <i>S. Enteritidis</i>
232	222	90	+	+	+	-
233	223	91	-	-	-	-
234	224	92	-	-	-	-
235	225	92	-	-	-	-
Zusammen	225	92	52^d	56^d	35^d	30^d
Positive Rat			23,1%	24,9%	15,6%	13,3%

A: Packungsnummer: Die gleiche Packungsnummer bedeutet : verschieden Proben

(Labor Nummer) kommen aus einen größten Packung

B: Sal-1, Sal-3, Sal-544 sind drei verschiedene Sonden für FISH

C: „+“ -- positives Ergebnis.

„-“, -- negatives Ergebnis

D: Anzahlen von positiv Ergebnisse

Tab. 27 Die Ergebnisse des Nachweises von Salmonellen aus Voranreicherung und selektiv Anreicherung (Rappaport-Vassiliadis-Bouillon) durch FISH-Methode mit drei *Salmonella*-Sonden.

Labor Nr.	Sonde Sal-1			Sonde Sal-3			Sonde Sal-544		
	18 Std.	24 Std.	48 Std.	18 Std.	24 Std.	48 Std.	18 Std.	24 Std.	48 Std.
176	-	+	+	-	+	+	-	-	-
177	-	-	-	-	-	-	-	-	-
178	-	-	-	-	-	-	-	-	-
179	-	-	-	-	+	-	-	-	-
180	+	+	+	+	+	+	+	+	+
181	-	-	+	-	+	+	-	-	-
182	-	-	-	-	-	-	-	-	-
183	+	+	+	+	+	+	+	+	+
184	-	-	-	-	-	+	-	-	-
185	-	-	-	-	-	-	-	-	-
186	+	+	+	+	-	-	-	-	-
187	-	-	-	-	+	+	-	+	-
188	+	+	-	+	-	-	-	-	-

189	+	+	-	+	-	-	-	-	-
190	+	+	+	+	+	+	-	-	+
191	-	+	+	-	-	+	-	-	-
192	-	-	-	-	-	-	-	-	-
193	-	-	-	-	+	-	-	-	-
194	-	-	-	-	+	+	-	-	-
195	-	+	+	+	+	+	-	-	-
196	+	+	+	+	+	+	+	+	+
197	+	-	+	+	+	-	-	+	+
198	+	+	-	+	+	+	-	-	-
199	+	+	+	+	+	+	+	-	-
200	-	-	-	-	-	-	-	-	-
201	-	-	-	-	-	-	-	-	-
202	-	-	-	-	+	+	-	-	-
203	-	-	-	-	-	-	-	-	-
204	+	+	-	+	+	+	-	-	-
205	+	+	-	+	-	+	+	+	-
206	-	-	-	-	-	-	-	-	-
207	-	-	-	-	-	-	-	-	-
208	-	-	-	-	-	-	-	-	-
209	-	-	-	-	-	-	-	-	-
210	-	-	-	-	-	-	-	-	-
211	-	-	-	-	-	-	-	-	-
212	-	-	-	-	-	-	-	-	-
213	-	-	-	-	-	-	-	-	-
214	-	-	-	-	-	-	-	-	-
215	-	-	-	-	-	-	-	-	-
216	-	-	-	-	-	-	-	-	-
217	-	-	-	-	-	-	-	-	-
218	-	-	-	-	-	-	-	-	-
219	-	-	-	-	-	-	-	-	-
220	-	-	-	-	-	-	-	-	-
221	-	-	-	-	-	-	-	-	-
222	-	-	-	-	-	-	-	-	-
223	-	-	-	-	-	-	-	-	-
224	-	-	-	-	-	-	-	-	-
225	-	-	-	-	-	-	-	-	-
226	-	-	-	-	-	-	-	-	-
227	-	-	-	-	-	-	-	-	-
228	-	-	-	-	-	-	-	-	-
229	-	-	-	-	-	-	-	-	-
230	-	-	-	-	-	+	-	-	-
231	+	+	+	+	+	+	+	+	+
232	+	+	+	+	-	-	+	-	-
233	-	-	-	-	-	-	-	-	-
234	-	-	-	-	+	-	-	-	-
235	-	+	+	-	-	+	-	+	-
Total	14	17	14	15	18	18	7	7	6

Danksagung

Herrn Prof. Dr. K. Botzenhart danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit.

Zu besonderem Dank verpflichtet bin ich **Herrn S. Brockmann** für die sehr gute Betreuung meiner Arbeit, für seine ständige Diskussionsbereitschaft sowie für die kritische Durchsicht meines Manuskripts.

Mein Dank gilt **Herrn Dr. J. Bohnert** für hilfreiche Unterstützung durch seine fachliche Beratung.

Meine ganz besonderer Dank gilt auch der Grimminger Zoonosen-Stiftung (Stuttgart), die meine Doktorarbeit finanziell unterstützt hat.

Ich danke dem Landsgesundheitsamt (LGA, Stuttgart) und dem Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Fellbach (CVUA Stuttgart) für die Überlassung von Lebensmittelproben.

Ebenso bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts, insbesondere **bei Herrn Dr. A. Wiedenmann, Frau Dr. P. Krüger, Frau C. Hock, Frau P. Kühner, Frau M. Hirlinger sowie Frau S. Gommel** für ihre ständige Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

Schließlich gilt mein spezieller Dank meiner Frau für ihre vielfältige Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Qiang Fang
Geburtstag: 26. 10. 1969
Nationalität: Chinesisch (VR China)
Geburtsort: Yingtan, Provinz Jianxi/VR China
Familienstand: Verheiratet

Ausbildung

1976-1981 Besuch der ersten Grundschule von Yingtan.
1981-1987 Besuch des ersten Gymnasiums von Yingtan.
Juni 1987 Abitur
1987-1993 Medizinstudium an der West China University of medical Science, Chengdu, Provinz Sichuan.

Famulaturen und berufliche Weiterbildung

1991-1992 Innere Medizin, Pädiatrie, Infektionskrankheiten an der West China University of Medical Science
Hygiene und Umweltmedizin am Amt für Krankheitsprophylaxe der Stadt Yibin.
1997-1998 Stipendiat (berufliche Aus- und Fortbildung auf dem Gebiet Umweltschutz in Deutschland). Schwerpunkt: Hygienische mikrobiologische Wasseruntersuchung.

Berufstätigkeit

1993-1997 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Amt für Krankheitsprophylaxe und Hygiene der Provinz Sichuan.
Tätigkeitsbereiche:
Mikrobiologische und chemische Trinkwasserüberwachung;
Amtliche Lebensmittelhygiene sowie Krankenhaushygiene Kontrollen; Betreuung von Studenten der Humanmedizin;
Wissenschaftliche Arbeiten im Bereich der Abwasser-aufbereitung.
1998-2002 Wissenschaftliche geprüfte Hilfskraft am Institut für Allgemeine Hygiene und Umwelthygiene (Uni-Tübingen)