Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

DISSERTATION

Vergleich dreier Pulsfeld-Gelelektrophorese-Protokolle zur Typisierung von *Clostridium perfringens*-Isolaten

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lisa Kehr
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. O. Liesenfeld

2. Prof. Dr. med. M. Mielke

3. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Th. Schneider

Datum der Promotion: 29.01.2010

Meinen Eltern

I. Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
1.1 Einführung 1
1.2 Problemstellung 2
1.3 Stand der Forschung 3
1.3.1 Antibiotika-assoziierte Diarrhö 3
1.3.2 Molekulare Typisierungsmethoden 6
1.4 Zielstellung 9
1.5 Methodischer Ansatz 9

2 Material und Methoden 11
2.1 Methodisches Vorgehen 11
2.2 Mikroorganismen 12
2.2.1 Bakterienisolate und Kulturbedingungen 12
2.3 Pulsfeld-Gelelektrophorese 13
2.4 Protokoll nach Sperner et al. 14
2.4.1 Materialien 14
2.4.1.1 Lösungen 14
2.4.1.2 Sonstige Materialien 19
2.4.2 Methode 19
2.5 Protokoll nach Collie et al. 21
2.5.1 Materialien 21
2.5.1.1 Lösungen 21
2.5.1.2 Sonstige Materialien 23
2.5.2 Methode 23
2.6 Protokoll nach Maslow et al. 25
2.6.1 Materialien 25
2.6.1.1 Lösungen 25
2.6.1.2 Sonstige Materialien 28
2.6.2 Methode 28

3 Ergebnisse 31
3.1 Adaptation des Protokolls nach Sperner et al. 31
3.1.1 Inkubation der Bakterien 31
3.1.2 Durchführung des Protokolls 31
3.1.3 Modifikation der bakteriellen Aufbereitung 33
3.1.4 Veränderungen der Lysisenzyme 35
3.1.5 Optimierung der Proteinase K-Konzentration und Inkubationszeit 36
3.1.6 Veränderung des Waschvorgangs 37
3.1.7 Veränderungen des Restriktionsenzymverdaus 37
3.1.7.1 Modifikation der SmaI-Konzentration 37
3.1.7.2 Stoppen der SmaI-Wirkung 37

3.1.8 Veränderung des Laufpuffer TBE ... 38
3.1.9 Veränderung der PFGE-Agarose ... 38
3.1.10 Einführung einer Vorelektrophorese ... 39
3.1.11 Variation der Laufzeiten ... 39
3.2 Adaptation des Protokolls nach Collie et al. ... 40
3.2.1 Inkubation der Bakterien ... 41
3.2.2 Modifikationen der bakteriellen Anzucht der Bakterien ... 41
3.2.2.1 Vorbehandlung der Bakterien mit Formaldehyd ... 41
3.2.2.2 Bestimmung der optischen Dichte ... 42
3.2.3 Veränderung der Blöckchenagarose ... 42
3.2.3.1 Herabsetzung der Agarose-Konzentration ... 42
3.2.4 Veränderung der Lysis-Lösung ... 43
3.2.4.1 Verwendung zusätzlicher Enzyme ... 43
3.2.4.2 Alleinige Lysis mit Proteinase K ... 44
3.2.5 Veränderung des Proteinverdaus ... 44
3.2.5.1 Verkürzung der Inkubation ... 44
3.2.5.2 Beendigung des Proteinverdaus mit Phenylmethylsulfonylfluoride ... 44
3.2.6 Doppelte Restriktion ... 45
3.2.7 Veränderte Laufdauer, Umschaltzeiten und Spannungsgradienten ... 45
3.3 Adaptation des Protokolls nach Maslow et al. ... 46

4 Diskussion ... 47
4.1 Gegenüberstellung der drei Protokolle und Modifikationen ... 47
4.1.1 Anzucht ... 48
4.1.2 Bakterienaufbereitung ... 48
4.1.2.1 Messung der optischen Dichte ... 48
4.1.2.2 Bakterienvorbehandlung zum Schutz vor DNS Degradation ... 49
4.1.3 Lysis ... 49
4.1.3.1 Wahl und Konzentration der Lysisenzyme ... 49
4.1.3.2 Dauer der Lysis ... 50
4.1.4 Deproteinisierung ... 51
4.1.4.1 Konzentration der Proteinase K ... 51
4.1.4.2 Dauer der Deproteinisierung ... 51
4.1.5 Waschen ... 52
4.1.6 Restriktionsverdau ... 52
4.1.6.1 Wahl und Konzentration der Restriktionsenzyme ... 52
4.1.6.2 Aktivitätssteigerung des Enzyms ... 52
4.1.7 Elektrophorese ... 53
4.1.7.1 Laufpuffer ... 53
4.1.7.2 Elektrophoreseparameter ... 54
4.2 Zusammenfassende Beurteilung der Ergebnisse ... 55
4.3 Ausblick ... 57

5 Zusammenfassung 61

6 Summary 62

7 Literaturverzeichnis 63

8 Appendix 71

8.1 Übersicht der *C. perfringens*-Isolate 71

8.2 Vergleich der drei eingesetzten Protokolle mit PFGE-Protokollen der internationalen Literatur 73

8.3 Tabellarischer Lebenslauf 76

8.4 Danksagung 76

Abkürzungsverzeichnis

AAD	Antibiotika-assoziierte Diarrhö
Abb.	Abbildung
Art-Nr.	Artikelnummer
Best-Nr.	Bestellnummer
Anm.	Anmerkung
C.	Clostridium
CDAD	*Clostridium-difiicile*-assoziierte-Diarrhö
CPE	*Clostridium perfringens* Enterotoxin
CBF	Campus Benjamin Franklin, Charité
Cm	Zentimeter
DNS	Desoxyribonucleosidtrophosphat
€	Euro
ff.	folgende
g	Gramm
ggf.	Gegebenenfalls
Fa.	Firma
Fr.	Frau
H	Stunde
Kb	Kilobasen
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
M	Molar
Min	Minuten
n.b.	nicht bekannt
neg.	Negativ
Nm	Nanometer
Nr.	Nummer
pH	Negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
PMSF	Phenylmethylsulfonylflourid
Prot K	Proteinase K
pos.	Positiv
Rpm	Umdrehungen per Minute
S	Sekunde
Spp.	Spezies
üN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation von *C. perfringens* und Bedeutung für Mensch und Tier 4
Tabelle 2: Zusammensetzung des universellen Nährbodens 12
Tabelle 3: Zusammensetzung des Columbia-Blut-Agars 12
Tabelle 4: Übersicht der bakteriellen Isolate 71
Tabelle 5: Vergleich der drei eingesetzten Protokolle mit PFGE-Protokollen der internationalen Literatur 73

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Fließdiagramm der durchgeführten Arbeiten 11
Abbildung 2-2: Spannungsverlauf des Chef-III-Systems. 13
Abbildung 2-3: Schematische Darstellung der PFGE 14
Abbildung 3-1: Wachstum von *C. perfringens* nach 24h Bebrütung bei 37°C 31
Abbildung 3-2: 1. PFGE nach dem Protokoll von Sperner et al. 32
Abbildung 3-3: 2. PFGE nach dem Protokoll von Sperner et al. 33
Abbildung 3-4: PFGE mit modifizierter bakterieller Aufbereitung 34
Abbildung 3-5: Vergleichende Darstellung der PFGE aus Abb. 3-4 mittels Polaroidfoto 35
Abbildung 3-6: PFGE mit modifiziertem Zelllysis-Puffer 36
Abbildung 3-7: PFGE-Testlauf mit lysierten und vorverdauten Lambda ladder 38
Abbildung 3-8: PFGE mit modifizierten Laufzeiten 40
Abbildung 3-9: PFGE nach dem Protokoll von Collie et al. 41
Abbildung 3-10: PFGE mit und ohne Formaldehyd 42
Abbildung 3-11: PFGE mit verringerter Konzentration der Blöckchenagarose 43
Abbildung 3-12: PFGE mit PMSF-behandelten bakteriellen Isolaten 45
Abbildung 4-1: PFGE-Protokoll für *C. difficile* 60

1 Einleitung

1.1 Einführung

Durchfallerkrankungen gehören zu den weltweit häufigsten Infektionskrankheiten. Neben nahrungsmittelassoziierten Infektionen, Medikamenten sowie entzündlich oder ischämisch bedingten Darmerkrankungen (Schneider and Zeitz 2001; Abrahao, Carman et al. 2001) können Diarrhöen als häufige unerwünschte Nebenwirkungen einer Antibiotikatherapie auftreten. Abhängig von der Art des Antibiotikums kommt es in 5-25% aller Fälle zu einer antibiotika-assoziierten Diarrhö (AAD) (Bartlett 1996). Das klinische Spektrum der AAD reicht von blanden Durchfällen bis zur pseudomembranösen Kolitis (Bartlett 2002; Ayyagari, Agarwal et al. 2003). Typische Symptome sind mit Krämpfen einhergehende abdominale Schmerzen, schleimige oder wässrige Durchfälle, Fieber und Leukozytose (Fekety 1997). Als Hauptrisikofaktor für die Erkrankung werden neben der Einnahme von Antibiotika ein Krankenhausaufenthalt, fortgeschrittenes Alter, Immunsuppression und Zytostatikatherapie angesehen (Samuel, Hancock et al. 1991; Modi and Wilcox 2001).

Das Bakterium *Clostridium difficile* mit den Toxinen A und B ist die am häufigsten diagnostizierte Ursache der AAD (Bartlett, Onderdonk et al. 1977; Bartlett, Chang et al. 1978; Larson, Price et al. 1978; Fekety, Kim et al. 1981; Spencer 1998). Zahlreiche Studien belegen aber, dass nur bei 10-25% der Patienten mit AAD *C. difficile* nachgewiesen wird (Gerding 1989; Fekety and Shah 1993; Kelly, Pothoulakis et al. 1994; Spencer 1998; Bartlett 2002), während in bis zu 80% der Fälle kein Erreger diagnostiziert werden kann (Modi and Wilcox 2001). Neben *C. difficile* wurden als weitere Ursachen der AAD Salmonellen, *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans* diskutiert (Bartlett 2002). Auch toxinbildende *C. perfringens*-Stämme wurden wiederholt als Ursache für die AAD beschrieben (Borriello, Larson et al. 1984; Brett, Rodhouse et al. 1992; Abrahao, Carman et al. 2001; Modi and Wilcox 2001). Sporen und vegetative Formen von *C. perfringens* finden sich in Erdböden, Staub und Wasser (Rodloff 2001). Während toxinnegative *C. perfringens*-Stämme zur physiologischen Standardflora des Intestinaltraktes des Menschen gehören, produzieren ungefähr 1-6% aller *C. perfringens*-Isolate ein Enterotoxin (CPE) (Borriello, Larson et al. 1984; Abrahao, Carman et al. 2001; Modi and Wilcox 2001; Sparks, Carman et al. 2001). Dieses CPE ist bereits seit den frühen 80er Jahren als Erreger von Lebensmittelintoxikationen bekannt (Stringer, Turnbull et al. 1980; Schalch, Björkroth et al. 1997; Schalch, Sperner et al. 1999; Stolle, Sperner et al. 2001; Lukinmaa, Takkunen et al. 2002). In mehreren Studien wurde gezeigt, dass Patienten mit AAD erhöhte CPE-Konzentrationen in Stuhlproben aufwiesen (Borriello, Larson et al.

1984; Borriello, Barclay et al. 1985; Samuel, Hancock et al. 1991). CPE wird derzeit in bis zu 9% aller AAD-Fälle als Ursache angesehen (Abrahao, Carman et al. 2001; Modi and Wilcox 2001; Asha and Wilcox 2002; Heimesaat, Granzow et al. 2005; Vaishnavi, Kaur et al. 2005; Asha, Tompkins et al. 2006).

Die Übertragung von *C. difficile* erfolgte meist nosokomial im Krankenhaus (McFarland, Mulligan et al. 1989), da die Erreger resistent gegen herkömmliche Desinfektionsmaßnahmen sind. Über die Ausbreitung und Übertragung von *C. perfringens*-Stämmen liegen derzeit keine Daten vor. Um die Ausbreitung der Bakterien im Krankenhausmilieu und ihre klonale Verwandtschaft aufzudecken und nachfolgend Präventionsmaßnahmen zu installieren, werden molekulare Typisierungsmethoden angewandt. Diese sind für *C. difficile*-, nicht aber für *C. perfringens*-Stämme gut erforscht. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit eine Pulsfeld-Gelelektrophorese-Technik etabliert werden, um *C. perfringens*-Stämme von Patienten mit AAD typisieren zu können.

1.2 Problemstellung

Die AAD ist eine nosokomiale Infektion, deren Bedeutung infolge der alternden Bevölkerung, der steigenden Anzahl an immunsupprimierten Patienten und dem erhöhten Verbrauch an Antibiotika weiter zunimmt (Bartlett 1994; Kelly, Pothoulakis et al. 1994). Die *C. difficile*-assoziierte AAD steht an fünfter Stelle der häufigsten Hospitalinfektionen (Silva 1994). Für Patienten, die an einer *C. difficile*-assoziierten-Diarrhö (CDAD) leiden, verlängert sich der Krankenhausaufenthalt um ein bis drei Wochen und erhöht massiv die Kosten (Spencer 1998; Kyne, Hamel et al. 2002; Wilkins and Lyerly 2003). 10-25% der stationären Patienten sind mit *C. difficile* kolonisiert (Ackermann 2004). Die klonale Ausbreitung des Erregers in Krankenhäusern und Pflegeeinrichtungen hat bereits schwerwiegende Ausbrüche in den USA, in Kanada und in Großbritannien verursacht (Eggertson 2004; McDonald 2005; Warny, Peoin et al. 2005).

Mitte der 80er Jahre wurde die Rolle von *C. perfringens* als Erreger der AAD erstmals beschrieben (Borriello, Larson et al. 1984) und in weiteren Studien bestätigt (Borriello, Barclay et al. 1985; Samuel, Hancock et al. 1991; Wada, Masuda et al. 1996; Abrahao, Carman et al. 2001; Modi and Wilcox 2001; Sparks, Carman et al. 2001; Asha and Wilcox 2002; Heimesaat, Granzow et al. 2005; Vaishnavi, Kaur et al. 2005). Obwohl die Bedeutung des Erregers in klinischer und gesundheitsökonomischer Hinsicht seit der Erstbeschreibung

erheblich zugenommen hat, ist die Epidemiologie der CPE-bedingten AAD nicht im Detail untersucht worden (Mpamugo, Donovan et al. 1995; Abrahao, Carman et al. 2001; Asha and Wilcox 2002; Forwald, Tompkins et al. 2003; Miyamoto, Wen et al. 2004).

Molekulare Typisierungsmethoden klären die Frage der Klonalität von Bakterien und können nosokomiale Übertragungen aufzeigen. Diverse Studien beschäftigten sich mit der Typisierung von toxinpositiven *C. perfringens*-Isolaten von Menschen, Tieren und Lebensmitteln (Borriello, Barclay et al. 1985; Wada, Masuda et al. 1996; Schalch, Björkroth et al. 1997; Sparks, Carman et al. 2001; Schalch, Bader et al. 2003; Tanaka, Isobe et al. 2003). Während toxinbildende *C. perfringens*-Stämme in der Vergangenheit bereits typisiert wurden (Schalch, Björkroth et al. 1997; Schalch, Sperner et al. 1999; Stolle, Sperner et al. 2001; Schalch, Bader et al. 2003), liegen zur Genotypisierung von nicht-toxinbildenden *C. perfringens*-Isolaten derzeit in Deutschland keine Studien vor. Eine klonale Verbreitung auch dieser Stämme könnte als Hinweis auf eine nosokomiale Übertragung gewertet werden. Zudem ist es vorstellbar, dass auch nicht-toxinbildende Stämme von *C. perfringens* aus der physiologischen Standortflora eine Bedeutung für die AAD haben. So konnten Sparks et al. (Sparks, Carman et al. 2001) nachweisen, dass das plasmidkodierte CPE-Gen in vitro durch Konjugation auf CPE-negative Isolate übertragen werden kann. Sollte diese Übertragung auch in vivo erfolgen, so könnte das CPE-Gen auf diese Art auf CPE-negative Isolate der physiologischen Darmflora übertragen werden und den Ursprung einer AAD darstellen.

1.3 Stand der Forschung

1.3.1 Antibiotika-assoziierte Diarrhö

Die pseudomembranöse Kolitis (PMC) gilt als schwerste Form der AAD. Auf das Krankheitsbild der PMC wurde erstmalig 1893 bei einer Patientin mit letal verlaufener postoperativer Diarrhö hingewiesen (Finney 1893). Bis zur Mitte des 20. Jahrhunderts vermutete man, dass *Staphylococcus aureus* der alleinige Erreger der AAD sei (Oeding and Austarheim 1954). Durch die gehäufte Gabe von Antibiotika wie Clindamycin entwickelte sich die AAD in den 60er und 70er Jahren zu einem immer größer werdenden klinischen Problem. Erstmals konnte 1977 in einem Tierversuch mit Hamstern gezeigt werden, dass das Bakterium *C. difficile* die Erkrankung durch Bildung eines zytopathischen Toxins verursacht (Bartlett, Onderdonk et al. 1977; Larson, Parry et al. 1977; Larson, Price et al. 1978). Borriello et al. (Borriello, Larson et al. 1984) konnten 1984 erstmals in *C. difficile*-negativen

Stuhlproben von Patienten mit AAD toxinbildende *C. perfringens*-Stämme nachweisen. *C. perfringens* ist ein unbewegliches, grampositives, sporenbildendes, stäbchenförmiges Bakterium von plumper Gestalt. Es ist in der Lage, vier Toxine sowie ein Enterotoxin zu bilden. Die vier Nekrose-auslösenden Haupttoxine, die mit den griechischen Buchstaben α, β, ε und ι bezeichnet werden, bilden die Grundlage der Klassifizierung unterschiedlicher *C. perfringens*-Stämme in die Typen A- E. Diese Toxine sind für ein breites Spektrum von Infektionen verantwortlich (Songer 1996).

Tabelle 1: Klassifikation von *C. perfringens* und Bedeutung für Mensch und Tier (Songer 1996)

C. perfringens Typ	Haupt-Toxin(e)	Enterotoxin	Erkrankungen	Wirte
A	A	+	Lebensmittelintoxikation, AAD, sporadische Durchfälle, Wundgasödem; Nekrotisierende Mastitis und Enteritis	Mensch, Säugetiere Rind, Schwein, Geflügel
B	α, β, ε	n.b.	Lämmerdysenterie, hämor-rhagische Enteritis Enterotoxämien	Kalb, Schaf
C	α, β	+	Nekrotisierende Enteritis Nekrotisierende und hämorrhagische Enterotoxämien	Mensch, Lamm, Kalb, Ziegen, Fohlen
D	α, ε	+	Enterotoxämien	Rind, Schaf
E	α, ι	+	Enterotoxämien	Rind, Schaf

Die AAD und Lebensmittelintoxikationen verursachenden Clostridien-Stämme gehören fast ausschließlich dem Typ A an; allerdings ist das CPE-Gen bei beiden Erkrankungen an unterschiedlichen Orten lokalisiert: So tragen nordamerikanische und europäische Isolate von *C. perfringens* Typ A-Stämmen das Enterotoxin-Gen bei Lebensmittelvergiftungen chromosomal, bei AAD jedoch auf einem Plasmid (Collie and Mc Clane 1998; Sparks, Carman et al. 2001; Miyamoto, Wen et al. 2004).

Die CDAD verursacht zusätzliche diagnostische und therapeutische Maßnahmen und somit erhöhte Kosten für stationäre Patienten. Diese wurden 1996 in Großbritannien im

Durchschnitt auf £4000 pro Patient geschätzt (Wilcox, Cunniffe et al. 1996). In einem europäischen Krankenhaus erkranken im Jahr durchschnittlich 100 Patienten (Spencer 1998) an der CDAD und verursachen innerhalb der Europäischen Union Mehrkosten von 3 Mrd. € (Kuijper, Coignard et al. 2006). In Deutschland wurde ein Anstieg der Patienten mit der Diagnose CDAD von 7,4 pro 100 000 stationärer Aufnahmen im Jahre 2000 auf 39,3 im Jahre 2004 festgestellt (Reichardt, Chaberny et al. 2007). Ähnliche Zahlen werden aus den USA berichtet (Kofsky, Reed et al. 1991; Kyne, Hamel et al. 2002; Wilkins and Lyerly 2003). Während in den USA die zusätzlichen Kosten 1991 auf $5000 pro Patient geschätzt wurden (Kofsky, Reed et al. 1991), gehen neuere Untersuchungen von $10.000 pro Patient aus (Wilkins and Lyerly 2003).

Die Letalität der CDAD liegt bei 1-2% (Bartlett 2002). 2-5% gesunder Erwachsener tragen im Darm *C. difficile*. Die erhöhte Prävalenz von *C. difficile* von 20-30% in Krankenhäusern liegt vermutlich an der relativ schnellen Infektion nach stationärer Aufnahme (McFarland, Mulligan et al. 1989; Bartlett 1992). McFarland et al. (McFarland, Mulligan et al. 1989) berichteten, dass das Risiko, an einer nosokomialen AAD zu erkranken, in den ersten 48h am höchsten ist und 25% der Patienten innerhalb der ersten Woche mit *C. difficile* infiziert werden. Als besonders häufige Ursache der nosokomialen Infektion wird die Übertragung durch direkten Kontakt mit anderen Patienten oder durch kontaminierte Hände des Personals angesehen. So konnte in einer Studie mit 428 Patienten nachgewiesen werden, dass 21% der Patienten mit AAD *C. difficile* durch eine nosokomiale Übertragung erworben hatten. 60% des Krankenhauspersonalspersonals waren mit *C. difficile* infiziert (McFarland, Mulligan et al. 1989). Aber auch unbelebte Erregerquellen wie kontaminierte Medikamente, Nachttöpfe oder medizinische Instrumente gelten als Reservoir der Erreger (Fekety, Kim et al. 1981; McFarland, Mulligan et al. 1989). Hitzeresistente Sporen von *C. difficile* können für Monate in Krankenhausstationen an Böden, Betten oder Toiletten persistieren und sind sehr resistent gegen Sauerstoff, Austrocknung und Desinfektionsmittel, was ihre Bekämpfung erschwert (Bender, Bennett et al. 1986; Kelly, Pothoulakis et al. 1994; Kraatz, Gitlin et al. 1988).

Für die durch *C. perfringens* verursachte AAD liegen wenige Informationen über mögliche Infektionsquellen und Häufigkeiten vor. Es wird angenommen, dass die durch CPE ausgelöste AAD ebenfalls zu einem verlängerten Krankenhausaufenthalt führt (Asha and Wilcox 2002). Kürzlich ist von einem durch CPE verursachten Ausbruch in Japan berichtet worden (Fukao, Sato et al. 2004). Eine anfangs vermutete Lebensmittelvergiftung in einem Schwesternheim

konnte nach Untersuchung der Nahrungsmittel nicht bestätigt werden. Stattdessen fanden sich in sämtlichen Stuhlproben der Patienten und der unmittelbaren Umgebung enterotoxinpositive *C. perfringens*-Isolate des gleichen Serotyps. Die Isolate des identischen Klons waren nahrungsmittelunabhängig übertragen worden. Derartige Ausbruchsituationen sind bislang nur von Lebensmittelintoxikationen durch *C. perfringens* bekannt (Schalch, Björkroth et al. 1997; Maslanka, Kerr et al. 1999; Schalch, Sperner et al. 1999; Lukinmaa, Takkunen et al. 2002; Tanaka, Isobe et al. 2003). Einer der schwersten Ausbrüche CPE-kontaminierter Lebensmittel in Deutschland ereignete sich 1989 in einem münchener Altenheim. Nach Verzehr von Rinderherzgeschnetzeltem erkrankten 21 Bewohner an einer akuten Gastroenteritis, zwei verstarben innerhalb von zwei Tagen im Krankenhaus (Schalch, Bader et al. 2003). Dieser Ausbruch weist auf die Notwendigkeit hin, die Epidemiologie der Infektion mit *C. perfringens* zu klären. In Deutschland werden gegenwärtig jedoch viele dieser Ausbrüche nicht epidemiologisch erfasst (Graf and Bader 2000).

1.3.2 Molekulare Typisierungsmethoden

Für die Klärung der Verbreitung unterschiedlicher Stämme eines Erregers (Molekulare Epidemiologie) stehen unterschiedliche Verfahren zur Auswahl (Lukinmaa, Nakari et al. 2004). Die Auswahl des Typisierungsverfahrens wird basierend auf der Typisierbarkeit, Reproduzierbarkeit und Diskriminierungsfähigkeit getroffen (Kristjansson, Samore et al. 1994). Die Typisierung von Mikroorganismen erlaubt es so, den Verwandtschaftsgrad von Bakterien zu bestimmen und die Einteilung in Gruppen, Stämme oder Klone vorzunehmen (Tenover, Arbeit et al. 1995; Collie and Mc Clane 1998). Für die Differenzierung von *C. perfringens* sind bereits phänotypische und genotypische Typisierungsverfahren erfolgreich angewandt worden (Schalch, Björkroth et al. 1997). Zu den wichtigsten genotypischen Methoden für Clostridien zählen die Ribotypisierung, Restriktionsendonuklease-Analyse (REA), Plasmidanalyse, Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) und die PFGE (Grimont and Grimont 1986; Brett, Rodhouse et al. 1992; Maslanka, Kerr et al. 1999; Schalch, Sperner et al. 1999; Sperner, Schalch et al. 1999; McLauchlin, Ripabelli et al. 2000; Stolle, Sperner et al. 2001; Pituch, Van den Braak et al. 2002; Schalch, Bader et al. 2003; Lukinmaa, Nakari et al. 2004; Miyamoto, Wen et al. 2004).

Die Ribotypisierung ist ein für epidemiologische Untersuchungen von Grimont et al. (Grimont and Grimont 1986) eingeführtes Verfahren, bei dem mittels einer markierten

Gensonde vorhandene rRNA-Gene sichtbar gemacht werden. Auch für die Differenzierung von *C. perfringens* stellt sie eine gut geeignete Methode dar (Schalch, Sperner et al. 1999; Schalch, Bader et al. 2003; Lukinmaa, Nakari et al. 2004). Ihre Vorteile liegen in dem guten Typisierungsvermögen, der unkomplizierten Interpretation, der guten Reproduzierbarkeit und dem hohen Diskriminierungsgrad (Schalch, Sperner et al. 1999). Kristjansson et al. (Kristjansson, Samore et al. 1994) typisierten *C. difficile*-Isolate mittels Ribotypisierung, bemängelten jedoch, dass der Diskriminierungsgrad der Ribotypisierung geringer sei als der der REA oder PFGE und daher selbst epidemiologisch nicht verwandte Isolate die gleichen Muster aufwiesen.

REA ist eine unkomplizierte, weit verbreitete Methode, die sich bei der Analyse der DNS von Bakterienspezies wie *Streptococcus pyogenes* (Cleary, Kaplan et al. 1988) oder *C. difficile* bewährt hat (Devlin, Au et al. 1987; Brazier 2001). Hierbei wird die gesamte zelluläre DNS mittels eines häufig schneidenden Restriktonsenzyms verdaut und die resultierenden Fragmente werden anschließend in einer Elektrophorese aufgespalten (Kristjansson, Samore et al. 1994). Kuijper et al. (Kuijper, Oudbier et al. 1987) bewiesen damit die nosokomiale Übertragung von *C. difficile* bei zwei Patienten, die in einem Krankenhauszimmer untergebracht waren. Die Methode ist technisch anspruchvoll und sehr arbeitsintensiv. Zahlreiche Fragmente sind oft schlecht getrennt, so dass eine direkte Einteilung von Isolaten in Gruppen nicht möglich ist (Kristjansson, Samore et al. 1994).

Die Plasmidtypisierung beinhaltet die Identifikation von bestimmten Plasmid-Profilen, das Plasmid-Fingerprinting und die Entdeckung bestimmter Plasmidgene (Lukinmaa, Nakari et al. 2004). Allerdings ist die Analyse abhängig von der Variabilität der Plasmid-Muster innerhalb einer Spezies, der Häufigkeit der Isolate ohne Plasmide und der Stabilität der Plasmide. In einer Untersuchung mit *C. perfringens* wurden bei 33% der Isolate keine Plasmide gefunden (Schalch, Sperner et al. 1999), bei einer Studie mit *C. difficile* konnten sogar bei 47% der Isolate keine Plasmide nachgewiesen werden (Devlin, Au et al. 1987). Da einige Bakterien spontan ihre Plasmide verlieren oder neue Plasmide erwerben können, ist die Plasmidanalyse als alleinige Typisierungsmethode in epidemiologischen Untersuchungen eher ungeeignet (Lukinmaa, Nakari et al. 2004).

Eine weitere Möglichkeit zur epidemiologischen Differenzierung von Bakterien sind PCR-basierte Typisierungsmethoden, zu denen auch die AFLP zählt. Hierbei erfolgt nach der

Verdauung der DNS durch Restriktionsenzyme eine Verknüpfung der resultierenden Fragmente mit einem doppelsträngigen Oligonukleotid-Adapter, der komplementär zur Basensequenz der Restriktionsstelle ist. Der Adapter ist dabei so modifiziert, dass eine weitere Restriktionsverdauung und eine Verknüpfung der Adapter untereinander verhindert werden. Die resultierenden DNS-Fragmente werden durch passende Primer durch die PCR amplifiziert und anschließend durch die Gel-Elektrophorese analysiert (McLauchlin, Ripabelli et al. 2000). Die AFLP ist bereits zur epidemiologischen Typisierung von *C. difficile* und *C. perfringens* angewandt worden (McLauchlin, Ripabelli et al. 2000; Klaassen, Van Haren et al. 2002; Lukinmaa, Nakari et al. 2004). Die Methode ist leicht durchführbar und benötigt nur eine einfache und kostengünstige Ausrüstung (McLauchlin, Ripabelli et al. 2000). Die AFLP zeichnete sich in einer Studie bei allen *C. perfringens*-Isolaten durch hohe Reproduzierbarkeit und hohe Trennschärfe der Banden aus (Lukinmaa, Takkunen et al. 2002). Allerdings ist es ohne eine spezielle Computer-Software nicht möglich, eine große Anzahl an AFLP-Bandenmustern visuell zu analysieren (Klaassen, Van Haren et al. 2002).

Bei der PFGE handelt es sich um ein Elektrophoreseverfahren, das erstmals 1984 von Schwartz und Cantor für die Auftrennung der DNS-Moleküle von *Saccharomyces cerevisiae* (200-300 kbp) vorgestellt wurde (Schwartz and Cantor 1984). Die Entwicklung des Gerätes ermöglicht heute eine Separation von DNS-Doppelsträngen in bis zu 25 Fragmente mit einer Länge von bis zu 2000 kbp (Arbeit, Arthur et al. 1990). Die PFGE wird von vielen Autoren als Goldstandard für epidemiologische Untersuchungen angesehen (Gibson, Sutherland et al. 1994; Kristjansson, Samore et al. 1994; Tenover, Arbeit et al. 1995; Klaassen, Van Haren et al. 2002; Lukinmaa, Takkunen et al. 2002). Sie gilt als ein präzises und reproduzierbares Verfahren, das überschaubare und gut interpretierbare Ergebnisse liefert (Lukinmaa, Nakari et al. 2004; Alonso, Martin et al. 2005). Die PFGE-Ergebnisse von verschiedenen Laboren sind aufgrund der uniformen Ausrüstungen einfach miteinander zu vergleichen (Klaassen, Van Haren et al. 2002). Auch zur Genotypisierung von *C. difficile* und C. *perfringens* ist sie bereits erfolgreich angewandt worden (Kristjansson, Samore et al. 1994; Schalch, Björkroth et al. 1997; Collie and Mc Clane 1998; Maslanka, Kerr et al. 1999; Schalch, Sperner et al. 1999; Sperner, Schalch et al. 1999; Brazier 2001; Klaassen, Van Haren et al. 2002; Pituch, Van den Braak et al. 2002; Schalch, Bader et al. 2003; Tanaka, Isobe et al. 2003; Lukinmaa, Nakari et al. 2004; Alonso, Martin et al. 2005). In Studien mit *C. difficile* zeigte sie einen höheren Diskriminierungsgrad als andere DNS-basierte Typisierungsmethoden wie REA oder AFLP (Kristjansson, Samore et al. 1994; Brazier 2001; Klaassen, Van Haren et al. 2002; Alonso,

Martin et al. 2005). Erstmals wurde die PFGE zur Genotypisierung von *C. perfringens* 1989 verwendet. Canard et al. (Canard and Cole 1989) erstellten mittels der PFGE eine physikalische Genkarte des Bakteriums. In weiteren epidemiologischen Untersuchungen mit *C. perfringens*-Isolaten von Patienten mit nahrungsmittelassoziierten Diarrhöen lieferte die Methode zuverlässige Ergebnisse zur klonalen Identität der Bakterien und deren Verwandschaftsverhältnissen (Wada, Masuda et al. 1996; Collie and Mc Clane 1998; Schalch, Sperner et al. 1999; Sperner, Schalch et al. 1999; Stolle, Sperner et al. 2001; Tanaka, Isobe et al. 2003). Auch in Ausbruchsituationen, z.B. bei Lebensmittelvergiftungen, hat die PFGE zuverlässige Informationen über die Herkunft und Übertragung der CPE-Isolate geliefert (Maslanka, Kerr et al. 1999; Lukinmaa, Takkunen et al. 2002; Tanaka, Isobe et al. 2003). Als Nachteil der Methode werden vielfach die Untypisierbarkeit einiger Stämme, die hohen anfänglichen Kosten und die intensive Laborzeit genannt (Kristjansson, Samore et al. 1994; Tenover, Arbeit et al. 1995; Schalch, Sperner et al. 1999; Brazier 2001; Stolle, Sperner et al. 2001; Schalch, Bader et al. 2003; Lukinmaa, Nakari et al. 2004). Trotzdem hat sie sich als die am weitesten verbreitete Methode zur Typisierung von Bakterien durchgesetzt (Lukinmaa, Nakari et al. 2004) und wurde folglich als Untersuchungsmethode der vorliegenden Arbeit ausgewählt.

1.4 Zielstellung

Aufgrund der steigenden Bedeutung der AAD und der nosokomialen Übertragung von *C. perfringens*-Stämmen im Krankenhaus sollte in der vorliegenden Arbeit ein PFGE- Protokoll zur Typisierung von *C. perfringens* im Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät Charité entwickelt und etabliert werden. Grundlage der Etablierung waren zwei in der internationalen Literatur beschriebene PFGE-Protokolle für *C. perfringens* sowie ein PFGE-Protokoll zur Typisierung von *Staphylococcus aureus*. Nach Etablierung sollte die PFGE zur Klärung der klonalen Beziehung zwischen *C. perfringens*-Stämmen von Patienten unterschiedlicher Stationen der Charité herangezogen werden.

1.5 Methodischer Ansatz

Um das geeignete PFGE-Protokoll zur Untersuchung der Klonalität der *C. perfringens*-Isolate von Patienten mit AAD zu etablieren, wurden drei unterschiedliche Protokolle miteinander verglichen: Das erste Protokoll zur Typisierung stammte aus dem Institut für Hygiene und

Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München (Sperner, Schalch et al. 1999; Stolle, Sperner et al. 2001). Das zweite Protokoll beruhte auf einem Laborprotokoll der Abteilung für Molekulargenetik und Biochemie der Pittsburgh Universität (Collie, Mc Clane et al. 1998; Sarker, Shivers et al. 2000; Sparks, Carman et al. 2001), während es sich bei dem dritten Protokoll um das etablierte Verfahren zur Typisierung von *Staphylococcus aureus* und Enterokokken des Nationalen Referenzzentrums für Krankenhaushygiene am Institut für Hygiene der Charité (CBF) handelt. Grundlage des letztgenannten Protokolls ist die Methode von Maslow et al. (Maslow, Slutsky et al. 1993). Zur Typisierung wurden solche *C. perfringens*-Stämme verwendet, die im TPE-Labor des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene aus dem Stuhl von Patienten mit Verdacht auf AAD isoliert worden waren.

2 Material und Methoden

2.1 Methodisches Vorgehen

In der folgenden Abbildung wird der Aufbau der vorliegenden Dissertation beschrieben. Aufbauend auf der Auswahl der Bakterienisolate aus der Routinediagnostik wurden zur Etablierung eines geeigneten PFGE-Protokolls für *C. perfringens* drei unterschiedliche Protokolle angewandt und anschließend modifiziert, um die *C. perfringens*-Isolate der Charité (CBF) zu genotypisieren.

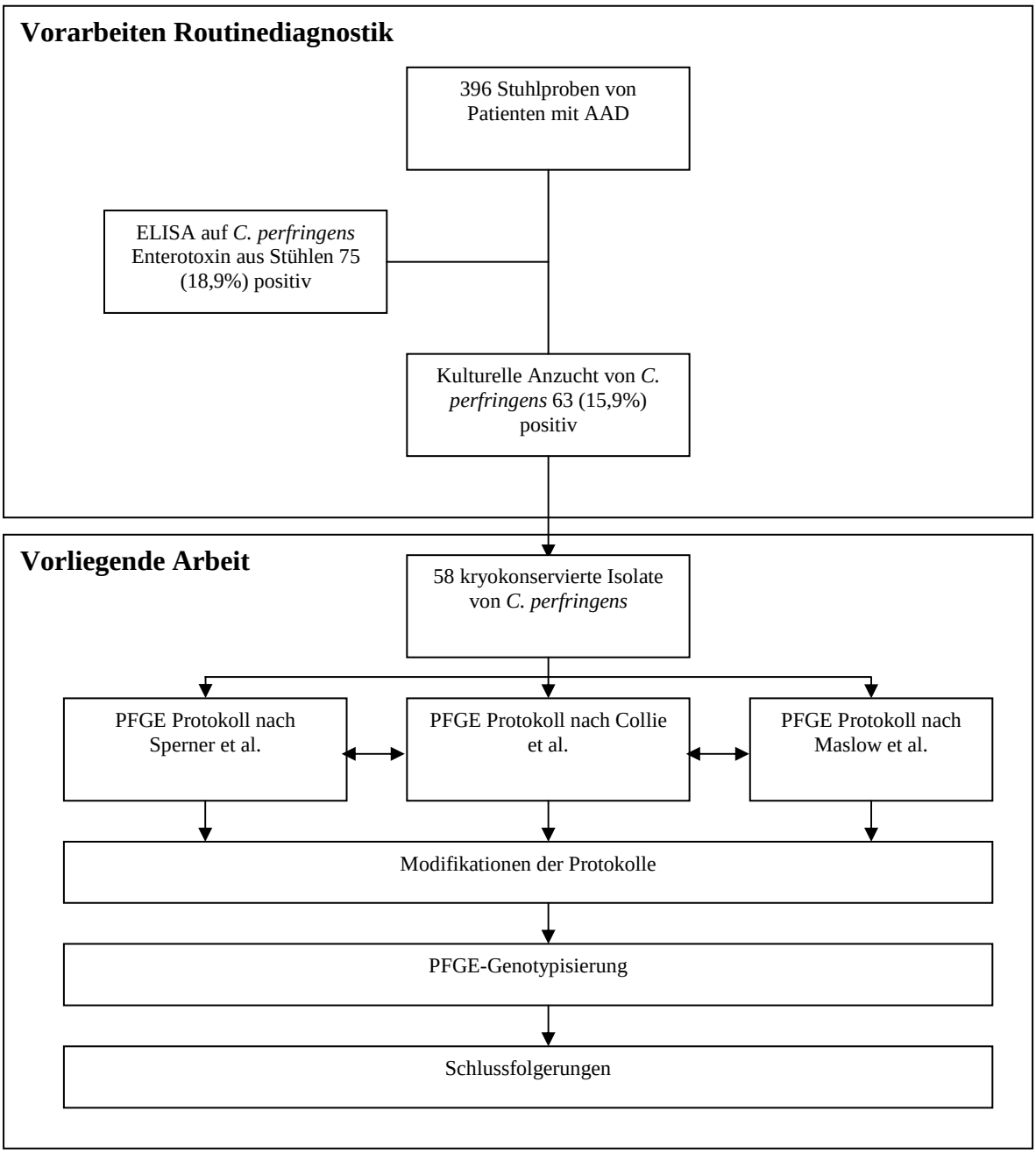


Abbildung 2-1: Fließdiagramm der durchgeführten Arbeiten

2.2 Mikroorganismen

Zum Einsatz kamen kryokonservierte Isolate von *C. perfringens*. Sie waren aus 396 Stuhlproben, die der Routinediagnostik des Institutes für Mikrobiologie und Hygiene (CBF) der Charité - Universitätsmedizin Berlin zwischen April 1989 und Mai 1999 mit der Fragestellung auf AAD zugeführt wurden, isoliert worden. In 63 (16%) der 396 Stuhlproben konnte *C. perfringens* kulturell nachgewiesen werden. Eine Übersicht über die verwendeten Isolate befindet sich im Anhang (S. 70).

2.2.1 Bakterienisolate und Kulturbedingungen

Die Bakterienisolate wurden in Cryobank™-Kulturbehältern (Mast Diagnostica, Reinfeld) bei -70°C gelagert. Nach Auftauen bei Raumtemperatur wurden die Bakterien mit einem sterilen Glasstab auf Fest- oder Flüssigmedien überführt. Als Flüssigmedien wurden Brain-Heart-Infusion (BHA, Oxoid, Art.-Nr. CM 225, Hampshire, England) oder Thioglycolat-Bouillon (Thioglycolat-Nährboden U.S.P., Oxoid, Art-Nr. CM 0173), als Festmedien ein universeller Blutnährboden (Tabelle 2) und Columbia-Schafblut-Agar (Tabelle 3) verwendet. Die Agarplatten wurden 24-48 h im Anaerobiertopf (Becton Dickinson, Heidelberg) bei 37°C bebrütet. Zur Herstellung eines anaeroben Milieus wurde eine mit 35 ml A. dest. befeuchtete Anaerocult® A-Reagenzmischung (Merck, Darmstadt) im Anaerobiertopf eingeschlossen. Zum Nachweis des anaeroben Milieus wurde ein Anaerotest-Indikator (Merck, Darmstadt) eingesetzt.

Tabelle 2: Zusammensetzung des universellen Nährbodens

Zusammensetzung	Menge
Casein-Sojamehlpepton-Agar TSA (Oxoid, Art.-Nr. CMC 131)	40 g
A. dest.	1 l
Defibriniertes, steriles Schafsblut (Oxoid, Art.-Nr. FSR 1055)	50 ml

Tabelle 3: Zusammensetzung des Columbia-Blut-Agars

Zusammensetzung	Menge
Columbia-Agar-Basis (Oxoid, Art-Nr. CM 331)	39,0 g
A. dest.	950 ml
Vitamin K	1 ml
Defibriniertes, steriles Schafsblut (Oxoid, Art.- Nr. FSR 1055)	50 ml

2.3 Pulsfeld-Gelelektrophorese

In der vorliegenden Arbeit wurde mit der CHEF-DR® III (clamped homogenous electric field) Apparatur der Firma Bio-Rad (München) gearbeitet. Hierbei sind 24 Elektroden hexagonal um das Gel angeordnet. Das elektrische Feld wird durch ein Kontrollgerät zwischen zwei einander gegenüberliegenden Elektroden angelegt. Die Richtung der elektrischen Feldvektoren ist jeweils +60° bzw. -60° gegenüber der Richtung der vertikalen Achse des Gels verschoben.

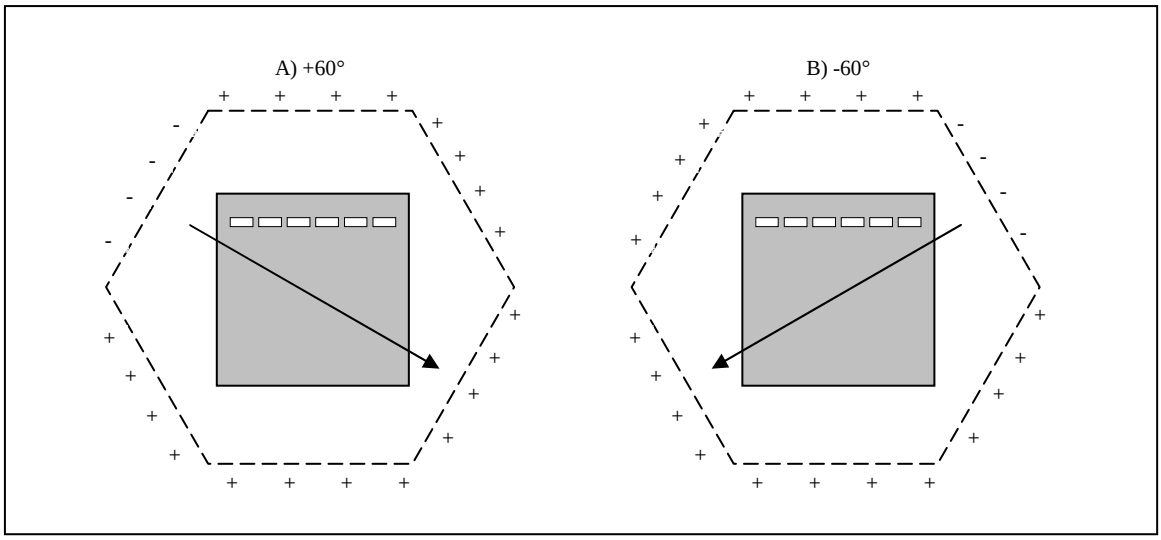


Abbildung 2-2: Spannungsverlauf des Chef-III-Systems.
Relatives Elektrodenpotential bei Aktivierung des A +60° und B – 60° Feldvektors

Das CHEF-Gerät besteht aus der Elektrophoresekammer, einer Pumpe, die den Pufferkreislauf unterhält, einer Kühleinheit und einer Steuereinheit zur Steuerung und Kontrolle der Elektroden.

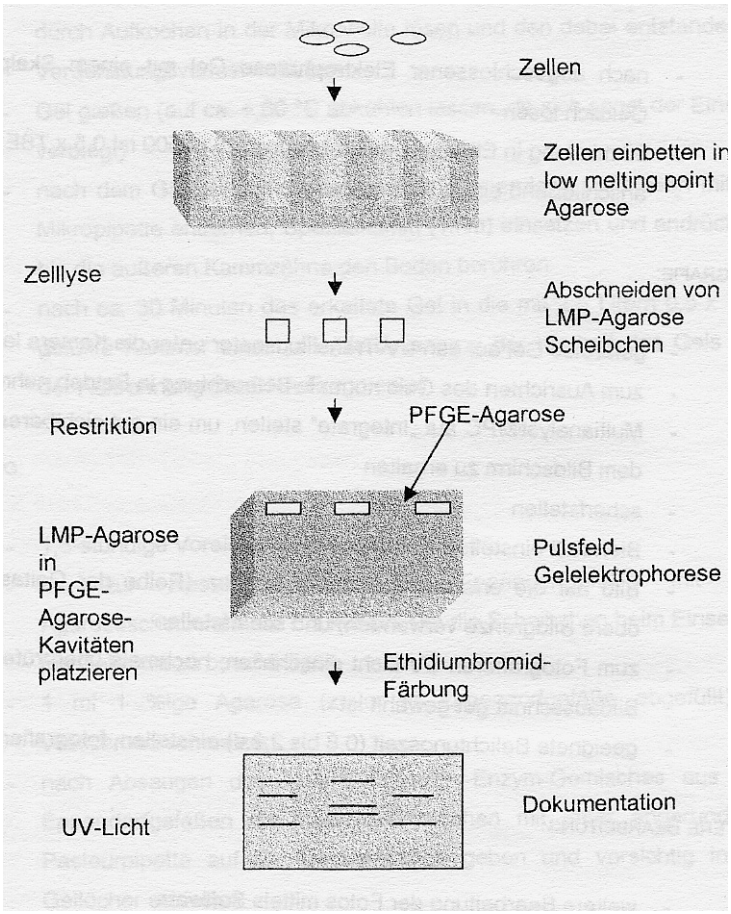


Abbildung 2-3: Schematische Darstellung der PFGE

PFGE-Protokolle

Im Folgenden werden die drei in Abschnitt 1.5 bereits genannten PFGE-Protokolle des Institutes für Hygiene und Technologie der Universität München (Protokoll nach Sperner et al.), der Abteilung für Molekulargenetik und Biochemie der Pittsburgh Universität (Protokoll nach Collie et al.) und des Institutes für Hygiene und Umweltmedizin der Berliner Charité (CBF) (Protokoll nach Maslow et al.) im Detail beschrieben.

Zur besseren Übersicht wurden die Lösungen der Protokolle jeweils in drei Teile gegliedert: Präparation der bakteriellen DNS, Restriktionsenzymverdau der Agaroseblöckchen, Pulsfeld-Gelelektrophorese

2.4 Protokoll nach Sperner et al.

2.4.1 Materialien

2.4.1.1 Lösungen

Die folgenden Lösungen wurden zur Präparation der bakteriellen DNS benötigt.

PIV-Puffer (pH 7,6)

10 mM Trisma base (Sigma, T-1503, München)	0,606 g
1 M NaCl (Merck, Nr. 6406, Darmstadt)	29,22 g
A. dest.	ad 500 ml

Lagerung bei +4°C

Low Melt Preparative Grade Agarose 2%

Agarosepulver (Bio-Rad, Nr. 162-0017*)*	2 g
PIV-Puffer	100 ml

Lysis-Puffer (pH 7,6)

6 mM Trisma Base (Sigma, T-1503)	0,073 g
1 M NaCl *(*Merck, Nr. 6404)	5,844 g
100 mM EDTA (Sigma, E-4884)	3,722 g
0,5% Brij-58 (Polyoxytethylene 20 Cetylether) (Sigma, L-5884)	0,5 g
0,2% Desoxycholsäure Natriumsalz (Roth, Nr. 3484)	0,2 g
0,5% N-Lauroyl-Sarcosine (Sigma, L-5125)	0,5 g
A. dest.	ad 100 ml

Lagerung bei + 4°C

Ribonuclease A-Stammlösung

RNAse (Sigma, R-4875)	10 mg
Steriles A. dest.	1 ml

je 70 µl in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß

Lagerung bei -20°C

Lysozym-Stammlösung

Lysozym (Sigma, L-6876)	1 g
Steriles A. dest.	20 ml

je 700 µl in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß

Lagerung bei -20°C, nur 1x auftauen

Lysostaphin- Puffer (pH 7 6)

50 mM Trisma Base (Sigma; T-1503)	0,303 g
0,15 M NaCl (Merck, Nr. 6404)	0,438 g
A. dest. 50 ml	
Lagerung bei Zimmertemperatur	

Lysostaphin-Stammlösung

Lysostaphin-Pulver (Sigma, L-4402)	7750 U
Lysostaphin-Puffer	15 ml
je 340 µl in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß	
Lagerung bei -20°C	

Mutanolysin-Stammlösung

Mutanolysin (Sigma, M-4782)	10000 U
A. dest.	14 ml
je 1 ml in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß	
Lagerung bei -20°C	

Lysis-Lösung

8 Ansätze	
RNAse-Stammlösung	70 µl
Lysozym-Stammlösung	700 µl
Lysostaphin-Stammlösung	350 µl
Mutanolysin-Stammlösung	1 ml
Lysispuffer	35 ml

Anmerkung: Die Lysis-Lösung wurde immer frisch hergestellt und Lysostaphin und RNAse wurden zuletzt hinzugefügt.

ES-Puffer (pH 8)

0,5 M EDTA (Sigma, E-4884)	93,05 g
10% N-Lauroyl-Sarcosine (Sigma, L-5125)	50 g
A. dest.	500 ml
Lagerung bei Zimmertemperatur	

Proteinase K-Stammlösung

Proteinase K (Sigma, P-2308)	50 mg
ES-Puffer	25 ml

1h bei 50°C inkubieren

Lagerung bei +4°C

ESP-Lösung

8 Ansätze

Proteinase K-Stammlösung	3,5 ml
ES-Puffer	70 ml

Anmerkung: Die Lösung sollte immer frisch hergestellt werden.

TE-Puffer (pH 7,6)

10 mM Trisma Base (Sigma, T-1503)	0,606 g
1 mM EDTA (Sigma, E-4884)	0,186 g
A. dest.	ad 500 ml

Lagerung bei Zimmertemperatur

Die folgenden Lösungen wurden zur Restriktionsenzymverdauung der Agaroseblöckchen benötigt.

Restriktionsenzym SmaI

1. Sigma, R-4503; 10 U/µl: 25°C
2. Roche, Nr. 1047639; 40 U/µl, 25°C, Grenzach-Wyhlen
3. New England BioLabs, R0141S; 20 U/µl, 25°C, Frankfurt/Main

Restriktion

Enzym	Sequenz	Schnittstelle	Sequenz
SmaI	5´…	CCC↓GGG	…3´
	3´…	GGG↑CCC	…5´

10x Restriktionspuffer (pH 7,9)

33 mM Trisacetat

66 mM Kaliumacetat

10 mM Magnesiumacetat

0,5 mM Diothiothreitol

10x Restriktionspuffer (pH 7,9)

330 mM Trisacetat

660 mM Kaliumacetat

100 mM Magnesiumacetat

5 mM Dithiothreitol

10x Restriktionspuffer

1x NE Buffer 4 (pH 7,9)

50 mM Kaliumacetat

20 mM Trisacetat

10 mM Magnesiumacetat

1 mM Dithiothreitol

Die folgenden Lösungen wurden für die Pulsfeld-Gelelektrophorese benötigt.

Laufpuffer für Elektrophorese

0,5x TBE	2 l

TBE 5x (pH 8)

446 mM Tris (Bio-Rad, Nr. 161-0716)	54 g
446 mM Borsäure (Sigma, B-6768)	27,5 g
10 mM EDTA (Sigma, E-4884)	3,72 g
A. dest.	ad 1 l

Lagerung bei Zimmertemperatur

PFGE-Gel (1%)

Pulsed Field Certified Agarose (Bio-Rad, Nr. 162-0137)	1,1 g
0,5x TBE	110 ml

Färbelösung

Ethidiumbromid-Stammlösung (Sigma, E-1510; 10 mg/ml)	25 µl
0,5x TBE	500 ml

Lagerung bei Zimmertemperatur im Dunkeln

2.4.1.2 Sonstige Materialien

Eppendorfreaktionsgefäße (Plastibrand®; Fa. Brand, Wertheim)
Brutschrank (Heraeus Electronic, Hanau)
Waage (Sartorius, Göttingen)
Magnetrührer (IKA-Combimag RCT, Staufen)
Vortex (IKA, Janke und Kunkel)
Zentrifugenröhrchen 15 ml
Zentrifuge (Heraeus Sepatech)
Zentrifuge (Eppendorf, 5415c , Hamburg)
Wasserbad (Köttermann, Uetze/Hänigsen)
Schüttler
Thermomixer (Eppendorf)
PFGE- Apparatur (Bio-Rad)
Objektträger und Deckgläschen (Menzel-Gläser, Braunschweig)
UV - Kontaktlampe (Chroma 42; Vetter GmbH, Ravensburg)
UV - Transilluminator (Reprostar II, Polaroid, LAMAG, Gotha)

2.4.2 Methode

1. Tag - Kultur der Bakterienstämme
Wie in 2.2.1 beschrieben wurden die tiefgefrorenen Bakterienisolate aufgetaut, auf eine Blutagar-Platte oder in ein Flüssigmedium inokuliert und unter anaeroben Bedingungen bei 37°C über Nacht inkubiert.

2. Tag - Zelllyse
Zur Vorbereitung wurden 15 ml Zentrifugenröhrchen und Eppendorf-Reaktionsgefäße beschriftet. 2%ige LMP-Agarose (im weiteren Verlauf als Blöckchen-Agarose bezeichnet) wurde in PIV-Puffer vollständig gelöst und bei 60°C im Wasserbad flüssig gehalten. Es wurden 0,5 ml Agarose pro Probe verwendet. Auf Blutagarplatten wurde das Wachstum der Übernacht-Kulturen beurteilt. 5 ml des kalten PIV-Puffers wurden in 15 ml Röhrchen gegossen und mit 2 ml der Übernacht-Kultur (in Flüssigmedien) gemischt und bei 1000 x g und 4°C für 15 min zentrifugiert (Zentrifuge 5415c, Eppendorf). Nach dem Dekantieren des Überschusses wurden die Sedimente mit 1 ml PIV-Puffer resuspendiert und die Röhrchen auf Eis gelegt. Die im Wasserbad warm gehaltene Agarose wurde dann mit der

Bakteriensuspension zusammengebracht: Hierbei wurde schnell gearbeitet, damit die Agarose sich nicht vorzeitig festigte. In den Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurden je 0,5 ml der Bakteriensuspension in PIV-Puffer mit je 0,5 ml der warmen Agarose vermischt, gevortext und anschließend blasenfrei in die vorgefertigten Blöckchenformen (Bio-Rad, Nr. 170-3713) pipettiert. Zum Abkühlen und Erhärten wurden die Blöckchen für 30 min in den Kühlschrank (4°C) gestellt. Während des Aushärtens der Bakterienagarose-Blöcke wurde die Lysis-Lösung hergestellt. Nachdem die Agaroseblöckchen einen gelartigen Zustand erreicht hatten, wurden sie vorsichtig aus der Blöckchenform geschoben, in 15 ml Röhrchen überführt und je 4 ml Lysis-Lösung hinzupipettiert. Die Röhrchen wurden verschlossen und auf einem Schüttler liegend bei 37°C über Nacht inkubiert.

3. Tag - Proteinverdau

Am 3. Arbeitstag wurden zunächst der ES-Puffer und die ESP-Lösung hergestellt.

Die Lysis-Lösung der Agaroseblöckchen wurde abgegossen und verworfen. Die Blöckchen wurden in 5 ml Röhrchen gegeben und mit je 2,5 ml ESP-Lösung bedeckt. Es erfolgte eine Inkubation für 2 h bei 50°C im Thermoblock oder Wasserbad. Nach Abgießen des Puffers wurde erneut ESP-Lösung dazugegeben und für 2 weitere Stunden bei 50°C inkubiert. Danach fand ein weiterer Wechsel der Lösung statt. Die Blöckchen wurden nun bei 50°C über Nacht inkubiert.

4. Tag - Waschen und Restriktion

Am 4. Arbeitstag wurde die ESP-Lösung abgegossen und die Blöckchen in neue Gefäße überführt. Anschließend wurden die nun transparenten Blöckchen zur Inaktivierung der Proteinase K viermal für je 15 min in TE-Puffer bei 37°C gewaschen.

Nach dem 4. Waschvorgang wurde der TE-Puffer abgegossen und 100 µl des Restriktionspuffers in die Gefäße gefüllt. Dieser wirkte 20 min auf die Bakterien-DNS-haltigen-Blöckchen ein, bevor er wieder vorsichtig abgesaugt wurde, um 100 µl neuen verdünnten Restriktionspuffer mit je 20 Units (U) Sma I zuzugeben. Die Blöckchen wurden nun über Nacht bei der für Sma I optimalen Temperatur von 25°C in einem Thermoblock inkubiert.

5. Tag - Pulsfeld-Gelelektrophorese

Am 5. Arbeitstag wurde zuerst das PFGE-Gel hergestellt. Dazu wurden Gelform und Kamm mit Ethanol desinfiziert. Zur Herstellung des 1%igen Gels wurde 1,1 g PFGE-Agarose in 110

ml 0,5 x TBE im Wasserbad gelöst, der dabei entstandene Verdunstungsverlust aufgefüllt und das Gel mit der entsprechenden Menge gegossen. Nach Entfernen von entstandenen Blasen im flüssigen Gel mit Hilfe einer Mikropipette wurde der Spezialkamm eingesetzt. Überschüssige Agarose wurde bei 58°C aufbewahrt. Nach 10 min wurde das Gel zum weiteren Erhärten für 30-45 min in den Kühlschrank gestellt und dann der Kamm entfernt. In der Zwischenzeit wurde das CHEF-Gerät vorbereitet und ca. 2 l 0,5 x TBE in die Kammer gefüllt. Die Kühlung der Elektrophorese wurde auf 8°C gestellt und gestartet, da die Temperatur in der Kammer maximal 13-16°C betragen sollte. Nach vorsichtigem Abpipettieren des Restriktionspuffer-Enzym-Gemisches aus den Eppendorfküvetten wurden die Blöckchen auf ein Deckgläschen gekippt und mit einem Skalpell in ca. 3 x 4 mm große Rechtecke geschnitten. Anschließend wurden sie in die ausgestanzten Löcher im Gel geschoben. Das mittlere und die beiden äußeren Gellöcher wurden mit einem Molekulargewichtsmarker (*Saccharomyces cerevisiae*, Bio-Rad, Nr. 170-3605) oder Lambda ladder (Bio-Rad, Nr. 170-3635) versehen. Die restliche Agarose wurde über die Blöckchen pipettiert, um ihr Wegschwimmen zu verhindern. Nachdem die Agarose erstarrt war, wurde das Gel in die Kammer mit dem Laufpuffer gelegt, das entsprechende Programm eingestellt und der Lauf über Nacht gestartet.

6. Tag - Auswertung

Nach Abschluss des Laufes wurde das Gel aus der Kammer entnommen und für ca. 1 h in Ethidiumbromid-Lösung gefärbt. Anschließend wurde es für einige Minuten bis Stunden gewässert. Zur Visualisierung wurde das gefärbte Gel unter einem UV-Transilluminator (bei 320 nm) fotografiert. Zum Abschluss wurde die Elektrophoresekammer gereinigt, indem bei angeschalteter Pumpe der Puffer aus dem Kreislauf gepumpt und die Kammer großzügig mit A. dest. gespült.

2.5 Protokoll nach Collie et al.

2.5.1 Materialien

2.5.1.1 Lösungen

Die folgenden Lösungen wurden zur Präparation der bakteriellen DNS benötigt.

TES-Puffer (200 ml)

1 M Tris (pH 8); (Bio-Rad, Nr. 161-0716)	2,5 ml
0,5 M EDTA (pH 8); (Sigma, E -4884)	2,5 ml
5 M NaCl (Merck, Nr. 6404)	50 µl
A. dest.	195 ml

Lysis-Lösung (15 ml)

1 M Tris (pH 8); (Bio-Rad; Nr. 161-0716)	90 µl
5 M NaCl (Merck, Nr. 6404)	3 ml
0,5 M EDTA (Sigma; E-4884)	3 ml
10% N-Lauroyl-Sarcosine (Sigma, L-5777)	750 µl
Lysozym (Sigma, L-6876)	15 mg
A. dest.	8,2 ml

ESP-Lösung (11, 5 ml)

0,5 M EDTA (pH 8); (Sigma, E-4884)	10 ml
10% N-Lauroyl-Sarcosine (Sigma, L-5777)	500 µl
20 mg/ml Proteinase K (Quiagen®, Nr. 19133, Hilden)	500 µl

Die folgenden Lösungen wurden zur Restriktionsenzymverdauung der Agaroseblöckchen benötigt.

TE-Puffer

10 mM Tris (pH 8)

1mM EDTA (pH 8)

Restriktionspuffer zu SmaI (New England BioLabs, Nr. 1047639, Frankfurt/Main)

1x NEBuffer 4 (pH 7,9)

50 mM Kaliumacetat

20 mM Trisacetat

10 mM Magnesiumazetat

1 mM DTT

Restriktion

Ohne Enzym	Pro Probe	Mit Enzym

20 µl	Restriktionspuffer 10 x	20 µl
180 µl	A. dest.	180 µl
	Sma I	5 µl

Die folgenden Lösungen wurden für die Pulsfeld-Gelelektrophorese benötigt.

1% PFGE-Agarose

PFGE-Agarose (Bio-Rad, Nr. 162-0137)	1,5 g
1x TBE	150 ml

Laufpuffer

0,5x TBE	1,5 – 2 l

Ethidiumbromid-Färbelösung

Ethidiumbromid (Sigma, E-1510)	30 µl
A. dest.	300 ml

2.5.1.2 Sonstige Materialien

Zur Modifikation des Protokolls:

37% Formaldehyd (Sigma, F-47068)

Phenylmethylsulfonyl Flouride (PMSF, Sigma, P-7626)

Rinderserum

Magnesiumacetat

2.5.2 Methode

1. Tag - Kultur anlegen

Die tiefgefrorenen Bakterienisolate wurden in 10 ml Thioglycolat inokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2. Tag - Zelllyse

Am 2. Arbeitstag wurden 1,5 ml der Thioglycolat-Kultur-Lösung bei 13000 rpm für 5 min zentrifugiert. Nachdem der Überschuss abgegossen war, wurden 2 Pellets dreimal in 500 µl 1x TES gewaschen: Hierfür wurden diese in TES resuspendiert und bei 13000 rpm erneut für je 5 min zentrifugiert. Nach dem dritten Waschvorgang wurde der Überschuss abgegossen und der Bodensatz in 500 µl 50 mM Tris und 10 mM EDTA resuspendiert.
Zur Herstellung der 2%igen Agarose für die Blöckchen wurde die Agarose in TES-Puffer bei 68°C eine Stunde lang verflüssigt. 500 µl des Bakterien-Puffer-Gemisches wurden daraufhin für 1-2 min bei 68°C erwärmt, um es dann mit der Agarose gut zu vermischen. Diese Mischung wurde zügig in die Gelblockformen pipettiert und nach Erstarren der Blöckchen in Lysis-Lösung (4 Scheibchen in 5 ml Lösung) bei 37°C über Nacht inkubiert.

3. Tag - Proteinverdau

Am 3. Arbeitstag wurden die Gelblöcke in 5 ml Röhrchen überführt und mit je 3 ml ESP-Lösung bedeckt. Es erfolgte eine Inkubation bei 50°C für 48 h.

4. Tag - Waschen der Blöckchen und Restriktion

Am 4. Arbeitstag wurden die Blöckchen in 5 ml Röhrchen überführt und mit 5 ml einer Lösung aus 10 mM Tris- und 1 mM EDTA-Lösung bedeckt. Anschließend wurden die Blöckchen in geeignete Größen geschnitten und Eppendorf-Reaktionsgefäße vorbereitet. Darin wurden die Gelblöckchen dreimal für je 1-2 h in 1000 µl TE-Puffer gewaschen. Nach dem dritten Waschvorgang wurde der Puffer abgegossen und die Blöcke in neuen Reaktionsgefäßen für 2 h bei 20 µl 10x Restriktionspuffer und 180 µl A. dest bei 25°C (Verdauungstemperatur von Sma I) inkubiert. Danach wurde der Puffer durch 200 µl neuen Restriktionspuffer und 5 µl Restriktionsenzym (SmaI) ersetzt. Die Blöckchen wurden über Nacht bei 25°C inkubiert.

5. Tag - Pulsfeld-Gelelektrophorese

Am 5. Arbeitstag wurde ein 1%iges PFGE-Gel mit Stanzlöchern hergestellt. Nachdem dieses erstarrt war, wurden die Blöckchen in die Formen des Gels geschoben. Das mittlere und die äußeren Gellöcher wurden auch hier mit Molekulargewichtsmarkern der Firma Bio-Rad versehen (siehe Protokoll Nach Sperner et al. 5. Arbeitstag). Die Gellöcher wurden anschließend mit warmer 0,5x PFGE-Agarose verschlossen, indem diese tropfenweise auf die Blöckchen pipettiert wurde. Das Gel wurde dann in die mit 2 l 0,5x TBE gefüllte und

gekühlte (13-16°C) Kammer gelegt. Die Kammer wurde verschlossen, das entsprechende Programm eingestellt und der Lauf gestartet.

Das Protokoll für *C. perfringens* umfasste die folgenden Bedingungen:

	C. perfringens PFGE
Anfangsumschaltzeit	5 s
Endumschaltzeit	120 s
Laufzeit	46 h
Spannungsgradient	4,5 V/cm
Max. Stromfluss	0,2 A

6. Tag - Auswertung

Am 6. Arbeitstag wurde das Gel nach Abschluss des Laufes der Kammer entnommen und für 20 min in Ethidiumbromid gefärbt. Anschließend wurde es für etwa 1 h in A. dest. entfärbt. Die Auswertung und Visualisierung erfolgte, wie im Protokoll Nach Sperner et al. (6. Tag) beschrieben, mit Hilfe des UV-Transilluminators und einer Fotokamera.

2.6 Protokoll nach Maslow et al.

2.6.1 Materialien

2.6.1.1 Lösungen

Die folgenden Lösungen wurden zur Präparation der bakteriellen DNS benötigt.

PIV-Puffer (pH 8)

10 mM Tris-HCL (pH 8); (Tris base: Calbid; Nr. 648310)	500 µl
1 M NaCl (Merck, Nr. 6404)	20 ml
A. dest.	ad 100 ml

Low Melting Point Agarose für 100 Proben

LMP-Agarose (Sigma, A 9414-50G)	72 mg
PIV-Puffer	6 ml

Lösen im Wasserbad bei 100°C

Lysislösung (pH 8) 50 ml

A. dest	30 ml
6 mM Tris-HCL (pH 8)	150 µl
1 M NaCl (Merck, Nr. 6404)	10 ml
100 mM EDTA; (Chelaplex II; Merck; Nr. 1.08417.0250) pH 8	10 ml
0,2% Na-Desoxycholat (Merck, Nr. 1.06504)	100 mg
0,5% Na-Lauroyl-Sarkosin (Sigma, L-9150)	250 mg
0,5% Brij 58 (Sigma, P-5884)	250 mg

Lysostaphin-Stammlösung

Lysostaphin (Sigma; L-4402)	2 mg
A. dest.	400 µl

Lagerung bei -20°C

Es wurden 11 µl Lysostaphin-Stammlösung/Probe benötigt.

ES-Puffer (pH 9) für 60 Proben

0,5 M EDTA (Chelaplex II; Merck; Nr. 1.08417.0250)	35,07 g
A. dest.	240 ml

Mit NaOH auf pH 9 einstellen

1 % N-Lauroyl-Sarcosine (Sigma, L-9150)	2400 mg

Proteinase K-Lösung/Probe

Proteinase K (Sigma, P 6556)	1 mg
ES-Puffer	1 ml

TE-Puffer (pH 7,5) für 15 Proben

10 mM Tris-HCl	3,75 ml
1 mM Na_2-EDTA (Chelaplex III; Merck, Nr. 8431)	1,5 ml
A. dest.	750 ml

Die folgenden Lösungen wurden zur Restriktionsenzymverdauung der Agaroseblöckchen benötigt.

Restriktionsenzym

Sma I (Roche, Nr. 1047639, Grenzach Wyhlen) 40 U/ µl

Ohne Enzym	Für 15 Proben	Mit Enzym
765 µl	Restriktionsenzym-Puffer	714 µl
85 µl	Aqua dest.	85 µl
	Sma I	51 µl
50 µl	**Je Probe**	**50 µl**

Die folgenden Lösungen wurden für die Pulsfeld-Gelelektrophorese benötigt.

10x TBE

Tris (Bio-Rad, Nr. 161-0716)	121,1 g
Borsäure (Serva, Nr. 15165, Heidelberg)	61,8 g
EDTA (Sigma, Nr. 59#03591)	3,7 g
A. dest.	ad 1 l

Bei 4°C kalt stellen

1x PFGE-Gele

Reagenzien	Kleines Gel (10 Schlitze)	Großes Gel (30 Schlitze)
PFGE-Agarose (LMP-Agarose)	800 mg	1200 mg
1x TBE	80 ml	120 ml

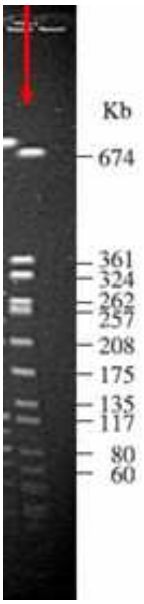
Die flüssige Agarose wurde im Wasserbad bei 58°C aufbewahrt.

Laufpuffer

10x TBE	100 ml
A.dest.	900 ml

Referenzstamm: Multiresistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) 8325 (NCTC)

(Restriktionsenzym SmaI)



Ethidiumbromid Lösung

Ethidiumbromid-Stammlösung (Plus one; Nr. 17-1328-01; 10 mg/ml, Dübendorf, Schweiz)	500 µl
1x TBE	1000 ml

Achtung: Ethidiumbromid ist ein Mutagen.

2.6.1.2 Sonstige Materialien

BioPhotometer (Eppendorf; 8.5 mm)
Magnetrührer (Heidolph; MR 2002, Kelheim)
Zentrifuge (Eppendorf, 5417 R)
Kamera (Bio-Rad; Gel Doc™2000)

Zur Modifikation des Protokolls:
37% Formaldehyd (Sigma, F-47608)

2.6.2 Methode

1. Tag - Wie in 2.2.1 beschrieben, wurden die kryokonservierten Isolate aufgetaut und für 24-48 h auf den entsprechenden Nährböden inkubiert.

2. Tag - Zelllyse

Für jede Übernachtkultur wurde 1 ml A. dest. in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 ml) gegeben. Von der Blutagarplatte wurden 10-20 Kolonien mit einem sterilen Glasstab in A. dest. überführt, bis sich eine gleichmäßig starke Trübung ergab. Anschließend wurde das Gemisch bei 9000 U/min für 5 min zentrifugiert (Zentrifuge 5417R, Eppendorf) und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 1 ml PIV-Lösung suspendiert, gevortext, erneut zentrifugiert (s.o.) und der Überstand abgegossen. Das Pellet wurde in 1 ml PIV-Lösung resuspendiert.

Anschließend wurde die optische Dichte (OD) (BioPhotometer, Eppendorf) bestimmt und mit PIV-Puffer auf einen Wert zwischen 0,9 und 1,2 eingestellt. Zum Gießen der Agaroseblöckchen wurde zunächst die Low-Melting-Point-Agarose (LMP-Agarose) in PIV-Lösung bei 100°C im Wasserbad gelöst. Je Isolat wurden 125 µl Agarose mit 125 µl Keimsuspension gemischt und in vorgefertigte Blockgießformen pipettiert. Die Blöckchen härteten bei -20°C für 5 min und für weitere 30 min bei 4°C aus. Anschließend wurden die Agaroseblöckchen in Eppendorfgefäße überführt. Für die Lysislösung wurde je Probe 1 mg Lysozym (Sigma, L-6876) mit 1 ml Lysispuffer für ca. 10 min gemischt und kurz vor Gebrauch 10 µl/ml Lysostaphin (Sigma; L-4402) zugefügt. Die Blöckchen mit je 1 ml Lysislösung wurden über Nacht bei 37°C inkubiert (Thermomixer, 5436, Eppendorf).

3. Tag - Proteinverdau

Am 3. Arbeitstag wurde die Lysislösung unter Bewahrung der Blöckchen in den Eppendorfgefäßen abgegossen und durch 1 ml ES-Puffer ersetzt. Nach 10 min wurde dieser entfernt und neuer ES-Puffer (1 ml) zugefügt. Nach weiteren 10 min wurde auch dieser entfernt und durch 1 ml Proteinase K-Lösung ersetzt. Die Proben wurden nun über Nacht bei 50°C inkubiert.

4. Tag - Spaltung der DNS durch das Restriktionsenzym SmaI

Am 4. Arbeitstag wurde die Proteinase K-Lösung abgegossen, die Scheibchen in Reagenzgläser überführt und dreimal für je 1 h in 14 ml TE-Puffer gewaschen. Nach dem Abgießen des Puffers wurden die Blöckchen in neuen Eppendorf-Reaktionsgefäßen für 30 min mit je 1 ml Äquilibrierungspuffer bedeckt. Dieser Puffer wurde vollständig entfernt. 50 µl verdünnter Restriktionsenzympuffer (1x) wurde den Blöckchen vorerst ohne Enzym hinzugefügt. Anschließend wurden die Blöckchen bei 4°C 45 min inkubiert. Nach Entfernen des Puffers wurden jeder Probe 50 µl der Restrktionsenzym-Lösung SmaI zugefügt, bei 4°C

für 45 min und anschließend im Thermomixer bei 25°C über Nacht inkubiert. Für den nächsten Tag wurde ein 1%iges PFGE-Gel vorbereitet, das über Nacht bei 4°C gelagert wurde.

5. Tag - Pulsfeld-Gelelektrophorese

Am 5. Tag wurde der Restriktionspuffer mit Enzym entfernt und die Blöckchen in 3 x 4 mm große Quadrate geschnitten. Der molekulare Größenstandard (MRSA 8325-NCTC) wurde in die äußeren und in die mittlere Spur des PFGE-Gels eingeführt. Die anderen Slots wurden mit den Proben befüllt und anschließend mit flüssiger Agarose verschlossen. Das Gel wurde zum Erhärten der restlichen Agarose für 15 min im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

Die PFGE-Kammer wurde mit ca. 2 l Laufpuffer (1x TBE) gefüllt und das Kühlgerät für den Puffer auf 14°C eingestellt und gestartet. Bei Erreichen der gewünschten Temperatur wurde das ausgehärtete Gel in die PFGE-Kammer gelegt und diese verschlossen. Anschließend wurde die Pumpe auf 60-70 eingestellt (was ungefähr einer Pumpgeschwindigkeit von 0,75 l/min entspricht) und das CHEF III-Hauptgerät (Bio-Rad, München) gestartet.

6. Tag - Dokumentation

Nach Beendigung des Laufes wurde das PFGE-Gel für 30 min in der Ethidiumbromid-Lösung gefärbt. Anschließend wurde es für 1 h in A. dest. gewässert. Zur Dokumentation wurde das Gel fotografiert (Gel Doc^{TM}2000, Bio-Rad, München) und visuell nach den Tenover-Kriterien (Tenover, Arbeit et al. 1995) oder EDV-gestützt mit Hilfe der Quantity one Software der Firma Bio-Rad und dem Gel Doc 2000-System ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Adaptation des Protokolls nach Sperner et al.

Erste Versuche zur Etablierung eines PFGE-Protokolls zur Identifikation und Typisierung von *C. perfringens* wurden nach dem Protokoll von Sperner et al. gemacht.

3.1.1 Inkubation der Bakterien

Auf dem universellen Blutagar zeigten *C. perfringens*-Stämme typisches Wachstum mit 2-3 mm großen, grau-gelben und glänzenden Kolonien, die von einem aus zwei Zonen bestehenden Hämolysehof umgeben waren. Die Thioglykolatbouillon wies nach der Übernacht-Inkubation der Bakterien eine deutliche für Anaerobier charakteristische Trübung des Mediums in der Tiefe auf.

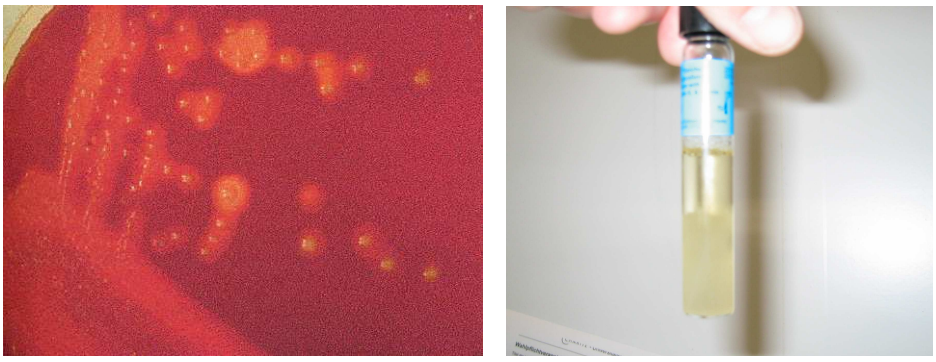


Abbildung 3-1: Wachstum von *C. perfringens* nach 24 h Bebrütung bei 37°C
a) auf universellem Blutagar, b) in Thioglykolatbouillon

3.1.2 Durchführung des Protokolls

Im ersten Ansatz waren bei Durchführung der PFGE wie im Protokoll nach Sperner et al. beschrieben im UV-Licht DNS-Banden nur an solchen Stellen erkennbar, an denen die Blöckchen mit bakterieller DNS in das Gel eingesetzt worden waren (Abb. 3-2). Jedoch kam es zu keiner deutlichen Trennung der Fragmente; die DNS war lediglich als blasser Schmier unterhalb der Ausgangsbande im Gel erkennbar.

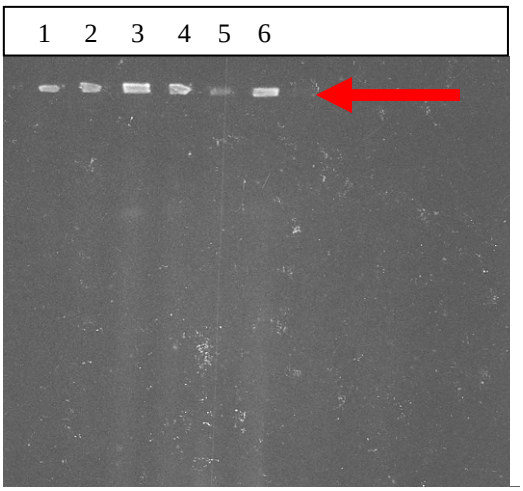


Abbildung 3-2: 1. PFGE nach dem Protokoll von Sperner et al.
PFGE-Bandenmuster von SmaI verdauter DNS von *C. perfringens*-Isolaten. Die DNS wurde nach den Angaben des Protokolls nach Sperner et al. aufbereitet. Elektrophoreseparameter: 1%iges Agarosegel in 0,5% TBE, 6 V/cm, Winkel 120°, Pulszeit: 5-30 s, Laufzeit: 23 h. Banden 1, 2 und 3: CPE+ Kontrollen (Erfurt); Banden 4 und 5: Isolat-Nr. 49, Bande 6: Isolat-Nr. 528 (s. Anhang 8.1). Der Pfeil weist auf die DNS an der Stelle hin, an der die bakterielle DNS in das Gel eingelassen worden war.

In einem separaten Gel wurden *C. perfringens*-DNS-Blöckchen (gleiche Charge wie oben) und unterschiedliche Molekulargewichtsmarker (*S. cerevisiae* (S), lambda ladder (L), Bio-Rad, München) mitgeführt (Abb. 3-3). Die *C. perfringens*-DNS liess sich wiederum nur als Bande in dem Bereich, in dem die Blöckchen ins Gel eingesetzt worden waren, nachweisen, ohne dass eine weitere Auftrennung in Fragmente erkennbar war. Für die Molekulargewichtsmarker *S. cerevisiae* und lambda ladder war nur eine Auftrennung im hochmolekularen Bereich nachweisbar (Abb. 3-3).

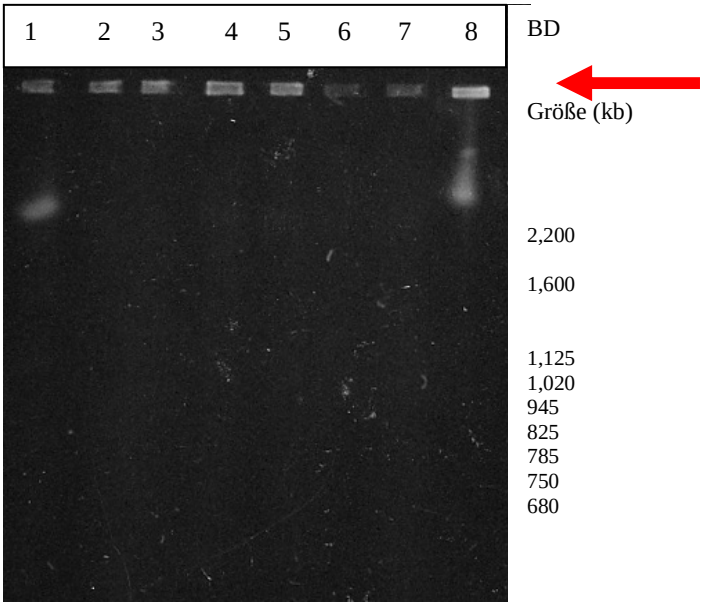


Abbildung 3-3: 2. PFGE nach dem Protokoll von Sperner et al.
PFGE-Bandenmuster von SmaI verdauter DNS von *C. perfringens*-Isolaten. Die DNS wurde nach den Angaben des Protokolls nach Sperner et al. aufbereitet. Elektrophoreseparameter: 1%iges Agarosegel in 0,5% TBE, 6 V/cm, Winkel 120°, Pulszeit: 5-30 s, Laufzeit: 23 h. Bande 1: Molekulargewichtsmarker *Saccharomyces cerevisiae*, Stamm YNN295, Bande 8: Größenstandard Lambda Ladder für PFGE, Bande 2 und 3: CPE+ Kontrollen aus Erfurt, Bande 4: Isolat-Nr. 49, Bande 5, 6 und 7: Isolat-Nr. 528 (s. Anhang 8.1). Der Pfeil weist auf die DNS an der Stelle hin, an der die bakterielle DNS in das Gel eingelassen worden war.

Aufgrund der negativen Ergebnisse wurde entschieden, einzelne Teile des Protokolls, wie in den folgenden Kapiteln beschrieben, zu modifizieren. Aufbauend auf den Vorschlägen des Protokolls nach Maslow et al. und der internationalen Literatur wurden mehrere Fragen formuliert, deren Untersuchungsergebnisse zu Modifikationen der Protokolle führten, um die erfolgreiche Genotypisierung der *C. perfringens*-Isolate mittels PFGE sicherzustellen.

3.1.3 Modifikation der bakteriellen Aufbereitung

Fragestellung 1: Ist die fehlende Auftrennung der C. perfringens-DNS auf eine fehlerhafte bakterielle Aufbereitung zurückzuführen?

Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurden die Bakterien im Institut für Hygiene der Charité nach den dortigen Standards (Anleitung s. 2.6.2, Tag 2) aufbereitet. Die Ergebnisse zeigten zunächst ein gutes Wachstum von *C. perfringen*s auf dem Blutagar. Jedoch wurden in der PFGE erneut die *C. perfringens*-DNS-Banden bis auf eine Ausnahme nicht in Fragmente gespalten. Bei dem Bakterienisolat Nr. 10 (Abb. 3-4, Spur 2, roter Pfeil) waren schwache Banden zwischen 600 und 1100 kb sichtbar. Nur die internen Standards des Hygiene-Institutes (Referenzstamm MRSA 8325 (NCTC), Spuren 1 und 13) wurden über die gesamte Länge in Fragmente aufgetrennt. Die Darstellung der DNS-Fragmente konnte durch

Verwendung der Quantity one Software der Firma Bio-Rad und dem Gel Doc ™2000-System gegenüber dem Foto mit der herkömmlichen Polaroidkamera deutlich verbessert werden (Abb. 3-4 und Abb. 3-5).

Auf Basis der Untersuchungsergebnisse konnte die Frage nicht beantwortet werden. Die veränderte Aufarbeitung der DNS konnte lediglich bei einem einzigen Bakterienstamm eine leichte Verbesserung der Fragmentierung herbeiführen, so dass die fehlende Auftrennung nicht durch eine mangelhafte Aufarbeitung der bakteriellen DNS erklärbar ist.

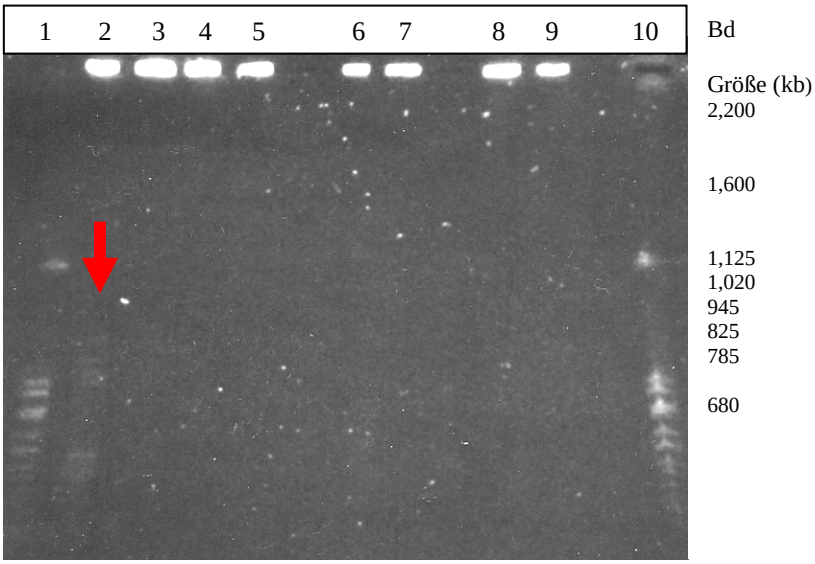


Abbildung 3-4: PFGE mit modifizierter bakterieller Aufbereitung
PFGE-Bandenmuster von SmaI verdauter DNS von *C. perfringens*-Isolaten. Einfluss der Bakterienaufbereitung nach den Angaben des Protokolls nach Maslow et al. (s. 2.6.2) und anschließender weiterer Aufbereitung nach dem Protokoll von Sperner et al. Elektrophoreseparameter: 1%iges Agarosegel in 0,5% TBE, 6 V/cm, Winkel 120°, Pulszeit: 5- 30 s, Laufzeit: 23 h. Banden 1 und 10: Referenzstamm MRSA 8325; Banden 2, 8 und 9: Isolat-Nr. 10, Banden 3 und 4: Isolat-Nr. 51, Bande 5 und 7: Isolat-Nr. 143, Bande 6: CPE+ Kontrolle aus Erfurt (s. Anhang 8.1). PFGE-Bandenmuster dargestellt mit der Quantity one Software und dem Gel DocTM 2000 System. Der rote Pfeil weist auf die DNS-Fragmente des Isolats Nr. 10 zwischen 1100 und 700 kb hin.

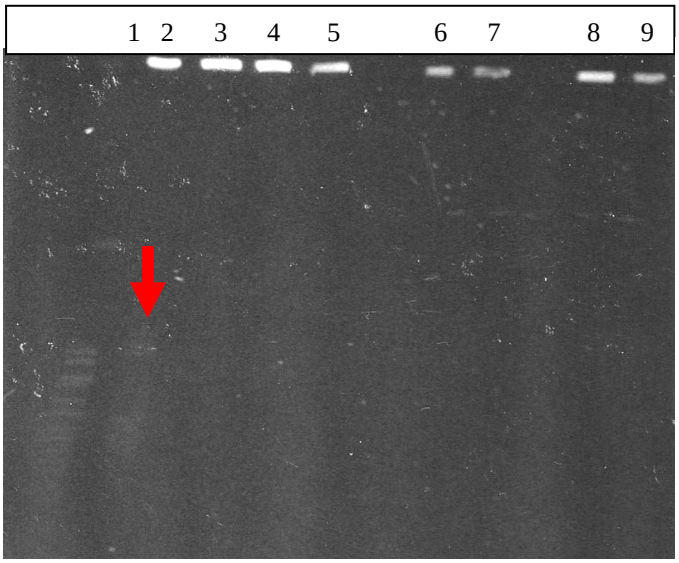


Abbildung 3-5: Vergleichende Darstellung der PFGE aus Abb. 3-4 mittels Polaroidfoto
PFGE-Bandenmuster von SmaI verdauter DNS von *C. perfringens*-Isolaten. Einfluss der Bakterienaufbereitung nach den Angaben des Protokolls nach Maslow et al. (s. 2.6.2) und anschließender weiterer Aufbereitung nach dem Protokoll von Sperner et al. Elektrophoreseparameter: 1%iges Agarosegel in 0,5% TBE, 6 V/cm, Winkel 120°, Pulszeit: 5-30 s, Laufzeit: 23 h. Bande 1: Referenzstamm MRSA 8325; Banden 2, 8 und 9: Isolat-Nr. 10, Banden 3 und 4: Isolat-Nr. 51, Banden 5 und 7: Isolat-Nr. 143, Bande 6: CPE+ Kontrolle aus Erfurt (s. Anhang 8.1). PFGE-Bandenmuster fotographiert mittels Polaroidkamera. Der rote Pfeil weist auf die DNS-Fragmente des Isolats Nr. 10 zwischen 1100 und 700 kb hin.

3.1.4 Veränderungen der Lysisenzyme

Fragestellung 2: Beruht die mangelnde Auftrennung der C. perfringens-Banden auf einer ungenügenden Zelllysis durch eine inadäquate Zusammensetzung der Lysislösung?

Zu Beantwortung der Frage wurde die Lysislösung ohne Mutanolysin angesetzt. Die Veränderung der Lysis-Lösung führte nicht zu Verbesserungen (Abb. 3-6). Die DNS-Banden waren wiederum nur an den Stellen im UV-Licht nachweisbar, an denen die Blöckchen in das Gel gesetzt worden waren. Nur das Isolat Nr. 143 (Abb. 3-6, Spuren 3, 6, 10, 13) zeigte unabhängig von den verwendeten Lysisenzymen Schlieren unterhalb der Banden; alle anderen Isolate zeigten keine Auftrennung.

Fragestellung 3: Führen Inaktivitäten der Lysisenzyme zu ungenügender Lysis der Zellen?

Um auszuschließen, dass die Inaktivierung des Lysisenzyms die fehlende Auftrennung verursacht, wurden innerhalb eines Ansatzes eine Hälfte der *C. perfringens*-Blöckchen im eigenen Labor, die andere Hälfte im Hygienelabor nach dem dortigen Protokoll (Anleitung 2.6.1.1) lysiert. Die Lysis-Lösung, die im Hygienelabor verwendet wurde, wurde in doppelter Menge hergestellt, um sie parallel für Untersuchungen der Hygieneabteilung zur Typisierung

von *Staphylococcus aureus* mittels PFGE zu benutzen und auf diese Weise die Enzymaktivität zu kontrollieren.

Während mit der o.g. Lysislösung erfolgreich die DNS von *Staphylococcus aureus*-Isolaten aufgetrennt werden konnte, konnte die DNS von *C. perfringen*s auch in diesem Versuch mittels PFGE nicht erfolgreich aufgetrennt werden. Die Inaktivierung des Lysispuffers ist somit nicht für die fehlende Auftrennung der DNS von *C. perfringen*s verantwortlich.

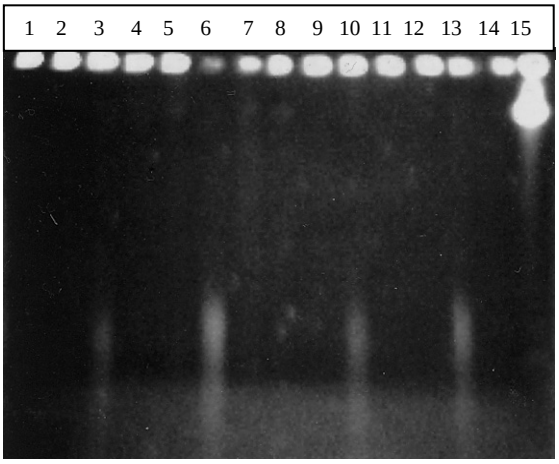


Abbildung 3-6: PFGE mit modifiziertem Zelllysis-Puffer
PFGE-Bandenmuster von SmaI verdauter DNS von *C. perfringens*-Isolaten. Die DNS wurde nach den Angaben des Protokolls nach Sperner et al. aufbereitet. Zelllyse der Banden 1-8 erfolgte nach den Vorgaben des Protokolls nach Maslow et al. nur mit Lysostaphin und Lysozym. Elektrophoreseparameter: 1%iges Agarosegel in 0,5% TBE, 6 V/cm, Winkel 120°, Pulszeit: 5- 30 s, Laufzeit: 23 h. Banden 1 und 8: Referenzstamm MRSA 8325, Banden 2, 5, 9 und 12: Isolat-Nr. 49, Banden 3, 6, 10 und 13: Isolat-Nr. 143, Banden 4, 7, 11 und 14: CPE+ Kontrollen aus Erfurt, Bande 15: Lambda ladder für PFGE (BioRad). Die Blöckchen wurden vor der Restriktionsverdauung mehrmals geteilt, so dass für jedes Isolat mehrere, unter den gleichen Bedingungen hergestellte Blöckchen, die PFGE durchliefen.

3.1.5 Optimierung der Proteinase K-Konzentration und Inkubationszeit

Fragestellung 4: Kann die Proteinase K in zu hoher Konzentration oder bei erhöhter Wirkdauer die DNS zerstören?

Die Proteinase K-Konzentration wurde von 1 auf 0,1 mg/ml im Puffer verringert und zusätzlich wurde der Proteinverdau von 12 h auf 6 h verkürzt. Unabhängig von der Konzentration der Proteinase K-Lösung und der Dauer der Inkubation zeigten sich erneut nur Banden im Bereich der Stanzlöcher des PFGE-Gels. Eine Fragmentierung der DNS-Banden war jedoch nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Somit ist auch die Proteinase K-Konzentration und -Inkubationsdauer nicht Ursache der fehlenden Auftrennung der DNS von *C. perfringens*.

3.1.6 Veränderung des Waschvorgangs

Fragestellung 5: Ist das ungenügende Waschen der DNS-Blöckchen in TE-Puffer die Ursache der mangelnden Aufspaltung der C. perfringens-DNS in Fragmente?

Nach den Vorgaben des Protokolls nach Maslow et al. (s. Anleitung 2.6.2, 4. Tag) wurde die Waschzeit in TE-Puffer verdreifacht und die Menge des Puffers pro Block von 1 auf 14 ml erhöht.

Die veränderte Waschzeit in Verbindung mit einer erhöhten Puffermenge zeigte jedoch ebenfalls keinen Einfluss auf das Auftrennungsverhalten der *C. perfringens*-DNS (Daten nicht gezeigt). Somit ist die Dauer des Waschvorgangs und die Puffermenge nicht der Grund der fehlenden Auftrennung der Erreger-DNS.

3.1.7 Veränderungen des Restriktionsenzymverdaus

3.1.7.1 Modifikation der SmaI-Konzentration

Fragestellung 6: Die Konzentration des Restriktionsenzyms kann je nach bakterieller Aufbereitung und Größe des Blöckchens unterschiedlich sein. Ist diese Konzentration abhängig von der Menge der zu verdauenden DNS?

Die SmaI-Konzentration von 20 U/Blöckchen wurde auf 80 bzw. 200 U SmaI/Blöckchen erhöht. Das Hygiene-Labor verwendete SmaI der Firma Roche. In den anderen Versuchen wurde SmaI der Firmen Sigma oder New England BioLabs (s. 2.4.1.1) angewandt. Eine Erhöhung der Restriktionsenzym-Konzentration führte jedoch nicht zur Auftrennung der DNS-Banden in einzelne Fragmente (Daten nicht gezeigt). Somit kann die fehlende Auftrennung der Erreger-DNS nicht durch eine zu geringe Konzentration des SmaI-Enzyms erklärt werden.

3.1.7.2 Stoppen der SmaI-Wirkung

Fragestellung 7: Wird für die optimale Wirkung des Restriktionsenzyms SmaI eine Stopp-Reaktion benötigt?

Um die Wirkung der Stopp-Reaktion zu überprüfen, wurde die Restriktionsreaktion entweder durch Zugabe von ESP-Lösung gestoppt oder ohne Stopp-Puffer belassen. Durch die Stopp-Reaktion konnte jedoch keine Verbesserung der Auftrennung erreicht werden. Im Gel war

DNS wiederum nur an den Einsetzstellen anfärbbar, nicht aber aufgetrennte Banden. Folglich scheint das Stoppen des Restriktionsenzymsverdaus keinen Einfluss auf die Auftrennung der Erreger-DNS zu haben.

3.1.8 Veränderung des Laufpuffer TBE

Fragestellung 8: Führen unterschiedliche Konzentrationen des Laufpuffers in der Kammer und im PFGE-Gel zu Diffusion der Pufferbestandteile?

Die Konzentration des Laufpuffers (laut Protokoll nach Sperner et al. 0,5x TBE) wurde der Pufferkonzentration des PFGE-Gels (1x) angepasst. Diese Erhöhung der TBE-Konzentration führte zu einer erhöhten Stromstärke in der Kammer; die Erreger-DNS wurde jedoch erneut nicht in Fragmente getrennt. Da bei zusätzlichen Testläufen mit bereits lysierten und verdauten Standards der Firma Bio-Rad aber gezeigt werden konnte, dass sowohl bei einer TBE-Konzentration von 0,5x als auch von 1x eine gute Auftrennung der Standards (Lambda ladder) erfolgte (Abb. 3-7, 3-9, 3-11), scheint der TBE-Konzentrationsunterschied in der Kammer und im PFGE-Gel nicht Ursache der fehlenden Auftrennung der Erreger-DNS zu sein.

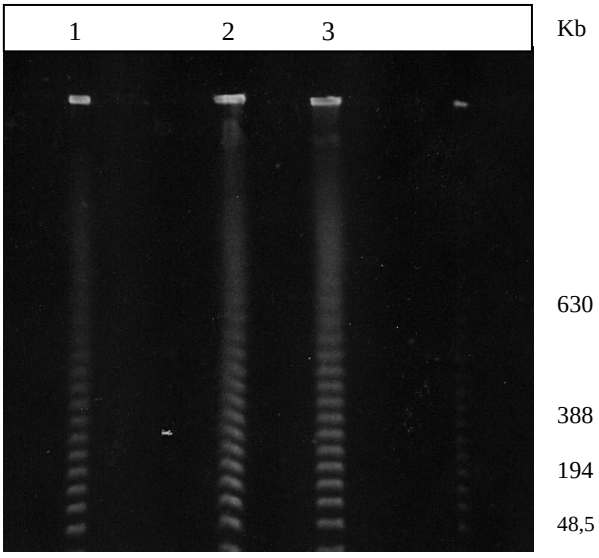


Abbildung 3-7: PFGE-Testlauf mit lysierten und vorverdauten Lambda ladder (Banden 1, 2, 3)
Elektrophoreseparameter: 1%iges Agarosegel in 0,5% TBE, 6 V/cm, Winkel 120°, Pulszeit: 50-90 s, Laufzeit: 22 h.

3.1.9 Veränderung der PFGE-Agarose

Fragestellung 9: Ist die fehlende Auftrennung der C. perfringens-DNS auf die Verwendung des falschen PFGE-Agarosepulvers zurückzuführen?

Die 1%ige Pulsed Field Certified Agarose (Bio-Rad) wurde gegen die 1% Low Melting Point Agarose von Sigma ausgetauscht. Diese Agarose wird erfolgreich für diverse PFGE-Gele zur Auftrennung von anderen Bakterien im Hygienelabor verwendet. Die Anwendung des neuen Agarosepulvers führte allerdings nicht zur verbesserten Auftrennung der DNS-Banden (Daten nicht gezeigt). Da die 1%ige Pulsed Field Certified Agarose von Bio-Rad in einem Testlauf mit Standards gute Ergebnisse zeigte, wurde diese auch in weiteren Versuchen verwendet.

3.1.10 Einführung einer Vorelektrophorese

Fragestellung 10: Kann die Qualität der DNS-Fragmente durch eine Vorelektrophorese verbessert werden?

Vor Beginn des PFGE-Laufes wurden Gele für 90 min in die Elektrophorese-Kammer gelegt. Da die PFGE auch nach Vorelektorphorese nicht in besserer Auftrennung der Erreger-DNS resultierte (Daten nicht gezeigt), wurde in nachfolgenden Versuchen keine Vorelektrophorese integriert.

3.1.11 Variation der Laufzeiten

Fragestellung 11: Kann die Auftrennung der DNS durch Variation der Laufzeiten der Elektrophorese verbessert werden?

Das Institut für Hygiene und Technologie der Universität München empfahl für *Clostridium spp*. Laufzeiten von 23 h mit Pulszeiten von 5-30 s und einem Spannungsgradienten von 6 V/cm. Da es bei diesen Zeiten zu keiner Auftrennung der *C. perfringens*-DNS kam, wurden die Zeiten im Laufe der Versuche variiert. Die Umschaltzeiten wurden in einem Lauf auf 10-60 s, in einem anderen auf 50-90 s und die Dauer der Elektrophorese auf 22 bzw. 24 h gestellt. Weder das Verändern der Umschaltzeiten noch die Elektrophoresedauer bewirkten Verbesserungen des Auftrennungsverhaltens der Erreger-DNS (Abb. 3-8).

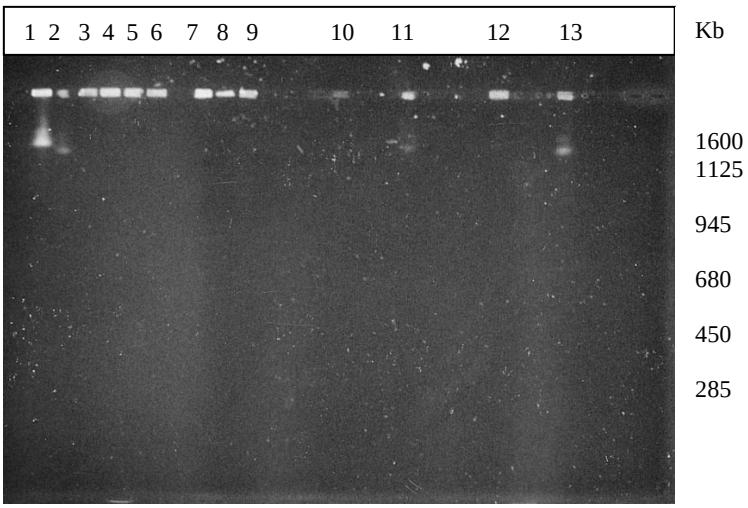


Abbildung 3-8: PFGE mit modifizierten Laufzeiten
PFGE-Bandenmuster von SmaI verdauter DNS von *C. perfringens*-Isolaten. Die DNS wurde nach den Angaben des Protokolls nach Sperner et al. aufbereitet. Elektrophoreseparameter: 1%iges Agarosegel in 0,5% TBE, 6 V/cm, Winkel 120°, Pulszeit: 60-120 s, Laufzeit: 24 h. Banden 1, 2 und 11: Größenstandard Lambda ladder für PFGE (BioRad), Banden 3, 4, 5, 6 und 12: Isolat-Nr. 49; Banden 7, 8 und 9: CPE+ Kontrollen aus Erfiurt; Bande 10: Isolat-Nr. 528; Bande 13: Molekulargewichtsmarker *Saccharomyces cerevisiae* (BioRad). Die Blöckchen wurden vor der Restriktionsverdauung mehrmals geteilt, so dass für jedes Isolat mehrere unter den gleichen Bedingungen hergestellte Blöckchen die PFGE durchliefen.

3.2 Adaptation des Protokolls nach Collie et al.

Aufgrund der erfolglosen Versuche zur Typisierung der *C. perfringens*-Stämme mit Hilfe des Protokolls nach Sperner et al. und der oben genannten Modifikationen wurde für weitere Versuche das PFGE-Protokoll nach Collie et al. hinzugezogen. Die Elektrophoreseparameter wurden dem Protokoll entsprechend angepasst. Als Standard wurde Lambda ladder der Firma Bio-Rad mitgeführt. Abb. 3-9 zeigt Ergebnisse des ersten Laufs nach dem Protokoll nach Collie et al.: Zwar ist eine gute Auftrennung der Lambda ladder zu erkennen, jedoch sind die *C. perfringens*-DNS-Blöckchen nur als Banden an den Stellen sichtbar, an denen sie ins Gel eingesetzt wurden. Aus diesem Grund wurde auch das Protokoll nach Collie et al. entlang einiger Fragenn untersucht und auf Basis der Ergebnisse modifiziert.

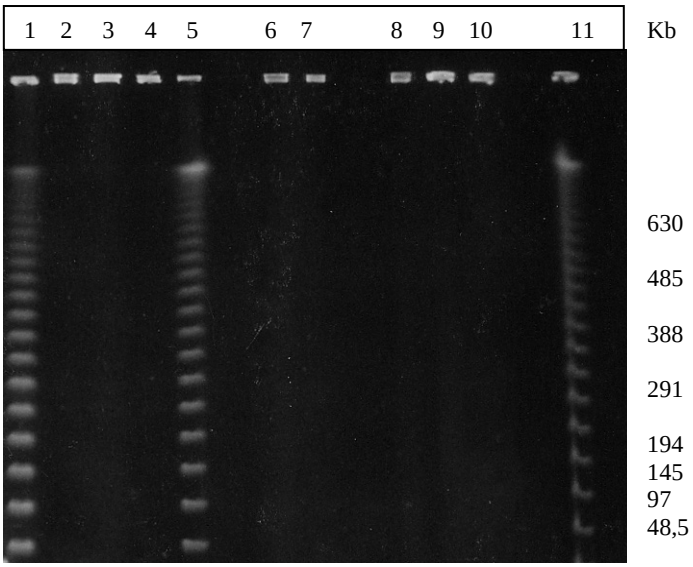


Abbildung 3-9: PFGE nach dem Protokoll von Collie et al.
PFGE-Bandenmuster von SmaI verdauter DNS von *C. perfringens*-Isolaten. Die DNS wurde nach den Angaben des Protokolls nach Collie et al. aufbereitet. Elektrophoreseparameter: 1%iges Agarosegel in 1% TBE, 4,5 V/cm, Winkel 120°, Pulszeit: 5- 120 s, Laufzeit: 46 h. Banden 1, 5 und 11: Größenstandard Lambda ladder für PFGE (BioRad), Banden 2, 3 und 4: Isolat-Nr. 41, Banden 6, 7, 8, 9 und 10: Isolat-Nr. 143. Die Blöckchen wurden vor der Restriktionsverdauung mehrmals geteilt, so dass für jedes Isolat mehrere unter den gleichen Bedingungen hergestellte Blöckchen die PFGE durchliefen.

3.2.1 Inkubation der Bakterien

Fragestellung 12: Optimiert die Verlängerung der Inkubationszeit das Wachstum für C. perfringens und deren DNS-Isolation?

Um auszuschließen, dass die Bakterien nach 24 h-Inkubation nicht das optimale Wachstum für die weitere Aufbereitung, DNS-Isolierung und PFGE erreicht haben, wurde in einem separaten Ansatz die Inkubationszeit der *C. perfringens*-Stämme auf 48 h verlängert. Das Wachstum war gut, jedoch zeigte sich keine verbesserte Auftrennung nach PFGE (Daten nicht gezeigt).

3.2.2 Modifikationen der bakteriellen Anzucht der Bakterien

3.2.2.1 Vorbehandlung der Bakterien mit Formaldehyd

Fragestellung 13: Ist bei bestimmten Bakterien wie Clostridien oder Campylobacter eine Fixierung mit Formaldehyd notwendig, um die Degradation der DNS durch endogene Nukleasen zu vermeiden?

Bakterien wurden mit 37%- bzw. 3,7-%igem Formaldehyd behandelt. Die DNS-Blöckchen zeigten erneut keine Auftrennung in Fragmente, sondern waren nur als Banden im Bereich der Stanzlöcher des Gels im UV-Licht erkennbar (Abb. 3-10).

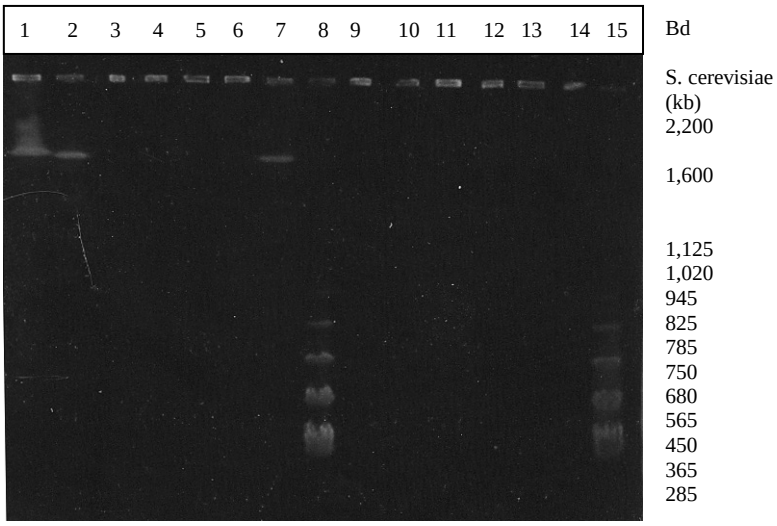


Abbildung 3-10: PFGE mit und ohne Formaldehyd
PFGE-Bandenmuster von SmaI verdauter DNS von *C. perfringens*-Isolaten. Die DNS wurde nach den Angaben des Protokolls nach Collie et al. aufbereitet. Die Bakterien der Banden 4, 5, 9, 11, 12, 13 und 14 wurden vor der Herstellung der Blöckchen mit Formaldehyd behandelt. Elektrophoreseparameter: 1%iges Agarosegel in 1% TBE, 4,5 V/cm, Winkel 120°, Pulszeit: 5-120 s, Laufzeit: 46 h. Banden 1, 8 und 15: Größenstandard Lambda ladder für PFGE (BioRad), Banden 2 und 7: Molekulargewichtsmarker *Saccharomyces cerevisiae* (BioRad); Banden 3, 4 und 5: Isolat-Nr. 10; Banden 6, 9 und 14 Isolat-Nr. 49; Banden 10, 11, 12 und 13: Isolat-Nr. 143.

3.2.2.2 Bestimmung der optischen Dichte

Fragestellung 14: Kann durch die regelmäßige Messung der optischen Dichte ein Zusammenhang zwischen der Zellzahl der Bakterien und der benötigten Restriktionsenzymkonzentration festgestellt werden?

Die optische Dichte wird typischerweise bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) anhand eines Photometers gemessen, um ein Maß für die Konzentration der Bakterien in PIV-Puffer zu erhalten. In mehreren Versuchen wurde die OD_{600} auf Werte zwischen 0,8 und 1,8 eingestellt. Es konnte jedoch keine Korrelation zwischen der Extinktion als Ausdruck der Bakterienkonzentration und der erforderlichen Enzymmenge festgestellt werden (Abb. 3-11).

3.2.3 Veränderung der Blöckchenagarose

3.2.3.1 Herabsetzung der Agarose-Konzentration

Fragestellung 15: Führen unterschiedliche Konzentrationen der Blöckchenagarose und PFGE-Agarose zur Hemmung der PFGE?

Die bisherige Konzentration der Blöckchenagarose wurde von 2% auf 1% gesenkt, was der vorgegebenen Pulsfeldgelkonzentration entspricht. Sämtliche Bakterien wurden daher in einem Ansatz sowohl mit 2%iger Low Melting Point Agarose der Firma Bio-Rad, als auch mit 1%iger Agarose der Firma Sigma angesetzt.

Unabhängig von der verwendeten Agarose-Konzentration der Blöckchen waren im UV-Licht nach PFGE sämtliche Proben lediglich als nicht aufgetrennte Banden dargestellt. Der Standard *S. cerevisiae* zeigte hingegen eine gute Auftrennung.

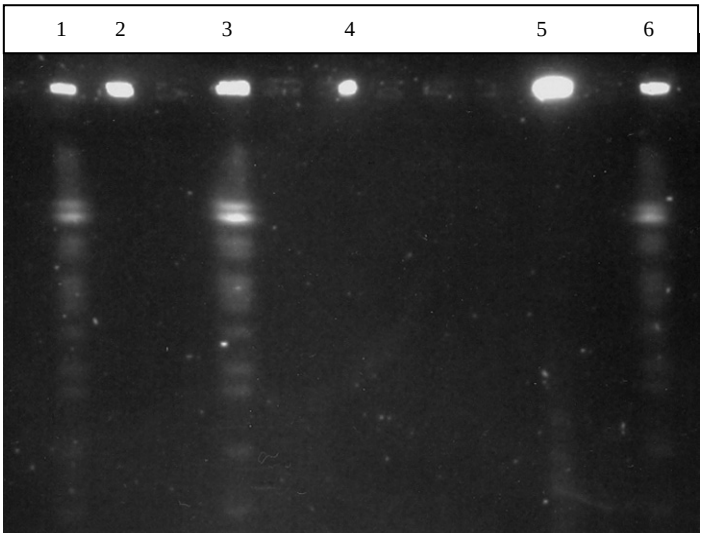


Abbildung 3-11: PFGE mit verringerter Konzentration der Blöckchenagarose
PFGE-Bandenmuster von SmaI verdauter DNS von *C. perfringens*-Isolaten. Die DNS wurde nach den Angaben des Protokolls nach Collie et al. aufbereitet. Die Bakterien der Banden 4 und 5 wurden mit 1%iger Agarose angesetzt, das Isolat der Bande 2 mit 2%iger Agarose wie im Protokoll beschrieben. Die optische Dichte der Bakterien-Puffer-Gemische (Banden 2, 4 und 5) wurde bei 600 nm auf 1,0 eingestellt. Elektrophoreseparameter: 1%iges Agarosegel in 1% TBE 4,5 V/cm, Winkel 120°, Pulszeit: 5- 120 s, Laufzeit: 46 h. Banden 1, 3 und 6: Molekulargewichtsmarker *Saccharomyces cerevisiae* (BioRad); Banden 2 und 5: Isolat-Nr. 10; Bande 4: CPE+ Kontrolle aus Erfurt.

3.2.4 Veränderung der Lysis-Lösung

3.2.4.1 Verwendung zusätzlicher Enzyme

Fragestellung 16: Werden für die Lysis der C. perfringens-Zellen neben dem Enzym Lysozym weitere Lysisenzyme benötigt?

Zur Testung der Frage wurden *C. perfringens*-Agarose-Blöckchen wie im Protokoll aufgeführt entweder mit Lysozym, Lysozym plus Lysostaphin (im Hygiene-Labor) oder mit Lysozym, Lysostaphin, Mutanolysin plus RNAse über Nacht inkubiert. In keiner der drei

Fraktionen konnte nach PFGE fragmentierte Erreger-DNS nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), so dass die Zugabe weiterer Lysisenzyme nicht erforderlich erscheint.

3.2.4.2 Alleinige Lysis mit Proteinase K

Fragestellung 17: Ist für die Zelllyse von C. perfringens oder Campylobacter alleinig Proteinase K, nicht aber eine Lysislösung mit Lysisenzymen notwendig?

Unter der Annahme, dass die Lyse von *C. perfringens* mit Proteinase K ausreichend und notwendig ist, wurde auf die Lysis der Bakterien in Lysis-Lösung verzichtet und stattdessen über Nacht alleinig mit Proteinase K lysiert. Nach PFGE waren im UV-Licht jedoch nur Banden an solchen Stellen sichtbar, an denen die DNS-Blöckchen ins Gel gesetzt worden waren (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde in weiteren Versuchen weiterhin die herkömmliche Lysislösung verwendet.

3.2.5 Veränderung des Proteinverdaus

3.2.5.1 Verkürzung der Inkubation

Fragestellung 18: Ist die Inkubationszeit der C. perfringens-Blöckchen in Proteinase K zu lang?

Der Effekt einer 24 versus 48-stündigen Inkubation der Blöckchen mit Proteinase K-Lösung wurde untersucht. Sowohl die 24- als auch die 48-stündige Inkubation der Blöckchen ergab in der PFGE keine Auftrennung der bakteriellen DNS in Fragmente (Daten nicht gezeigt).

3.2.5.2 Beendigung des Proteinverdaus mit Phenylmethylsulfonylfluoride

Fragestellung 19: Ist die Inaktivierung der Proteinase K-Wirkung notwendig?

Proben wurden nach Proteinase K-Proteinverdau mit Phenylmethylsulfonylflourid (PMSF) behandelt. Es zeigte sich, dass nach der Inkubation der Blökchen in Stopp-Lösung nicht nur die Proben, sondern auch die Standards nicht mehr aufgetrennt (s. Abb. 3-13) wurden. Daher wurde auf die Verwendung von PMSF verzichtet.

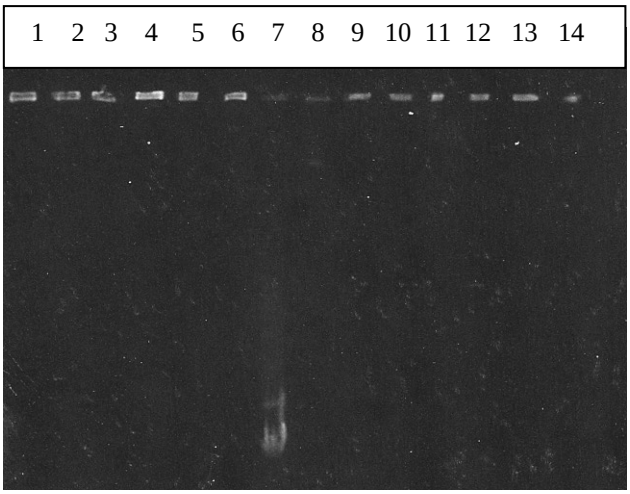


Abbildung 3-12: PFGE mit PMSF-behandelten bakteriellen Isolaten
PFGE-Bandenmuster von SmaI verdauter DNS von *C. perfringens*-Isolaten. Die DNS wurde nach den Angaben des Protokolls nach Collie et al. aufbereitet. Die Isolate der Banden 2-6 wurden nach der Deproteinisierung zusätzlich mit Phenylmethylsulfonylflourid behandelt. Elektrophoreseparameter: 1%iges Agarosegel in 1% TBE, 4,5 V/cm, Winkel 120°, Pulszeit: 5- 120 s, Laufzeit: 46 h. Banden 1 und 8: Molekulargewichtsmarker *Saccharomces cerevisiae* (BioRad), Bande 7: Größenstandard Lambda ladder für PFGE (BioRad), Banden 2, 3, 5, 9 und 10: Isolat-Nr. 41, Banden 4, 11 und 12: Isolat-Nr. 521, Banden 6, 13 und 14: Isolat-Nr. 528. Die Blöckchen der Isolate 41 und 528 wurden vor der Restriktionsverdauung mehrmals geteilt, so dass für jedes Isolat mehrere unter den gleichen Bedingungen hergestellte Blöckchen die PFGE durchliefen.

3.2.6 Doppelte Restriktion

Fragestellung 20: Ist die Wirkung des Restriktionsenzyms SmaI unzureichend?

Die Inkubation der Blöckchen im Restriktionsenzym wurde in einem Lauf doppelt durchgeführt (zweimalige Inkubation für je 12-16 h bei der in 2.5.1.1 angegebenen SmaI Konzentration). Als Besonderheit wurde dem Enzym zudem aktivitätssteigerndes Magnesiumazetat zugefügt. Die zweimalige Inkubabtion mit Restriktionsenzym führte jedoch nicht zu einer besseren Auftrennung der Erreger-DNS nach PFGE (Daten nicht gezeigt). Die DNS war wiederum nur als Einzelbande im Bereich der Stanzlöcher erkennbar.

3.2.7 Veränderte Laufdauer, Umschaltzeiten und Spannungsgradienten

Fragestellung 21: Optimiert eine Verkürzung der PFGE-Laufzeiten die Qualität des PFGE-Profils?

Da sich die Laufzeiten des Protokolls nach Collie et al. stark von den Laufzeiten anderer Protokolle für *C. perfringens* (Sperner, Schalch et al. 1999; Stolle, Sperner et al. 2001; Schalch, Bader et al. 2003) unterscheiden, wurden Bakterien nach dem Protokoll nach Collie

et al. aufbereitet und die PFGE-Laufzeiten auf 20 h bei Umschaltzeiten von 0,5-40 s und einem Spannungsgradienten von 6 V/cm verändert. Es zeigte sich jedoch, dass auch diese Veränderungen nicht die Auftrennung der Banden verbesserten (Daten nicht gezeigt).

3.3 Adaptation des Protokolls nach Maslow et al.

Nachdem wie oben beschrieben Modifikationen einzelner Schritte der PFGE in Anlehnung an die Protokolle nach Sperner et al., Collie et al. und Maslow et al. verglichen worden waren, ohne dass eine verbesserte Auftrennung der Erreger-DNS resultierte, wurde in einem letzten Ansatz die PFGE für *C. perfringens* komplett anhand des PFGE-Protokolls des Hygiene-Labors durchgeführt. Dieses Protokoll wird erfolgreich zur Typisierung von *Staphylococcus aureus* und Enterokokken eingesetzt (s. 2.6). Auch bei Anwendung dieses Protokolls konnte die *C. perfringens*-DNS wiederum nur als Bande in den vorgegebenen Stanzlöchern des PFGE-Gels, nicht jedoch als Fragmentierung nachgewiesen werden.

4 Diskussion

Da die AAD eine der häufigsten nosokomialen Infektionen mit hohen Kosten darstellt, ist die Prävention der Infektion ein wichtiges Instrument der Krankenhaushygiene. Für die Implementierung geeigneter Präventionsmaßnahmen ist die Kenntnis der Infektionswege essentiell. Zur Aufklärung der Infektionswege der AAD ist es erforderlich, diskriminierende und reproduzierbare Typisierungsverfahren von Bakterienisolaten einzusetzen. Dazu werden in der Literatur zahlreiche Verfahren wie Ribotypisierung, Plasmid- und Restriktionsendonuklase-Analyse (REA), Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP), Random amplified polymorphic DNS (RAPD)-PCR und Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) beschrieben (Kristjansson, Samore et al. 1994; Schalch, Björkroth et al. 1997; Yoo, Lee et al. 1997; Schalch, Sperner et al. 1999; McLauchlin, Ripabelli et al. 2000; Brazier 2001; Sparks, Carman et al. 2001; Klaassen, Van Haren et al. 2002; Urwin and Maiden 2003; Waters, Savoie et al. 2003; Al-Khaldi, Myers et al. 2004; Lukinmaa, Nakari et al. 2004; Johansson, Aspan et al. 2006; Jost, Trinh et al. 2006; Keto-Timonen, Heikinheimo et al. 2006; Siragusa, Danyluk et al. 2006), unter denen sich besonders die PFGE als geeignet herausgestellt hat (Stolle, Sperner et al. 2001).
Bei Lebensmittelvergiftungen konnte anhand der PFGE bereits nachwiesen werden, dass die für diese Intoxikationen verantwortlichen *C. perfringens*-Isolate von Menschen und Tieren klonal voneinander abstammen (Maslanka, Kerr et al. 1999; Lukinmaa, Takkunen et al. 2002; Tanaka, Isobe et al. 2003; Johansson, Aspan et al. 2006). In den USA wurden Untersuchungen zur Typisierung von CPE-positiven Isolaten in Fällen der AAD mittels PFGE durchgeführt (Collie and Mc Clane 1998; Sarker, Shivers et al. 2000; Sparks, Carman et al. 2001). Ziel der vorliegenden Untersuchung war es deshalb, klinische *C. perfringens*-Isolate mit und ohne Enterotoxin mittels PFGE zu typisieren und anhand der Versuchsergebnisse Rückschlüsse auf die Ausbreitung der Bakterien und die Prävention der Übertragung im klinischen Alltag zu ziehen.

4.1 Gegenüberstellung der drei Protokolle und Modifikationen

Zur Etablierung der PFGE-Methode wurden drei unterschiedliche PFGE-Protokolle angewandt und einzelne Schritte der Methode modifiziert. Eine vergleichende Darstellung der drei eingesetzten Protokolle mit weiteren PFGE-Protokollen der internationalen Literatur

befindet sich im Anhang (s. 8.2). Im Folgenden werden mögliche Probleme bei der Etablierung der Methode diskutiert.

4.1.1 Anzucht

In den drei beschriebenen Protokollen werden die tiefgefrorenen Bakterienisolate auf einer Blutagarplatte oder in einem Flüssigmedium inokuliert und unter anaeroben Bedingungen über Nacht inkubiert. Das Wachstum der *C. perfringens*-Stämme wurde visuell beurteilt. Wie in 3.1.1 beschrieben, zeigten die Bakterien typisches Wachstum mit 2-3 mm großen, grau-gelben und glänzenden Kolonien, die von einem aus zwei Zonen bestehenden Hämolysehof umgeben waren. Die bakterielle Anzucht wurde daher nicht als ein Problem angesehen. Trotzdem wurde aufgrund der Nichttypisierbarkeit der Bakterien im Verlauf dieser Studie die Inkubationszeit wie von einigen Veröffentlichungen empfohlen (Engström, Fermer et al. 2003; Klaasen, Van Haren et al. 2002; Pituch, Van den Braak et al. 2002) auf 48 h verlängert (s. 3.2.1). Das Wachstum war ebenso gut. Einige Autoren empfehlen allerdings (Canard and Cole 1989, Collie and McClane 1998, Hielm, Björkroth et al. 1998) eine Verkürzung der Inkubationszeit auf ca. 5 h, da die Bakterien nach dieser Zeit bis zur mittleren exponentiellen Phase gewachsen sind. Diese Wachstumsphase wird als optimale Voraussetzung für eine spätere PFGE-Typisierbarkeit angesehen. Nichtsdestotrotz sollte betont werden, dass die Mehrzahl der veröffentlichten PFGE-Protokolle (Maslanka, Kerr et al. 1999; Lin and Labbe 2003; Nauerby, Pederson et al. 2003; Alonso, Martin et al 2005; Barbara, Trinh et al. 2008; Chalmers, Martin et al. 2008) die bakterielle Anzucht über Nacht empfehlen.

4.1.2 Bakterienaufbereitung

4.1.2.1 Messung der optischen Dichte

Bei der Kultivierung der Bakterienisolate ist ausschließlich im Protokoll nach Maslow et al. die Messung der optischen Dichte des Bakterien-Puffer-Gemisches vorgesehen, mit deren Hilfe die Bakteriendichte der Proben auf dieselben Konzentrationen eingestellt werden kann. Diese Angabe dient als Richtwert für die Konzentration und Menge von Proteinase K, Lysis- und Restriktionsenzymen. Obwohl es in dieser Studie nicht gelang durch Ermittlung der optischen Dichte Rückschlüsse auf die Konzentrationen der benötigten Enzyme für *C. perfringens* zu ziehen, wird eine optische Dichte der Bakteriensuspension bei 610 nm auf 1,2-

1,3 als optimal angesehen (Maslanka, Kerr et al. 1999; Ribot, Fitzgerald et al. 2001; Lin und Labbe 2003; Alonso, Martin et al. 2005, Barbara, Trinh et al. 2008; Chalmers, Martin et al. 2008).

4.1.2.2 Bakterienvorbehandlung zum Schutz vor DNS Degradation

Diverse Autoren (Kristjansson, Samore et al. 1994; Sperner, Schalch et al. 1999; Stolle, Sperner et al. 2001; Klaassen, Van Haren et al. 2002) sehen die Degradation der DNS bei bestimmten Bakterien wie Clostridien als Hauptproblem der PFGE-Nichttypisierbarkeit an. Um die endogene DNAse-Aktivität zu hemmen, wurden wie in Kapitel 3.2.2.1 bereits beschrieben, einige *C. perfringens*-Stämme mit Formaldehyd behandelt. Die Inkubation der Blöckchen in Formalin wird in mehreren Veröffentlichungen empfohlen (Gibson, Sutherland et al. 1994; Hielm, Björkroth et al. 1998; Maslanka, Kerr et al. 1999; Ribot, Fitzgerald et al. 2001, Schalch, Bader et al. 2003; Alonso, Martin et al 2005; Gal, Northey et al. 2005). Hielm et al. (Hielm, Björkroth et al. 1998) sehen darin sogar die einzige effektive Maßnahme gegenüber der DNS-Degradation. Daher ist es naheliegend, dass alle *C. perfringens*-Stämme mit Formaldehyd vorbehandelt werden sollten. Alternativ wird die Erwärmung der Bakteriensuspension zur Verhinderung der DNS-Degradation vorgeschlagen (Hielm, Björkroth et al. 1998). Auch in dieser Studie wurden die Bakterien, die nach dem Protokoll von Collie et al. aufbereitet wurden, vor dem Mischen mit der Agarose auf 68°C erwärmt. Das Erhitzen verhindert das vorzeitige Festigen der Bakterien-Agarose-Mischung und fördert nachweislich die Lyse der Zellen (Boondeekhun, Gurtler et al. 1993; Lin and Labbe 2003) und inaktiviert Enzyme, vermutlich auch endogene DNAsen; es konnte jedoch gezeigt werden, dass dadurch nicht die Degradation der DNS verhindert wird (Hielm, Björkroth et al. 1998).

4.1.3 Lysis

4.1.3.1 Wahl und Konzentration der Lysisenzyme

Die Wahl und Konzentration der Lysisenzyme stellt ein Problem dar, das in der vorliegenden Studie durch die Verwendung unterschiedlicher Enzyme bzw. Enzymkombinationen ausgeschaltet werden sollte. Die drei PFGE-Protokolle unterscheiden sich in der Wahl und Konzentration der Lysisenzyme. Während die Anleitung nach Collie et al. und weitere

Studien (Canard and Cole 1989; Kristjansson, Samore et al. 1994; Fawley and Wilcox 2002; Lin and Labbe 2003; Lukinmaa, Nakari et al. 2004; Alonso, Martin et al. 2005, Barbara, Trinh et al. 2008, Chalmers, Martin et al. 2008) nur Lysozym zur Zelllyse empfehlen, wird im Protokoll nach Maslow et al. neben Lysozym auch Lysostaphin verwendet. Beim Protokoll nach Sperner et al. wird zusätzlich zu diesen beiden Enzymen noch Mutanolysin und RNAse verwendet. Lysozym gilt bei grampositiven Bakterien als das Mittel der Wahl, um Zellwände abzubauen und wurde bereits erfolgreich zur Zelllysis von *C. difficile* und *C. perfringens* in einer Konzentration von 1 mg/ml eingesetzt (Canard and Cole 1989; Lin and Labbe 2003; Lukinmaa, Tukkinen et al. 2002; Barbara, Trinh et al. 2008, Chalmers, Martin et al. 2008). Lediglich Chalmers et al. (Chalmers, Martin et al. 2008) verwendet Lysozym zur Lyse von *C. perfringens*-Zellen in einer Konzentration von 50 mg/ml. Mutanolysin wurde bereits als Lysisenzym grampositiver Bakterien beschrieben (Monsen, Holm et al. 1983; Palva, Nybers et al. 1988) und auch zur erfolgreichen Zelllysis von *C. botulinum* wurde neben Lysozym Mutanolysin eingesetzt. Zur Degradation von vorhandener RNA wurde zusätzlich RNAse hinzugefügt (Hielm, Björkroth et al. 1998; Johnson, Tepp et al. 2005; Leclair, Pagotto et al. 2006; Nevas, Lindström et al. 2006). Nauerby et al. (Nauerby, Pederson et al. 2003) wiederum setzen zur Lysis neben Lysozym nur RNAse ein und konnten so *C. perfringens*-Stämme typisieren. Zusätzlich sollte erwähnt werden, dass auf Empfehlung einiger Veröffentlichungen (Barret 1994; Gibson, Sutherland et al. 1994; Maslanka, Kerr et al. 1999) in dieser Studie die Zelllysis einiger Blöckchen nur mit Proteinase K ohne Lysisenzyme (s. 3.2.4.2) durchgeführt wurde. Trotz des Einsatzes unterschiedlicher Enzyme in der vorliegenden Studie konnte nicht geklärt werden, welches Enzym das geeignete zur Zelllysis von *C. perfringens* ist. Allerdings scheint aufgrund der Vielfalt der Enzyme und Enzymkombinationen der unterschiedlichen Studien die Wahl des Enzyms zur Zelllysis nicht das Hauptproblem der Typisierbarkeit von *C. perfringens* mittels PFGE zu sein.

.

4.1.3.2 Dauer der Lysis

Die Blöckchen wurden nach Anleitung der drei Protokolle über Nacht bei 37°C in Lysis-Lösung inkubiert. Diese Inkubationsdauer korreliert mit den Angaben anderer PFGE-Protokolle (Canard and Cole 1989; Lin and Labbe 2003; Lukinmaa, Nakari et al. 2004; Barbara, Trinh et al. 2008). Allerdings wird der langandauernde Lysisprozess als Grund für die Degradation der DNS diskutiert (Klassen, Van Haren 2002) und wird daher in einigen PFGE-Protokollen verkürzt (Hielm, Björkroth et al. 1998; Fawley and Wilcox 2002;

Chalmers, Martin et al. 2008). So konnten auch in den nachträglich durchgeführten Experimenten durch u.a. die verkürzte Lysisdauer von 5 h einige exemplarische *C. perfringens*-Isolate mittels PFGE typisiert werden. Dies unterstreicht die Annahme, dass die DNS- Degradation während der langandauernden Lysis ein essentielles Problem für die PFGE-Typisierbarkeit bestimmter Bakterien darstellt.

4.1.4 Deproteinisierung

4.1.4.1 Konzentration der Proteinase K

In den durchgeführten Versuchen wurde zum Proteinverdau Proteinase K eingesetzt. Die Protokolle nach Collie et al. und Maslow et al. sowie die Protokolle anderer Autoren (Lin and Labbe 2003; Nauerby, Pederson et al. 2003; Barbara, Trinh et al. 2008) schlagen zur Deproteinisierung von *C. perfringens* eine Proteinase K-Konzentration von 1 mg/ml vor. Obwohl einige Studien (Lukinmaa, Takkunen et al. 2002; Lin and Labbe 2003; Johannson, Aspan et al. 2006) und das Protokoll nach Sperner et al. die Proteinase K-Konzentration auf 0,1 bzw 0,3 mg/ml verringern, sehen andere Autoren eher eine Erhöhung der Konzentration auf 2-5 mg/ml (Canard and Cole 1989; Fawley and Wilcox 2002; Chalmers, Martin et al. 2008) als sinnvoll an. Somit soll gewährleistet werden, dass es zum vollständigen Abbau der Proteine kommt. Ist die Proteinase K-Konzentration zu gering, werden die Proteine nicht vollständig abgebaut und die DNS kann nicht freigesetzt werden.

4.1.4.2 Dauer der Deproteinisierung

Des Weiteren unterscheiden sich die Protokolle in der Dauer des Proteinverdaus, der im Protokoll nach Collie et al. 48 gegenüber 24 h bei den anderen Protokollen beträgt. Die angegebenen Inkubationszeiten für Proteinase K stimmen mit denen in verschiedenen Studien (Kristjansson, Samore et al. 1994; Brazier 2001; Stolle, Sperner et al. 2001; Klaassen, Van Haren et al. 2002; Tanaka, Isobe et al. 2003; Alonso, Martin et al. 2005) überein. Allerdings besteht das Problem der DNS-Degradation während der langandauernden Deproteinisierung. Daher sollte nach Nauerby et al. (Nauerby, Pederson et al. 2003) die Proteolyse auf 2 h verkürzt werden. In den durchgeführten Versuchen konnte nicht geklärt werden, ob die DNS während des Proteinabbaus degradiert wurde und ob eine ausreichende Proteinase K-Konzentration vorlag. Somit stellt der Schritt der Deproteinisierung ein zentrales Problem bei der PFGE-Typisierbarkeit dar.

4.1.5 Waschen

Um die DNS von *C. perfringens* zum Restriktionsverdau vorzubereiten, ist es notwendig, die Blöckchen ausreichend zu waschen. Die angegebenen Zeiten in den verwendeten Protokollen und PFGE-Protokollen anderer Autoren (Maslanka, Kerr et al. 1999; Barbara, Trinh et al. 2008; Chalmers, Martin et al. 2008) unterscheiden sich nur leicht hinsichtlich der Dauer und Frequenz der Waschvorgänge. Nach dem Waschen sollen die Blöckchen transparent und klar sein. Dies stellte in den durchgeführten Versuchen kein Problem dar und scheint für die Etablierung der Methode und der PFGE-Typisierbarkeit eher eine untergeordnete Rolle zu spielen.

4.1.6 Restriktionsverdau

4.1.6.1 Wahl und Konzentration der Restriktionsenzyme

Der Restriktionsverdau ist ein entscheidender Schritt in der PFGE, in dem die DNS mit selten schneidenden Restriktionsenzymen in Fragmente geschnitten wird. SmaI gilt als das am besten geeignete Enzym zur Restriktion chromosomaler *C. perfringens*-DNS (Canard and Cole 1989; Sparks, Carman et al. 2001; Stolle, Sperner et al. 2001; Klaassen, Van Haren et al. 2002; Schalch, Bader et al. 2003, Nauerby, Petersen et al. 2003; Johannson, Aspan et al 2006) und wurde daher in allen Versuchen verwendet. In einigen wenigen Studien wurden alternative Enzyme wie ApaI oder XbaI eingesetzt (Maslanka, Kerr et al. 1999; Lukinmaa 2002; Lin and Labbe 2003).
Die empfohlene SmaI-Konzentration im Protokoll nach Sperner et al. betrug 20 U/Block, in den beiden anderen 120 bzw. 125 U/Block. Daher wurde die SmaI-Konzentration im Laufe der Versuche mehrfach variiert. Auch in der internationalen Literatur (Canard and Cole 1989; Sparks, Carman et al. 2001; Stolle, Sperner et al. 2001; Lukinmaa 2002; Schalch, Bader et al. 2003, Nauerby, Petersen et al. 2003; Johannson, Aspan et al 2006) findet man unterschiedliche Angaben zwischen 15 und 100 U/Block.

4.1.6.2 Aktivitätssteigerung des Enzyms

Um die Wirkung des Enzyms zu erhöhen, wurde dem Restriktionsenzym Magnesiumacetat hinzugefügt (s. 3.2.6). Dies ist zwar bereits im Puffer des Enzyms enthalten, es kann jedoch bei ungenügendem Waschen der Blöckchen von EDTA-Restbeständen aus dem Lysis- oder ESP-Puffer gebunden werden und würde nicht mehr zur Aktivierung von SmaI zur Verfügung stehen. In der vorliegenden Studie konnte jedoch die Notwendigkeit dieser aktivitätssteigernden Maßnahme nicht gezeigt werden. In den hier durchgeführten zusätzlichen Versuchen einiger *C. perfringens*-Isolate wurde stattdessen nach Reichardt et al. (Reichardt, Chaberny et al 2007) RNAse zu SmaI zugegeben, da vorhandene RNA SmaI inhibiert.

4.1.7 Elektrophorese

4.1.7.1 Laufpuffer

In den beschriebenen Protokollen und den Protokollen anderer Studien (Kristjansson, Samore et al. 1994; Schalch, Björkroth et al. 1997; Schalch, Sperner et al. 1999; Sparks, Carman et al. 2001; Klaassen, Van Haren et al. 2002; Waters, Savoie et al. 2003; Lukinmaa, Nakari et al. 2004; Johansson, Aspan et al. 2006) wird TBE als Laufpuffer für die PFGE verwendet. Dabei ist die Temperatur des Puffers von Bedeutung. Übersteigt diese 14°C, steigt die DNS-Beweglichkeit, während Bandenschärfe und Auflösung abnehmen. Nachdem in verschiedenen Versuchen (Abb. 3-2 und 3-6) ein Schmier aus DNS-Banden beobachtet wurde, wurde in den kommenden PFGE-Läufen der Puffer bei 14°C vorgekühlt und ein Vorlauf ohne Gel durchgeführt. Da jedoch trotz Vorkühlung erneut DNS-Schmier unterhalb der Banden entstand, wurden andere Parameter als Ursache für die schlechte Auftrennung verantwortlich gemacht.

Mehrere Autoren (Schalch, Sperner et al. 2003; Fawley and Wilcox 2002; Arbeit, Arbique et al. 2007; Chalmers, Martin et al. 2008) sehen die Degradation der DNS während des Elektrophoresevorgangs als Hauptproblem der PFGE-Untypisierbarkeit bestimmter Stämme an und fügen daher Thio-Harnstoff dem TBE zu. Da in den hier durchgeführten zusätzlichen Experimenten ebenfalls Harnstoff zum Laufpuffer zugegeben wurde und so einige der *C. perfringens*-Isolate mittels PFGE typisiert werden konnten, scheint die Zugabe von Thiourea zum Laufpuffer bei bestimmten Bakterien wie *Clostridium* notwendig zu sein.

4.1.7.2 Elektrophoreseparameter

Ein Problem der PFGE-Nichttypisierbarkeit könnte in der Auswahl der Elektrophoreseparameter bestehen. Nur das Protokoll nach Collie et al. gibt definierte Werte vor, die vor allem in der Laufdauer stark von den Zeiten anderer Studien abweichen. In Anlehnung an verschiedene Autoren (Maslanka, Kerr et al. 1999; Schalch, Sperner et al. 1999; Lukinmaa, Takkunen et al. 2002; Waters, Savoie et al. 2003) und die Empfehlung der Firma Bio-Rad (Zeiten für *S. cerevisiae*) wurden die Zeiten bei den durchgeführten Versuchen variiert. Die Wanderung der DNS und Bandschärfe im PFGE-Gel ist von verschiedenen Parametern abhängig. Die Größe der zu trennenden DNS ist ausschlaggebend für die gewählte Agarosekonzentration. Laut Hersteller ist für Bakterien mit einer Genom-Größe von bis zu 3 mb eine Blöckchenagarose-Konzentration von 1,2- 1,5% geeignet. Die Protokolle gaben eine Agarosekonzentration von 1,2% (Protokoll nach Maslow et al.) bzw. 2% (Protokolle nach Collie et al. und Sperner et al.) an. Da in Zusammenarbeit mit dem Institut für Hygiene Versuche mit 1,2%iger und 2%iger Agarosekonzentration durchgeführt (s. 3.2.3.1) und gleiche Ergebnisse erzielt wurden, ist die Abweichung der Agarose-Konzentration nicht von Bedeutung.

Neben den oben genannten Faktoren kann auch der Spannungsgradient bzw. die Feldstärke Einfluss auf die Elektrophorese nehmen. Die DNS-Migration verhält sich dabei proportional zur eingestellten Feldstärke. Mit steigender Feldstärke nimmt jedoch die Bandschärfe ab. Bei großer DNS (>3 Mb) besteht die Gefahr, dass sie bei hohen Feldstärken (6 V/cm) nicht im Gel aufgetrennt werden kann. Da die DNS-Größe von *C. perfringens* ca. 3 mb beträgt (Canard and Cole 1989; Yoo, Lee et al. 1997), könnte die eingestellte Feldstärke von 6 V/cm in den Versuchen eine mögliche Ursache für die fehlende Auftrennung der DNS der *C. perfringens*-Blöckchen sein und sollte daher in nachfolgenden Untersuchungen verringert werden.

Darüber hinaus ist die Migration der DNS-Moleküle auch von den Pulszeiten abhängig. Je nach angegebenem Zeitintervall wechseln die elektrischen Felder und damit die DNS-Moleküle ihre Richtung. Obwohl im Laufe der Versuche unterschiedlichste Anfangs- und Endumschaltzeiten eingestellt wurden (0,5- 40 s, 5- 30 s, 5- 40 s, 5- 90 s, 5- 120 s. 10- 60 s, 50- 90 s), konnten Pulszeiten für die *C. perfringens*-Isolate nicht optimiert werden. Da diverse Autoren (Canard and Cole 1989; Collie and Mc Clane 1998; Maslanka, Kerr et al. 1999; Klaassen, Van Haren et al. 2002; Lukinmaa, Takkunen et al. 2002; Lin and Labbe 2003; Schalch, Bader et al. 2003; Gal, Northey et al. 2005) verschiedene Pulszeiten für *C. perfringens* angeben, scheinen diese relevant für die Bandenschärfe zu sein, nicht jedoch für

die fehlende Auftrennung der DNS, die in den meisten Versuchen beobachtet wurde. Die Ursache der fehlenden Typisierung liegt folglich nicht in den gewählten Umschaltzeiten.

4.2 Zusammenfassende Beurteilung der Ergebnisse

Trotz der Anwendung der drei unterschiedlichen Protokolle und der oben beschriebenen Modifikationen konnte die PFGE zur Typisierung der *C. perfringens*-Isolate von Patienten der Charité (CBF) mit AAD nicht erfolgreich etabliert und damit die Frage der Klonalität nicht beantwortet werden. Die Erreger-DNS-haltigen Blöckchen waren im PFGE-Gel nicht als aufgetrennte Banden, sondern nur als einzelne Bande im Bereich der Stanzlöcher nachweisbar. Diese Befunde sprechen dafür, dass zwar Erreger-DNS-haltige Agarose in die Stanzlöcher eingelassen worden war, es jedoch nicht zu einer Auftrennung der DNS im Pulsfeld gekommen war. In wenigen Fällen konnte ein Schmier unterhalb dieser Bande in Höhe des Stanzlochs nachgewiesen werden, ohne dass einzelne Banden erkennbar waren.
Zahlreiche Autoren berichten über ähnliche Probleme bei der Differenzierung von Clostridien mittels PFGE (Kristjansson, Samore et al. 1994; Hielm, Björkroth et al. 1998; Maslanka, Kerr et al. 1999; Schalch, Sperner et al. 1999; Sperner, Schalch et al. 1999; Brazier 2001; Stolle, Sperner et al. 2001; Klaassen, Van Haren et al. 2002; Tanaka, Isobe et al. 2003; Alonso, Martin et al. 2005). So konnten Klaassen et al. (Klaassen, Van Haren et al. 2002) in einer Studie 25 von 30 klinischen *C. difficile*-Isolate anhand der PFGE nicht typisieren, da die Banden im Gel nicht aufgetrennt wurden und auch diverse Modifikationen des Protokolls wie verkürzte Inkubationszeiten, Verwendung höher konzentrierter Zellsuspension, Erwärmung der Zellen oder Zugabe von Harnstoff zum Laufpuffer zu keinen interpretierbaren Ergebnissen führten. In einer Studie von Alonso et al. (Alonso, Martin et al. 2005) konnten ebenfalls klinische *C. difficile*-Isolate mit der PFGE mit dem Standard-Protokoll nicht typisiert werden, da bei allen Proben nur DNS-Schmier aus kleinen DNS-Fragmenten beobachtet wurde, allerdings keine Banden bestimmbar waren.
Zur Identifizierung eines *C. perfringens*-Stammes im Rahmen einer Lebensmittelintoxikation entwickelten Maslanka et al. (Maslanka, Kerr et al. 1999) ein PFGE-Protokoll, dessen Grundlage die Methode von Barrett et al. (Barrett, Lior et al. 1994) darstellte. Als Modifikationen wurde die optische Dichte der Zellsuspensionen bei 610 nm auf 1,3 eingestellt, die Bakterienzellen vor dem Mischen mit der Agarose zum Teil mit Formaldehyd behandelt und sechs unterschiedliche Restriktionsenzyme verwandt, von denen sich SmaI als

das am besten geeignete Enzym herausstellte. Trotzdem konnten 8% der 62 Isolate mit dieser Methode nicht typisiert werden.

In Deutschland wurde bereits mehrfach zur Untersuchung von lebensmittelbedingten Erkrankungen und Ausbrüchen *C. perfringens* auf genotypischer Ebene typisiert (Ridell, Bjorkroth et al. 1998; Schalch, Sperner et al. 1999; Sperner, Schalch et al. 1999; Stolle, Sperner et al. 2001; Schalch, Bader et al. 2003). Obwohl die PFGE als Mittel der Wahl galt, wird auf andere Verfahren wie Ribotypisierung zurückgegriffen, da diverse *C. perfringens*-Isolate mittels PFGE nicht differenzierbar waren (Stolle, Sperner et al. 2001; Schalch, Bader et al. 2003). Auch die Einführung nukleaseinhibitorischer Modifikationen in drei unterschiedlichen Laboren führte zu wenig befriedigenden Ergebnissen (Schalch, Bader et al. 2003). Die PFGE wurde daher als nicht ausreichend einsetzbar und unzuverlässig eingeschätzt. Auch in Ausbruch-Situationen wird bereits aufgrund der Nichttypisierung einiger Organismen, der hohen Kosten und der sehr komplexen und langwierigen Methoden und Analysen auf die PFGE verzichtet (McLauchlin, Ripabelli et al. 2000). Mündlich wurde auch von der Arbeitsgruppe von Prof. Jonas, Universität Freiburg (Jonas 2006) mitgeteilt, dass nach mehreren erfolglosen Versuchen, *Clostridien*-Isolate mittels PFGE zu typisieren, andere molekulare Typisierungsmethoden vorgezogen wurden. Kürzlich gelang jedoch an der Universität Hannover die Typisierung von *C. difficile*-Isolaten mittels PFGE durch Zugabe von RNAse zum Restriktionsenzym SmaI und Thiourea zum Laufpuffer (Reichardt, Chaberny et al 2007). Diese beiden zusätzlichen Schritte sollten in nachfolgenden Untersuchungen auch zur Typisierung von *C. perfringens* hinzugefügt werden.

Viele Autoren sehen als Hauptursache der Untypisierbarkeit bestimmter *C. difficile*- und *C. perfringens*-Isolate mittels PFGE die Degradation der DNS durch Endonukleasen an (Kristjansson, Samore et al. 1994; Sperner, Schalch et al. 1999; Stolle, Sperner et al. 2001; Klaassen, Van Haren et al. 2002; Schalch, Bader et al. 2003; Alonso, Martin et al. 2005). Der genaue Mechanismus der Degradation ist jedoch nicht bekannt und die verursachenden Nukleasen konnten bisher nicht in den Bakterienisolaten nachgewiesen werden (Maslanka, Kerr et al. 1999).

Die DNS-Degradation wird in der Literatur als Gel-Schmier aus kleinen DNS-Fragmenten (Kristjansson, Samore et al. 1994; Schalch, Sperner et al. 1999; Stolle, Sperner et al. 2001) in Form diffuser Banden bzw. fehlender Banden (Stolle, Sperner et al. 2001) beschrieben. Diese Beschreibung ähnelt dem Bild der PFGE-Gele der vorliegenden Arbeit. Die Vermutung liegt

nahe, dass auch hier der Abbau der DNS durch zelleigene Nukleasen die Hauptursache für die mangelnde Auftrennung darstellt.
In der Literatur angeführte Gründe für die Degradation sind beispielsweise die langandauernden Lysis- und Deproteiniserungsprozesse, bei denen die DNS einer hohen Nukleaseaktivität ausgesetzt ist (Klaassen, Van Haren et al. 2002) oder die Bildung freier Tris-Radikale während des Elektrophoresevorgangs (Corkill, Graham et al. 2000).
Der Zeitpunkt der Degradation wird unterschiedlich eingeschätzt. Einige Autoren berichten von der Degradation während der Isolierung der DNS (Blaschek and Griffin 1984; Kristjansson, Samore et al. 1994; Schalch, Bader et al. 2003; Alonso, Martin et al. 2005), andere von der Degradation während des eigentlichen Elektrophoresevorgangs (Corkill, Graham et al. 2000; Fawley and Wilcox 2002; Klaassen, Van Haren et al. 2002).
Andere Gründe für die immer wieder zu beobachtende mangelnde Typisierbarkeit von *C. perfringens*-Isolaten mittels PFGE können allerdings nicht ausgeschlossen werden. Neben dem unvollständigen Proteinverdau (Maslow, Slutsky et al. 1993) könnte v.a. die mangelnde Lysis der Bakterienzelle Ursache für die Nichttypisierbarkeit sein (Spencer 1998; Stolle, Sperner et al. 2001; Schalch, Bader et al. 2003).

4.3 Ausblick

Mit den vorliegenden PFGE-Protokollen war keine Typisierung von *C. perfringens*-Isolaten möglich. Die angeführten Versuche, die in Anlehnung an etablierte Protokolle für die Typisierung von *C. perfringens* oder anderer Erreger bearbeitet wurden, ließen keinen Schluss auf die genaue Ursache der fehlenden Auftrennung der Erreger-DNS mittels PFGE zu. Um die genaue Ursache der mangelnden Typisierbarkeit zu eruieren, könnten verschiedene Ansätze in Betracht gezogen werden. Beachtet werden sollte grundsätzlich, dass unterschiedliche Isolate derselben Clostridium spp. sich in Bezug auf die Anwendung eines gewissen PFGE-Protokolls nicht immer gleich verhalten müssen. So bedeutet die erfolgreiche Typisierung eines individuellen Stammes mit einem bestimmten Protokoll nicht grundsätzlich, dass dieses Protokoll für weitere Stämme derselben Spezies geeignet ist (Stolle, Sperner et al. 2001). Neben der weiteren Optimierung der PFGE sollten deshalb auch alternative Techniken bedacht werden.

Zur Optimierung des PFGE-Protokolls könnte in zukünftigen Arbeiten die bakterielle Aufbereitung weiter modifiziert werden. Neben der Testung definierter Erregerzahlen sollte

untersucht werden, ob die Bakterien nach der anaeroben Anzüchtung hauptsächlich in vegetativer Form oder in Sporenform vorliegen und ob die Sporenform einen negativen Einfluss auf die Typisierbarkeit der DNS hat. Auch wäre es möglich, dass Dauerformen der Bakterien eine andere Aufbereitung benötigen; so wäre z.B. eine verlängerte Zelllysis oder DNS-Restriktion oder auch ein höher konzentriertes Enzym denkbar. Des Weiteren könnten Untersuchungen mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen wie ApaI oder I-CeuI und anderen Proteinasen durchgeführt werden.

In der Zwischenzeit sind PCR-basierte Verfahren wie die Multi-Locus-Sequenz-Typisierung (MLST), repetitive-element PCR oder DNS-Mikroarrays entwickelt worden, die die hier beschriebenen Probleme der PFGE weitestgehend umgehen. Außerdem berichteten Fawley et al. (Fawley, Freeman et al. 2008) über die Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analyse (MLVA), die sich gegenüber der PFGE bei der Klärung von klonalen Beziehungen zwischen *C. difficile*-Stämmen innerhalb einer Institution und zwischen verschiedenen Institutionen als überlegen erwies.
Alle vier Methoden wurden kürzlich erfolgreich zur molekularen Typisierung von *C. perfringens* bzw. *difficile* eingesetzt (Urwin and Maiden 2003; Perreten, Vorlet-Fawer et al. 2005; Jost, Trinh et al. 2006; Siragusa, Danyluk et al. 2006, Fawley, Freeman et al. 2008). Das Problem der Degradation der Erreger-DNS konnte bei allen Proben umgangen werden, da nur eine geringe Menge an DNS benötigt wurde und die Versuche auch mit teildegradierter DNS durchgeführt werden konnten. Die Methoden unterscheiden sich zwar in ihrer Sensitivität und Spezifität, doch mit allen Verfahren ist eine Aussage über die Klonalität der Bakterienisolate möglich. In den drei zuvor genannten Untersuchungen konnten alle *C. perfringens*-Isolate reproduzierbar typisiert und in Gruppen eingeteilt werden (Urwin and Maiden 2003). Die Methoden lassen sich zudem in wesentlich kürzerer Zeit durchführen als die PFGE und weisen dennoch eine hohe Diskriminierungskraft auf (Siragusa, Danyluk et al. 2006).
Obwohl besonders MLST und die DNS-Mikroarray-Technologie mit hohen Anfangsinvestitionen verbunden sind (Urwin and Maiden 2003; Perreten, Vorlet-Fawer et al. 2005), ist aufgrund zukünftiger Preissenkungen eine rasante Verbreitung zu erwarten. Es ist davon auszugehen, dass PCR-basierte Typisierungsmethoden herkömmliche Methoden wie die PFGE in Zukunft ersetzen werden.
Allerdings ist zu berücksichtigen, dass bei PCR-basierten Methoden im Gegensatz zur PFGE nur eine bestimmte Region des Genoms untersucht wird. Diese Regionen machen ca. 10% des

Genoms (Summe der Amplifikationsstellen) aus, während bei PFGE Analysen ca. 90% der chromosomalen DNS (Summe der Restriktionsstellen) untersucht werden (Singh et al. 2006). Während die Bandenmuster bei der PFGE die Distanzen zwischen den Restriktionsstellen reflektieren (Arbeit, Arbique et al. 2007), werden bei der PCR bestimmte DNS-Abschnitte amplifiziert und nachgewiesen. Zur Amplifikation der Ziel-DNS-Abschnitte ist die Kenntnis der DNS-Sequenzen notwendig, um spezifische Primer einzusetzen. PCR Methoden zeichnen sich durch eine sehr gute Sensitivität und extrem hohe Spezifität aus (Becker 2000). Bereits kleinste genetische Veränderungen können innerhalb der Primerbindungsstellen analysiert werden. Dazu werden allerdings immer neue Primer benötigt, da es durch Punktmutation z.B. während eines Krankheitsausbruchs zu veränderten DNS-Sequenzen kommen kann (Singh, Goering et al. 2006). Dies ist bei einer kleinen Anzahl an Proben möglich (Belkum, Tassios et al. 2007). Bei longitudinalen Studien mit einer großen Anzahl an Proben besteht allerdings die Gefahr, dass aufgrund genetischer Mutationen und der großen Anfälligkeit der PCR-Methoden gegenüber veränderten Bedingungen und Reagenzien klonale Zusammenhänge nicht aufgedeckt werden (Belkum, Tassios et al. 2007). Daher ist der Einsatz PCR-basierender Typisierungsmethoden bei longitudinalen Studien bisher nur begrenzt möglich.

Nach Abschluss der Arbeiten im Rahmen dieser Promotionsschrift wurde im Institut für Hygiene der Charité aufgrund der steigenden Bedeutung der *C. difficile*-Infektionen ein PFGE-Protokoll zur Typisierung von *C. difficile*-Stämmen etabliert. Wesentliche Unterschiede zu den in dieser Arbeit angewandten Methoden stellt das Waschen der Bakterien in Lysislösung mit Lysostaphin vor Herstellung der Agaroseblöckchen, die Inkubation in Lysozym für 5 statt 16 bzw. 24 h, die Zugabe von RNAse zur SmaI-Restriktion, die Restriktion für 1 statt 16 h und die Zugabe von Thiourea zum Laufpuffer dar (persönliche Mitteilung, Fr. D. Weist, Institut für Hygiene der Charité). Ausgewählte *C. perfringens*-Stämme wurden in einem Pilotexperiment in der überarbeiteten PFGE mitgeführt. Ergebnisse dieses Pilotexeriments sind in Abb. 4-1 dargestellt.

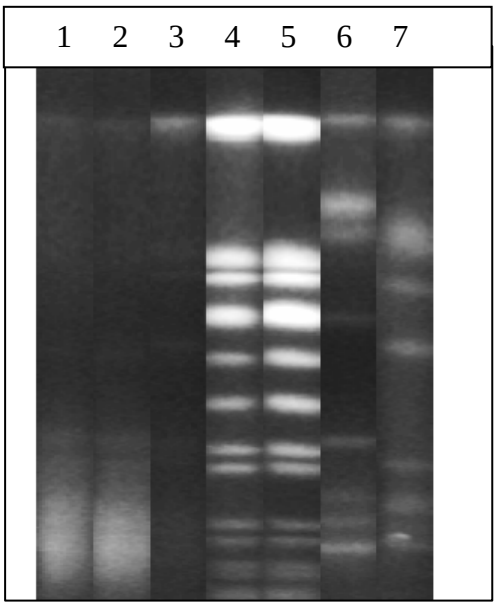


Abbildung 4-1: PFGE-Protokoll für *C. difficile*
PFGE-Bandenmuster von SmaI verdauter DNS von *C. perfringens*-Isolaten. Die DNS wurde nach einem modifizierten PFGE-Protokoll für *C. difficile* im Institut für Hygiene der Charité aufbereitet. Folgende Modifikationen wurden im Vergleich zum Protokoll nach Maslow et al. wie in 2.6 beschrieben angewandt: Waschen der Bakterien in Lysislösung mit Lysostaphin vor der Herstellung der Blöckchen, Inkubation in Lysozym für 5 h, Zugabe von RNAse zur SmaI-Restriktion, Restriktion für 1 h, Zugabe von Thiourea zum Laufpuffer. Elektrophoreseparameter: 1%iges Agarosegel in 0,5% TBE, 6 V/cm, Winkel 120°, Pulszeit: 1-35 s, Laufzeit: 22 h. Bande 1: Isolat-Nr. 49, Bande 2: Isolat-Nr. 55, Bande 3: CPE+ Kontrolle aus Erfurt, Banden 4 und 5: Molekulargewichtsmarker *Staphylococcus aureus* 8325 (NCTC), Bande 6: Isolat-Nr. 521, Bande 7: Isolat-Nr. 143 (s. Anhang 8.1).

Während die Kontrollstämme (MRSA 8235 NCTC) eine deutliche Bandentrennung zeigen, lässt sich bei den *C. perfringens*-Stämmen 521 und 143, nicht jedoch bei den Stämmen 49 und 55, ein weniger deutliches Bandenmuster erkennen. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Typisierung von *C. perfringens*-Stämmen in der PFGE grundsätzlich möglich ist, jedoch von großer Variabilität in der Typisierbarkeit individueller Stämme geprägt zu sein scheint. Die Typisierung der Isolate 49 und 55 verdeutlicht, dass trotz kürzerer Verdauzeiten und der Verwendung von Thiourea die DNS-Degradation durch Endonucleasen weiterhin als Hauptursache der Nichttypisierbarkeit angesehen werden sollte. Allerdings scheint bei einigen Stämmen (wie bei der CPE+ Kontrolle aus Erfurt, Bande 3) eine verbesserte Bakterien- und DNS-Aufbereitung nötig zu sein, um Verunreiniungen der DNS durch RNA oder Proteine zu verhindern.

5 Zusammenfassung

Die AAD ist eine nosokomiale Infektion, die bei stationären Patienten zu verlängertem Krankenhausaufenthalt, zusätzlichen diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen und erhöhten Kosten für das Gesundheitswesen führt. Als Haupterreger der AAD gelten das Bakterium *Clostridium difficile* und seit den 80er Jahren auch das Bakterium *Clostridium perfringens*. *C. perfringens* ist weltweit als Erreger bei Lebensmittelintoxikationen bekannt. 2-5% aller *C. perfringens*-Isolate produzieren ein Enterotoxin (CPE), das auch in Stuhlproben von Patienten mit AAD gefunden wurde.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Pulsfeld-Gelelektrophorese als molekulare Typisierungsmethode zu etablieren, um enterotoxinpositive und enterotoxinnegative *C. perfringens*-Stämme zu differenzieren und anhand der damit gewonnenen Ergebnisse klonale Zusammenhänge aufzudecken.

Die verwendeten *C. perfringens*-Isolate stammen aus Stuhlproben von Patienten des CBF der Charité - Universitätsmedizin Berlin, bei denen der Verdacht auf eine AAD bestand.
Zur Etablierung eines geeigneten PFGE-Protokolls wurden im Rahmen der Arbeit drei Protokolle von unterschiedlichen Laboren (Ludwig-Maximilians-Universität München, Pittsburgh Universität, Charité Berlin) verglichen und anschließend in Anlehnung an Literaturangaben modifiziert.

Trotz der Verwendung etablierter Protokolle und der Adaptation zahlreicher Modifikationen konnten *C. perfringens*-Isolate mittels PFGE nicht erfolgreich typisiert werden. Die Degradation der *C. perfringens*-DNS durch Endonukleasen, nicht vollständige Zelllysis oder Proteinverdauung sowie eine spezielle Art der bakteriellen Aufbereitung wurden als mögliche Ursachen diskutiert.
Um die genaue Ursache der mangelnden Typisierbarkeit festzustellen, sind weitergehende Untersuchungen erforderlich. Alternativ können neue PCR-basierte Verfahren eingesetzt werden. Zur Aufklärung der Epidemiologie der AAD ist es dringend notwendig, weiterhin *C. perfringens*-Isolate auf molekularer Ebene zu typisieren, da die AAD eine der häufigsten nosokomialen Infektionen darstellt und die Prävention der Infektion ein wichtiges Instrument der Krankenhaushygiene ist.

6 Summary

AAD is a nosocomial infection which leads to extended hospital stay of stationary patients, additional diagnostic and therapeutic measures, and thus increased costs for the public health service. The most commonly accepted pathogen of AAD is *C. difficile*. Since the 1980s, *C. perfringens*, known as pathogen of food-borne illness, is also discussed in the context of AAD. Two to five percent of all *C. perfringens* isolates found in stool samples of patients infected by AAD produce an enterotoxin (CPE).

The aim of this study was to establish the pulse-field gel electrophoresis as a molecular technique to differentiate enterotoxin positive and -negative *C. perfringens* strains and to clarify their clonal relationships.

C. perfringens isolates used in the present study were isolated from stool samples of hospitalized patients of the CBF (Charité-Universitätsmedizin Berlin) with a putative diagnosis of AAD. In order to establish a PFGE protocol three existing protocols kindly provided by different laboratories were compared and modified. Despite numerous modifications *C. perfringens* could not be successfully typed by PFGE. As potential causes, the degradation of *C. perfringens* DNS by endonucleases, incomplete cell lysis and/or protein digestion as well as specific techniques for preparation of bacterial DNS are discussed.

Further research is required in order to identify and evaluate the exact cause of unsuccessful typing. The typing of *C. perfringens* isolates on molecular level is essential to clarify the epidemiology of AAD. Due to the fact that AAD is one of the most frequent nosocomial infections prevention is an important tool for hospital hygiene.

7 Literaturverzeichnis

Abrahao, C., R. J. Carman, H. Hahn, O. Liesenfeld (2001). "Similar frequency of detection of Clostridium perfringens enterotoxin and Clostridium difficile toxins in patients with antibiotic-associated diarrhea." Eur J Clin Microbiol Inf Dis 20: 676-677.

Ackermann, G. (2004). "Clostridium difficile - Aktueller Stand." Mikrobiologie 14: 123-129.

Al-Khaldi, S. F., K. M. Myers, A. Rasooly, V.Chizhikor (2004). "Genotyping of Clostridium perfringens toxins using multiple oligonucleotide microarray hybridization." Mol Cell Probes 18: 359-367.

Alonso, R., A. Martín, T. Peláez et al. (2005). "An improved protocol for pulsed-field gel electrophoresis typing of Clostridium difficile." J Med Microbiol 54: 155-157.

Arbeit, R. D., M. Arthur, R. Dunn et al. (1990). "Resolution of recent evolutionary divergence among Escheria coli from related lineages: the application of pulsed-field electrophoresis to molecular epidemiology." J Infect Dis 161: 230-235.

Arbeit, R. D., J. C. Arbique, B. Beall et al. (2007). "Molecular Methods for Bacterial Strain Typing; Approved Guideline." MM1l-A 27(10): 001-084.

Asha, N. J. and M. H. Wilcox (2002). "Laboratory diagnosis of Clostridium perfringens antibiotic-associated diarrhoea." J Med Microbiol 51: 891-894.

Ayyagari, A., J. Agarwal, A. Garg (2003). "Antibiotic Associated Diarrhoea: Infectious Causes." Ind J Med Microbiol 21(1): 6-11.

Barbara A. J., H. T. Trinh, R. D. Glock (2007). "Necrotic enteritis-producing strains of Clostridium perfringens displace non-necrotic enteritis strains from the gut of chicks." Vet Microbiol 126: 377-382.

Barrett, T. J., H. Lior, G. H. Green et al. (1994). "Laboratory investigation of a multistate food-borne outbreak of Escherichia coli 0157:H7 by using pulse-field gel electrophoresis and phage typing." J Clin Microbiol 32: 3013-3017.

Bartlett, J. G. (2002). "Antibiotic-associated diarrhea." N Engl J Med 346(5): 334-339.

Bartlett, J. G. (1996). "Management of Clostridium difficile infection and other antibiotic associated diarrhoea." Eur J Gastroenterol Hepatol 8: 1054-1061.

Bartlett, J. G. (1994). "Clostridium difficile: history of its role as an enteric pathogen and the current state of knowledge about the organism." Clin Infect Dis 18(Suppl 4): S265-272.

Bartlett, J. G. (1992). "Antibiotic-associated diarrhea." Clin Infect Dis 15: 573-581.

Bartlett, J. G., T. W. Chang, M. Gurwith (1978). "Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia." N Engl J Med 298: 531-534.

Bartlett, J. G., A. B. Onderdonk, R. L. Cisneros, D. L. Kasper (1977). "Clindamycin-associated colitis due to a toxin- producing species of Clostridium in hamsters." J Infect Dis 136(5): 701-705.

Becker, K. (2000). "Prinzipien und Stellenwert von Nuleinsäure-Nachweistechniken (NNT) in der modernen mirkobiologischen Diagnostik." Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther. 35: 35-40.

Borriello, S. P., F. E. Barclay, A. R. Welch et al. (1985). "Epidemiology of diarrhoea caused by enterotoxigenic Clostridium perfringens." J Med Microbiol 20(3): 363-372.

Borriello, S. P., H. E. Larson, A. R. Welch et al. (1984). "Enterotoxigenic Clostridium perfringens: a possible cause of antibiotic-associated diarrhoea." Lancet 1(8372): 305-307.

Brazier, J. S. (2001). "Typing of Clostridium difficile." Clin Microbiol Infect 7: 428-431.

Brett, M. M., J. C. Rodhouse, T. J. Donovan, G. M. Tebbutt, D. N. Hutchinson (1992). "Detection of Clostridium perfringens and its enterotoxin in cases of sporadic diarrhoea." J Clin Pathol 45: 609-611.

Canard, B. and S. T. Cole (1989). "Genome organization of the anaerobic pathogen Clostridium perfringens." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6676-6680.

Chalmers, G., S.W. Martin, D. B. Hunter (2008)."Genetic diversity of Clostridium perfringens iolated from healthy broiler chickens at a commercial farm." Vet Microbiol 127: 116-127.

Cleary, P. P., E. L. Kaplan, C. Livdahl, S. Skjord (1988). "DNA fingerprints of Streptococcus pyogenes are M type specific." J Infect Dis 158: 1317- 1323.

Collie, R. E. and B. A. Mc Clane (1998). "Evidence that the enterotoxin gene can be episomal in Clostridium perfringens isolates associated with non-food-borne human gastrointestinal diseases." J Clin Microbiol 36(1): 30-36.

Corkill, J. E., C. A. Graham, C. A. Hart, S. Stubbs (2000). "Pulsed-field gel electrophoresis of degradation-sensitive DNAs from Clostridium difficile PCR ribotype 1 strains." J Clin Microbiol 38: 2791-2792.

Daube, G., P. Simon, B. Limbourg et al. (1996). "Hybridization of 2,659 Clostridium perfringens isolates with gene probes for seven toxins (alpha, beta, epsilon, iota, theta, mu and enterotoxin) and for sialidase." Am J Vet Res 57: 496-501.

Devlin, H. R., W. Au, L.Foux, W. C. Bradbury (1987). "Restriction endonuclease analysis of nosocomial isolates of Clostridium difficile." J Clin Microbiol 25: 2168- 2172.

Eggertson, L. (2004). "Hospitals battling outbreaks of C. difficile." CMAJ 171: 19-21.

Engstrom, B. E., C. Fermer, A. Lindberg et al. (2003). "Molecular typing of isolates of Clostridium perfringens from healthy and diseased poultry." Vet Microbiol 94: 225-235.

Fawley, W. N., J. Freeman, C. Smith et al. (2008). "Use of Highly Disriminatory Fingerprinting to Analyse Clusters of Clostridium difficile Infection Cases Due to Epidemic Ribotype 027 Strains." J Clin Microbiol 46(3): 954-960.

Fawley, W. N. and M. H. Wilcox (2002). "Letter to the editor: Pulsed-Field Gel Electrophoresis Can Yield DNA Fingerprints of Degradation-Susceptible Clostridium difficile Strains." J Clin Microbiol 40(9): 3546-3547.

Fekety, R. (1997). "Guidelines for the diagnosis and management of Clostridium difficile-associated diarrhea and colitis." Am J Gastroent 92(5): 736- 750.

Fekety, R., K. H. Kim, D. Brown et al (1981). "Epidemiology of antibiotic associated colitis: Isolation of Clostridium difficile from the hospital environment." Am J Med 70: 906-908.

Fekety, R. and A. B. Shah (1993). "Diagnosis and treatment of Clostridium difficile colitis." JAMA 269: 71-75.

Finney, J. M. T. (1893). "Gastroenterostomy for cicatrizing ulcer of pylorus." BULL.Johns Hopkins Hosp (4): 53.

Forwald, L. J., D. S. Tompkins, M. M. Brett (2003). "Detection of Clostridium cytotoxin and clostridium perfringens enterotoxin in cases of diarrhoea in the community." J Med Microbiol 52: 753-757.

Fukao, T., M. Sato, Y. Tanaka, C. Monma, N. Kato (2004). "An outbreak of diarrheal disease caused by enterotoxigenic Clostridium perfringens following exposure to a contaminated environment in a nursing home." Kansenshogaku Zasshi 78(1): 32- 39.

Gerding, D. N. (1989). "Disease asoociated with Clostridium difficile infection." Ann Intern Med 110: 255-257.

Gholamiandekhordi A. R., R. Ducatelle, M. Heyndrickx (2006). "Molecular and phenotypical characterization of Clostridium perfringens isolates from pultry flocks with different disease status." Vet Microbiol 113:143-152.

Gibson, J. R., K. Sutherland, R. J. Owen (1994). "Inhibition of DNAse activity in PFGE analysis from Campylobacter jejuni." Lett Appl Microbiol 19: 357-358.

Graf, P. and L. Bader (2000). Gastroenteritis-Ausbruch durch Clostridium perfringens, Robert Koch Institut.

Grimont, P. A. D. and F. Grimont (1986). "Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools." Annales de l`institute Pasteur/ Microbiolgy (Paris) 137B: 165- 175.

Harrison B., D. Raju, H.S. Garmony (2005). "Molecular Characterization of Clostridium perfringens Isolate with Sporadic Diarrhea: Evidence for Transcriptional Regulation of th Beta2-Toxin-Encoding Gene." Appl. Environ. Microbiol 71(12):8362-8370.

Heimesaat, M. M., K. Granzow, H. Leidinger, O.Liesenfeld (2005). "Prevalence of Clostridium difficile Toxins A and B and Clostridium perfringens Enterotoxin A in

Stool Samples of Patients with Antibiotic-Associated Diarrhea." Infection 33(5/6): 340-344.

Hielm, S., J. Björkroth, E. Hyytia, H. Korkeala (1998). "Genomic Analysis of Clostridium perfringens Group II by Pulsed-Field gel Electrophoresis." Appl Environm Microbiol 02: 703-708.

Johansson, A., A. Aspan, E. Bagge, V. Baverud (2006). "Genetic diversity of Clostridium perfringens type A isolates from animals, food porsoning outbreaks and sludge." BMC Microbiology 6(47).

Jonas, D. "personal communication."

Jost, B. H., H. T. Trinh, J. G. Songer (2006). "Clonal relationships among Clostridium perfringens of porcine origin as determined by multilocus sequence typing." Vet Microbiol 116: 158-165.

Kaatz, G.W., S.D. Gitlin, D.R. Scharberg, K.H. Wilson (1988). " Acquisition of Clostridium difficile from the hospital environment." Am J Epidemiol 127(06): 1289-1294.

Kokai-Kun, J. F., J. Glenn Songer, J. R. Czeculin, F. Chen (1994). "Comparison of Western Immonoblots and Gene Detection Assays for Identification of Potentially Enterotoxigenic Isolates of Clostridium perfringens" J Clin Microbiol 32(10): 2533-2539.

Keto-Timonen, R., A. Heikinheimo, E. Eerola, H. Korkeala (2006). "Identification of Clostridium Species and DNA Fingerprinting of Clostridium perfringens by Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis." J Clin Microbiol 44(11): 4057-4065.

Klaassen, C. H., H. A. Van Haren, A. M. Horrevorts (2002). "Molecular fingerprinting of Clostridium difficile isolates. pulsed-field gel electrophoresis versus amplified fragment length polymorphism." J Clin Microbiol 40(1): 101-104.

Kristjansson, M., M. H. Samore, D. N. Gerding et al. (1994). "Comparison of restriction endonuclease analysis, ribotyping, and pulsed- field gel electrophoresis for molecular differentiation of Clostridium difficile strains." J Clin Microbiol 32(8): 1963- 1969.

Kuijper, E. J., J. H. Oudbier, W. N. Stuifbergen, A. Jansz, H. C. Zanen (1987). "Application of whole-cell DNA restriction endonuclease profiles to the epidemiology of Clostridium difficile-induced diarrhea." J Clin Microbiol 25: 751-753.

Kyne, L., M. B. Hamel, R. Polavaram, C. P. Kelly (2002). "Health care costs and mortality asoociated with nosocomial diarrhea due to Clostridium difficile." Clin Infect Dis 34: 346-353.

Larson, H. E., J. V. Parry, A. B.Price, D. R. Davies, D. A Tyrrellet (1977). "Underdescribed toxin in pseudomembranous colitis." BMJ 1: 1246-1248.

Larson, H. E., A. B. Price, P. Honour, S. P. Borriello (1978). "Clostridium difficile and the aetiology of pseudomembranous colitis." Lancet i: 1063-66.

Lin, Y.-T. and R. Labbe (2003). "Enterotoxigenicity and genetic relatedness of Clostridium perfringens isolates from retail foods in the united states." App Environ Microbiol 69(3): 1642-1646.

Lukinmaa, S., U.-M. Nakari, M. Eklund, A. Siitonen (2004). "Application of molecular genetic methods in diagnostics and epidemiology of food-borne bacterial pathogens." A P MIS 112: 908-929.

Lukinmaa, S., E. Takkunen, A. Siitonen (2002). "Molecular epidemiology of Clostridium perfringens related to food- borne outbreaks of disease in Finland from 1984 to 1999." Appl Environ Microbiol. 68(8): 3744-3749.

Maslanka, S. E., J. G. Kerr, G. Williams et al. (1999). "Molecular subtyping of Clostidium perfringens by pulsed- field gel electrophoresis to facilitate food- borne- disease outbreak investigations." J Clin Microbiol 37(7): 2209-2214.

Maslow, J. N., A. M. Slutsky, R. D. Arbeit (1993). The application of pulsed field gel electrophoresis to molecular epidemiology. Diagnostic molecular microbiology. D. M. Persing, T. F. Smith, F. C. Tenover and T. J. White. Washington, D.C., Am Soc Microbiol: 563-572.

McDonald, L. C. (2005). "Clostridium difficile: responding to a new threat from an old enemy." Infect Control Hosp Epidemiol 26(8): 672-675.

McFarland, L. V., M. E. Mulligan, R. Y. Y. Kwok, W. E. Stamm (1989). "Nosocomial acquisition of Clostridium difficile Infection." N Eng J Med 320(4): 204-210.

McLauchlin, J., G. Ripabelli, M. M. Brett, E. J. Threlfall (2000). "Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of Clostridium perfringens for epidemiological typing." Int J Food Microbiol 56: 21-28.

Miyamoto, K., Q. Wen, B. A. McClane (2004). "Multiplex PCR genotyping assay that distinguishes between isolates of Clostridium perfringens type A carrying a chromosomal enterotoxin gene (cpe) locus, a plasmid cpe locus with an IS1470- like sequence, or a plasmid cpe locus with an IS1151 sequence." J Clin Microbiol 42(4): 1552-1558.

Modi, N. and M. H. Wilcox (2001). "Evidence for antibiotic induced Clostridium perfringens diarrhoea." J Clin Pathol 54: 748-751.

Mpamugo, O., T. Donovan, M. M. Brett (1995). "Enterotoxigenic Clostridium perfringens as a cause of sporadic cases of diarrhoea." J Med Microbiol 43: 442-445.

Nauerby, B., K. Pederson, M. Madson (2003). "Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of the genetic diversity among Clostridium perfringens isolates from chickens." Vet Microbiol 92: 257-266.

Oeding, P. and K. Austarheim (1954). "The occurence of Staphylococci in the intestinal content after treatment with antibiotics." Acta Pathol Microbiol Scand 35: 473-483.

Olive, D. M. and P. Bean (1990). "Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms." J Clin Microbiol 37: 1661-1669.

Perreten, V., L. Vorlet-Fawer, P. Slickers et al. (2005). "Microarray-Based Detection of 90 Antibiotic Resistance Genes of Gram-Positive Bacteria." J Clin Microbiol 43(5): 2291-2302.

Pituch, H., N. Van den Braak, A. Van Belkum et al. (2002). "Characterization of Clostridium perfringens stains isolated from polish patients with suspected antibiotic-associated diarrhea." Med Sci Monit 8(3): 85-88.

Reichardt C., I. F. Chaberny A. Kola et al (2007). "Dramatic increase of diarrhea associated with *Clostridium difficile* in Germany: has the new strain PCR-ribotype 027 reached us? " Dtsch Med Wochenschr 132(5): 223-228

Ribot, E. M., C. Fitzgerald, K. Kubota et al. (2001). "Rapid pulsed- field gel electrophoresis protocol for subtyping of campylobacter jejuni." J Clin Microbiol 39(5): 1889-1894.

Ridell, J., J. Bjorkroth, H. Eisgruber et al. (1998). "Prevalence of the enterotoxin gene and clonality of Clostridium perfringens strains associated with food-poisoning outbreaks." J Food Prot 61(2): 240-243.

Rodloff, A. C. (2001). Obligat anaerobe sporenbildende Stäbchen (Clostridien). Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. H. Hahn, D. Falke, S. Kaufmann and U. Ullmann. Berlin Heidelberg; New York, Springer. 4.: 357-360.

Samuel, S. C., P. Hancock, D. A. Leigh (1991). "An investigation into Clostridium perfringens enterotoxin- associated diarrhoea." J Hosp Inf 18: 219- 230.

Sarker, M. R., R. P. Shivers, S. G. Sparks, V. K. Juneja, B M. McClane (2000). "Comparative experiments to examine the effects of heating on vegetative cells and spores of clostridium perfringens isolates carrying plasmid genes versus chromosomal enterotoxin genes." Appl Environ Microbiol. 66(8): 3234-3240.

Schalch, B., L. Bader, H.-P. Schau et al. (2003). "Molecular typing of Clostridium perfringens from a food- borne disease outbreak in a nursing home: ribotyping versus pulsed- field gel electrophoresis." J Clin Microbiol 41(2): 892-895.

Schalch, B., J. Björkroth, H. Eisgruber, H. Korkeala, A. Stolle (1997). "Ribotyping for Strain Charaterization of Clostridium perfringens isolates from food poisoning cases and outbreaks." Appl Environ Microbiol. 63(10): 3992-3994.

Schalch, B., B. Sperner, H. Eisgruber, A. Stolle (1999). "Molecular methods for the analysis of clostridium perfringens relevant to food hygiene." FEMS Immunol Med Microbiol 24: 281-286.

Schneider, T. and M. Zeitz (2001). "Häufige infektiöse Enteritiden." DMW 126 (18): 527-531

Schwartz, D. C. and C. R. Cantor (1984). "Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis." Cell 37: 67-75.

Silva, J. (1994). "Nosocomial infections - still lethal and persistent." Infect Control Hosp Epidemiol 15: 368-369.

Singh, A., R. V. Goering, S. Simjee et al. (2006). "Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection." Clin Microbiol Rev 19(3): 512-530.

Siragusa, G. R., M. D. Danyluk, K. L. Hiett, M. G. Wise, S. E. Craven (2006). "Molecular Subtyping of Poultry-Associated Type A Clostridium perfringens Isolates by Repetitive-Element PCR." J Clin Microbiol 44(3): 1065-1073.

Songer, J. G. (1996). "Clostridial enteric diseases of domestic animals." Clin Microbiol Reviews 9(2): 216-234.

Sparks, S. G., R. J. Carman, M. R. Sarker, B. A. McClane (2001). "Genotyping of enterotoxigenic Clostridium perfringens fecal isolates associated with antibiotic-associated diarrhea and food poisoning in North America." J Clin Microbiol 39(3): 883-888.

Spencer, R. C. (1998). "Clinical impact and associated costs of Clostridium difficile-associated disease." J Antimicrob Chemo 41(Suppl. C): 5-12.

Sperner, B., B. Schalch, H. Eisgruber, A. Stolle (1999). "Short protocol for pulsed field gel electrophoresis or a variety of Clostridia species." FEMS Immunol Med Microbiol 22: 287-292.

Stolle, A., B. Sperner, B. Schalch, H. Eisgruber (2001). "Comparison of protocols for pulsed-field gel electrophoresis of Clostridia." Electrophoresis 22: 1585-1589.

Tanaka, D., J. Isobe, S. Hosorogi et al. (2003). "An outbreak of food- borne gastroenteritis caused by Clostridium perfringens carrying the cpe gene on a plasmid." Jpn J Infect Dis 56: 137-139.

Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering et al. (1995). "Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing." J Clin Microbiol 33(9): 2233-2239.

Urwin, R. and C. J. Maiden (2003). "Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology." Trends Microbiol 11(10): 479-487.

Vaishnavi, C., S. Kaur, K. Singh (2005). "Clostridium perfringens type A & antibiotic associated diarrhoea." Ind J Med Res 122: 52- 56.

Van Belkum, A., P. T. Tassios, L.Dijkshoorn et al. (2007). "Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial eprdemiology." Clin Microbiol Inf Dis 13(Suppl.3): 1-46.

Wada, A., Y. Masuda, M. Fukayama et al. (1996). "Nosocomial diarrhoea in the elderly due to enterotoxigenic Clostridium perfringens." Microbiol Immunol. 40(10): 767-771.

Walters, B. A., R. Stafford, R. K. Roberts, E. Seneviratne (1982). "Contamination and cross infection with Clostridium difficile in an intensive care unit." Aust. N. Z. J. Med. 12: 255-258.

Warny, M., J. Peoin, A. Fang et al. (2005). "Toxin production by an emerging strain of Clostridium difficile associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe." Lancet 366 (9491): 1079-1084.

Waters, M., A. Savoie, H. S. Garmory et al. (2003). "Genotyping and phenotyping of beta2-toxigenic Clostridium perfringens fecal isolates associated with gastrointestinal diseases in piglets." J Clin Microbiol 41(8): 3584- 3591.

Wilcox M. H., J. G. Cunniffe et al (1996). "Financial burden of hospital-acquired *Clostridium difficile* infection. " J Hosp Inf 34: 23-30.

Wilkins, T. D. and D. M. Lyerly (2003). "Clostridium difficile testing: after 20 years, still challenging." J Clin Microbiol 41: 531-540.

Yoo, H. S., S. U. Lee, K. Y. Park (1997). "Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of Clostridium perfringens types by multiplex PCR." J Clin Microbiol 35(1): 228-232.

8 Appendix

8.1 Übersicht der *C. perfringens*-Isolate

Tabelle 4: Übersicht der bakteriellen Isolate (Abk.: CHI=Chirurgie, DERM=Dermatologie, GAST=Gastroenterologie, HAEM=Hämatologie, INT-K=Intensivmedizin, ISO=Isolierstation, PMED=Poliklinik für Innere Medizin, PSY=Pyschiatrie)

Isolate-Nr.	Eingangs-Datum	Station	Stuhl-konsistenz L=liquid SS=semisolid S=solid B=bloody M=mucous	Clostridium perfringens Kultur nachweis	ELISA zur Identifikation des *C. perfringens*-Entero-toxins	PCR zum Nachweis des *C. perfringens*-Enterotoxins
10	01.05.	INTK	SS	Pos	neg	Neg
17	01.06.	CHI	S	Pos	neg	Neg
22	01.07.	AUF	SS	Pos	neg	Neg
47	01.12.	HAEM	S	Pos	neg	Neg
48	01.12.	ISO	S	Pos	neg	Neg
49	01.12.			Pos	**pos**	**Pos**
54	13.01.	ISO	S	Pos	**pos**	Neg
58	13.01.	HAEM	S	Pos	neg	Neg
61	13.01.	HAEM	S	Pos	neg	Neg
68	15.01.	GAST	SS	Pos	neg	Neg
69	15.01.	CHI	SS	Pos	neg	Neg
74	18.01.	GAST	B	Pos	neg	Neg
75	18.01.	HAEM	SS	Pos	**pos**	Neg
78	18.01.	HAEM	SS	Pos	neg	Neg
83	19.01.	HAEM	SS	Pos	neg	Neg
85	20.01.	HIV		Pos	**pos**	Neg
90	20.01.	HAEM	SS	Pos	**pos**	Neg
99	22.01.	PSY	SS	Pos	**pos**	Neg
104	22.01.	PSY	SS	Pos	**pos**	Neg
109	25.01.	HAEM	SS	Pos	neg	Neg
140	29.01.	ISO	SS	Pos	neg	Neg
143	29.01.	ISO	SS	Pos	neg	**Pos**
161	03.02.	HIV	SS	Pos	neg	Neg
162	04.02.	HAEM	SS	Pos	neg	Neg
167	05.02.	INT-K	M	Pos	neg	Neg
177	08.02.	HAEM	SS	Pos	neg	Neg
179	09.02.	INT-K	SS	Pos	neg	Neg
180	09.02.	HAEM	SS	Pos	neg	Neg
182	10.02.	HAEM	SS	Pos	neg	Neg
188	12.02.	HIV	SS	Pos	neg	Neg
196	15.02.	HIV	M	Pos	neg	Neg
197	15.02.	HIV	M	Pos	neg	Neg
229	22.02.	PMED	M	Pos	neg	Neg
246	24.02.	GAST	SS	Pos	neg	Neg
250	26.02.	GAST	M	Pos	neg	Neg
291	09.03.	DERM	M	Pos	neg	Neg
335	22.03.	HAEM	SS	Pos	neg	Neg
355	29.03.	HIV	M	Pos	neg	Neg
362	31.03.	HAEM	S	Pos	neg	Neg

365	01.04.	GAST	SS	Pos	**pos**	**Pos**
368	01.04.	ISO	SS	Pos	**pos**	
378	06.04.	INTK	S	Pos	neg	Neg
385	07.04.	CHI	SS	Pos	neg	Neg
389	09.04.	AUF	S	Pos	neg	Neg
391	09.04.	HAEM	SS	Pos	neg	Neg
397	13.04.	ISO	SS	Pos	neg	Neg
424	20.04.		S	Pos	neg	Neg
429	21.04.	ISO	SS	Pos	neg	Neg
446	26.04.	HAEM	S	Pos	neg	Neg
457	29.04.	HAEM	SS	Pos	neg	Neg
466	30.04	GAST	SS	Pos	neg	Neg
481	03.05.	CHI	SS	Pos	neg	Neg
490	05.05.	GAST	SS	Pos	neg	Neg
492	06.05.	HAEM	SS	Pos	neg	Neg
518	11.05.	HAEM	S	Pos	neg	Neg
521	11.05.	HAEM	SS	Pos	neg	Neg
528	12.05.	HIV	SS	Pos	neg	Neg
603	31.05.	HAEM	S	Pos	neg	Neg
442		PSY	S	Pos		
451		PSY		Pos		
489		HAEM	S	Pos		
523		ISO		Pos		
529		ISO		Pos		

8.2 Vergleich der drei eingesetzten Protokolle mit PFGE-Protokollen der internationalen Literatur

Tabelle 5: Vergleich der drei eingesetzten Protokolle mit PFGE-Protokollen der internationalen Literatur (Abk.: Prot K =Proteinase K, üN = über Nacht)

Protokoll-verlauf	Arbeits-schritte	Sperner et al. 1999	Collie et al. 1998	Maslow et al. 1993	Barbara et al. 2008	Chalmers et al. 2008	Lukinmaa et al. 2002	Maslanka et al. 1999	Nauerby et al. 2003
Anzucht	Kultur-wachstum	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h, dann 5 h Bouillon	24 h	24 h
Bakterienauf-bereitung	Waschen der Bakterien	10 mM Tris 1 M NaCl	12,5 mM Tris 1,25 mM NaCl 6,25 mM EDTA	6 mM Tris-HCl 1 M NaCl	10 mM Tris 20 mM NaCl 50 mM EDTA		10 mM Tris 1 M NaCl	75 mM NaCl 25 mM EDTA	1M NaCl 10mM Tris
	Zentrifu-gieren	1 x 1000 x g, 15 min	3 x 13000 rpm, 5 min	2 x 9000 rpm, 5 min	2 x 4000 x g, 20 min		1 x 3000 x g, 15 min		3 x 13000 rpm, 2 min
	Optische Dichte			OD_{610}=0,9-1,2	OD_{600}=1,3	OD_{600}=1,25		OD_{610}=1,3	OD_{620}=1,5
Agarose-blöckchen	Agarosekon-zentration	2%	2%	1,2%	2%	0,8%	2%	1,2%	1,6%
Lysis	Lysis-Puffer	6 mM Tris 1 M NaCl 100 mM EDTA 0,5% Na-Lauroyl Sarkosin 0,2% Na-Desoxycholat 0,5% Brij-58	6 mM Tris 1 M NaCl 100 mM EDTA 0,5% Na-Lauroyl Sarkosin	6 mM Tris-HCl 1 M NaCl 100 mM EDTA 0,5% Na-Lauroyl Sarkosin 0,2% Na-Desoxycholat 0,5% Brij-58	10 mM Tris 50 mM NaCL 0,5% Na-Lauroyl Sarkosin 0,2% Na-Desoxycholat	10 mM Tris 100 mM EDTA	6 mM Tris 1 M NaCl 100 mM EDTA 0,5% Na-Lauroyl Sarkosin 0,2% Na-Desoxycholat 0,5% Brij-58	50 mM Tris-HCL 50 mM EDTA 1% Na-Lauroyl-Sarkosin 1 mg/ml Prot K	10 mM Tris 1 M NaCl 0,2 M EDTA 0,5% Na-Lauroyl Sarkosin 0,2% Na-Desoxycholat
	Wahl und Konzentra-	1 mg/ml Lysozym	1 mg/ml Lysozym	1 mg/ml Lysozym	1 mg/ml Lysozym	50 mg/ml Lysozym	1 mg/ml Lysozym		1 mg/ml Lysozym

	tion der Enzyme	5,16 U/ ml Lysostaphin 0,02 mg/ml RNAse 20 U/ml Mutanolysin 4 ml Lysis-Lösung/ Probe	1 ml Lysis-Lösung/ Probe	10 µl/ ml Lysostaphin 1 ml Lysis-Lösung/ Probe					20 µg/ ml RNAse
	Dauer der Lysis	16 h	12 h	16 h	16 h	5 h	16 h	12 h	18 h
Deproteinisierung	Puffer	0,5 M EDTA 10% Na-Lauroyl Sarkosin 0,1 mg/ml Prot K	0,5 M EDTA 0,5% Na-Lauroyl Sarkosin 1 mg/ml Prot K	0,5 M EDTA 1% Na-Lauroyl Sarkosin 1 mg/ml Prot K	100 mM EDTA 1% Na-Lauroyl-Sarkosin 0,2% Na-Desoxycholat 1 mg/ml Prot K	0,5 M EDTA 1% Sarkosyl 2 mg/ml Prot K	0,5 M EDTA 1% Na-Lauroyl-Sarkosin 0,3 mg/ml Prot K		0,5 M EDTA 10% Na-Lauroyl Sarkosin 1 mg/ml Prot K
	Dauer der Deproteinisierung	2 x 2 h bei 50°C, dann üN	1 x 48 h bei 50°C	2 x je 10 min nur Puffer, dann bei 50°C üN	üN		üN		2 h bei 54°C
	SmaI stoppen						4 mM PMSF,		
Waschen	Puffer	10 mM Tris 1 mM EDTA	10 mM Tris 1 mM EDTA	10 mM Tris 1 mM Na_2-EDTA	20 mM Tris 50 mM EDTA	10 mM Tris 1 mM EDTA	10 mM Tris-HCL 1 mM EDTA	10 mM Tris 10 mM EDTA	Steriles H_2O
	Zeit	4 x 15 min	3 x 1-2 h	3 x je 1 h in 14 ml TE	4 x in 50 ml 20 mM Tris 50 mM EDTA	5 x 30 min	3 x 30 min	3 x 15 min in sterilem H_2O, 3 x 15 min in TE	3 x bei 54°C
Restriktion	Puffer	100 µl/Block	200 µl/Block	50 µl/Block	200 µl/Block	200		Puffer mit 20	

		verdünnter Puffer	für 2 h bei 25- 30°C	für 45 min bei 4°C	für 15 min bei 25°C	µl/Block für 20 min		mg/ ml Rinderserum-albumin	
	Wahl und Konzentra-tion des Enzyms	100 µl Puffer und 20 U SmaI/Block üN	200 µl Puffer und 5 µl SmaI/Block üN	50 µl Puffer und 3 µl SmaI/Block	12 U SmaI bei 25°C üN	200µl Puffer und 100 U SmaI bei 25°C für 5 h	15 U SmaI, 5 U Apa I	SmaI ApaI FspI MluI KspI XbaI, 4 h	20 U SmaI
	Reaktion stoppen				1 ml 0,66x TBE, 30 min				
Elektropho-rese	PFGE GEL	1% Gel 0,5x TBE	1% Gel 1x TBE	1% Gel 1x TBE	1% Gel	1% Gel TE	1% Gel	1% Gel 0,5x TBE	1% Gel 0,5x TBE
	Laufpuffer	0,5x TBE	0,5x TBE	1x TBE		0,5x TBE, 200 µl Harnstoff		0,5x TBE	0,5x TBE
	Laufzeiten		CHEF III: 46 h 5-120 s 4,5 V/cm 120°	Keine Angaben für Clostridien Spp.	CHEF II: 20 h 0,5-40 s 6 V/cm 120°	CHEF III: 19 h 4-38 s 6 V/cm 120°	CHEF II: 20 h 0,5-50 s	Mapper XA PFGE: 20 h 0,5-40 s 6 V/cm	CHEF III: 10 h 7-12 s, 10 h 20-40 s 6 V/cm 120°
Auswertung	Färbung: Ethidiumbro-mid								2 µl/ml, 15 min

8.3 Tabellarischer Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

8.4 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Oliver Liesenfeld für das Überlassen des Themas und die stetige Betreuung. Er hat mir bei diversen Fragen hilfreich zur Seite gestanden und mich bei Rückschlägen stets neu motiviert, neue Anregungen und Vorschläge gemacht und viel Geduld gezeigt.

Herrn Prof. Dr. H. Hahn und Herrn Prof. Dr. Dr. U. Göbel danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in der Abteilung für Medizinische Mikrobiologie und Infektionsimmunologie des Campus Benjamin Franklin der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Allen Mitarbeitern des Institutes, und hier möchte ich besonders Jutta Imlau und Uschi Rüschendorf erwähnen, möchte ich für die freundliche Unterstützung, die gute Zusammenarbeit und die fachliche Beratung danken.

Ein weiterer großer Dank gilt Dr. Klaus und Dagmar Weist des Institutes für Hygiene, die für mich ständige Ansprechpartner waren, Versuche mit mir zusammen durchführten und mit ihrer Erfahrung und ihrem Wissen immer bemüht waren, die Arbeit voranzutreiben.

Zum guten Schluss danke ich natürlich all denjenigen, die mich bei der Anfertigung der Arbeit unterstützt haben und somit sehr wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Neben meinen Eltern und Geschwistern möchte ich besonders Tobias Zimmermann erwähnen, der maßgeblich dazu beigetragen hat, dass am Ende jede Seite auch eine Ziffer hatte!

Erklärung

„Ich, Lisa Kehr, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Vergleich dreier Pulsfeld-Gelelektrophorese-Protokolle zur Typisierung von *Clostridium perfringens*-Isolaten selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 16.07.2009 Lisa Kehr