

3. Material und Methoden

3.1. Bakterienstämme

Die Untersuchungen zur Serotypie von *E. coli*-Stämmen und die Anwendung alternativer Typisierungsmethoden wurden von 1998-2004 an 4431 Isolaten verschiedenen Ursprungs aus der Sammlung des NRZ für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger, Robert Koch-Institut, Bereich Wernigerode, sowie 235 Referenzstämmen für *E. coli* O- und H-Antigene der Sammlung der WHO-Zentrale für *Klebsiella* und *E. coli* in Kopenhagen, DK, durchgeführt.

3.1.1. Referenzstämmen für *E. coli*-O-Antigene

Zur Herstellung der Testseren für die O-Antigenbestimmung und die Vergleichsuntersuchungen mit der Methode der LPS-Musteranalyse wurden als Referenzstämmen für O-Antigene definierte 181 *E. coli*-Stämme aus der Sammlung der WHO-Zentrale für *Klebsiella* und *E. coli* in Kopenhagen, DK, genutzt. Detaillierte Auflistung siehe Anhang 1.

3.1.2. Referenzstämmen für *E. coli*-H-Antigene

Zur Herstellung der Testseren für die H-Antigenbestimmung, sowie für die Analyse des *fliC*-Gens, wurden die 54 H-Antigen-Referenzstämmen der Sammlung der WHO-Zentrale für *Klebsiella* und *E. coli* in Kopenhagen, DK, verwendet, welche ebenfalls in Anhang 1 aufgelistet sind.

3.1.3. Klinische Stämme von *E. coli*-Infektionen

Aus den laufenden Einsendungen an das NRZ für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger wurden für die Untersuchungen *E. coli*-Isolate ausgewählt, welche unterschiedlichen Pathovaren zugeordnet werden konnten.

Dabei kamen von 1998-2004 insgesamt 4431 Isolate der Pathovaren EHEC/STEC, EAaggEC, EPEC, ETEC und ExPEC zur Anwendung. Von diesen wurden 222 Stämme einer LPS-Analyse unterworfen und 39 Stämme für die *fliC*-PCR, sowie die 120 Stämme für die Optimierung der Serotypiemethode eingesetzt. Diese Stämme sind in Anhang 3 aufgeführt.

3.1.4. *E. coli*-Stämme aus Ringversuchen (EQA)

Für die Prüfung der internationalen Vergleichbarkeit der erarbeiteten *E. coli*-Serotypie-Protokolle (SOP) wurden 23 *E. coli*-Stämme eingesetzt, welche zu Ringversuchszwecken von der WHO-Zentrale für *Klebsiella* und *E. coli* in Kopenhagen, DK, an das NRZ versandt worden waren.

Die Stämme sind in Anhang 2 enthalten.

3.2. Medien

Zur Untersuchung von Einflüssen der Kulturbedingungen auf die Ausbildung der O- und H-Antigene kamen verschiedene Nährmedien zur Anwendung.

3.2.1. Nährmedien für die Anzucht und biochemische Charakterisierung

Zur Anzucht der Bakterienstämme kamen folgende Nährmedien zum Einsatz:

Enterohämolysinagar mit und ohne Antibiotika (Novobiocin, Cefsoludin),
Galle-Chrysoidin-Glycerol-Agar,
Nähragar.

Ihre Zusammensetzung ist in Anhang 4 aufgeführt.

3.2.2. Nährmedien für die Bildung der *E. coli*-O-Antigene

Die Bildung der O-Antigene der *E. coli*-Stämme erfolgte mit Hilfe von:

Enterohämolysinagar ohne Antibiotika,
Nähragar,
Antigen-Bouillon.

Die Zusammensetzung ist in Anhang 4 enthalten.

3.2.3. Nährmedien und Chemikalien für die Bildung der E. coli-H-Antigene

Für die Isolierung der H-Antigene wurden zuzüglich zu den unter 3.2.2. aufgeführten Medien eingesetzt:

Beweglichkeitsagar,

PBS-Formalin-Lösung.

Die Zusammensetzung ist in Anhang 4 aufgeführt.

3.2.4. Nährmedien und Chemikalien für die LPS-Präparation

Die Anzucht der Bakterien für die LPS-Präparation erfolgte in Nährbouillon und auf Tryptic-Soy-Agar.

Für die Präparation wurde Tris-Puffer verwendet.

Die Zusammensetzungen sind in Anhang 4 und 5 aufgeführt.

3.3. Anzucht der Stämme

Die Anzucht der Stämme erfolgte in der Regel durch fraktionierten Ausstrich auf Enterohämolysinagar-Platten (siehe Anhang 4) über Nacht bei 37°C im Inkubator. Abweichende Anzuchtverfahren sind in den jeweiligen Abschnitten aufgeführt.

3.3.1. Beweglichkeit

Die Prüfung der Beweglichkeit erfolgte in U-Röhrchen (mundgeblasenes Glasrohr, Durchmesser 8 mm; Rettberg GmbH), die zu $\frac{3}{4}$ mit Beweglichkeitsagar gefüllt waren (siehe Anhang 5).

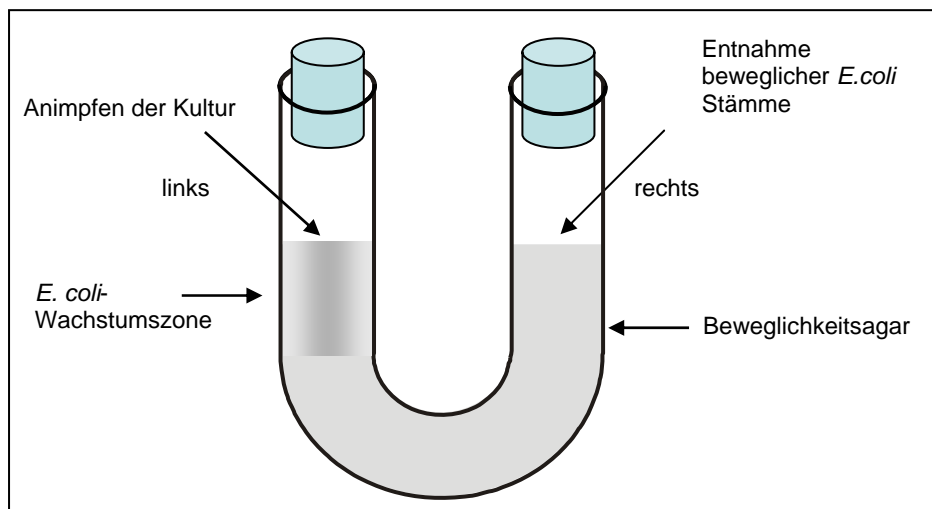
Nach dem Beimpfen mit einer Kolonie einer Über-Nacht-Kultur von *E. coli* auf Enterohämolysinagar-Platten mittels Impföse oder Glasstab auf der jeweils linken Seite des U-Röhrchens, wurden die Stämme im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Das Wachstum wurde täglich beobachtet und protokolliert. Eine schematische Darstellung dieses Vorgehens ist in Abbildung 4 zu sehen.

Als „beweglich“ wurden solche Stämme bewertet, die auch die rechte Seite, also das komplette U-Röhrchen durchwachsen. Als „unbeweglich“ wurden solche Stämme bewertet, die nach 14 Tagen nicht die rechte Seite, d.h. weniger als $\frac{2}{3}$ des U-Röhrchens durchwachsen.

Für die Präparation zur H-Antigen-Bestimmung erfolgte eine zweite Passage im U-Röhrchen mit Material (ca. 10µl) von der durchwachsenen rechten Seite des 1.U-Röhrchens. Nach erneuter Inkubation bei 37°C konnten nach 24- 48 Stunden, wiederum aus der durchwachsenen rechten Seite des U-Röhrchens, Proben für die weitere Bearbeitung entnommen werden (siehe Abbildung 4).

Abbildung 4: Beweglichkeitsprüfung mittels U-Röhrchen



3.3.2. Sauerstoffmangel

Zur Prüfung der Produktion von (LPS) und Flagellin unter Sauerstoffmangelbedingungen erfolgte die Anzucht der *E. coli*-Stämme in unterschiedlichen Medien (Tryptic-Soy-Agar, Nähragar, Beweglichkeitsagar) auf Petrischalen und in U-Röhrchen im Anaerobiertopf (Oxoid Ltd.) unter Zusatz von Ascorbinsäure als Reduktionsmittel (AnaeroGen™, OXOID, GB).

Die Inkubationszeit betrug für LPS 24 Stunden bei einer Inkubationstemperatur von 30 und 37°C.

Die Bildung von Flagellen wurde bei 30 und 37°C über einen Zeitraum von 14 Tagen untersucht.

3.3.3. Temperatur

Analog zu der unter 3.1. beschriebenen Prüfung der Beweglichkeit wurden Stämme bei 30°C und bei Raumtemperatur (Klimatisierung der Laborräume: 21°C + 3°C) kultiviert, zur Untersuchung der Variabilität der *E. coli*-Flagellen-Expression.

3.4. Biochemische Charakterisierung der Isolate

Die Typisierung der *E. coli*-Stämme durch Klassifizierung der O-Antigene und H-Antigene erfolgt unter der Voraussetzung der eindeutigen Identifizierung der Spezies.

Insbesondere für die klinischen Stämme aus *E. coli*-Infektionen (siehe Abschnitt 3.1.3.) wurde die Testung biochemischer Stoffwechselreaktionen mit der „Bunten Reihe nach FARMER“ angewandt (siehe Anhang 6) (FARMER, 1996; EWING, 1986).

Nicht eindeutig identifizierbare Isolate wurden mittels BIOLOG MicroLog TMSsystem, Release 4.0, nach Herstellervorschrift untersucht.

3.5. Herstellung und Prüfung der Testseren zur Erfassung von *E. coli*-O- und H-Antigenen

Die Grundlage der Serotypie von *E. coli*-Stämmen bilden Testseren, die auf der Basis von Antigen-Präparationen aus Referenzstämmen mit charakteristischen Antigenstrukturen hergestellt wurden. Es werden hierzu die definierten 235 *E. coli*-Referenzstämmen der WHO-Zentrale für *Klebsiella* und *E. coli*, Kopenhagen, DK, für O- und H-Antigene verwandt.

3.5.1. Antigen-Präparation

Die Präparation der Antigene erfolgte nach biochemischer und serotypischer Überprüfung der entsprechenden *E. coli*-Referenzstämmen. Die Anzucht wurde durchgeführt wie unter 3.2.2., 3.3. und 3.3.1. beschrieben.

3.5.1.1. O-Antigene

Jeweils eine Kolonie einer bestätigten Kultur wurde mittels Impfüse von einer Enterohämolysinagar-Platte ohne Antibiotika nach Standard-Anzucht (18 Stunden, 37°C) in 6 Röhren mit je 8 ml Antigen-Bouillon abgeimpft.

Dieser Bouillon wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Abtötung der Bakterien und Zerstörung der hitzelablen Kapsel- und H-Antigene wurden die Kulturen für 1 Stunde bei 90°C im Wasserbad erhitzt.

Nach Abkühlung wurde 1ml dieser Bouillon in ein separates Gefäß zur O-Antigen-Kontrolle entnommen. Die Kulturröhren wurden 10 min. bei 5.000 x g zentrifugiert.

Nach Resuspendierung der Pellets in sterile PBS und Herstellung einer Stammlösung durch Einstellung einer optischen Dichte (OD) nach McFarland (gegen einen Bariumsulfat-Standard) von 0,75 war die O-Antigen-Präparation für die Immunisierung einsetzbar.

3.5.1.2. H-Antigene

Zur Präparation von H-Antigenen für die Immunisierung wurde jeweils eine Kolonie, einer im U-Röhren geprüften beweglichen *E. coli*- Referenzkultur, mittels Impfüse von einer Enterohämolysinagar-Platte ohne Antibiotika nach Standard Anzucht (18 Stunden, 37°C) in 6 Röhren mit je 8 ml Antigen-Bouillon angeimpft.

Wie unter 3.5.1.1. beschrieben wurden diese Bouillon-Röhren inkubiert.

Anschließend wurden zur Abtötung der Bakterien und Stabilisierung der H-Antigene je Röhren 800µl 10% PBS-Formalin-Lösung hinzugefügt. Nach einer Einwirkzeit von 1 Stunde bei Raumtemperatur war die H-Antigen-Präparation für die Immunisierung einsetzbar.

Zur serologischen H-Antigen-Kontrolle wurde 1ml fertige Bouillon in ein separates Gefäß überführt und hinsichtlich H- (und O-)Antigen des jeweiligen Referenzstammes geprüft.

3.5.2. Immunisierung

Zur Immunisierung wurden Kaninchen der Rasse New Zealand mit einem Gewicht von 3-5kg (Lieferant: BfR Berlin-Marienfelde; Tierversuchsanzeige: Az.: 42502-3-356, Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt, Halle) verwendet.

Die Räume der Tierhaltung waren klimatisiert auf 18-21°C, hatten 75% rel. Luftfeuchte und einen Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden.

Gefüttert wurde mit Alleinfutter für Kaninchen (ssniff® K-H, SSNIFF Spezialdiäten GmbH), Heubriketts (Pressling, SSNIFF Spezialdiäten GmbH) und Wasser ad libitum.

Nach einer Quarantänezeit von einer Woche ab Lieferung wurden den Tieren gemäß Immunisierungsschema (siehe Tabellen 1, 2) die Antigen-Präparationen i.v. in die Ohrtrandvene appliziert.

Mit Beendigung des Versuches wurden die Tiere nach Inhalationsnarkose entblutet.

Tabelle 1: Immunisierungsschema für O-Antigene

Tag	Immunisierungsmenge	Zellzahl (ca. KBE)
0/ Probeblut	-	-
1	0,5 ml	5×10^8
3	1,0 ml	1×10^9
7	1,5 ml	$1,5 \times 10^9$
10	2,0 ml	2×10^9
14/ Probeblut	2,0 ml	2×10^9
17	2,0 ml	2×10^9
21/ Entbluten		

Tabelle 2: Immunisierungsschema für H-Antigene

Tag	Immunisierungsmenge	Zellzahl (ca. KBE)
0/ Probeblut	-	-
1	0,5 ml	5×10^8
5	1,0 ml	1×10^9
10	1,0 ml	1×10^9
15	2,0 ml	2×10^9
20	2,0 ml	2×10^9
25/ Probeblut		
30/ Entbluten		

3.5.3. Serumgewinnung

Das Serum aus dem in sterilen Glasgefäßen (z.B. Erlenmeyerkolben) aufgenommenen Blut wurde nach Inkubation bei 37°C für 1 Stunde und anschließender Kühlung bei 4°C über Nacht gewonnen. Die Reste des Blutkuchens wurden durch Zentrifugation bei 5.000 x g abgetrennt.

Die Aufbewahrung der Antiseren erfolgte bei 4°C nach Zusatz von 1ml 10%iger NaN₃-Lösung pro 100 ml Serum.

Zur Testung der Titer und zur Prüfung mit dem Referenzset wurde eine Gebrauchsverdünnung von 1:10 in PBS hergestellt.

3.5.4. Testung der Seren mit den homologen Stämmen und dem Referenzset

Zur Testung der Antiseren wurden die zur Immunisierung eingesetzten Antigen-Präparationen (Abschnitte 5.1.1. und 5.1.2.), sowie Antigen-Präparationen von klinischen Stämmen aus der Stammsammlung des NRZ und Antigen-Präparationen von Referenzstämmen mit bekannten kreuzreagierenden Komponenten im Mikrotiterplatten (MTP)-Assay (siehe Abschnitt 3.6.2. und 3.6.3.) getestet.

3.5.5. Kommerziell verfügbare Seren

Im Vergleich mit den eigen produzierten Testseren wurden ausgewählte Seren der Firmen SIFIN GmbH Berlin, D und SSI Kopenhagen, DK, getestet. Die verfügbaren Seren sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Die Testung erfolgte wie in Abschnitt 3.6.2. und 3.6.3. beschrieben.

Tabelle 3: Zur Testung nach SOP eingesetzte kommerziell verfügbare Seren

<i>E. coli</i>-Testserum	Hersteller
O91	SIFIN
O103	SIFIN
O118	SIFIN
O119	SIFIN

O125	SIFIN
O126	SIFIN
O128	SIFIN
O145	SIFIN
H2	SSI
H11	SSI
H31	SSI

3.6. Serologische Testung von *E. coli*- O- und H-Antigenen im Mikrotiterplatten-Assay

Die O- und H-Antigenpräparationen erfolgten wie unter 3.3.1., 3.5.1., 3.5.1.1. und 3.5.1.2. für die Präparation der Immunisierungssuspensionen beschrieben. Für die Präparation der Antigene von *E. coli*-Stämmen für die Serotypie wurde jedoch jeweils nur 1 Röhrchen mit 8 ml Antigen-Bouillon beimpft.

Bei Lagerung von 4°C und steriler Entnahme von Material waren diese O- und H-Antigen-Präparationen mehrere Wochen (bis zu 1 Jahr) verwendungsfähig.

3.6.1. O-Antigen-Bestimmung

Die O-Antigen-Bestimmung erfolgte im 3-Schritt-Verfahren als Agglutinationsreaktion, wobei im 1. Schritt unter Ausnutzung von Antigenverwandtschaften Testseren gruppiert werden, die mit ähnlichen Strukturen reagieren. Im 2. Schritt werden alle Einzelkomponenten einer positiv reagierenden Gruppe (Pool) getestet. Der abschließende 3. Schritt erlaubt durch Bewertung des Titers nach einer Titration positiv reagierender Einzel-Testseren, die Bestimmung des O-Typs.

3.6.1.1. Poolseren

Die Gruppierung ähnlich reagierender Testseren in sogenannten „Pools“ erfolgte analog zu den bei ØRSKOV et al. (1984) publizierten Gruppen.

Für den Einsatz in Mikrotiterplatten wurden Arbeitsverdünnungen von 1:200 hergestellt, indem je 0,5ml aller Einzelseren eines Pools mit PBS-Azid ad 100,0 ml aufgefüllt wurden. Die O-Antiserum-Pools sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: O-Antiserum-Pools

Pool	Antiserum gegen <i>E.coli</i>-O-Ag
A	1,2,50,74,149
B	3,23,28ac,38,115
C	4,16,18ab,18ac,19
D	5,7,39,65,70,71,114,116
E	6,9,30,55,57
F	8,46,60,75,93
G	17,44,77,106,111,113
H	25,26,62,68,73,102
I	12,15,40,78,87,92,96
J	13,21,22,32,34,83,85,140
K	14,20,107,117,118,123,138,148
L	86,88,90,127,128ab,141
M	10,11,24,27,28ab,29,33,36,37,41,56
N	42,43,45,48,49,51,52,54,58,59,61
O	63,64,66,69,76,79,80,81,82,112ab,144,150
P	84,89,91,95,97,98,99,100,101,103,104,105
Q	108,109,110,119,120,121,124,125ab,125ac,126,130,131
R	132,134,136,137,142,143,145,146,170
S	35,129,133,135,139,147,171,172,173
T	151,152,153,154,155,156,157
U	158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169
W	174,175,176,177,178,179,180,181

3.6.1.2. Agglutination

Für die Agglutinationsreaktionen wurden 96- well-Mikrotiterplatten (MTP) aus Polystyrol mit U-Boden (Greiner, D) verwendet.

Sie wurden mit je 25µl der Poolseren A-W beschickt. Zu jeder Vertiefung mit Poolserum wurde anschließend 25µl der zu testenden O-Antigen-Präparation hinzugefügt.

Anschließend wurden die Testansätze durch leichtes Schütteln der MTP durchmischt, die MTP mit Deckel verschlossen und durch Abkleben oder Aufbewahrung in Boxen vor Verdunstung geschützt. Nach Inkubation bei 50°C über Nacht konnten die Agglutinate mit Hilfe eines speziellen Ablesespiegels für MTP (Dynex, NL) ausgewertet werden.

Eine positive Reaktion war durch flächige körnige Agglutination gekennzeichnet.

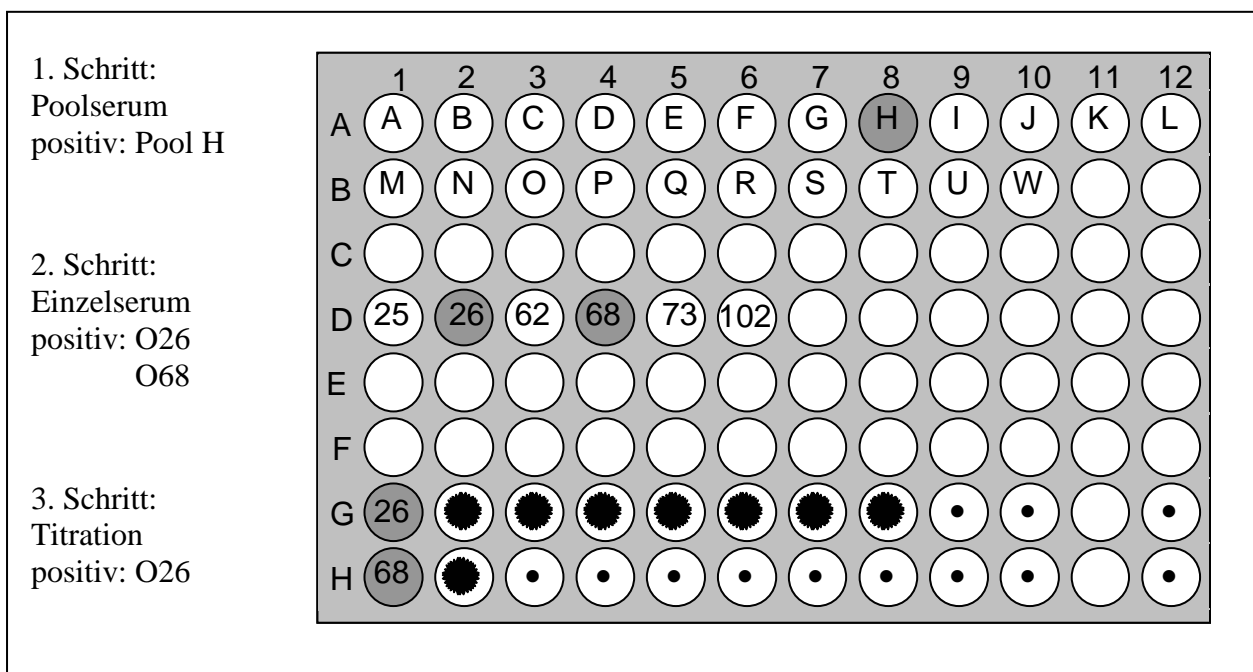
Eine negative Reaktion war durch punktförmig am Boden der U-förmigen Vertiefung zusammen gelagerten Bakterien zu identifizieren.

Anschließend wurde in gleicher Weise jedes Einzelserum mit der O-Antigen-Präparation getestet, das in dem entsprechenden positiv agglutinierenden Poolserum enthalten war.

Die Einordnung des O-Antigens wurde durch Titration der positiv bewerteten Einzelseren beginnend mit einer Verdünnung von 1:20 wie vorstehend getestet.

Zur eindeutigen Identifizierung des O-Antigens musste eine Agglutinationsreaktion bis zur 4. Titerstufe zu verzeichnen sein (siehe Abbildung 5).

Abbildung 5: Schematische Darstellung der *E. coli*-O-Antigentestung im MTP-Assay für ein *E. coli* O26-Isolat



3.6.2. H-Antigen-Bestimmung

Analog zu den unter 3.6.1. beschriebenen Verfahren wurde die Präparation der H-Antigene vorgenommen, falls das *E.coli*-Isolat positiv in der Beweglichkeitsprüfung (Abschnitt 3.3.1.) bewertet worden war.

Auch die H-Antigen-Agglutination erfolgte im beschriebenen 3-Schritt-Verfahren.

3.6.2.1. Poolseren

Ebenso wie die Testseren für die O-Antigenbestimmung wurden die Seren für die H-Antigenbestimmung in Gruppen (Poolseren), wie bei ØRSKOV und ØRSKOV (1984) publiziert, eingeordnet. Der Herstellung der Pools musste durch die z. T. hohen Titer gegen den homologen Referenzstamm folgendermaßen realisiert werden:

Pool A bis I enthielten je 5 Seren, die ad 50,0 ml mit PBS-Azid aufgefüllt wurden, nach Mischung der Einzelseren entsprechend ihrem Titer , wie folgt:

Titer 1:10000 und mehr: 0,2 ml

Titer über 1:5000: 0,4 ml

Titer über 1:2000: 1,0 ml

Titer 1:1280: 2,0 ml .

Pool J enthielt 8 Seren und wird demnach ad 80,0 ml PBS-Azid aufgefüllt.

Die Poolseren der H-Antigen-Gruppen sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: H-Antiserum-Pools

Pool	<i>E. coli</i>-H-Antigen
A	1,2,3,12,16
B	4,5,6,9,17
C	8,11,21,40,43
D	7,10,14,15,18
E	19,20,23,24,25
F	26,27,28,29,31
G	30,32,34,36,41
H	33,35,37,38,45
I	39,42,44,46,47
J	48,49,51,52,53,54,55,56

3.6.2.2. Agglutination

96-well-Mikrotiterplatten (MTP) aus Polystyrol mit U-Boden (Greiner, D) wurden mit je 25µl der Poolseren A-J beschickt. Pro Vertiefung wurden 25µl H-Antigen-Präparation hinzugefügt (siehe Abschnitt 3.6.1.2).

Anschließend wurden die Suspensionen in den MTP durch leichtes Schütteln gemischt, mit Deckel versehen und bei 50°C 2 Stunden inkubiert.

Die Auswertung der Agglutinate wurden die MTP auf einem speziellen Ablesespiegel für MTP (Dynex, NL) begutachtet.

Positive Reaktionen waren durch wolkige großflächige Agglutinationen gekennzeichnet.

Als negative Reaktionen wurden punktförmige Ablagerungen am Boden der U-förmigen Vertiefung bewertet (Abbildung 5).

Wie unter 3.6.1.2. für O-Antigene beschrieben, wurde auch für die Identifizierung der H-Antigene der 2. und 3. Schritt mit gleichen Bewertungskriterien durchgeführt (Abbildung 5).

3.7. LPS-Musteranalyse

Für die molekulare Analyse der serologisch bestimmten O-Antigene wurde ein Verfahren zur LPS-Musteranalyse mittels SDS-PAGE eingesetzt.

3.7.1. Präparation der LPS

Von einer Vorkultur auf TSA-Platten (klein) wurden je 2-3 Kolonien in 5 ml Nährbouillon-Röhrchen überimpft. Diese wurden im Schüttelinkubator (37°C, 150 U/min) 5 Stunden geschüttelt. Anschließend wurden die Bouillons auf 2 große TSA-Platten ausgespatelt und diese nochmals bei 37°C über Nacht (ca. 18 h) inkubiert.

Zur Aufarbeitung wurden die Platten mit 10 ml Trispuffer abgeschwemmt und die Suspension in Zentrifugenröhrchen überführt.

Nach Kühlzentrifugation bei 10000 U/min für 10 min (4°C)) wurden die Sedimente in 10 ml Trispuffer aufgenommen und unter gleichen Bedingungen nochmals zentrifugiert.

Die Sedimente wurden anschließend in 8 ml Trispuffer aufgenommen und mittels Ultraschall (4 min, 100W, 20kHz) aufgeschlossen.

Die gewonnene Suspension wurde bei 8000U/min 15 min (4°C), und anschließend 2ml dieses Überstands bei 25000U/min für 1 h (4°C) zentrifugiert.

Die durch Abnehmen der Überstände gewonnenen Sedimente wurden in 400µl Auftragspuffer gelöst, in Eppendorf-Röhrchen überführt und nach einem Kochschritt (5 min im Wasserbad) mit 40µl Proteinase K versetzt.

Nach einer Inkubation bei 60°C für 1 Stunde (Wasserbad) waren die Präparationen für die SDS-PAGE verwendungsfähig.

3.7.2. Elektrophorese

Die Erfassung der LPS-Muster von *E. coli*-Stämmen erfolgte mit Hilfe der SDS-PAGE welche ein Analyseverfahren darstellt, das ausschließlich nach Molekülgröße trennt (BOLLANG und EDELSTEIN, 1991).

3.7.2.1. Präparation der SDS-PAGE-Gele

Es erfolgte eine Eigenherstellung der Gele mit einer Schichtdicke von 1 mm in Gelkammer „Multigel Long“ (Biometra, D) nach Pipettierschema wie in Tabelle 6.

Tabelle 6: Pipettierschema für die Herstellung der SDS-Gele

Trenngel (12%ig):	
Trenngelpuffer	12,5 ml
Acrylamidfertiglösung	10,0 ml
SDS	2,5 ml
APS	0,63 ml
TEMED	50µl

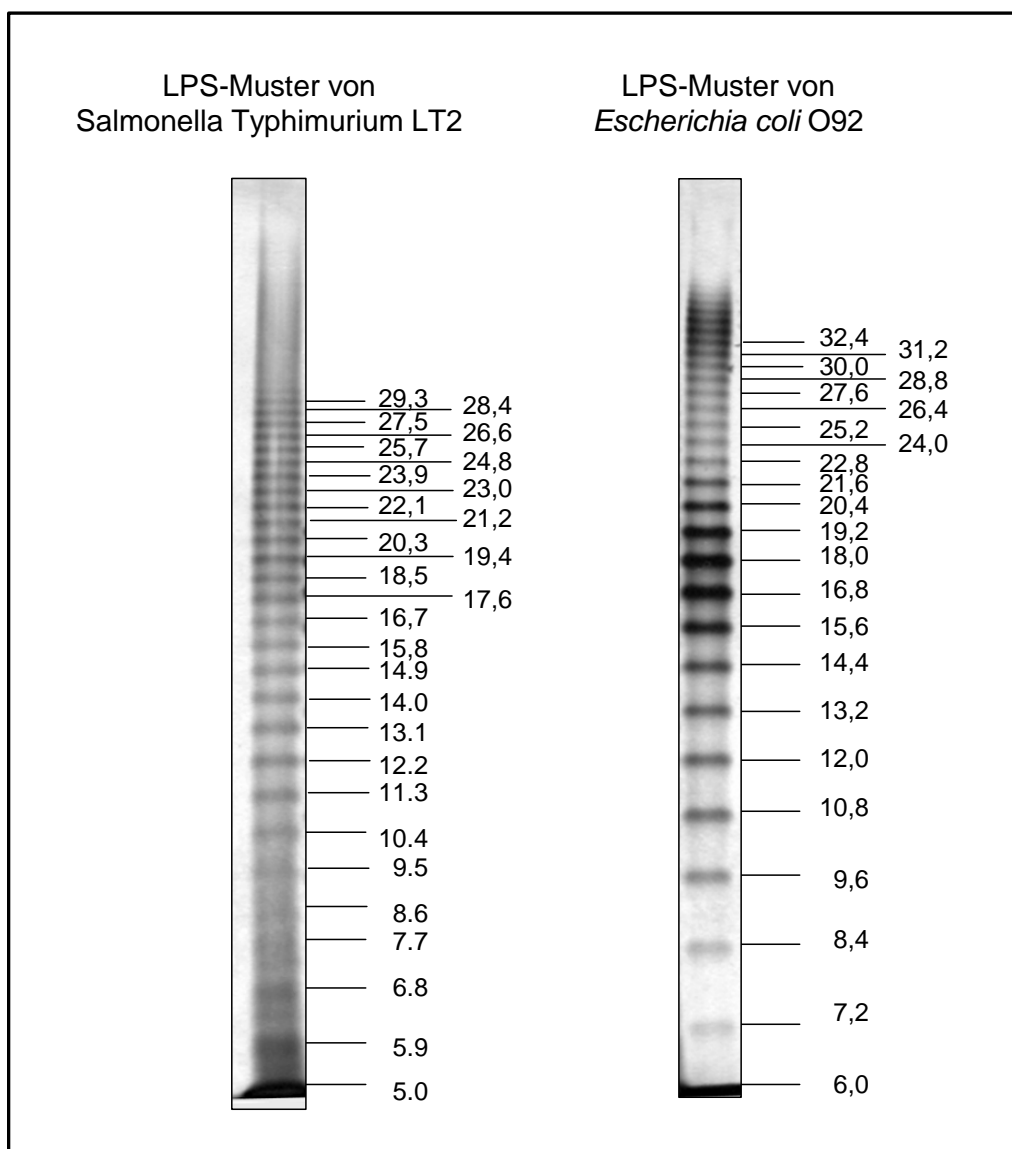
Sammelgel (3%ig):	
Obergelpuffer	5,0 ml
Acrylamidfertiglösung	1,5 ml
SDS	0,5 ml
APS	0,24 ml
Aqua bidest.	3,26 ml
TEMED	35µl

3.7.2.2. Laufbedingungen

Nach dem Auftragen der Proben wurde die elektrophoretische Auftrennung mit einer Spannung von 500V und einer Stromstärke von 30mA (Sammelgel) und 40 mA (Trenngel) ca. 2 Stunden durchgeführt.

Als Standards wurden Aufarbeitungen von *E. coli* O92 und *S. Typhimurium* LT2 (= S.Tm 618) verwendet (siehe Abbildung 6). Anhand des bekannten Molekulargewichts der Repeating unit (RU) von S.Tm 618 wurde der Wert von *E. coli* O92 berechnet, und zur Auswertung der *E. coli*-Stämme herangezogen, weil auf *E. coli* Bezug genommen werden sollte (HANCOCK et al., 1994).

Abbildung 6: Standards für die Auswertung der LPS-SDS-PAGE



3.7.2.3. Färbung der Gele

Die Gele wurden mittels Silberfärbung nach TSAI und FRASCH (1982) entwickelt. Hierbei wird das SDS-PAGE-Gel in Ethanol (10%) gespült, mit 0,7% Periodsäure oxidiert. Mit 0,1% Silbernitratlösung für 20 min. wird das Gel sensibilisiert und mit dem Reduktionsmittel Formalin (3% Natriumcarbonatlösung mit 1vol% Formalin) entwickelt. Durch 1%ige Essigsäure wird die Reaktion gestoppt. Mit aqua dest. gespült, lässt sich das Gel in Cellophan einbetten und im Gelrockner (2h, 63°C) trocknen.

3.7.2.4. Auswertung der Gele

Die Auswertung der Gele erfolgte nach dem Scannen (Imaging Densitometer, Model GS-700, Bio Rad) mit dem Gel-Auswertesystem Molecular Analyst Fingerprinting Plus, Version 1.6 (Bio Rad) und Quantity One Version 4.0 (Bio Rad). Hierzu eignen sich frisch entwickelte Gele ebenso wie getrocknete.

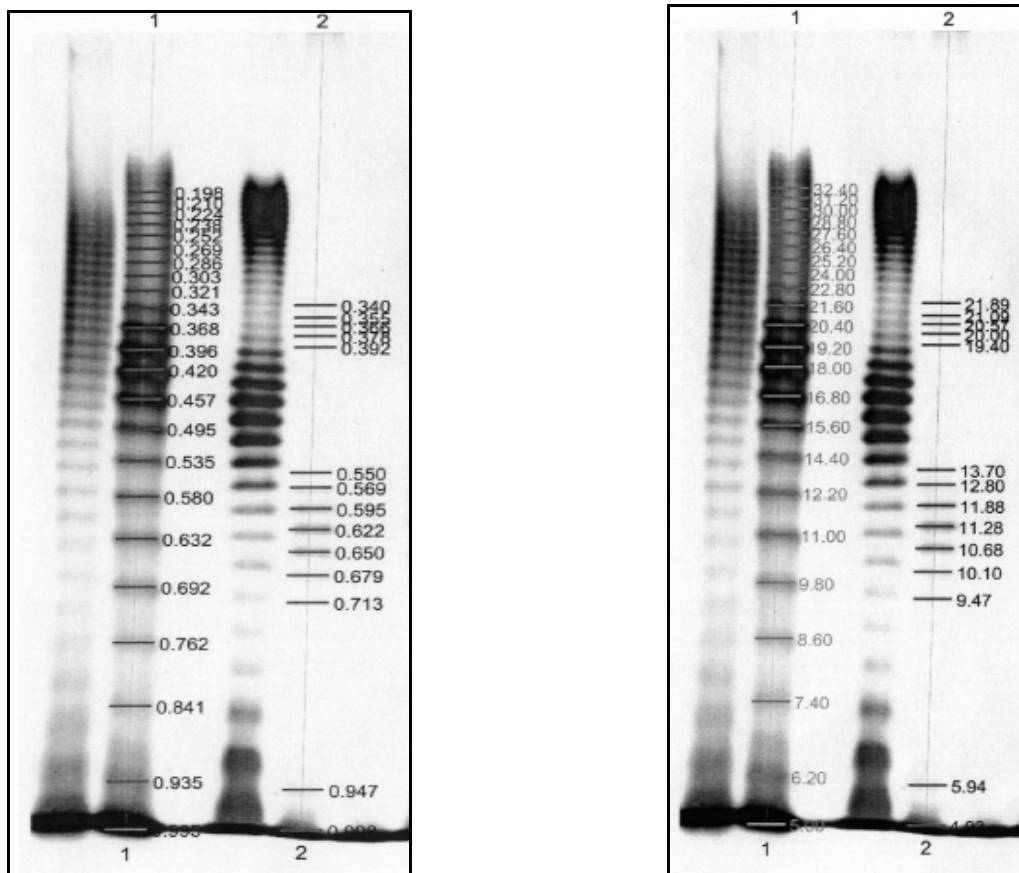
3.7.3. Computergestützte Ermittlung des Molekulargewichts der LPS-Banden

Das o. g. Gel-Auswertesystem lieferte nach Festlegung der Parameter für die Spur der Probe auf dem Gel, die Lauffront und den als Berechnungsgrundlage dienenden Standard, alle für die weitere Analyse verwendeten Daten für jedes Einzelisolat.

3.7.3.1. Ermittlung der Rf-Werte der LPS-Muster

Die Ermittlung der Rf-Werte stellte die Basis dar für die weitere Bearbeitung der Stammeigenschaften zum LPS-Mustervergleich. Nach Festlegung von Lauffront und Standard eines jeden Gels, wurden die 5 Banden eines jeden Isolats ausgewählt und markiert, die mit der stärksten Intensität sichtbar waren. Eine Überprüfung der Intensität und der Richtigkeit der Markierung war durch densitometrische Auswertung und Festlegung von Grenzen innerhalb bestimmter Minimum- und Maximumwerte durch die Auswerte-Software gegeben (Abbildung 8). Durch Vergleich dieser Bandenparameter mit dem Standard wurden daraus Rf-Werte berechnet, aus denen wiederum das Molekulargewicht für jede einzelne Bande ermittelt werden konnte. Abbildung 7 soll diese Ermittlung schematisch darstellen.

Abbildung 7: Schematische Darstellung der Ermittlung von Rf- und MW-Werten

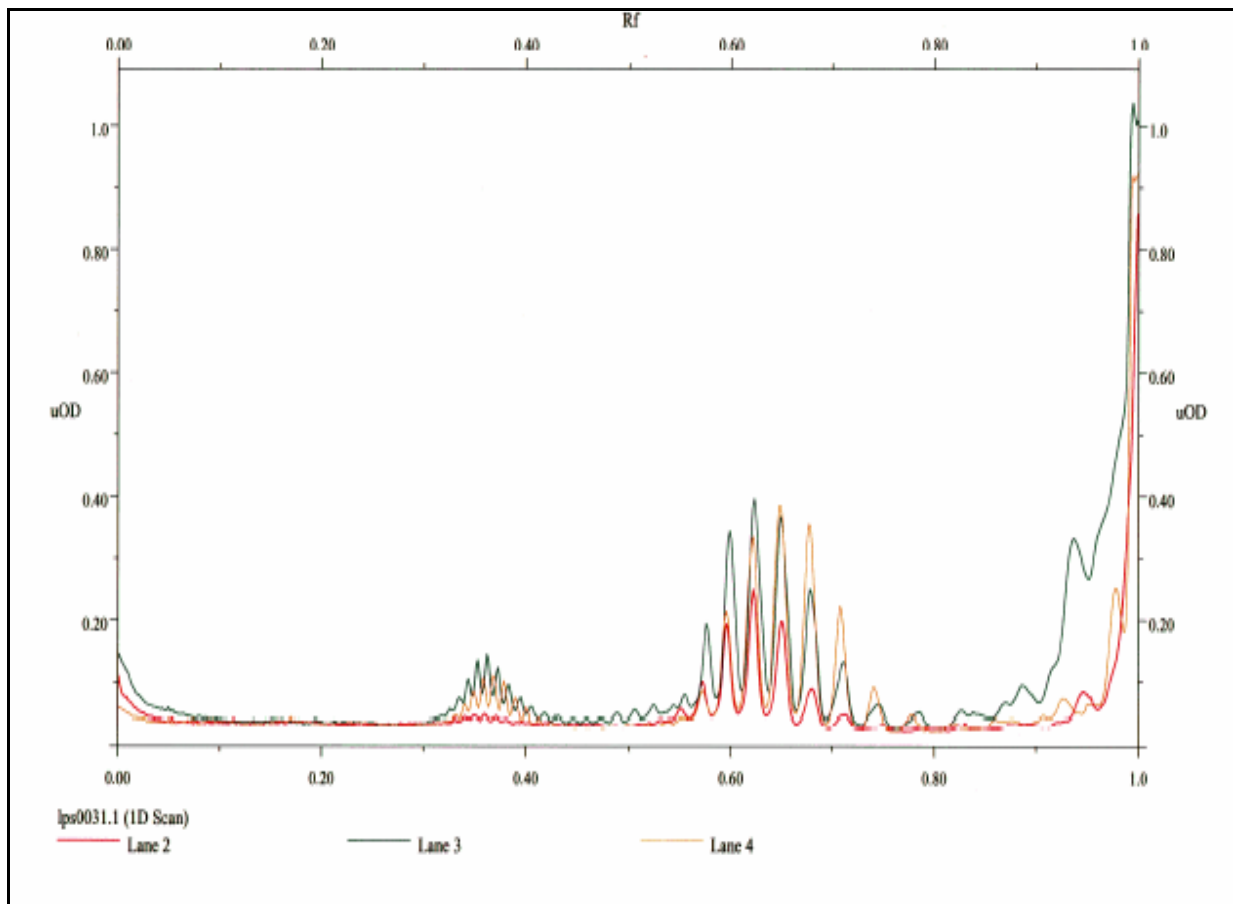


Rf-Werte: *E. coli* O92 *E. coli* 03-03651

Molekulargewichtswerte der LPS-Banden
in Relation zum Standard *E. coli* O92

In Abbildung 8 ist die Intensität der Banden anhand eines Densitogramms von 3 *E. coli* Ont-Stämmen beispielhaft dargestellt. Die 5 aufeinanderfolgenden Banden mit der größten Intensität wurden für die weitere Auswertung der LPS-Muster verwendet. Mit Hilfe des Programms Quantity One 4.0 (Bio Rad) konnte in diesen Desitogrammen außerdem der direkte Mustervergleich von Stämmen eines Gels (bis zu 10 Stämme) erfolgen, da die Lage der Banden anhand ihres Rf-Wertes dargestellt wurde.

Abbildung 8: Densitogramm der LPS-Muster von 3 *E. coli* Ont:H- Isolaten
(nach HECKE, 2004)



3.7.3.2. Molekulargewicht der Repeating unit (RU)

Die Analyse der LPS-Muster erfolgte durch Vergleich einer erstellten Referenzmusterdatei für alle *E. coli*-O-Typstämme der Referenzstammsammlung WHO-Zentrale für *Klebsiella* und *E. coli*, Kopenhagen, DK, (Anhang 1) mit dem jeweiligen zu untersuchenden Muster. Zusätzlich wurde das Molekulargewicht der RU ermittelt, um individuelle Stammeigenschaften (z.B. Polymeraseaktivität bei der LPS-Expression) näher untersuchen zu können. Hierzu wurden Differenzen aus den Molekulargewichten der 5 aufeinander folgenden Banden mit der stärksten Intensität gebildet. Der Durchschnitt aus diesen Werten ergab das für das O-Antigen des Stammes typische Molekulargewicht der RU. Innerhalb einer Gruppe von Stämmen gleichen Serovars bzw. gleicher LPS-Muster (z.B. Ont-Stämme, siehe Abschnitt 4.1.6.8.) konnten so jeweils Serotyp-Konstante numerische Werte für den O-Antigen-Polymorphismus erfasst werden.

3.8. PCR und RFLP des *fliC*-Gens

Die Bestimmung des Polymorphismus des *fliC*-Gens zur Erfassung von H-Antigenen erfolgte wie bei PRAGER, R., STRUTZ, U., FRUTH, A., TSCHÄPE, H. (2003) bereits publiziert. Für die PCR wurden die in Tabelle 7 aufgeführten Primersequenzen verwendet, für die Erfassung der *fliC*-RFLP wurden die Enzyme RsaI und CfoI eingesetzt.

Tabelle 7: PCR-Primer zur Verwendung in der *fliC*-PCR

Bezeichnung	Primersequenz	Referenz
F-FLIC1	5'-atg gca caa gtc att aat acc caa c-3'	FIELDS, P.I. et al., 1997
R-FLIC2	5'-cta acc ctg cag ca gaga ca-3'	
<i>fliC</i> -up	5'-caa gtc att aat ac(a/c) aac agc c-3'	MACHADO, J. et al., 2000
<i>fliC</i> -rev	5'-gac at(a/g) tt (a/g) ga(g/a/c) act tc(g/c) gt-3'	

3.9. Biostatistik

Die Ermittlung der biometrischer bzw. statistischer Größen erfolgte nach KÖHLER et al., 1992.

3.10. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden im Anhang 6 aufgelistet.

3.11. Geräte

Soweit im Text nicht beschrieben wurden alle verwendeten Geräte in Anhang 7 aufgeführt.