



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Fakultät Life Sciences

Thema der Abschlussarbeit:

Vergleich der RIDA GENE[®] Bacterial Stool Panel (r.biopharm) Real-Time PCR mit Kulturen aus der Labordiagnostik zum Nachweis von Infektionen durch *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. und *Yersinia enterocolitica*

Art der Abschlussarbeit:

Bachelor

Im Studiengang:

Biotechnologie

vorgelegt von:

Denise Weige
2078932

Hamburg

am 05.01.2015

Gutachter: Herr Professor Doktor Oliver Ullrich (HAW Hamburg)
Gutachter: Herr Professor Doktor med. Ralf Bialek (LADR)

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor der Firma LADR GmbH medizinisches Versorgungszentrum. Lauenburger Straße 65, 21502 Geesthacht

Danksagung

Diese Bachelorarbeit wurde auf Seiten der Hochschule für Angewandte Wissenschaften (HAW) Hamburg von Herrn Prof. Dr. Ullrich betreut. Dafür und für seine schnellen Antworten auf alle Fragen möchte ich mich hiermit bedanken.

Die Erstellung der Arbeit erfolgte in der Laborärztlichen Arbeitsgemeinschaft für Diagnostik und Rationalisierung (LADR) in Geesthacht in der Abteilung der Mikrobiologie unter der Betreuung von Prof. Dr. Bialek. Ihm möchte ich für seine Betreuung während der ganzen Zeit danken, vom Vorschlag des Themas und Erstellung der interessanten Fragestellungen bis hin zur kritischen Beurteilung meiner Ergebnisse. Zudem bedanke ich mich bei Frau Dr. Zelck für Ihre grundlegende Beratung zum wissenschaftlichen Schreiben und der Laborantin Frau Steffens, die mich eingearbeitet hat und mir bei praktischen Angelegenheiten mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ich danke meinen Eltern und meiner Familie, die mich während des Studiums finanziell und moralisch unterstützt haben und meinem Freund für seine Geduld, auch während der Tiefen und Klausurphasen.

Zuletzt bedanke ich mich noch bei meiner Kommilitonin Stefanie Kaul, die mir immer eine treue und zuverlässige Laborpartnerin war, mir bei einigen Wissenslücken auf die Sprünge geholfen hat und nun zu meinen besten Freunden zählt.

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung.....	1
1.1	<i>Salmonella spp.</i>	2
1.2	<i>Campylobacter spp.</i>	6
1.3	<i>Yersinia enterocolitica</i>	8
1.4	Zielsetzung.....	10
2	Material.....	11
2.1	Geräteliste.....	11
2.2	Chemikalienliste	11
2.3	Patientenproben.....	12
3	Methoden	13
3.1	Bakterienkulturverfahren	13
3.1.1	<i>Salmonella spp.</i>	13
3.1.2	<i>Campylobacter spp.</i>	14
3.1.3	<i>Yersinia enterocolitica</i>	15
3.2	ELISA zum Nachweis von <i>Campylobacter spp.</i> Antigen aus Stuhlproben	16
3.3	DNA-Isolierung.....	17
3.4	Real-Time PCR	18
4	Molekularbiologische Methoden.....	22
4.1	Vorbereitung der Proben	22
4.2	DNA-Isolierung: Maxwell (Promega)	22
4.3	Kochen.....	23
4.4	PCR	23
4.4.1	Kontrollen.....	24
4.5	Analytische und diagnostische Nachweisgrenze	24
4.6	Sensitivität und Spezifität	25
5	Ergebnisse	26
5.1	Analytische und diagnostische Nachweisgrenze	26

5.1.1	<i>Salmonella spp.</i>	27
5.1.2	<i>Campylobacter spp.</i>	29
5.1.3	<i>Yersinia enterocolitica</i>	31
5.2	Patientenproben.....	33
5.2.1	<i>Salmonella spp.</i>	33
5.2.2	<i>Campylobacter spp.</i>	34
5.2.3	<i>Yersinia enterocolitica</i>	36
5.2.4	Besonderheit.....	36
6	Diskussion	37
6.1	Vergleich: Kulturen und PCR.....	37
6.1.1	<i>Salmonella spp.</i> : PCR aus Stuhl und Bouillon	37
6.1.2	<i>Campylobacter spp.</i> : Kulturen, ELISA und PCR	38
6.1.3	<i>Yersinia enterocolitica</i> : Kulturen und PCR.....	38
6.2	Vergleich: DNA Extraktion und Kochen	38
6.3	Nachweisgrenze.....	39
6.4	Empfehlung zum diagnostischem Vorgehen	40
7	Zusammenfassung	41
8	Abbildungsverzeichnis	42
9	Tabellenverzeichnis	43
10	Quellenverzeichnis	44
11	Erklärung	48
12	Anhang.....	49

1 Einleitung

Durchfallerkrankungen sind weltweit ein aktuelles Thema und betreffen sowohl Entwicklungs- als auch Industriestaaten. Jährlich erkranken 2 Milliarden Menschen an Durchfall und er ist die zweithäufigste Todesursache bei Kindern unter 5 Jahren (Weltgesundheitsorganisation, WHO). *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.* und *Yersinia enterocolitica* gehören zu den häufigsten bakteriellen Erregern von Durchfallerkrankungen (Robert-Koch-Institut, RKI).

Über 2.500 *Salmonella*-Serotypen sind beschrieben. Im Jahr 2013 wurden dem RKI 18.986 Salmonellosen gemeldet und war damit die zweithäufigste gemeldete bakterielle Infektionskrankheit des Darms nach der Campylobacteriose. Die meisten Erkrankten sind Kinder unter 10 Jahren, insbesondere Kleinkinder. Todesfälle sind in Deutschland selten, dennoch starben 2008 33 Menschen mit einem Durchschnittsalter von 79 Jahren an einer enteritischen Salmonellose. Die Dunkelziffer liegt möglicherweise höher, da nicht alle gemeldeten Nachweise bis zum Ende verfolgt werden (RKI).

Die meisten Campylobacteriosen werden durch *Campylobacter jejuni*, seltener durch *C. coli* ausgelöst (CDC). 2013 wurden dem RKI 63.636 Campylobacter-Enteritiden gemeldet. 500 Bakterien reichen aus, damit ein Mensch erkrankt. In seltenen Fällen kann nachfolgend das Guillan-Barré-Syndrom entstehen, eine Autoimmunkrankheit des Nervensystems mit aufsteigender Lähmung (RKI).

Yersinia enterocolitica ist eine von drei *Yersinia* Arten, die für den Menschen pathogen sind und eine Yersiniose des Darms verursacht. 2013 wurden dem RKI 2.590 Erkrankungen gemeldet, womit dieses Bakterium nicht so häufig vorkommt wie *Salmonella* und *Campylobacter*. In seltenen Fällen kann sich eine reaktive Arthritis entwickeln (CDC).

Die Infektionen aller drei Bakterien verschwinden nach einer oder mehreren Wochen ohne Behandlung, bei älteren Menschen oder Menschen mit einem geschwächten Immunsystem ist häufig ein Krankenhausaufenthalt notwendig. Therapeutisch ist der Ausgleich des Flüssigkeitsverlustes vorrangig und gegebenenfalls zusätzlich der Einsatz von Antibiotika (CDC).

1.1 *Salmonella* spp.

Salmonella spp. sind Enterobakterien, das heißt sie besiedeln den Darm. Sie sind gramnegativ und stäbchenförmig (Abb. 1). Etwa 2.500 Serotypen sind als humanpathogen bekannt (CDC, 2013).

Salmonella ist, zusammen mit *Campylobacter*, der häufigste bakterielle Enteritiserreger und ihr Nachweis meldepflichtig. 2013 zählte das Robert-Koch-Institut (RKI) 18.986 Fälle. Seit 2001 sinkt die Zahl der Erkrankungen von Jahr zu Jahr.

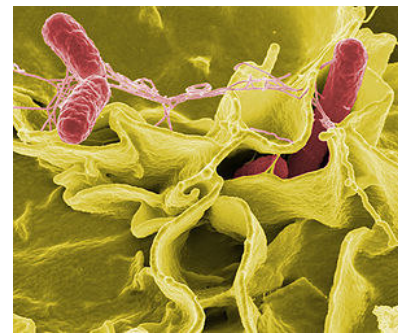


Abb. 1: *Salmonella typhimurium* unter einem Elektronenmikroskop

www.niaid.nih.gov

1874 beschrieb der polnische Pathologe Tadeusz Browicz erstmals das Bakterium als Ursache für Typhus. 1880 wurde der Erreger des *Typhus abdominalis* von den Medizinern Karl Joseph Eberth und Robert Koch entdeckt. 1884 züchtete der deutsche Arzt Georg Gaffky als Erster Salmonellen in Reinkultur. 1889 beschrieb der amerikanische Tierarzt Daniel Elmer Salmon eine Salmonelle, die einen choleraartigen Durchfall beim Schwein verursacht. Ihm zu Ehren wurde die Gattung mit „*Salmonella*“ benannt (Schomaker, 2012).

Salmonella spp. sind Erreger der Salmonellose. Sie gehört zu den Zoonosen, das heißt die Bakterien können von Tier auf Mensch und von Mensch auf Tier übertragen werden. Daher werden die Salmonellen häufig über infizierte Nahrung oder Wasser übertragen wie Fleisch von Tieren, die mit infiziertem Kot in Berührung gekommen sind. Aber auch Obst und Gemüse, die mit dem Kot kranker Tiere gedüngt worden sind, können für die Salmonellose verantwortlich sein. Ein weiterer Infektionsweg ist der Kontakt mit infizierten Tieren oder ihrem Kot in Verbindung mit mangelnder Hygiene. Eier und Geflügel gelten häufig als Infektionsquellen, da bei Vögeln und Reptilien Salmonellen zur normalen Darmflora gehören. Es gibt mehr Infektionen im Sommer als im Winter, da sich bei wärmeren Temperaturen die Salmonellen in Nahrungsmitteln schneller vermehren können. Die Arten *Salmonella typhimurium* und *Salmonella enteritidis* sind die häufigsten Erreger der enteritischen Salmonellose. Die Infektionsdosis liegt bei 10.000 bis 1.000.000 Keimen, bei Risikopatienten (z.B. Kleinkinder, alte Menschen) können auch schon 100 Keime ausreichend sein (RKI).

Der Infizierte bekommt 12 bis 72 Stunden nach Infektion Symptome wie Durchfall, Fieber und Magen-Darm Krämpfe, die nach vier bis sieben Tagen auch ohne spezifische Therapie wieder verschwinden. Menschen mit besonders starkem Durchfall, ältere Menschen sowie Menschen mit einer Immunschwäche müssen gegebenenfalls im Krankenhaus behandelt werden. Dort werden sie durch genügend Flüssigkeitszufuhr gegen Austrocknung und mit Antibiotika gegen die Bakterien behandelt.

Die Infektion mit Salmonellen über Lebensmittel kann durch ausreichendes Kochen verhindert werden, da somit die Salmonellen abgetötet werden. Zudem sollte Obst und Gemüse separat zum Fleisch zubereitet werden und auf ausreichende Hygiene geachtet werden (CDC, 2013).

Der Nachweis von Salmonellen erfolgt in der Laborroutine mittels Anzucht aus Stuhlproben. Die Anzüchtung erfolgt auf Salmonella-Selektivmedien. Die Identifikation gelingt biochemisch mittels bunter Reihe oder anhand der Proteinzusammensetzung mittels Maldi-tof (Laborlexikon, 2014). Die Bunte Reihe ist eine labormedizinische Methode zur Identifizierung von Bakterien. Hierbei werden spezifische Eigenschaften wie Enzymaktivitäten, Substratabbau und Fähigkeiten wie Bewegung überprüft anhand von verschiedenen Nährmedien (flexikon.dockcheck.com).

Eine schnelle Methode zum Nachweis von Salmonellen im Untersuchungsmaterial ist die Polymerase Kettenreaktion. Nachgewiesen wird z.B. das Gen *ttr* (Produkt: Tetrathionatreduktase), das als spezifisch für pathogene Salmonella-Arten angesehen wird. Dieses Gen befindet sich in der Pathogenitätsinsel 2 (Ansammlungen von Virulenzgenen, die sich nur in pathogenen Arten befinden) (Malorny et al., 2004). Befindet sich eine ausreichende Anzahl Salmonellen im Darm, wird eine Entzündungsreaktion ausgelöst, wodurch Immunzellen reaktive Sauerstoffverbindungen freisetzen. Die reaktiven Sauerstoffverbindungen schädigen alle Bakterien. Außerdem entsteht Tetrathionat durch Abbau von Aminosäuren in toten Organismen und durch die Oxidation von Thiosulfat. Mit Hilfe der Tetrathionatreduktase können die Salmonellen das Tetrathionat veratmen und dadurch ihren Energieumsatz steigern. Sie wird als der Grund angesehen, warum sich Salmonellen im Darm so stark vermehren können (Winter et al., 2010).

Mindestens 60 Gene sind für die Pathogenität von Salmonellen verantwortlich. Diese Virulenzgene befinden sich auf Chromosomen und Plasmiden. Viele Gene sind auf den zwölf Pathogenitätsinseln lokalisiert (Hensel, 2004). Bekannt ist, dass sich die Salmonellen mit Hilfe von Fimbrien an die Dünndarmepithelzellen anheften. Ihre Zielzellen sind die M-Zellen in den Peyerschen Plaques (Frost et al., 1997). Die M-Zellen sollen Antigene von Bakterien, Viren und Pilzen durch Endozytose aufnehmen und in die Lamina propria der Darmschleimhaut abgeben. Dort befinden sich dendritische Zellen in den Peyerschen Plaques, die Teil des adaptiven Immunsystems sind und Antikörper bilden (Ohl & Miller, 2001). Nach Anheftung an die M-Zellen sorgen die Transkriptionsprodukte des *invE*-Lokus dafür, dass Ca^{2+} in die M-Zellen einströmt (Kleer, 2003). Dadurch werden die Membranen der M-Zellen ausgestülpt und die Bakterien gelangen ins Zellinnere (Wallis & Galyov, 2000). Sie werden in Vesikel aufgenommen und können sich dort vermehren. Dann gelangen die Bakterien in die immunaktive Schicht der Darmwand und werden von Phagozyten aufgenommen (Kleer, 2003) (Abb. 2). Wenn die Phagozytose nicht effektiv ist, zum Beispiel bei Menschen mit einem geschwächten Immunsystem, können sich die Salmonellen von hier aus weiter ausbreiten in die Lymphknoten und die Milz, sodass es zu einer systemischen Infektionskrankheit kommt (Scharek & Tedin, 2007).

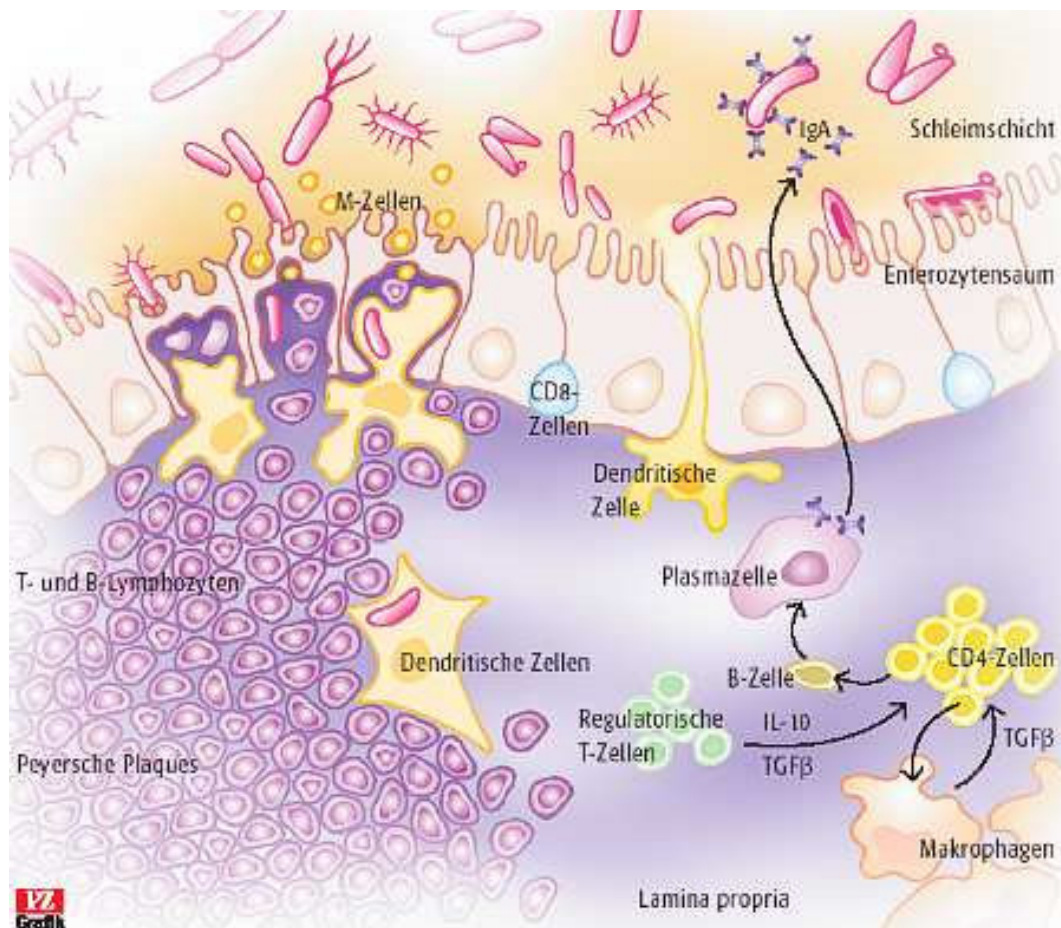


Abb. 2: Befall von Bakterien und Immunantwort im Darm

Die Bakterien (rosa Stäbchen oben) sondern Transkriptionsprodukte (gelb) aus. Diese sorgen dafür, dass die Bakterien ins Zellinnere gelangen (Mitte). Bei einem gesunden Immunsystem werden sie von dendritischen Zellen in den Peyerschen Plaques aufgenommen. Diese erzeugen Antigene zur Präsentation für die Antikörperbildung (unten) (Heyn, 2006).

Es sind viele weitere Gene bekannt, deren Funktion und Zusammenspiel noch nicht komplett erforscht ist. Die Genprodukte verursachen z.B. den Durchfall. Bekannt sind die Effektorproteine SopB und SopD. Sie sorgen für eine erhöhte Cl^- -Sekretion aus den Zellen in den Darm, was zum Flüssigkeitsausfluss und zum Durchfall führt. SopE1 und SopE2 spielen beim Eindringen der Bakterien in die Wirtszellen eine Rolle. Alle vier Effektorproteine befinden sich auf der Pathogenitätsinsel 1 (Wallis & Galyov, 2000).

1.2 *Campylobacter spp.*

Campylobacter spp. sind spiralförmige, gramnegative Bakterien (Abb. 3). *Campylobacter jejuni* ist der häufigste Vertreter und wächst am besten bei 37°C bis 42°C (CDC). Die Erkrankung durch *Campylobacter* ist meldepflichtig. 2013 wurden dem RKI 63.636 Fälle gemeldet und kamen somit häufiger vor als Salmonellosen. Sie ist nach dem Norovirus die zweithäufigste gemeldete Ursache einer Durchfallerkrankung 2013 gewesen (RKI).

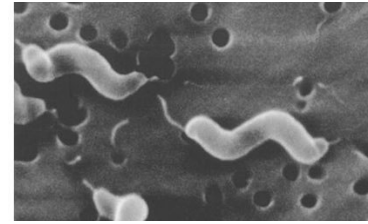


Abb. 3: *Campylobacter jejuni* unter dem Elektronenmikroskop

www.cdc.gov

1886 fand Escherich spiralförmige Bakterien in Stuhlproben von Kindern mit Durchfall. 1913 isolierten McFaydean und Stockman erstmals *Campylobacter* aus fetalem Gewebe von totgeborenen Schafsembryonen. 1947 fand die Erstisolation beim Menschen statt. 1963 bekamen die *Campylobacter spp.* ihren Namen. Seit 1977 gehört die Anzucht auf Selektivmedien zu den Routineverfahren in der Mikrobiologie (Darai et al., 2012).

Campylobacter spp. sind die Erreger der Campylobacteriose, eine Zoonose. Die minimale Infektionsdosis liegt bei 500 Bakterien. Übertragen werden die Bakterien über unzureichend gekochte kontaminierte Lebensmittel, insbesondere Geflügelfleisch. Auch unpasteurisierte Milchprodukte, Geflügel und kontaminiertes Wasser können Infektionsquellen sein. Es gibt mehr Infektionen im Sommer als im Winter, da sich die Bakterien im Sommer auf schlecht gekühlten Lebensmitteln schneller vermehren können.

Zwei bis fünf Tage nach der Infektion treten Symptome auf wie Durchfall, teilweise blutig und in Zusammenhang mit Übelkeit und Erbrechen, Fieber, Krämpfen und Unterleibsschmerzen. Es erkranken häufiger Kleinkinder und junge Erwachsene, Männer häufiger als Frauen. Die Campylobacteriose heilt üblicherweise nach einer Woche spontan aus und bedarf keiner speziellen Behandlung. Es muss auf eine ausreichende Flüssigkeitszufuhr geachtet werden. Personen mit einem geschwächten Immunsystem sind anfälliger für die schwere Form mit heftigem Durchfall. *Campylobacter* können sich bei dieser Patientengruppe leichter über den Blutkreislauf ausbreiten. Daher werden diese Menschen im Krankenhaus mit antimikrobiellen Therapien behandelt. In seltenen Fällen können aus einer

Campylobacteriose Autoimmunkrankheiten wie eine Arthritis oder das Guillain-Barré-Syndrom entstehen. Hierbei greift das Immunsystem die eigenen Nervenzellen an, was zu einer Paralyse führt, die mehrere Wochen andauern kann. Einer von 1.000 diagnostizierten Campylobacteriose-Patienten bekommt dieses Syndrom und bei 40% aller am Guillain-Barre-Syndrom Erkrankten sind *Campylobacter* der Auslöser.

Der Kontakt mit infizierten Tieren, deren Kot oder Innereien in Verbindung mit unzureichender Hygiene sollte vermieden werden. Insbesondere bei Kontakt mit Vögeln und bei der Zubereitung und Verzehr von Geflügelfleisch oder Eiern sollte auf ausreichende Hygiene geachtet werden, da sich die *Campylobacter* bei der Körpertemperatur von Vögeln am besten vermehren können, die Vögel aber keine Symptome zeigen. *Campylobacter* können durch ausreichendes Kochen abgetötet werden. *Campylobacter* sind anfällig gegenüber Sauerstoff, da sie mikroaerophil sind, und Trockenheit. Mikroaerophil heißt, dass die Bakterien nur wachsen können beziehungsweise aktiv sind, wenn der Sauerstoffgehalt in ihrer Umgebung deutlich unter dem der Luft liegt, also unter 20% (CDC, 2014).

Der Nachweis von *Campylobacter* erfolgt aus Stuhlproben. In der Routine werden sie auf hochwertigen Nährmedien unter sauerstoffreduzierten Bedingungen kultiviert. Das Ergebnis liegt nach zwei bis drei Tagen vor. Eine weitere Methode ist der Nachweis von *Campylobacter*-Antigenen mittels ELISA aus dem Stuhl. Das Ergebnis ist unabhängig von der Vitalität der Bakterien und liegt innerhalb von Stunden vor (Burkhardt, 1992). Auch das Ergebnis einer PCR liegt innerhalb von Stunden vor. Die PCR weist die 16S-rDNA des Bakteriums nach. Die 16S-rDNA kodiert für die kleinere Untereinheit des Ribosoms von Prokaryoten. Die Ribosomen binden während der Initiationsphase der Translation an eine bestimmte Sequenz der mRNA und bringt das Startcodon an die richtige Position im Ribosom (Chemielexikon). Die Zielsequenz in der 16S-rDNA ist spezifisch für *Campylobacter* und befindet sich mehrmals in einem Bakterium, sodass auch bei einer geringen Anzahl Bakterien der molekulare Nachweis gelingen kann.

Über die Pathogenitätsmechanismen der *Campylobacter* ist bisher wenig bekannt. Sie können Enterotoxine bilden, sich in Darmzellen einschleusen, die Darmschranke überwinden und sich von dort aus in den Organismus ausbreiten. Bekannt ist das „outer membrane proteins“ (OMP) CadF. CadF bindet an das Fibronectin, ein Teil

der extrazellulären Matrix, der Wirtszelle. Es ist bisher das einzige OMP, das sich an die Wirtszelle heften kann (Konkel et al., 2001).

1.3 *Yersinia enterocolitica*

Yersinia spp. sind stäbchenförmige, gramnegative Bakterien (Abb. 4). Sie sind häufig im Schwein zu finden, aber auch in anderen Tieren. Nur wenige *Yersinia*-Stämme sind humanpathogen. *Yersinia enterocolitica* löst eine Durchfallerkrankung aus (CDC). Eine Erkrankung mit *Yersinia enterocolitica* ist meldepflichtig. 2013 wurden laut RKI 2.590 Fälle gemeldet. In den letzten Jahren ist ein leichter Rückgang verzeichnet worden.

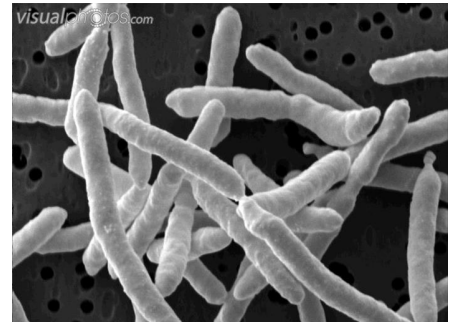


Abb. 4: *Yersinia enterocolitica*
www.visualphotos.com

1894 entdeckte der Schweizer Tropenarzt Emile Jean Yersin den Erreger *Yersinia pestis*. Ihm zu Ehren wurde die Gattung *Yersinia spp.* benannt (Burkhardt, 1992). 1934 wurden *Yersinia enterocolitica* erstmals aus Abszessproben isoliert und 1939 aus menschlichen Stuhlproben. 1997 wurde die endgültige Bezeichnung für das Darmbakterium „*Yersinia enterocolitica*“ festgelegt (Bottone, 1997).

Yersinia enterocolitica ist der Erreger der Yersiniose. Sie werden übertragen durch infiziertes, rohes beziehungsweise unzureichend gekochtes Fleisch, insbesondere vom Schwein oder infizierten Gedärmen. Auch infiziertes Wasser und unpasteurisierte Milchprodukte können Infektionsquellen sein. Ein weiterer Ansteckungsweg ist der Kontakt mit infizierten Tieren in Verbindung mit unzureichender Hygiene. Da sich Yersinien auch noch bei 4°C vermehren, gibt es mehr Infektionen im Winter als im Sommer (CDC).

Am häufigsten erkranken Kinder. Vier bis sieben Tage nach der Infektion treten Symptome auf wie Fieber, Unterleibsschmerzen und häufig blutiger Durchfall. Die Yersiniose verschwindet meist nach ein bis drei Wochen auch ohne Behandlung. Schwere Fälle werden mit Antibiotika behandelt. In seltenen Fällen kann eine reaktive Arthritis entstehen. Hierbei kommt es zu Gelenkschmerzen, häufig in den Knien, Knöcheln oder Handgelenken, die nach ein bis sechs Monaten wieder verschwinden.

Der Nachweis von *Yersinia enterocolitica* gelingt durch Anzucht aus einer Blut-, Biopsie- oder Stuhlprobe. Die Kultivierung wird über 48 Stunden auf Blut-, McConkey-Agar oder Yersinia-Selektivagar durchgeführt. Auch einige Salmonellen-Selektivmedien eignen sich. Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 25 bis 27°C. Auch eine Kälteanreicherung ist möglich (Burkhardt, 1992).

Eine weitere Alternative ist die PCR, u.a. mit der Zielsequenz im *ail*-Gen (attachment invasion locus). Dieses Gen kodiert für das Oberflächenprotein Ail, mit dem die Yersinien an die Oberflächen der Wirtszellen binden. Weitere Funktionen sind nicht näher bekannt. Ail kommt nur in pathogenen Yersinien vor (Carniel, 1995).

Die Pathogenität von *Yersinia enterocolitica* basiert auf verschiedenen Genen, die auf den Chromosomen und Plasmiden kodiert sind (Heesemann, 1990). Die Yops (*Yersinia* outer proteins) sind Polypeptide, die für die Serumresistenz, Phagozytenresistenz und Einschleusung in die Wirtszelle zuständig sind. Sie verhindern zum Beispiel die Phagozytose sodass die Yersinien vom Immunsystem zunächst nicht erkannt werden (Rosqvist et al., 1994). Yad A (*Yersinia* adhesin A) ist ein äußeres Membranprotein. Es heftet sich an die Wirtszelle und verhindert damit ein Ausschwemmen der Bakterien (Mantel et al., 1989). Außerdem ist es für die Serumresistenz des Erregers zuständig (Heesemann et al., 1983). Die Serumresistenz ist dafür verantwortlich, dass Lipopolysaccharide vom Immunsystem nicht erkannt werden (Hahn et al., 2000). Yops und das Yad A werden auf Plasmiden kodiert, während Inv und Ail chromosomal kodiert sind. Inv ist ein äußeres Membranprotein. Es reagiert spezifisch mit Proteinen auf den M-Zellen im Dünndarm und leitet die Infektion ein (Pepe et al., 1994). Das *ail*-Gen spielt eine entscheidende Rolle bei der Pathogenität der *Yersinia enterocolitica*. So nahm in Experimenten beim Ausschalten dieses Gens die Pathogenität ab. Weitere Funktionen sind nicht näher bekannt. Der wässrige Durchfall wird unter anderem durch das Enterotoxin Yst verursacht. Yst bindet an einen Guanylatcyclase-C-Rezeptor im Darm (Heesemann, 1990). In der Zelle wird cGMP gebildet, welches CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, ein Chloridkanal in der Zellmembran von Epithelzellen) aktiviert. Dadurch werden Elektrolyte und Wasser aus der Zelle in den Darm sezerniert (Hellwig, 2013). Des Weiteren kodiert *Yersinia enterocolitica* für ein Enzym, welches Urease bilden kann. Durch Urease findet eine Hydrolyse von Harnstoff zu Ammoniak und Carbamat statt. Dadurch steigt der pH-Wert im Darm an

und der Mageninhalt wird in den Darm entleert. *Yersinia enterocolitica* kann sich dadurch schneller vermehren (De Koning-Ward & Robins-Browne, 1997).

1.4 Zielsetzung

Durchfallerkrankungen sind häufig, ihre Ursachen vielfältig. Für die Diagnostik der häufigsten ursächlichen Bakterien werden Kulturverfahren und Anreicherungen eingesetzt. Entsprechend sind Inkubationszeiten von bis zu 72 Stunden erforderlich, um eine Diagnose zu stellen. Molekulare Verfahren, wie die PCR, können binnen Stunden Ergebnisse liefern. Dadurch können frühzeitig Hygiene- wie auch gegebenenfalls spezifische Therapiemaßnahmen ergriffen werden.

In dieser Studie wird untersucht, ob eine kommerzielle Multiplex-PCR eine mit Kulturverfahren bzw. Antigennachweisverfahren vergleichbare Sensitivität und Spezifität zum Nachweis der oben genannten Bakteriengattungen aus Stuhlproben aufweist.

Mit Hilfe von Verdünnungsreihen soll die Nachweisgrenze der PCR von *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* und *Yersinia enterocolitica* aus reinen Kultursuspensionen und Stuhl-Bakteriensuspensionen bestimmt werden.

In der Studie wird zudem die DNA-Extraktion mit einfachem Kochen der Probe verglichen.

Üblicherweise geht der Salmonellenanzucht eine Anreicherungsbouillon mit 16 Stunden Inkubationszeit voraus. Entsprechend wird in der Studie untersucht, ob die PCR Salmonellen-spezifische DNA in der Bouillon nachweisen kann.

Die Ergebnisse von Campylobacter-Antigennachweisen mittels ELISA aus Stuhlproben werden mit denen der PCR verglichen.

2 Material

2.1 Geräteliste

Gerät	Hersteller; Ort
37°C Brutschrank (Salmonella)	Sanyo Electric, jetzt Panasonic; Deutschland
37°C Brutschrank (Campylobacter)	IBS Integra Biosciences; Fernwald
26°C Brutschrank (Yersinia)	Memmert; Schwabach
Werkbank	Heraeus; Hanau
Werkbank (Mastermix)	Kisker; Mühlhausen
Heizblock	Eppendorf; Hamburg
Maxwell Extraktionsgerät	Promega; Mannheim
PCR-Cycler Stratagene Mx3005P	Agilent Technologies; Kalifornien (USA)

2.2 Chemikalienliste

Chemikalie	Hersteller; Katalognummer
NaCl 0,9%ig	Merck; Art. Nr.: 106404
Test Kit für PCR	
Interne Kontroll-DNA	r.biopharm; Art. Nr.: PG2405
PCR Wasser	
Reaktionsmix	
Taq-Polymerase	
Positivkontrolle	

XLD-Agarplatten	Thermo Scientific; Art. Nr.: PO5057A
CCDA-Agarplatten	Thermo Scientific; Art. Nr.: PO5091A
CIN-Agarplatten	Thermo Scientific; Art. Nr.: PO5044A
Selenit-Bouillon	Thermo Scientific Art. Nr.: CM 395
Thioglycolat-Bouillon	Heipha Art. Nr.: 146220

DNA/ RNA - Extraktionskit

Elutionspuffer	}	Promega; Art. Nr.: AS1290
Lysispuffer		
LEV-Kartuschen		

2.3 Patientenproben

Es wurden ausschließlich anonymisierte Stuhlproben untersucht. Da es sich um einen Methodenvergleich ohne Patientendaten handelt, ist laut Aussage der zuständigen Ärztekammer (Schleswig-Holstein) kein Votum einer Ethikkommission erforderlich.

194 Stuhlproben und 123 Selenit-Bouillons aus der Routinediagnostik, aus denen entweder *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.* und/ oder *Yersinia enterocolitica* kultiviert worden war, die kulturnegativ blieben und/ oder in denen *Campylobacter* Antigene nachweisbar waren.

Bakterienisolate zur Untersuchung der Nachweisgrenze:

- *Salmonella enteritidis* (Patientenisolat)
- *Yersinia enterocolitica* (Patientenisolat)
- *Campylobacter jejuni* (DSMZ 4688, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Leibniz-Institut, Braunschweig)

3 Methoden

3.1 Bakterienkulturverfahren

3.1.1 *Salmonella* spp.

Zur Anzucht von Salmonellen werden XLD-Agarplatten (Thermo Scientific) mit Stuhlproben beimpft. XLD-Agar steht für Xylose-Lysin-Desoxycholat Agar und wird für den Nachweis von gramnegativen enterischen Bakterien verwendet. Hefeextrakt dient als Energie- und Vitaminquelle. Grampositive Bakterien werden durch Natriumdesoxycholat gehemmt. Der pH-Wert des Mediums liegt bei 7,4 (Becton Dickinson GmbH). Als pH-Indikator dient Phenolrot und sorgt für die rote Farbe des Mediums (Carlroth). Einige enteritische Bakterien, zum Beispiel *E. coli*, können Xylose, Lactose oder Saccharose abbauen. Dabei entstehen Säuren, die den pH-Wert absinken lassen (Becton Dickinson GmbH), sodass sich Medium und Bakterienkolonien gelb färben (Carlroth). Salmonellen metabolisieren Natriumthiosulfat zu Schwefelwasserstoff, wodurch die *Salmonella*-Kolonien schwarz erscheinen. Ammoniumeisen-(III)-citrat dient als Indikator (Becton Dickinson GmbH). Zusätzlich decarboxylieren Salmonellen Lysin zu der Base Cadaverin. Dadurch erhöht sich der pH-Wert und die Umgebung der Kolonien färbt sich rot (Thermo Scientific).

Die Bebrütung erfolgt für 16 bis 24 Stunden bei 36 °C (± 1 °C) im Brutschrank.

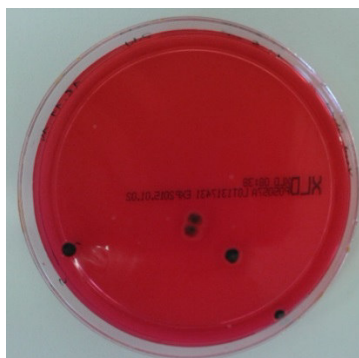


Abb. 5: *Salmonella* spp. auf XLD-Agar

eigene Verdünnungsreihe, 1:10.000; 100 μ l ausgestrichen

(eigenes Foto, 18.11.2014)

3.1.2 *Campylobacter* spp.

Campylobacter werden auf CCDA-Platten (Charcoal Cefoperazon Desoxycholat Amphotericin B; Thermo Scientific) angezüchtet. Natriumdesoxycholat hemmt das Wachstum von grampositiven Bakterien, coliforme Bakterien und Proteus-Arten, die einen Teil der natürlichen Darmflora darstellen (Roth). Eisensulfat, Natriumpyruvat und Aktivkohle neutralisieren einen Teil der Sauerstoffradikale. Dadurch wird die Aerotoleranz der *Campylobacter* erhöht und sauerstoffsensitive Isolate wachsen besser (heipha). Dem Medium wird das Antibiotikum Cefoperazon und das Antimykotikum Amphotericin B zugesetzt. Cefoperazon hemmt das Wachstum von gramnegativen Enterobakterien und von einigen grampositiven Bakterien. Amphotericin B unterdrückt das Wachstum von Pilzen (Thermo Scientific). Die Bebrütung erfolgt für 48 bis 72 Stunden bei 36 °C (± 1 °C) im CO₂-Inkubator.

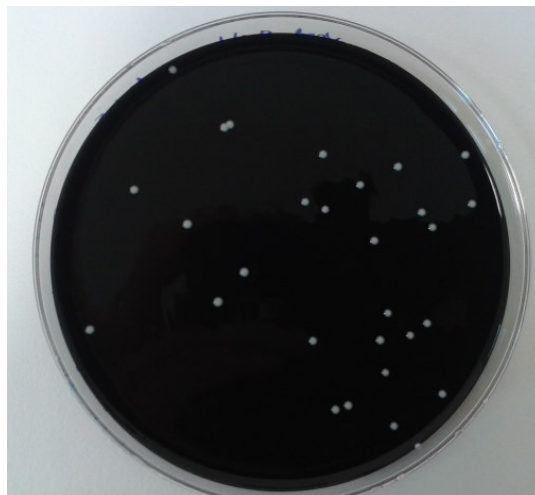


Abb. 6: Kolonien von *Campylobacter jejuni* auf CCDA Nährboden
eigene Verdünnungsreihe, 1:100.000, 100µl ausgestrichen
(eigenes Foto, 18.11.2014)

3.1.3 *Yersinia enterocolitica*

Yersinia enterocolitica wird auf CIN-Agar (Thermo Scientific) kultiviert. Er beinhaltet Cefsulodin, Irgasan und Novobiocin. Er wird für den Nachweis von allen *Yersinia*-Arten verwendet. Das Medium hat einen pH-Wert von 7,4. Neutralrot dient als Indikator und gibt dem Medium seine rote Färbung. Natriumdesoxycholat hemmt das Wachstum grampositiver Bakterien. Kristallviolett hemmt bestimmte gramnegative Bakterien (Merck). Irgasan dringt in die äußere Zellmembran ein und beschädigt sie, wodurch andere antibiotische Hemmstoffe besser eindringen können. Die meisten gramnegativen Bakterien, insbesondere *Salmonella* und *E. coli* werden gehemmt (Logue et al., 2000). Cefsulodin ist ein Drittgenerations-Cephalosporin (Antibiotikum), das u.a. das Wachstum von Pseudomonaden und anderen gramnegativen Bakterien hemmt (Schiemann, 1979). Novobiocin hemmt die Bindung von ATP an die Gyrase und damit die Aktivierung von dieser. Die Gyrase ist ein Enzym, welches Raumorientierung von DNA-Molekülen verändert, was sie platzsparender und partiell besser ablesbar macht. Das Wachstum grampositiver Bakterien, von Klebsiellen und *Proteus spp.* wird unterdrückt (Otten et al., 1975). Natriumpyruvat und ein umfangreiches Nährstoffangebot durch Hefeextrakt und Spezialpepton fördern das Wachstum von *Yersinia* (Merck). Mannitol wird von *Yersinia* zu Säuren abgebaut. Der pH-Wert im Medium sinkt und Neutralrot reichert sich in den Kolonien an. Dadurch haben die Kolonien ein rotes Zentrum und eine durchsichtige Umgebung (heipha).

Die Bebrütung erfolgt für mindestens 24 Stunden bei 26 °C.

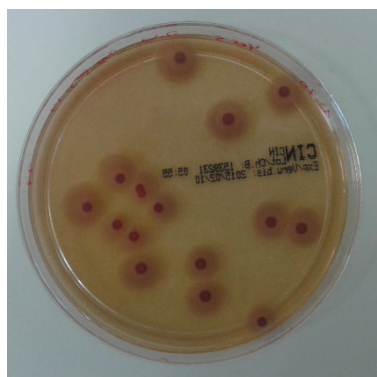


Abb. 7: *Yersinia enterocolitica* auf CIN-Agar
eigene Verdünnungsreihe, 1:20, 100µl ausgestrichen
(eigenes Foto, 30.09.2014)

3.2 ELISA zum Nachweis von *Campylobacter* spp. Antigen aus Stuhlproben

ELISA ist die Abkürzung für Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. ELISA ist auch ein Verfahren zum Nachweis von Antigenen, welches ursprünglich zum Nachweis von Antikörpern entwickelt wurde. Es wird mit Mikrotiterplatten gearbeitet. Diese sind mit Antikörpern beschichtet, die gegen das zu bestimmende Antigen gerichtet sind. Nach Zugabe der Probe bindet das Antigen an den Antikörper. Dann wird der Überstand entfernt und nicht bzw. unspezifisch gebundene Antigene durch Waschschriffe entfernt, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. Nach dem Waschen bindet ein zweiter Antikörper an das Antigen. An den zweiten Antikörper ist das Enzym Biotin gekoppelt. Dann wird ein Poly-Streptavidin-Peroxidase-Konjugat hinzugegeben. Das Streptavidin bindet an das Biotin. In einem zweiten Waschschriff wird nicht gebundenes Konjugat entfernt. Nach Zugabe eines Substrates, in diesem Fall Wasserstoffperoxid und TMB (3, 3', 5, 5'- Tetramethylbenzidin), katalysiert das Enzym Peroxidase die Reduktion von dem Wasserstoffperoxid und aktiviert den Farbstoff. TMB wird blau. Die Reaktion wird durch Zugabe einer Säure gestoppt, z.B. Schwefelsäure, was zu einem Farbumschlag nach gelb führt. Die Enzymaktivität kann über die Farbintensität des TMB photometrisch gemessen werden und wird in OD (optische Dichte) angegeben. Ein OD über dem errechneten Grenzwert ($[OD \text{ Negativkontrolle} + 0,15] + 10\% \text{ von } []$), üblicherweise $\geq 0,18$, wird als positiv bewertet. Die Intensität ist proportional zur Menge des gebundenen Zielmoleküls (Renneberg, 2009; Sigma-Aldrich; Rica & Stevens, 2012).

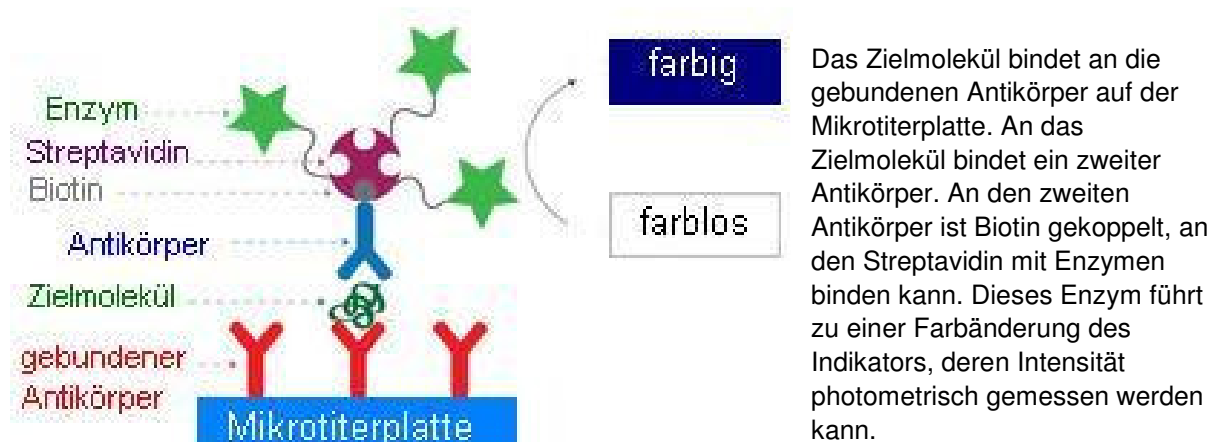


Abb. 8: Schema des Sandwich-ELISA

Rica & Stevens, 2012 (modifiziert)

3.3 DNA-Isolierung

Die DNA aus den Stuhlproben wurden über das Maxwell[®] 16 System (Promega) isoliert. Es können bis zu 16 Proben pro Lauf bearbeitet werden. Das System transportiert nur Partikel und keine Flüssigkeiten, wodurch eine Kontamination durch Spritzen oder Aerosole verhindert wird. Lyse, Aufschluss, Reinigung und Elution findet in einem 7-Kammer-Rack und einem Elutionsgefäß statt und dauert etwa 50 Minuten. In der ersten Kammer, in die Probe mit Lysispuffer gefüllt werden, wird die Probe aufgeschlossen und durch die Auf- und Abbewegung des Stößels gemischt. Während der Lyse wird die Zellmembran zerstört. In der zweiten Kammer befinden sich die Partikel. Die Partikel sind paramagnetisch. Dadurch können sie vom Stößel festgehalten werden, nachdem dieser magnetisiert wurde. Der Stößel bringt die Partikel in die erste Kammer. Aufgrund der negativen Ladung der DNA bindet sie an die Partikel. In den Kammern drei bis sieben wird die DNA durch Ablösen und Binden der Partikel gereinigt. Die Partikel und die Waschflüssigkeiten befinden sich bereits in den Kammern und müssen nicht vorher dazu gegeben werden, wodurch Pipettierfehler und Kontaminationen verhindert werden. Im Elutionsgefäß wird die DNA von den Partikeln gelöst. Das Elutionsvolumen kann je nach Bedarf mit 30 bis 100µl bestimmt werden.

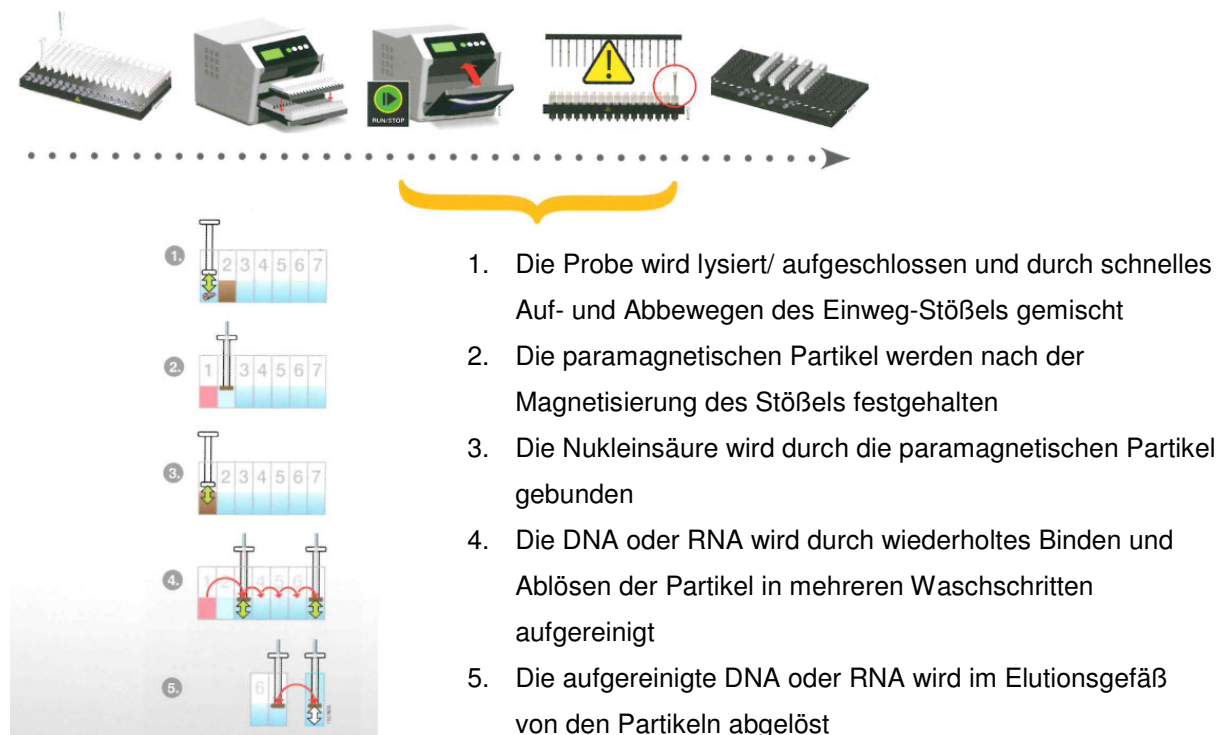


Abb. 9: Schema Aufreinigungsprinzip des Maxwell[®]16 Systems

3.4 Real-Time PCR

PCR ist die Abkürzung für polymerase chain reaction, übersetzt Polymerase-Kettenreaktion. Die Methode dient zur Vervielfältigung (Amplifizierung) eines oder mehrerer Genabschnitte. Es werden ein Vorwärtsprimer und ein Rückwärtsprimer am Anfang und am Ende des zu untersuchenden Bereichs (Zielgen) angelagert. Diese Primer sind kurze komplementäre DNA-Fragmente von etwa 20 Basen Länge. Die Primer werden mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase und Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) verlängert. Die PCR lässt sich in drei Phasen unterteilen. Die erste Phase heißt Denaturierung. Hier wird der DNA-Doppelstrang aufgeschmolzen (denaturiert) in seine beiden Einzelstränge. Dies geschieht bei etwa 95 °C. In der zweiten Phase (Annealing/ Anlagerung) werden die Primer angelagert bei 50 bis 70 °C. In der dritten Phase (Extension/ Verlängerung), bei etwa 70 °C, werden die Primer verlängert, indem die DNA-Polymerase dNTPs unter Abspaltung von Phosphatgruppen anlagert (Renneberg, 2009) (Abb. 10).

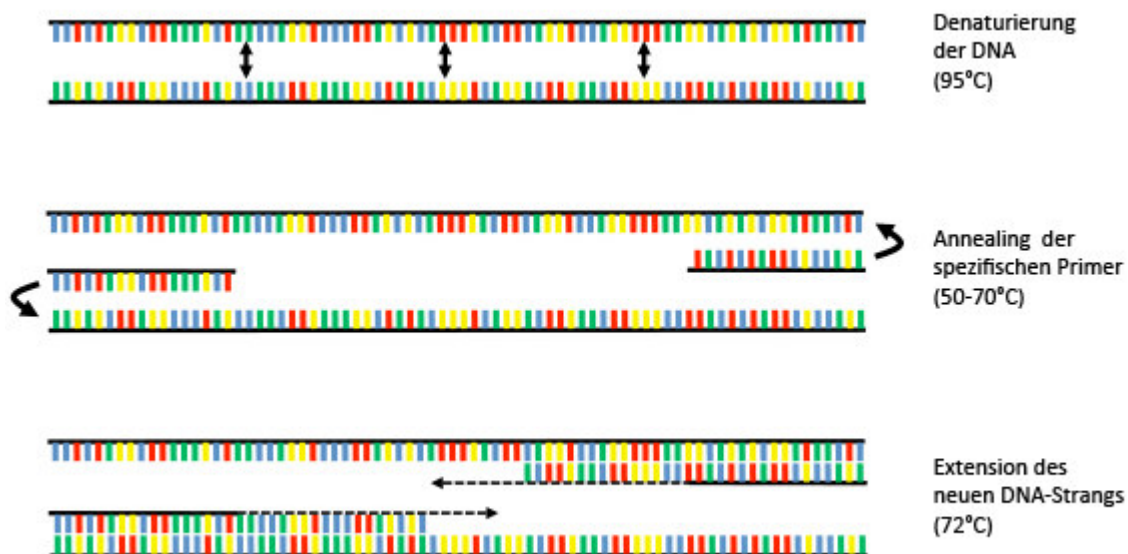


Abb. 10: Schema der drei Phasen der PCR

- 1, Denaturierung: Die DNA wird aufgeschmolzen bei 95°C. Die Doppelstränge werden aufgetrennt zu Einzelsträngen;
- 2, Annealing: Die Vorwärts- und Rückwärtsprimer werden angelagert bei 50 bis 70°C;
- 3, Extension: Die thermostabile DNA-Polymerase verlängert die Primer, indem sie Nukleotide anbaut bei 72°C.

<http://www.haematopathologie-hamburg.de/methoden/pcr-qpcr/>

Die PCR wurde 1983 erfunden vom amerikanischen Biochemiker Kary Mullis, der dafür 1993 den Nobelpreis erhielt. Erstmals beschrieben wurde sie 1971 von dem norwegischen Wissenschaftler Kjell Kleppe. Damals mussten die Proben in Wasserbecken mit den entsprechenden Temperaturen gehalten werden. Die thermostabile DNA-Polymerase war noch nicht bekannt, sodass für jeden Zyklus neue DNA-Polymerase hinzugegeben werden musste. Heutzutage läuft die PCR in Geräten vollautomatisch ab (Kleppe et al., 1971; Mullis & Faloona, 1987).

Bei der Real-Time PCR wird bereits während der Amplifikation die Menge der entstandenen DNA nachgewiesen. Dafür wird eine Online-Fluoreszenzmessung genutzt. Im PCR-Mix befinden sich neben der thermostabilen DNA-Polymerase, den Vorwärts- und Rückwärtsprimern und den dNTPs noch Hybridisierungs sonden. Eine Hybridisierungssonde besteht aus wenigen Oligonukleotiden und hat an einem Ende einen Reporter und am anderen Ende einen Quencher. Der Reporter ist ein Fluoreszenzfarbstoff, auch Fluorophor genannt. Der Reporter kann fluoreszieren, was aber von dem Quencher unterdrückt wird. Wenn die DNA-Einzelstränge vorliegen, lagert sich die Hybridisierungssonde an die DNA an. Während der Verlängerung des Primers wird die Sonde von der DNA-Polymerase abgebaut. Dabei wird der Reporter freigesetzt (Abb. 11). Der Reporter emittiert nun sein Fluoreszenzsignal, welches vom Gerät detektiert wird. Je mehr DNA vorhanden ist, an die die Sonden binden können, desto stärker ist das Signal (Renneberg, 2009).

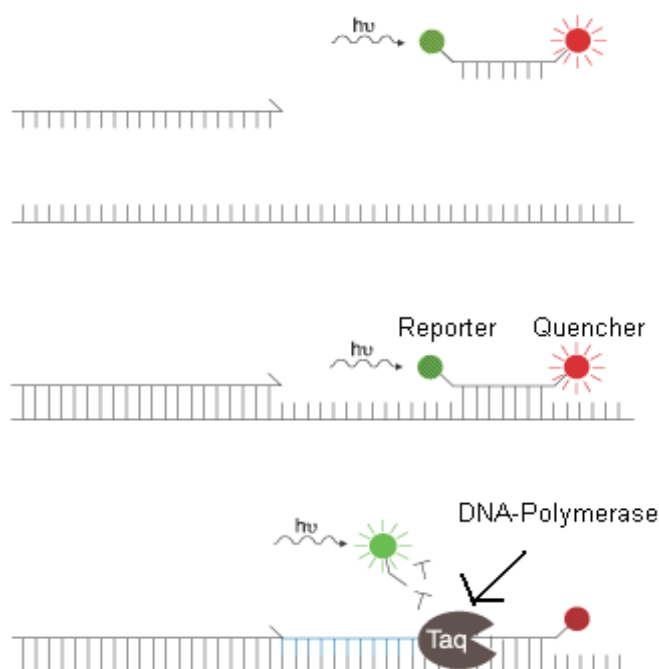


Abb. 11: Schema Real-Time PCR

Die Hybridisierungssonde lagert sich an die DNA an und wird während der Verlängerung der Primer abgebaut. Dabei wird der Reporter freigesetzt, der dann fluoresziert.

(www.bio.davidson.edu)

Für das in dieser Studie untersuchte RIDA GENE[®] Bacterial Stool Panel werden drei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Damit können mehrere PCRs simultan durchgeführt und ihre Produkte gemessen werden. FAM (6-Carboxyfluorescein, Abb. 12) ist der am häufigsten verwendete Fluoreszenzfarbstoff. Er emittiert bei einer Wellenlänge von 520, strahlt also blaugrünes Licht ab. Für die PCR zum Nachweis von Salmonellen-spezifischer DNA wird eine mit FAM-angelagerte Hybridisierungssonde verwendet.

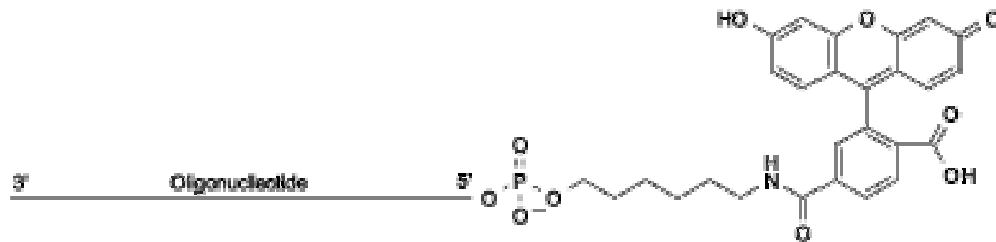


Abb. 12: Chemische Formel von 6-Carboxyfluorescein
(www.trilinkbiotech.com)

Cy5 (Cyanine5, Abb. 13) ist ein Fluoreszenzfarbstoff und wird zum Nachweis von Campylobacter-spezifischer DNA verwendet. Die Fluoreszenz bleibt auch gegenüber pH-Veränderungen stabil. Es emittiert bei einer Wellenlänge von 673 und strahlt somit rotes Licht ab.

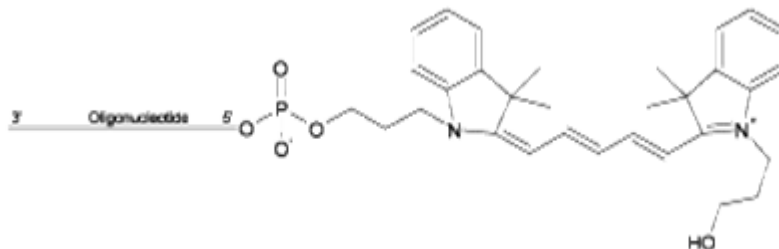


Abb. 13: Chemische Formel von Cyanine5
(www.trilinkbiotech.com)

ROX (Carboxy-X-Rhodamin, Abb. 14) ist ein Esterfarbstoff und wird zum Nachweis von Yersinien-spezifischer DNA verwendet. Es ist über einen größeren pH-Bereich stabil als die Fluoresceine und gut für Multiplexsysteme geeignet. Es emittiert bei einer Wellenlänge von 602 und strahlt somit rotes Licht ab.

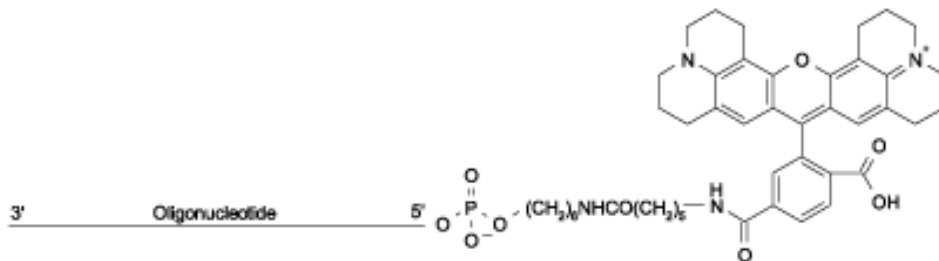


Abb. 14: Chemische Formel von Carboxy-X-Rhodamin
(www.trilinkbiotech.com)

HEX (Hexachloro-Fluorescein, Abb. 15) ist ein Phosphoramidit und wird zum Nachweis der internen Kontrolle verwendet. Es ist nicht sehr stabil und daher nur für bestimmte Anwendungen geeignet. Mit HEX markierte Primer sind sehr hydrophob, was die Effizienz der PCR beeinflussen kann. Es emittiert bei einer Wellenlänge von 556, strahlt also gelbes Licht ab.

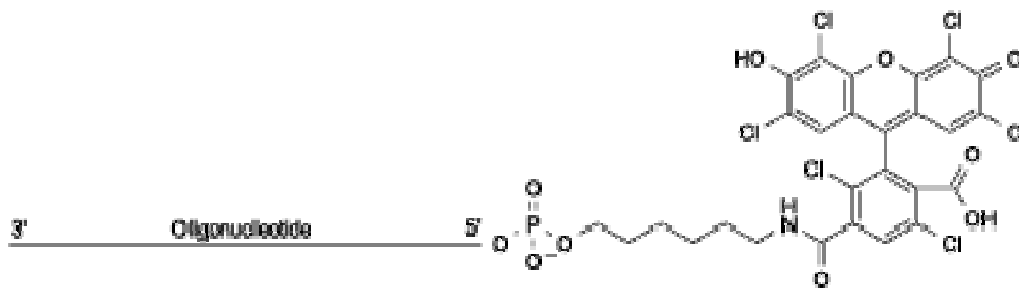


Abb. 15: Chemische Formel von Hexachloro-Fluorescein
(www.trilinkbiotech.com)
(eurofins Genomics; TriLink BioTechnologies)

4 Molekularbiologische Methoden

4.1 Vorbereitung der Proben

Flüssige Stuhlproben können direkt verwendet werden. Feste Stuhlproben werden je nach Menge mit ein bis fünf ml HPLC-Wasser aufgeschwemmt und der Überstand verwendet. Anreicherungsbouillons können direkt eingesetzt werden.

4.2 DNA-Isolierung: Maxwell (Promega)

Die DNA-Isolierung erfolgt über den Maxwell (Promega).

Die DNA wird nach dem Protokoll „Arbeitsanweisung Probenaufbereitung und DNA-Isolierung (Maxwell, Promega) für HSP/ PSP-PCR (r.biopharm)“, Nr. K114QA092, Version A vom LADR GmbH MVZ Geesthacht isoliert.

Am Maxwell wird das Programm ausgewählt Benutzer1 – DNA – Blood. Das Probenrack wird entnommen. Die LEV-Kartuschen werden im Probenrack hinten eingesetzt, 500µl Gefäße vorne. 100µl Elutionspuffer werden in die Elutionsgefäße gefüllt, diese werden anschließend verschlossen und beschriftet. Die Schutzfolie wird von den Kartuschen entfernt. 300µl Lysispuffer und 20µl interne Kontrolle werden in die hintere Tasche der Kartuschen pipettiert. Dann werden je 300µl einer Probe in die hintere Tasche pipettiert und durch Auf- und Abziehen der Pipette gemischt. Je ein Stößel wird in die vorderste Tasche der Kartuschen gestellt. Dann wird das Probenrack in das Gerät eingesetzt. Das Programm startet, sobald der Deckel geschlossen wurde.

Die Isolierung dauert circa 50 Minuten.

Nach Beendigung werden die Kartuschen als infektiöser Abfall entsorgt.

4.3 Kochen

300µl der Probe werden in 1,5ml Tubes pipettiert. Dann 10 Minuten auf dem Heizblock bei 95°C inkubieren und mit 400 rpm schütteln. Anschließend zwei Minuten zentrifugieren bei 8.000 rpm.

4.4 PCR

Die Lampe des MX3005P-Cyclers muss aufgewärmt werden, daher wird sie 20 Minuten vor dem Lauf angestellt.

Zusammensetzung Mastermix:

- 19,9µl Reaktions-Mix
- 0,1µl Taq-Polymerase
- 1µl Interne Kontrolle, wenn nicht über den Maxwell isoliert wurde (auch Positivkontrolle und Negativkontrolle)

Je 20µl des Mastermixes werden in die Vertiefungen der 96-Well-Platte pipettiert. Dann werden 5µl von der Negativkontrolle und von den über den Maxwell isolierten bzw. vom Überstand der gekochten Proben dazu pipettiert und vorsichtig durch Auf- und Abziehen der Pipette gemischt. Zum Schluss wird 5µl der Positivkontrolle sehr vorsichtig pipettiert, um eine Kontamination zu vermeiden. Die Vertiefungen der Platte werden mit PCR-Folie verschlossen. Die Folie wird mit einem Kamm festgedrückt. Die Platte wird in den Cycler gestellt und das Programm MXPro – Mx3005P Quantitative PCR kann gestartet werden.

PCR Programm:

	45 Zyklen	
Initiale Denaturierung	Denaturierung	Annealing/ Extension
95C	95C	60C
1 Minute	15 Sekunden	30 Sekunden

4.4.1 Kontrollen

Auf jeder Platte laufen eine Negativkontrolle und eine Positivkontrolle mit. Die Negativkontrolle ist Wasser für die PCR, was im Testkit mitgeliefert wird. Die Positivkontrolle enthält ein Plasmid mit den jeweiligen Zielsequenzen von *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.* und *Yersinia enterocolitica*.

In jeder Probe läuft eine interne Kontrolle mit. Die interne Kontrolle ist im Testkit enthalten. Für die Proben, die über den Maxwell isoliert werden, wird die interne Kontrolle vor der Isolierung dazu gegeben und mitisoliert. Entsprechend kann sie auch zur Kontrolle der Extraktion verwendet werden. Für die Proben, die gekocht werden, wird die interne Kontrolle in den Mastermix für die PCR hinzugegeben.

Die interne Kontrolle muss für alle Negativproben positiv ausfallen. Ist die interne Kontrolle nicht nachweisbar, besteht der Verdacht, dass die PCR fehlerhaft ist, sodass die Untersuchung wiederholt werden muss.

Die interne Kontrolle darf negativ ausfallen, wenn dafür ein anderer Parameter positiv ausfällt. Das ist ein Hinweis darauf, dass die Bakterienkonzentration sehr hoch ist. Dadurch werden während der PCR alle Nukleotide für die Amplifizierung der Bakterien-DNA verbraucht, sodass die interne Kontrolle nicht mehr ausreichend amplifiziert werden kann.

Richtwert für die PCR ist der Ct-Wert. Ct steht für „cycle threshold“ und beschreibt den Anfang des exponentiellen Wachstums einer Kurve. Die PCR wird in 45 Zyklen durchgeführt. Ct-Werte bis zum 40. Zyklus werden als positiv bewertet. Die Ct-Werte von zwei Logstufen (z.B. 1:10 und 1:100) sollten erfahrungsgemäß etwa 3 bis 3,3 Zyklen auseinander liegen.

4.5 Analytische und diagnostische Nachweisgrenze

Der Nachweis von *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.* und *Yersinia enterocolitica* aus der reinen Kultursuspension (analytische Nachweisgrenze) und aus einer Anreicherung in einer Stuhlsuspension (diagnostische Nachweisgrenze) wurden parallel durchgeführt.

Kulturen von einer Platte von *Salmonella spp.* und *Yersinia enterocolitica* wurden über Nacht in einer Thioglykolat-Bouillon angereichert. In einem Flüssignährmedium lassen sich Bakterien besser vereinzeln und mehr als 80% sind nach 16 Stunden Bebrütung noch vital, da sich das Wachstum in der exponentiellen Phase befindet. Die bewachsene Bouillon wurde als Ursprungslösung verwendet. Die Verdünnungsreihe wurde in 5 ml 0,9% NaCl-Röhrchen hergestellt. Tabelle 1 zeigt die Verdünnungsstufen.

Tabelle 1: Verdünnungsstufen von Kulturen von *Salmonella spp.* und *Yersinia enterocolitica* zur Analyse der Nachweisgrenze

Ursprungslösung
1:10
1:100
1:1.000
1:10.000
1:100.000
1:1.000.000

Suspensionen der Ursprungslösung und aller Verdünnungsstufen wurden zur DNA Extraktion und anschließend in der PCR eingesetzt. Von allen Verdünnungsstufen ab 1:100 wurden 100µl auf Selektivnährböden ausgestrichen und über Nacht kultiviert. Für die Untersuchung der Nachweisgrenze aus Stuhlproben wurden fünf Stuhlproben, die zuvor in der PCR negativ waren, mit 0,9% NaCl Lösung aufgeschwemmt und gemischt. Dann wurden 500µl Stuhlsuspension mit je 500µl der Ursprungslösung und aller Verdünnungsstufen gemischt, über den Maxwell isoliert und mit der PCR gemessen. Zusätzlich wurden die Verdünnungsstufen 1:1.000, 1:10.000 und 1:100.000 der angereicherten Stuhlsuspensionen ausgestrichen und über Nacht kultiviert. Die PCR wurde noch zwei Mal wiederholt mit denselben DNA Extrakten, um die Reproduktion der Ergebnisse zu bestimmen.

4.6 Sensitivität und Spezifität

Zur Berechnung der Sensitivität und Spezifität wurden folgende Formeln verwendet:

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{richtigpositiv}}{\text{richtigpositiv} + \text{falschnegativ}}$$

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{richtignegativ}}{\text{richtignegativ} + \text{falschpositiv}}$$

Da keine klinischen Daten zur Verfügung, um die Richtigkeit der Ergebnisse der unterschiedlichen Methoden zu überprüfen, werden alle Proben, die zumindest in einer Methode positive Ergebnisse zeigten, als richtigpositiv bewertet.

5 Ergebnisse

Zu Beginn wurden die 0,9%ige NaCl-Lösung, die Selenit-Bouillon und das HPLC-Wasser auf Verunreinigungen untersucht. Sie wurden zur DNA Extraktion und nachfolgend in das PCR Verfahren eingesetzt. In keiner Lösung konnte spezifische Bakterien-DNA mittels Real-Time PCR gefunden werden.

Die Negativkontrolle war für alle gemessenen Platten negativ.

Die Positivkontrolle war für jede Platte für alle vier Messparameter positiv.

5.1 Analytische und diagnostische Nachweisgrenze

Die Anzahl der gewachsenen Bakterienkolonien pro Platte wurde bestimmt und in KBE/ ml (Koloniebildende Einheiten pro ml) umgerechnet. Einige Platten konnten nicht ausgezählt werden, da sich zu viele Bakterienkolonien auf ihnen befanden. Diese wurden mit „nicht zählbar“ gekennzeichnet. Ausgehend von den Platten, die mit den reinen Bakterienverdünnungen beimpft wurden, wurde die Anzahl der KBE in der Ausgangslösung berechnet. Daraus wurde ermittelt, wie viele Bakterien sich in den Verdünnungen befanden und mittels PCR nachweisbar waren, sowohl für die Verdünnungsreihe aus Reinkulturen als auch in der der Stuhl-Bakteriensuspension.

Für die Verdünnungsreihe in Stuhlsuspensionen wurden 500µl von der Kultursuspension der jeweiligen Verdünnungsstufe mit 500µl Stuhlsuspension gemischt.

Aus den einzelnen Verdünnungsstufen der Kultursuspension und der Stuhlsuspension wurden 300µl zur Extraktion verwendet. Von den 100µl Eluat wurden 5µl in der PCR eingesetzt.

Somit kommt man zu folgender Rechnung:

Rechenweg KBE/ ml in KBE/ Reaktion:

$$\text{KBE/ Reaktion} = \text{KBE/ ml} \cdot 0,3 \cdot 0,05$$

5.1.1 *Salmonella* spp.

Tabelle 2 zeigt, wie viele *Salmonella*-Kolonien auf den Platten gewachsen sind.

In Klammern sind die angenommenen KBE angegeben, die bei der Verdünnungsstufe zu erwarten wären, ausgehend von 8 KBE/ 100µl in der 1:1.000.000 Verdünnung.

Tabelle 2: Gezählte *Salmonella*-Kolonien aus den Kultur- und Stuhlsuspensionen mit eingerührten Bakterien aus Reinkulturen

<i>Kulturen</i>		<i>Stuhlsusp.</i>			
Verdünnung	gez.	KBE/ ml		gez.	KBE/ ml
1:100	nicht zählbar				
1:1.000	nicht zählbar		1:1.000	65	650
1:10.000	nicht zählbar		1:10.000	6	60
1:20.000	nicht zählbar				
1:50.000	151 (160)	1510			
1:100.000	92 (80)	920	1:100.000	0	0
1:200.000	37 (40)	370			
1:500.000	16 (16)	160			
1:1.000.000	9 (8)	90			
Ursprung:	80.000.000	KBE/ml			

An den Zahlen ist zu erkennen, dass auf den Platten aus den Stuhlsuspensionen viel weniger *Salmonella* Kolonien gewachsen sind. Bei Betrachtung der Platten ist zu sehen, dass sehr viel Darmflora als Begleitflora gewachsen ist. Die Darmflora besteht aus coliformen Bakterien, z.B. *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. und anderen, gegen die sich die Salmonellen nicht durchsetzen konnten und daher schlechter gewachsen sind als in den Reinkulturen.

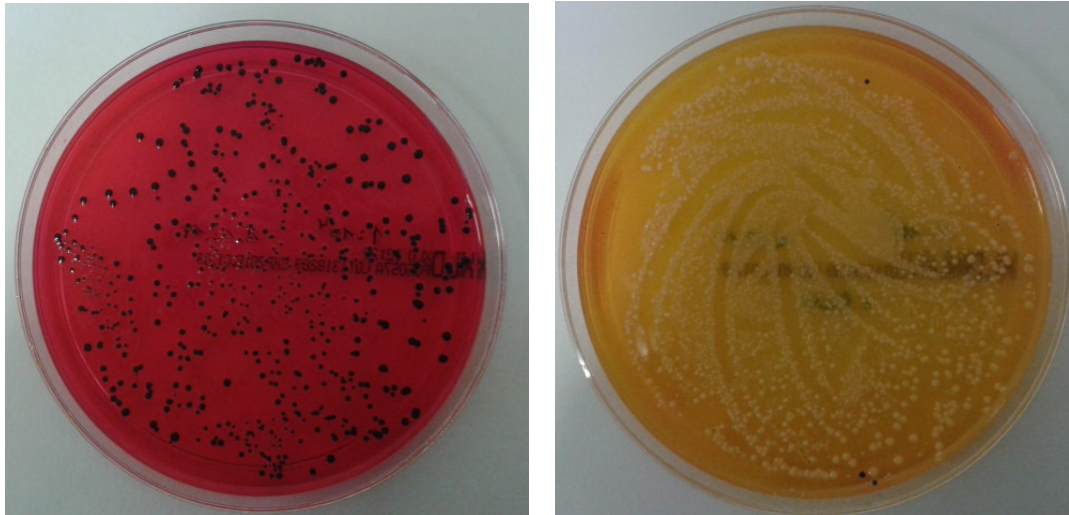


Abb. 16: XLD-Nährboden mit reiner Kultur und angeimpfter Stuhlsuspension (*Salmonella spp.*)

Links: Platte von der Verdünnungsstufe 1:10.000 aus der reinen Kultursuspension. Es sind so viele Bakterien gewachsen, dass sie nicht mehr zählbar sind. Rechts: Platte der gleichen Verdünnungsstufe mit Stuhlsuspension. Die schwarzen Punkte sind *Salmonella* Kolonien, der Rest coliforme Bakterien. (eigene Fotos)

Tabelle 3: PCR-Ergebnisse der Verdünnungsreihen mit reinen *Salmonella*-Kulturen und aus Stuhl-Bakteriensuspensionen

aus Stuhlsuspensionen				aus Kulturen		
Verd.	ct	KBE/ ml	KBE/ Reaktion	ct	KBE/ ml	KBE/ Reaktion
Ursprungslg.	21,11	40.000.000	600.000	19,01	80.000.000	1.200.000
1:10	24,62	4.000.000	60.000	22,62	8.000.000	120.000
1:100	28,01	400.000	6.000	25,00	800.000	12.000
1:1.000	31,40	40.000	600	29,19	80.000	1.200
1:10.000	34,67	4.000	60	32,45	8.000	120
1:100.000	no ct	400	6	34,64	800	12
1:1.000.000	no ct	40	0,6	no ct	80	1,2

Tabelle 3 zeigt die ct-Werte, die KBE/ ml und KBE/ Reaktion. Die ct-Werte von zwei Logstufen sollten etwa 3,3 Zyklen auseinander liegen. Der kleinste Abstand sind 2,38 Zyklen, der größte Abstand sind 4,19 Zyklen. Der höchste ct-Wert liegt jeweils bei 34,6.

Daraus ergibt sich eine errechnete Nachweisgrenze der Real-Time PCR von 12 Salmonellen/ Reaktion. In der Stuhlsuspension dagegen werden 60 Salmonellen pro Reaktion benötigt, um ein positives Ergebnis zu erhalten.

Die Wiederholungen der PCR zeigten die gleichen Ergebnisse mit etwas anderen ct-Werten. (siehe Anhang, Seite 57). Die im Anhang dargestellten Ergebnisse aller in

der PCR untersuchten Verdünnungsreihen ergaben im Mittel eine Abweichung von weniger als 1 ct /Verdünnungsstufe und die Variationskoeffizienten der einzelnen Verdünnungsstufen liegen unter 4%. sodass die Reproduzierbarkeit der Nachweisgrenze bestätigt wurde.

5.1.2 *Campylobacter* spp.

Tabelle 4 zeigt, wie viele *Campylobacter*-Kolonien auf den Platten gewachsen sind. In Klammern sind die angenommenen KBE angegeben, die bei der Verdünnungsstufe zu erwarten wären, ausgehend von 130 KBE/ 100µl in der 1:1.000.000 Verdünnung. Der Wert für die 1:200.000 Verdünnung wurde nicht in die Berechnung der Anzahl an Bakterien in der Ursprungslösung mit einbezogen, da die Suspension unabhängig von der Verdünnungsreihe hergestellt wurde und vermutlich daher zu stark von dieser abweicht.

Tabelle 4: Gezählte Kolonien pro 100µl ausgestrichene *Campylobacter*-Kultursuspensionen und Stuhl-Bakteriensuspensionen

<i>Kulturen</i>			<i>Stuhlsusp.</i>	
Verd.	gez.	KBE/ ml		gez.
1:100	nicht zählbar			
1:1.000	nicht zählbar		1:1.000	nicht bestimmbar
1:10.000	nicht zählbar		1:10.000	nicht bestimmbar
1:20.000	nicht zählbar			
1:50.000	nicht zählbar			
1:100.000	nicht zählbar		1:100.000	nicht bestimmbar
1:200.000	337 (650)	3370		
1:500.000	256 (260)	2560		
1:1.000.000	130	1300		
Ursprung:	130.000.000	KBE/ml		

Die Platten mit den angereicherten Stuhlsuspensionen waren nicht zählbar, da die Darmflora die *Campylobacter*-Kolonien überlagert haben.

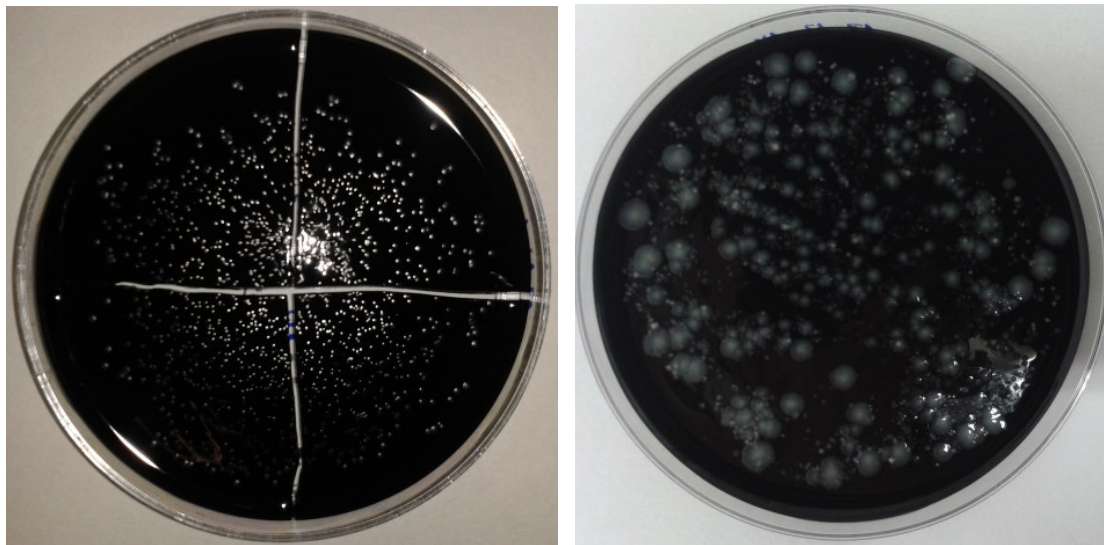


Abbildung 17: CCDA-Nährboden mit reiner Kultur und angereicherter Stuhlsuspension (*Campylobacter* spp.)

Links: Platte von der Verdünnungsstufe 1:500.000 aus der reinen Kultursuspension. Die Platte wurde in vier Teile eingeteilt, um die Kolonien besser zählen zu können. Rechts: Platte der gleichen Verdünnungsstufe von der angereicherten Stuhlsuspension. Die kleinen weißen Punkte sind *Campylobacter* spp., diese werden von der Darmflora (größere weiße Punkte) überlagert und können nicht gezählt werden. (eigene Fotos)

Tabelle 5: PCR-Ergebnisse der Verdünnungsreihen mit reinen *Campylobacter*-Kulturen und Stuhl-Bakteriensuspensionen

aus Stuhlsuspensionen				aus Kulturen		
Verd.	ct	KBE/ ml	KBE/ Reaktion	ct	KBE/ ml	KBE/ Reaktion
Ursprungslg.	17,74	65.000.000	975.000	17,85	130.000.000	1.950.000
1:10	21,83	6.500.000	97.500	22,15	13.000.000	195.000
1:100	24,92	650.000	9.750	25,67	1.300.000	19.500
1:1.000	28,43	65.000	975	27,26	130.000	1.950
1:10.000	31,57	6.500	97,5	30,34	13.000	195
1:100.000	34,53	650	9,75	32,70	1.300	19,5
1:1.000.000	No Ct	65	0,975	37,83	130	1,95

Tabelle 5 zeigt die ct-Werte und die Auswertung der PCR-Ergebnisse. Die ct-Werte liegen etwa eine Logstufe auseinander. Der kleinste Abstand sind 1,59 und der größte Abstand 5,13 Zyklen. Der höchste ct-Wert liegt für den Ansatz aus Stuhlsuspension bei 34,53 und für den Ansatz aus den reinen Kulturen bei 37,83.

Die ct-Werte zeigen, dass die PCR aus Reinkulturen eine Nachweisgrenze von 2 KBE/ Reaktion hat, die auf 10 KBE/ Reaktion bei Stuhlproben ansteigt.

Die Wiederholungen zeigten identische Ergebnisse (siehe Anhang, Seite 57), mit Variationskoeffizienten der einzelnen Verdünnungsstufen von < 4%. Wiederholung 3

zeigte noch ein positives Ergebnis in der Verdünnung 1:1.00.000 in angereicherter Stuhlsuspension. Das verdeutlicht, dass auch bei geringerer Bakterienmenge in der Probe spezifische DNA amplifiziert werden kann, das PCR Ergebnis aber nicht sicher reproduzierbar ist. Entsprechend können die oben genannten Nachweisgrenzen von 2 bzw. 10 KBE/ Reaktion als sicher reproduzierbar angesehen werden.

5.1.3 *Yersinia enterocolitica*

Tabelle 6 zeigt, wie viele Bakterien auf den Platten gewachsen sind.

In Klammern sind die angenommenen KBE angegeben, die bei einer Verdünnungsreihe zu erwarten wären, ausgehend von 5 KBE/ 100µl in der 1:100.000 Verdünnung. Die aus höheren Verdünnungen kultivierbaren Kolonien am ehesten Ausdruck von noch zufällig anwachsenden Bakterien, die gegebenenfalls durch unzureichende Vereinzelnung in vorangehenden Verdünnungsstufen übertragen wurden. Die Werte wurden aus der Analyse ausgeschlossen.

Tabelle 6: Gezählte Kolonien aus den *Yersinia*-Kultursuspensionen und Stuhlsuspensionen mit eingerührten Kulturen

<i>Kulturen</i>			<i>Stuhlsusp.</i>	
Verd.	gez.	KBE/ ml		gez.
1:100	nicht zählbar			
1:1.000	nicht zählbar		1:1.000	nicht bestimmbar
1:10.000	56 (50)	560	1:10.000	nicht bestimmbar
1:20.000	29 (25)	290		
1:50.000	10 (10)	100		
1:100.000	4 (5)	40	1:100.000	nicht bestimmbar
1:200.000	4	40		
1:500.000	0	0		
1:1.000.000	2	20		
Ursprung:	5.000.000	KBE/ml		

Bei der Berechnung der Bakterienanzahl in der Ursprungslösung wurden sich auf die gezählten Kolonien der Platten aus den Kultursuspensionen bezogen. Die Platten aus den Stuhlsuspensionen konnten nicht gezählt werden, da die Yersinien von der Darmflora kaum zu unterscheiden war. Wie bei den Salmonellen wuchs die

Darmflora auf den Platten viel besser und hat somit die das Yersinienwachstum unterdrückt.

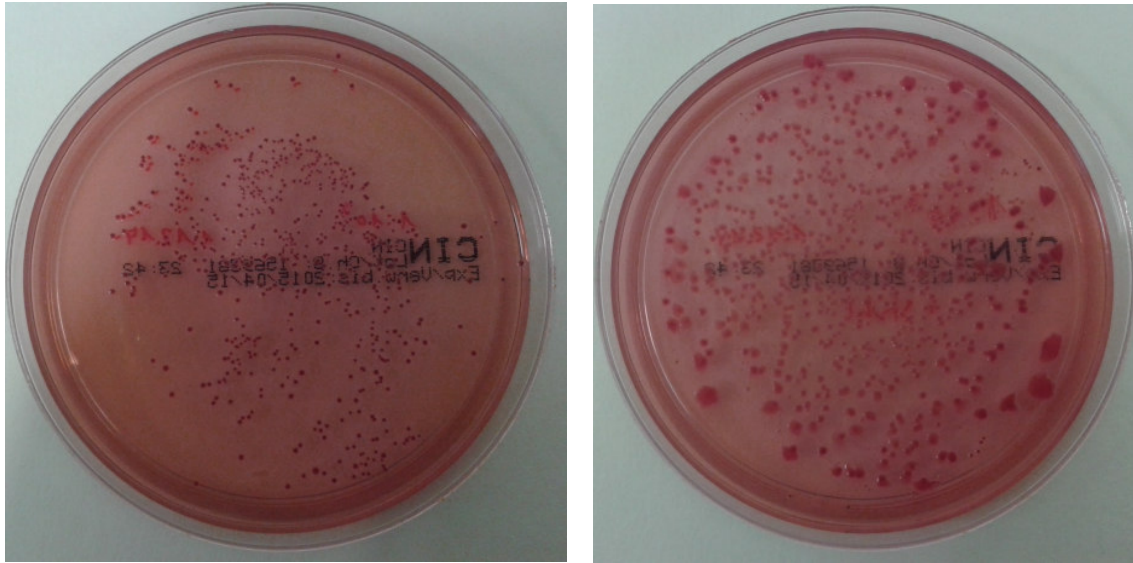


Abb. 18: CIN-Nährboden 100µl reiner Kultur und aus der Stuhlsuspension (*Yersinia enterocolitica*)

Platten aus der Verdünnungsstufe 1:1.000; Links: Platte aus der Kultursuspension, die Kolonien sind zu zahlreich, um sie zählen zu können; Rechts: Platte aus der angereicherten Stuhlsuspension, die größeren Kolonien sind andere Keime der Darmflora. Auf dem Foto nicht erkennbar sind sehr kleine *Yersinia* Kolonien, die sich zwischen und unter denen der Darmflora befinden (eigene Fotos)

Tabelle 7: PCR-Ergebnisse der Verdünnungsreihen mit reinen *Yersinia*-Kulturen und aus Stuhl-Bakteriensuspensionen

aus Stuhlsuspensionen				aus Kulturen		
Verd.	ct	KBE/ ml	KBE/ Reaktion	ct	KBE/ ml	KBE/ Reaktion
Ursprungslg.	23,70	2.500.000	37.500	(25,06)	5.000.000	75.000
1:10	27,62	250.000	3.750	26,53	500.000	7.500
1:100	31,57	25.000	375	29,74	50.000	750
1:1.000	35,67	2.500	37,5	33,21	5.000	75
1:10.000	no ct	250	3,75	36,34	500	7,5
1:100.000	no ct	25	0,375	no ct	50	0,75
1:1.000.000	no ct	2,5	0,0375	no ct	5	0,075

Tabelle 7 zeigt die ct-Werte und die Auswertung der PCR-Ergebnisse. Die ct-Werte liegen etwa eine Logstufe auseinander. Der kleinste Abstand sind 3,13 Zyklen, der größte Abstand sind 4,10 Zyklen. Der ct-Wert der Ursprungslösung der Kultursuspension wird nicht in die Auswertung mit einbezogen, da der Abstand zum ct-Wert der nächsten Verdünnungsstufe sehr viel kleiner ist als eine Logstufe. Der höchste ct-Wert liegt bei jeweils bei 36,3. Die Daten zeigen, dass mit der Real-Time PCR 8 KBE/ Reaktion die Nachweisgrenze darstellen, wenn aus Reinkulturen

extrahiert wurde. In der Stuhlsuspension dagegen werden 38 Yersinien pro Reaktion benötigt, um ein positives Ergebnis zu erhalten. Die Wiederholungen zeigten ähnliche Ergebnisse (siehe Anhang, Seite 57), die Variationskoeffizienten der einzelnen Verdünnungsstufen liegen unter 3%.

5.2 Patientenproben

5.2.1 *Salmonella* spp.

Zur Steigerung der Sensibilität des Kulturverfahrens wird eine Anreicherung in Selenit-Bouillon durchgeführt. In der PCR wurden sowohl die Stühle als auch die Bouillons untersucht.

Tabelle 8: Vier-Felder-Tafel: Ergebnisse der PCR und Bakteriologie von *Salmonella* spp. aus Stuhlproben und Bouillons

Stuhlproben		PCR				Bouillon		PCR			
		Extraktion		Kochen				Extraktion		Kochen	
		positiv	negativ	positiv	negativ			positiv	negativ	positiv	negativ
BAK:	positiv (41)	27	14	19	22	Bouillon	positiv (41)	41	0	41	0
	negativ (152)	0	152	0	152		negativ (82)	0	82	0	82

Direkt aus dem Stuhl konnte nur 27 aus (66%) bzw. 19 aus (46%) der 41 Kulturpositiven Proben Salmonellen-spezifische DNA mittels PCR amplifiziert werden. Aus den Bouillons dagegen stimmten alle Ergebnisse der PCR mit denen der Kultur überein (siehe Tabelle 8). Die Sensitivität der PCR ohne Anreicherung beträgt 0,66 für die DNA-Extraktion und 0,46 für das Kochen. Das heißt, dass etwa die Hälfte der Salmonelleninfektionen mit der PCR nicht nachgewiesen werden. Die Sensitivität der PCR aus der Anreicherungsbouillon beträgt 1, sowohl für die DNA-Extraktion als auch für das Kochen. Alle Salmonelleninfektionen werden durch Untersuchung der Bouillon nachgewiesen. Aufgrund der festgelegten Definition beträgt die Spezifität für die Stuhlproben und Bouillons 1. Wird angenommen, dass die Kulturen das richtige Ergebnis angezeigt haben, beträgt die Spezifität weiterhin 1, da keine kulturnegative Probe in der PCR positiv wurde.

5.2.2 *Campylobacter* spp.

Campylobacter spp. werden in der Routine durch Kulturen und über den Antigennachweis mittels ELISA nachgewiesen. Beide Verfahren werden kombiniert, da *Campylobacter* spp. besondere Kulturbedingungen benötigen, z.B. bezüglich dem Sauerstoffgehalt und sehr empfindlich sind. Daher sind sie schwer zu kultivieren und es kommt zu falsch-negativen Ergebnissen. Zudem liegt das Ergebnis erst nach zwei bis drei Tagen vor. Der ELISA ist eine schnelle Nachweismethode, aber auch sie kann falsche Ergebnisse liefern durch unspezifische Reaktionen, eine zu geringe Bakterien- oder Antigenkonzentration. Zunächst werden beide Methoden getrennt betrachtet. Tabelle 9 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse. Bis auf zwei nach Kochen der Stuhlprobe wiesen alle Kultur-positiven Proben auch *Campylobacter*-spezifische DNA auf. Dagegen fielen acht bzw. zehn Proben in der PCR positiv aus, die kein Wachstum in der Kultur aufwiesen. Das Ergebnis ist in Übereinstimmung mit der mäßigen Sensitivität der Kultur.

An der Gegenüberstellung ELISA und PCR ist zu sehen, dass die Ergebnisse mehrerer Proben nicht übereinstimmten. Drei über den Maxwell isolierte Proben sind im ELISA Antigen-positiv gewesen und in der PCR und Kultur negativ und jeweils acht Proben waren im ELISA negativ, aber in der PCR positiv.

Tabelle 9: Vier-Felder-Tafel: Ergebnisse der PCR und Kulturen bzw. ELISA von *Campylobacter* spp.

Kulturen						ELISA					
		PCR						PCR			
		Extraktion		Kochen				Extraktion		Kochen	
		positiv	negativ	positiv	negativ			positiv	negativ	positiv	negativ
BAK:	positiv (57)	57	0	55	2	BAK:	positiv (63)	60	3	58	5
	negativ (136)	8	128	10	126		negativ (130)	8	122	8	122

Mehr Ergebnisse stimmen überein, wenn die Ergebnisse von Kultur und ELISA zusammengefasst werden. Dabei wurden für die Bakteriologie alle Proben als positiv bewertet, die entweder in Kultur oder im ELISA oder mit beiden Verfahren positiv waren (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Vier-Felder-Tafel: Ergebnisse der PCR und Bakteriologie von *Campylobacter spp.* aus Stuhlproben

Stuhlproben		PCR			
		Extraktion		Kochen	
		positiv	negativ	positiv	negativ
BAK:	positiv (71)	68	3	66	5
	negativ (122)	3	119	1	121

Drei Proben waren in der PCR negativ und nur im ELISA positiv. Bei zwei der drei Proben (106 und 156) war der OD-Wert des ELISAs mit 0,28 bzw. 0,52 niedrig, was auf eine geringe Bakterienmenge hindeutet. Es könnte sein, dass die Bakterienmenge unter der Nachweisgrenze der PCR lag. Möglich ist auch eine unspezifische Reaktion im ELISA. Probe 108 hatte im ELISA einen hohen OD-Wert von 4,4. Bei einem so hochpositiven ELISA Ergebnis irritiert das auch bei Wiederholung negative PCR Ergebnis. PCR Inhibitoren können durch Nachweis der internen Kontrolle weitgehend ausgeschlossen werden. Da diese vor der Extraktion zugesetzt wurde, kann auch eine fehlerhafte DNA-Extraktion ausgeschlossen werden. Entweder die DNA in der Stuhlprobe wurde zerstört oder ein Fehler im ELISA, wie unzureichendes Waschen mit unspezifischer Konjugatbindung führte zu einem falsch-positiven ELISA Ergebnis.

Zwei weitere Proben (10 und 71) sind nur beim Kochen negativ geworden. Ursächlich könnten Inhibitoren sein, die beim Kochen nicht zerstört wurden, bei der DNA-Extraktion aber weitgehend eliminiert wurden. In Probe 71 konnte auch die interne Kontrolle nicht nachgewiesen werden, was diese Theorie erhärten würde. Drei Proben sind nur in der PCR positiv geworden. Am ehesten war die Bakterienmenge zu gering oder die Bakterien nicht mehr vital. Die hohen ct-Werte von über 32 würden dafür sprechen (siehe Anhang, Seite 53 Probe 112, 114, 115). Die Sensitivität für die DNA-Extraktion beträgt 0,96 und ist somit genauso hoch wie die Sensitivität der Kultur und des ELISAs zusammen betrachtet. Die Sensitivität der PCR für das Kochen beträgt 0,93 und ist damit etwas niedriger. Die Spezifität beträgt nach festgelegter Definition 1. Wenn die Kultur zusammen mit dem ELISA als Goldstandard angenommen wird, beträgt die Spezifität für die PCR nach DNA-Extraktion 0,98 und nach Kochen 0,99.

5.2.3 *Yersinia enterocolitica*

Da nur zwei kulturpositive *Yersinia*-Proben vorhanden waren, kann hier kein aussagekräftiges Ergebnis präsentiert werden. In beiden Proben wurde Yersinien-spezifische DNA mittels PCR nachgewiesen. Sämtliche für *Salmonella spp.* und *Campylobacter spp.* PCR positiven Proben blieben in der Yersinien-PCR negativ. Von den in der Kultur negativen Proben wurde eine Probe in der Yersinien-PCR positiv. Daraufhin wurde die Stuhlprobe erneut ausgestrichen und Yersinien konnten kultiviert werden. Es wird vermutet, dass die Stuhlproben und die Bouillons im Kühlschrank aufbewahrt worden sind und sich die initial geringe Yersinien-Menge in der Stuhlprobe durch Wachstum bei 4°C vermehrt hat, sodass sie jetzt auch in der Kultur positiv wurde.

Tabelle 11 zeigt einen Überblick über die Ergebnisse.

Tabelle 11: Vier-Felder-Tafel: Ergebnisse der PCR und Bakteriologie von *Yersinia enterocolitica* aus Stuhlproben

Stuhlproben		PCR			
		Extraktion		Kochen	
		positiv	negativ	positiv	negativ
BAK:	positiv (2)	2	0	2	0
	negativ (191)	1	190	0	191

5.2.4 Besonderheit

Die Probe 182 wurde aus der Auswertung herausgenommen. Diese Probe war für alle drei Bakterienarten kulturnegativ und im ELISA konnte kein *Campylobacter*-Antigen nachgewiesen werden. Mittels PCR konnte sowohl *Salmonella*-spezifische DNA nachgewiesen werden mit hohen ct-Werten von 34 als auch *Campylobacter*-spezifische DNA mit ct-Werten von 27 bzw. 28,5 sowohl nach DNA Extraktion als auch nach Kochen. Eine erneute Isolation der Probe brachte identische Ergebnisse. Es könnte sein, dass eine *Campylobacter*-Art im Stuhl vorhanden ist, die weder kultiviert noch vom ELISA erkannt wurde. Insbesondere Infektionen mit *Campylobacter lari*, *C. fetus* und *C. upsaliensis* können ein negatives ELISA Ergebnis aufweisen. Hingegen weist die PCR laut Herstellerangaben die DNA von allen humanpathogenen *Campylobacter* nach. Vielleicht wurde die Probe

unsachgemäß transportiert oder gelagert, sodass nur avitale Bakterien ausgestrichen wurden. Ein gleichzeitiger Befall von *Campylobacter* und *Salmonella* kommt vor. Es könnte sein, dass der Patient zu einem früheren Zeitpunkt einen Salmonellenbefall hatte und immer noch geringe Mengen ausscheidet. Der hohe ct-Wert würde dafür sprechen. Zusätzlich liegt aktuell eine Infektion mit *Campylobacter spp.* vor. Unspezifische PCR Reaktionen sind bei reproduzierbaren Ergebnissen und in Anbetracht der übrigen Ergebnisse eher unwahrscheinlich, aber nicht auszuschließen. In Anbetracht der anonymisierten Proben können keine klinischen Daten zur Klärung herangezogen werden.

6 Diskussion

6.1 Vergleich: Kulturen und PCR

6.1.1 *Salmonella spp.*: PCR aus Stuhl und Bouillon

In dieser Studie wurden kulturpositive und kulturnegative Stuhlproben und Anreicherungsbouillons mit der PCR untersucht worden ohne Korrelation zu klinischen Daten. Nur etwa 50% der *Salmonella* kulturpositiven konnten mit der PCR wiedergefunden werden. Hier stellt sich die Frage, ob die PCR so viele Infektionen übersieht oder ob die kulturpositiven Proben von Ausscheidern nach einer zurückliegenden Erkrankung stammen, bei denen die Salmonellenkonzentration unter der Nachweisgrenze der PCR liegt und die Patienten gar keine Symptome mehr zeigen. Die Fragen konnten in dieser anonymisierten Studie nicht geklärt werden, da keine klinischen Daten zur Verfügung standen und müssten in weiteren, klinischen Studien geklärt werden.

Der Nachweis von Salmonellen-spezifischer DNA aus der Anreicherungsbouillon ist sehr aussagekräftig und zuverlässig. Die Sensitivität beträgt 100%, alle positiven Ergebnisse aus Kulturen konnten also mit der PCR wiedergefunden werden. Die Zeit für die Diagnostik wird damit von zwei Tagen auf etwa 20 Stunden nach Probeneingang reduziert.

6.1.2 *Campylobacter spp.*: Kulturen, ELISA und PCR

Für die *Campylobacter spp.* zeigt die PCR eine ähnlich gute Sensitivität wie die Bakteriologie (Kulturen und ELISA zusammen betrachtet). Nur drei Proben, die in der Bakteriologie positiv waren, wurden mit der PCR nicht gefunden, wobei diese Proben nur im ELISA positiv waren. Für den Nachweis von *Campylobacter spp.* stellt die PCR mit DNA-Extraktion direkt aus der Stuhlprobe eine sensitive gute Alternative dar. Die PCR ist weniger anfällig für falsch-positive Ergebnisse als der ELISA bei vergleichbarem Zeitaufwand. Zudem ist die PCR schneller als die Kultur und unabhängig von der Vitalität der Bakterien in der Stuhlprobe. Die Zeit für die Diagnostik wird von zwei Tagen auf wenige Stunden reduziert.

6.1.3 *Yersinia enterocolitica*: Kulturen und PCR

Aufgrund des Mangels an Yersinien-positiven Stuhlproben kann darüber an dieser Stelle kein aussagekräftiger Vergleich angestellt werden. Die Ergebnisse der PCR der beiden vorhandenen Proben stimmten mit denen aus den Kulturen überein. In einer längerfristigen Studie könnten Yersinien-haltige Stuhlproben gesammelt, eingefroren und gesammelt mittels PCR analysiert werden.

6.2 Vergleich: DNA Extraktion und Kochen

Für PCR-Verfahren mit Zielgenen in den Toxinen von Enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) und *Clostridium difficile* konnte gezeigt werden, dass einfaches Kochen der Stuhlprobe für 10 Minuten, Zentrifugieren und Verwendung von 5-10 µl des Überstandes vergleichbare Ergebnisse liefert wie aus der Stuhlprobe aufgereinigte DNA. Da Kochen eine kosten- und zeitsparende Alternative auch für die hier verwendete Multiplex-PCR sein könnte, wurde ein Vergleich durchgeführt. Die Sensitivität der *Campylobacter*-PCR mit vorangehendem Kochen der Stuhlprobe zeigte eine Sensitivität von 0,93, nahezu identisch zur Sensitivität von 0,96 nach DNA-Extraktion. Für die Salmonellen-PCR lag die Sensitivität dagegen bei unter 50%, wenn auf eine DNA-Extraktion aus der Stuhlprobe verzichtet wurde. Bemerkenswert ist jedoch, dass die interne Kontrolle bei 19 von 82 kulturnegativen

Proben, also 23% (siehe Anhang, Seite 49), nicht detektiert werden konnte. Entsprechend können die negativen Ergebnisse nicht verwertet werden, die PCR muss in diesen Fällen wiederholt werden. Der Ausfall liegt wahrscheinlich an den Inhibitoren im Stuhl, die bei der DNA-Extraktion eliminiert oder zumindest reduziert werden, aber nach Kochen dagegen erhalten bleiben.

Bei den 82 Bouillons aus Stuhlproben, in denen keine der drei Bakteriengattungen kultiviert werden konnte, ist nur in Probe 143 die interne Kontrolle nach Kochen nicht nachweisbar gewesen, in Probe 145 konnte sie nach DNA-Extraktion nicht amplifiziert werden.

6.3 Nachweisgrenze

Aus der Theorie ist bekannt, dass bereits die DNA eines Bakteriengenoms ausreichend ist, um ein positives PCR-Ergebnis zu erzielen. Das ist aber nur unter optimalen Bedingungen möglich, das heißt u.a. ein reines Medium ohne Inhibitoren und Störstoffe und die einzelne Matrizen-DNA oder Proben-DNA muss sich im Template befinden. Die Analyse der theoretischen Nachweisgrenze hat gezeigt, dass sich, 12 Bakterien oder weniger noch nachweisen lassen (*Salmonella spp.* 12; *Campylobacter spp.* 2; *Yersinia enterocolitica* 8). Der Dreifachansatz aus demselben Isolat hat gezeigt, dass diese PCR-Ergebnisse reproduzierbar sind.

Die Menge der nachgewiesenen Bakterien in der PCR wurde anhand der gewachsenen Kolonien aus lebenden Bakterien auf den Nährböden berechnet. In der PCR können aber auch tote Bakterien nachgewiesen werden, sodass in Wirklichkeit mehr Bakterien für ein positives Ergebnis notwendig sind und die Nachweisgrenze höher liegen kann. Die hier gefundenen Nachweisgrenzen stimmen mit den Herstellerangaben überein.

Die Nachweisgrenze von Bakterien aus dem Stuhl liegt um etwa eine Zehnerpotenz höher als die theoretische Nachweisgrenze (*Salmonella spp.* 60; *Campylobacter spp.* 10 *Yersinia enterocolitica* 38). Das liegt wahrscheinlich daran, dass die DNA der verschiedenen Bakterien im Stuhl bei der Extraktion um die Bindungsstellen des Stößels konkurrieren und somit weniger DNA der Zielbakterien extrahiert wird.

An den Platten war allerdings zu sehen, dass der Stuhl dort die gleichen Probleme bereitet aufgrund der Darmflora. Daher müssen die Bakterien, z.B. die Salmonellen angereichert werden, was einen Tag Wartezeit notwendig macht. Bei den *Campylobacter* könnte durch Testung von Zwischenverdünnungsstufen untersucht werden, ob die Nachweisgrenze von Bakterien aus Stuhlsuspension noch niedriger als hier ermittelt liegt. Eine Erklärung für die sehr niedrige Nachweisgrenze der *Campylobacter* ist, dass die Zielsequenz der PCR in der ribosomalen 16S DNA liegt und diese befindet sich mehrmals in einem Bakterium.

6.4 Empfehlung zum diagnostischem Vorgehen

Als Ergebnis der Studie kann folgendes Vorgehen empfohlen werden:

Eingehende Stuhlproben werden zur DNA-Extraktion verwendet und am selben Tag die PCR durchgeführt. Ein positiver Befund für Salmonellen-, *Campylobacter* und *Yersinien*-spezifische DNA kann noch am Einsendetag mitgeteilt werden. Bleibt die PCR bei nachgewiesener interner Kontrolle, sprich nach Ausschluss von PCR-Inhibitoren negativ, wird eine Selenit-Bouillon angelegt und über Nacht bebrütet. Am nächsten Tag reicht es dann, die angereicherte Bouillon zu kochen und den Überstand nach Zentrifugation in die PCR einzusetzen.

Das Ergebnis zu Salmonellen im Stuhl kann innerhalb von 24 Stunden nach Probeneingang mitgeteilt werden – und positive Resultate können über Ausstrich der Bouillon kontrolliert und der Serotyp bestimmt werden. Für die PCR am Folgetag wäre es kostengünstiger statt der Multiplex-PCR nur eine Salmonellen-PCR einzusetzen.

Es bleibt anzumerken, dass das Ergebnis immer im Zusammenhang mit der Krankheitsgeschichte betrachtet werden muss. Der alleinige Nachweis spezifischer Bakterien-DNA im Stuhl ist nicht identisch mit einer Gastroenteritis.

7 Zusammenfassung

Salmonella spp., *Campylobacter spp.* und *Yersinia enterocolitica* zählen zu den häufigsten Erregern von Durchfallerkrankungen. Nachgewiesen werden sie in der Routinediagnostik aus Stuhlproben mittels Kulturen, Salmonellen nach Anreicherung, für *Campylobacter spp.* zusätzlich in einem Antigennachweis mittels ELISA. Das Ergebnis liegt erst nach bis zu 72 Stunden vor. In dieser Studie wurde untersucht, ob eine Multiplex-PCR eine vergleichbare Sensitivität und Selektivität aufweist und die Nachweisgrenze bestimmt. DNA-Extraktion wurde mit einfachem Kochen des Stuhls verglichen und in die Salmonellen-PCR wurden Stuhlproben und Bouillons eingesetzt. Die vergleichende Studie ergab folgende Ergebnisse: **1:** Von den *Salmonella*-kulturpositiven Proben, konnten aus den Stühlen etwa 50% nicht nachgewiesen werden, daher wäre die *Salmonella*-PCR keine Alternative zur Kultur. Aus den angereicherten Bouillons betrug die Sensitivität 100%. **2:** Die Sensitivität der *Campylobacter*-PCR betrug 96%, sie stellt also eine gute sensitive Alternative zur Kultivierung und zum ELISA dar. **3:** Nur zwei *Yersinia*-positive Proben standen zur Verfügung, daher wurden zu diesen Bakterien keine aussagekräftigen Ergebnisse erzielt. Die Sensitivität betrug 100%. **4:** 23% der internen Kontrollen ist in den kulturnegativen Stuhlproben nach Kochen ausgefallen. Bei den Bouillons zeigte sich kein Unterschied zwischen Extraktion und Kochen. **5:** Die Spezifität der PCR für alle drei Bakteriengattungen betrug 1. Die Nachweisgrenze aus Reinkulturen zeigte, dass in der PCR noch 12 Salmonellen, 2 *Campylobacter* und 8 *Yersinien* nachgewiesen werden können. Die Nachweisgrenze aus angeimpften Stuhlproben lag um etwa eine Zehnerpotenz höher (60 Salmonellen, 10 *Campylobacter*, 38 *Yersinien*).

Aus den Ergebnissen wird folgender Vorschlag für die Diagnostik gegeben: Die eingegangene Stuhlprobe wird extrahiert, da beim Kochen die interne Kontrolle zu 25% ausfällt und das Ergebnis nicht valide wäre, sodass die PCR wiederholt werden müsste. Das Isolat wird in die Multiplex-PCR eingesetzt. Ein positives Ergebnis auf *Campylobacter* und *Yersinia enterocolitica* wäre sicher. Werden keine Salmonellen nachgewiesen, muss die Probe angereichert werden. Am nächsten Tag kann die Anreicherung gekocht und der Überstand in der PCR eingesetzt werden. Die Zeit für die Diagnostik wird bis auf wenige Stunden reduziert.

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: <i>Salmonella typhimurium</i> unter einem Elektronenmikroskop.....	2
Abb. 2: Befall von Bakterien und Immunantwort im Darm	5
Abb. 3: <i>Campylobacter jejuni</i> unter dem Elektronenmikroskop	6
Abb. 4: <i>Yersinia enterocolitica</i>	8
Abb. 5: <i>Salmonella spp.</i> auf XLD-Agar	13
Abb. 6: Kolonien von <i>Campylobacter jejuni</i> auf CCDA Nährboden	14
Abb. 7: <i>Yersinia enterocolitica</i> auf CIN-Agar	15
Abb. 8: Schema des Sandwich-ELISA	16
Abb. 9: Schema Aufreinigungsprinzip des Maxwell ®16 Systems.....	17
Abb. 10: Schema der drei Phasen der PCR	18
Abb. 11: Schema Real-Time PCR.....	19
Abb. 12: Chemische Formel von 6-Carboxyfluorescein.....	20
Abb. 13: Chemische Formel von Cyanine5	20
Abb. 14: Chemische Formel von Carboxy-X-Rhodamin	21
Abb. 15: Chemische Formel von Hexachloro-Fluorescein.....	21
Abb. 16: XLD-Nährboden mit reiner Kultur und angeimpfter Stuhlsuspension (<i>Salmonella spp.</i>).....	28
Abbildung 17: CCDA-Nährboden mit reiner Kultur und angeimpfter Stuhlsuspension (<i>Campylobacter spp.</i>)	30
Abb. 18: CIN-Nährboden 100µl reiner Kultur und aus der Stuhlsuspension (<i>Yersinia enterocolitica</i>)	32

9 Tabellenverzeichnis

<u>Tabelle 1</u> : Verdünnungsstufen von Kulturen von <i>Salmonella</i> spp. und <i>Yersinia enterocolitica</i> zur Analyse der Nachweisgrenze	25
<u>Tabelle 2</u> : Gezählte <i>Salmonella</i> -Kolonien aus den Kultur- und Stuhlsuspensionen mit eingerührten Bakterien aus Reinkulturen.....	27
<u>Tabelle 3</u> : PCR-Ergebnisse der Verdünnungsreihen mit reinen <i>Salmonella</i> -Kulturen und aus Stuhl-Bakteriensuspensionen	28
<u>Tabelle 4</u> : Gezählte Kolonien pro 100µl ausgestrichene <i>Campylobacter</i> -Kultursuspensionen und Stuhl-Bakteriensuspensionen.....	29
<u>Tabelle 5</u> : PCR-Ergebnisse der Verdünnungsreihen mit reinen <i>Campylobacter</i> -Kulturen und Stuhl-Bakteriensuspensionen.....	30
<u>Tabelle 6</u> : Gezählte Kolonien aus den <i>Yersinia</i> -Kultursuspensionen und Stuhlsuspensionen mit eingerührten Kulturen	31
<u>Tabelle 7</u> : PCR-Ergebnisse der Verdünnungsreihen mit reinen <i>Yersinia</i> -Kulturen und aus Stuhl-Bakteriensuspensionen	32
<u>Tabelle 8</u> : Vier-Felder-Tafel: Ergebnisse der PCR und Bakteriologie von <i>Salmonella</i> spp. aus Stuhlproben und Bouillons	33
<u>Tabelle 9</u> : Vier-Felder-Tafel: Ergebnisse der PCR und Kulturen bzw. ELISA von <i>Campylobacter</i> spp.....	34
<u>Tabelle 10</u> : Vier-Felder-Tafel: Ergebnisse der PCR und Bakteriologie von <i>Campylobacter</i> spp. aus Stuhlproben.....	35
<u>Tabelle 11</u> : Vier-Felder-Tafel: Ergebnisse der PCR und Bakteriologie von <i>Yersinia enterocolitica</i> aus Stuhlproben	36

10 Quellenverzeichnis

Institutionen:

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta (USA)

Robert-Koch-Institut (RKI), Hamburg, (Deutschland)

World Health Organization (WHO)

Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), USA

Literatur:

Burkhardt, F. (1992) Mikrobiologische Diagnostik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Darai, G., Handermann, M., Sonntag, H. -G., Zöller, L. (2012) Lexikon Der Infektionskrankheiten Des Menschen. Springer-Verlag, Heidelberg

Hahn, H., Miksits, K., Falke, D., Kaufmann, S.H.E., Ullmann, U., Vogt, K.,

Renneberg, R. (2009) Bioanalytik für Einsteiger. Diabetes, Drogen und DNA. Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg

Kleer, J (2003) *Salmonella*. Einführung in die Lebensmittelhygiene. Sinell, H.J. (Hrsg), Parey-Verlag, Stuttgart, 19-33

Veröffentlichungen:

Hensel, M (2004) Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. Int J Med Microbiol. 294(2-3): 95-102

Konkel, M.E., Monteville, M.R.m Rivera-Amill, V., Joens, L.A. (2001) The pathogenesis of *Campylobacter jejuni* –mediated enteritis. Curr. Issues Interst. Microbiol. 2, 55-71

Frost, A.J., Bland, A.P., Wallis, T.S. (1997) The early dynamic response of the calf ileal epithelium to *Salmonella typhimurium*. Vet Pathol. 34(5): 369-386

Bottone, E.J. (1997) *Yersinia enterocolitica*: The charisma continues. Clin. Microbiol. Rev. 10(2): 257-276

Carniel, E. (1995) Chromosomal virulence factors of *Yersinia*. Contr. Microbiol. Immunol. 13: 218-224

De Koning-Ward, TF, Robins-Browne, RM. (1997) A novel mechanism of urease regulation in *Yersinia enterocolitica*. FEMS Microbiol Lett. 147(2): 221-226

Heesemann, J. (1990) Enteropathogene Yersinien: Pathogenitätsfaktoren und neue diagnostische Methoden. *Immun. Infekt.*, 18, 186-191

Heesemann, J., Keller, C., Morawa, R., Schmidt, N., Siemens, H.J., Laufs, R. (1983) Plasmids of human strains of *Yersinia enterocolitica* – Molecular relatedness and possible importance for pathogenesis. *J. Infect. Dis.* 147(1): 107-115

Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I., Khorana, H.G. (1971) Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNAs as catalyzed by DNA polymerases. *J. Mol. Biol.* 56: 341-361

Logue, C.M., Sheridan, J.J., Mc Dowell, D.A., Blair, I.S., Hegarty, T. (2000) The effect of temperature and selective agents on the growth of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 in pure culture. *J. Appl. Microbiol.* 88: 1001-1008

Malorny, B., Paccassoni, E., Fach, P., Bunge, C., Martin, A., Helmuth, R., (2004) Diagnostic Real-Time PCR for Detection of Salmonella in Food. *Appl Environ Microbiol.* 70(12): 7046-7052

Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155: 335-350

Ohl, M.E., Miller, S.I. (2001) Salmonella: a model for bacterial pathogenesis. *Annu Rev Med* 52: 259-274

Otten, H., Plempel, M., Siegenthaler, W. (1975) Antibiotikafibel. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Pepe, J.C., Badger, J.L., Miller, V.L. (1994) Growth phase and low pH affect the thermal regulation of the *Yersinia enterocolitica* *inv* gene. *Mol. Microbiol.* 11(1): 123-135

Rica, R., Stevens, M. M. (2012) Plasmonic ELISA for the ultrasensitive detection of disease biomarkers with the naked eye. *Nature Nanotechnology*, 7: 821-824

Rosqvist, R., Magnusson, K., Wolfwatz, H. (1994) Target-cell contact triggers expression and polarized transfer of Yersinia Yope cytotoxin into mammalian-cells. *EMBO J.* 13(4): 964-972

Scharek, L., Tedin, K. (2007) The porcine immune system-differences compared to man and mouse and possible consequences for infections by *Salmonella* serovars. *Berl. Munch Tierärztl. Wochenschr.* 120(7-8): 347-354

Schiemann, D.A. (1979) Synthesis of a selective agar medium for *Yersinia enterocolitica*. Can. J. Microbiol. 25: 1298-1304

Wallis, T.S., Galyov, E.E. (2000) Molecular basis of *Salmonella*- induced enteritits. Mol Microbiol. 36(5) 997-1005

Winter, S.E., Thiennimitr, P., Winter, M.G., Butler, B.P., Huseby, D.L., Crawford, R.W., Russell, J.M., Bevins, C.L., Adams, L.G., Tsolis, R.M., Roth, J.R., Bäumler, A.J. (2010) Gut inflammation provides a respiratory electron for *Salmonella*. Nature, 467(7314): 426-429

Internet:

Schomaker, Judith (2012) Salmonellen-Erkrankung. Curado GmbH, Leverkusen
<http://www.curado.de/Salmonellen-Erkrankung-22863/> (Stand: 04.01.2015)

Hellwig, B. (2013) Linaclotid bei Reizdarmdyndrom. DAZ.online, Nr. 18, 30-32
<http://www.deutsche-apotheker-zeitung.de> (Stand: 04.01.2015)

Heyn, Gudrun (2006) Sensible Festung gegen Angreifer. Pharmazeutische Zeitung online, Ausgabe 05/2006

<http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=653> (Stand: 04.01.2015)

<http://www.haematopathologie-hamburg.de/methoden/pcr-qpcr/> (Stand: 04.01.2015)

<http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/Molstudents/spring2003>

</Pierce/realtimepcr.htm> (Stand: 04.01.2015)

<http://www.wissenschaft-aktuell.de> (Stand: 04.01.2015)

Online-Lexika:

<http://flexikon.doccheck.com/> (Stand: 04.01.2015)

<http://www.laborlexikon.de/Lexikon/Infoframe/s/Salmonellen-Nachweis.htm> (Stand: 04.01.2015)

<http://www.chemgapedia.de/vsengine/> (Stand: 04.01.2015)

<http://www.chemie.de/> (Stand: 04.01.2015)

Firmen:

Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg (Deutschland)

<http://www.eurofinsgenomics.eu/> (Stand: 04.01.2015)

Trilink Biotechnologies, San Diego (USA)

<http://www.trilinkbiotech.com/> (Stand: 04.01.2015)

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg (Deutschland)

<http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8632> (Stand: 04.01.2015)

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (Deutschland)

http://www.carlroth.de/media/_de-de/usage/X941.pdf (Stand: 04.01.2015)

http://www.carlroth.com/media/_de-de/usage/5756.pdf (Stand: 04.01.2015)

heipha Dr. Müller GmbH, Eppelheim (Deutschland)

http://www.heipha.de/files/product/de/152e-4-0110_XLD-Agar.pdf (Stand: 04.01.2015)

http://www.heipha.de/files/product/de/334e-1-0101_Campylobacter-Agar-blutfrei.pdf
(Stand: 04.01.2015)

http://www.heipha.de/files/product/de/395e-1-0101_Yersinia-CIN.pdf (Stand: 04.01.2015)

Merck Millipore KGaA, Darmstadt (Deutschland)

Sigma-Aldrich Co. LLC, USA

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t0440?lang=en®ion=> (Stand: 04.01.2015)

11 Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtliche oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind in allen Fällen unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Unterschrift

12 Anhang

Legende:

Salm: *Salmonella spp.*

Camp: *Campylobacter spp.*

Yers: *Yersinia enterocolitica*

IC: interne Kontrolle

Auswertung der internen Kontrollen:

Stuhl kulturnegativ (82):			Bouillon kulturnegativ(82):		
	Maxwell	Kochen		Maxwell	Kochen
<i>Maximum</i>	30,75	36,71	<i>Maximum</i>	28,94	26,75
<i>Minimum</i>	25,08	23,52	<i>Minimum</i>	23,32	24,27
Anz. "No ct"	0	19	Anz. "No ct"	1	1
<i>Mittelwert</i>	27,84	25,32	<i>Mittelwert</i>	26,44	25,04

Ergebnisse der PCR (Rohdaten, in Excel übertragen):

	Salm	Camp	Yers	IC
Well Name	Ct (dR)	Ct (dR)	Ct (dR)	Ct (dR)
Iso-Kontrolle 1 NaCl-Lsg	No Ct	No Ct	No Ct	25,57
Iso-Kontrolle 2 NaCl-Lsg	No Ct	No Ct	No Ct	25,6
Iso-K Selenit-Bouillon	No Ct	No Ct	No Ct	25,67
Iso-K HPLC-Wasser	No Ct	No Ct	No Ct	24,88
Negative Stuhlsuspens.	No Ct	No Ct	No Ct	22,57

<i>Maxwell</i>					<i>Kochen</i>			
	Salm	Camp	Yers	IC	Salm	Camp	Yers	IC
Well Name	Ct (dR)	Ct (dR)	Ct (dR)	Ct (dR)	Ct (dR)	Ct (dR)	Ct (dR)	Ct (dR)
Salm Bouillon 1	21,08	No Ct	No Ct	28	20,27	No Ct	No Ct	25,95
Salm Bouillon 2	17,41	No Ct	No Ct	27,07	15,64	No Ct	No Ct	34,91
Salm Bouillon 3	21,42	No Ct	No Ct	27,63	19,19	No Ct	No Ct	27,62
Salm Bouillon 4	19,97	No Ct	No Ct	27,46	16,81	No Ct	No Ct	29,81
Salm Bouillon 5	25,65	No Ct	No Ct	28,31	22,58	No Ct	No Ct	26,91
Salm Bouillon 6	19,49	No Ct	No Ct	27,24	17,67	No Ct	No Ct	33,83
Salm Bouillon 7	20,08	No Ct	No Ct	27,65	17,74	No Ct	No Ct	No Ct
Salm Bouillon 8	18,27	No Ct	No Ct	26,46	17,78	No Ct	No Ct	26,9
Salm Bouillon 25	17,82	No Ct	No Ct	27,04	16,37	No Ct	No Ct	No Ct
Salm Bouillon 26	25,08	No Ct	No Ct	27,88	21,37	No Ct	No Ct	24,99
Salm Bouillon 27	28,93	23,69	No Ct	27,5	29,41	22,26	No Ct	25,97
Salm Bouillon 28	17,56	No Ct	No Ct	27,66	17,13	No Ct	No Ct	27,47
Salm Bouillon 29	26,93	No Ct	No Ct	27,88	24,48	No Ct	No Ct	28,04
Salm Bouillon 30	24,93	25,28	No Ct	28,9	23,97	25,02	No Ct	No Ct
Salm Bouillon 31	18,15	No Ct	No Ct	25,98	16,82	No Ct	No Ct	25,85
Salm Bouillon 44	18,25	No Ct	No Ct	25,7	18,44	No Ct	No Ct	No Ct
Salm Bouillon 45	18,38	No Ct	No Ct	25,53	16,6	No Ct	No Ct	No Ct
Salm Bouillon 46	21,1	No Ct	No Ct	26,24	25,45	No Ct	No Ct	26,18
Salm Bouillon 47	16,62	No Ct	No Ct	25,85	15,02	No Ct	No Ct	No Ct
Salm Bouillon 57	18,52	No Ct	No Ct	26,27	14,21	No Ct	No Ct	No Ct
Salm Bouillon 58	18,28	No Ct	No Ct	25,03	13,76	No Ct	No Ct	36,62
Salm Bouillon 59	19,06	No Ct	No Ct	26,18	16,63	No Ct	No Ct	No Ct
Salm Bouillon 60	18,27	No Ct	No Ct	25,12	17,71	No Ct	No Ct	28,9
Salm Bouillon 61	16,77	No Ct	No Ct	27,64	16,92	No Ct	No Ct	33,47
Salm Bouillon 62	16,69	No Ct	No Ct	26	13,89	No Ct	No Ct	No Ct
Salm Bouillon 63	32,22	No Ct	No Ct	26,12	31,18	No Ct	No Ct	25,33
Salm Bouillon 64	33,95	No Ct	No Ct	24,21	31,81	No Ct	No Ct	25,72
Salm Bouillon 76	20,5	No Ct	No Ct	25,63	17,84	No Ct	No Ct	No Ct
Salm Bouillon 77	19,9	No Ct	No Ct	25,99	17,1	No Ct	No Ct	No Ct
Salm Bouillon 78	19	No Ct	No Ct	25,77	15,72	No Ct	No Ct	No Ct
Salm Bouillon 79	18,2	No Ct	No Ct	24,56	17,42	No Ct	No Ct	No Ct
Salm Bouillon 80	17,75	No Ct	No Ct	24,71	15,32	No Ct	No Ct	38,93
Salm Bouillon 81	18,42	No Ct	No Ct	25,72	14,55	No Ct	No Ct	39,11
Salm Bouillon 82	18,37	No Ct	No Ct	25,91	15,43	No Ct	No Ct	No Ct
Salm Bouillon 83	22,64	No Ct	No Ct	26,11	19,01	No Ct	No Ct	27,07
Salm Bouillon 84	19,38	No Ct	No Ct	25,69	15,72	No Ct	No Ct	25,1
Salm Bouillon 85	17,33	No Ct	No Ct	25,49	15,1	No Ct	No Ct	No Ct
Salm Bouillon 86	15,92	No Ct	No Ct	26,45	15,64	No Ct	No Ct	43,03
Salm Bouillon 87	17,42	No Ct	No Ct	27,69	16,77	No Ct	No Ct	30,95
Salm Bouillon 88	16,83	No Ct	No Ct	27,67	15,81	No Ct	No Ct	No Ct
Salm Bouillon 89	18,13	No Ct	No Ct	27,46	14,95	No Ct	No Ct	No Ct

<i>Maxwell</i>					<i>Kochen</i>				<i>Kommentar</i>
	Salm	Camp	Yers	IC	Salm	Camp	Yers	IC	
Well Name	Ct (dR)	Ct (dR)	Ct (dR)	Ct (dR)	Ct (dR)	Ct (dR)	Ct (dR)	Ct (dR)	
Salm Stuhlprobe 1	27,06	No Ct	No Ct	26,53	31,1	No Ct	No Ct	24,5	
Salm Stuhlprobe 2	32,67	No Ct	No Ct	27,61	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
Salm Stuhlprobe 3	23,27	No Ct	No Ct	25,56	25,71	No Ct	No Ct	No Ct	
Salm Stuhlprobe 4	18,56	No Ct	No Ct	25,31	18,13	No Ct	No Ct	24,51	
Salm Stuhlprobe 5	No Ct	No Ct	No Ct	27,21	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
Salm Stuhlprobe 6	No Ct	No Ct	No Ct	26,75	No Ct	No Ct	No Ct	25,64	
Salm Stuhlprobe 7	25,41	No Ct	No Ct	27,88	25,3	No Ct	No Ct	24,76	
Salm Stuhlprobe 8	21,85	No Ct	No Ct	26,61	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
Yers Stuhlprobe 9	No Ct	No Ct	22,4	26,86	No Ct	No Ct	17,96	23,67	
Camp Stuhlprobe 10	No Ct	31,3	No Ct	26,05	No Ct	No Ct	No Ct	24,94	
Camp Stuhlprobe 11	No Ct	19,24	No Ct	27,27	No Ct	21,71	No Ct	24,1	
Camp Stuhlprobe 12	No Ct	24,96	No Ct	26,77	No Ct	25,3	No Ct	24,25	
Camp Stuhlprobe 13	No Ct	21,03	No Ct	25,15	No Ct	25,74	No Ct	24	
Camp Stuhlprobe 14	No Ct	25,84	No Ct	26,4	No Ct	26,14	No Ct	24,49	
Camp Stuhlprobe 15	No Ct	18,58	No Ct	25,57	No Ct	22,34	No Ct	24,08	
Camp Stuhlprobe 16	No Ct	25,67	No Ct	27,1	No Ct	25,72	No Ct	24,09	
Camp Stuhlprobe 17	No Ct	20,26	No Ct	26,12	No Ct	21,73	No Ct	24,01	
Camp Stuhlprobe 18	No Ct	24,67	No Ct	27,75	No Ct	28,22	No Ct	24,51	
Camp Stuhlprobe 19	No Ct	19,4	No Ct	27,27	No Ct	25,94	No Ct	23,15	
Camp Stuhlprobe 20	28,93	21,15	No Ct	26,33	No Ct	20,22	No Ct	23,33	Salm flach ansteigend
Camp Stuhlprobe 21	29,49	25,38	No Ct	27,94	No Ct	31,71	No Ct	23,7	Salm flach ansteigend
Camp Stuhlprobe 22	32,67	20,52	No Ct	28,82	No Ct	19,21	No Ct	23,42	Salm flach ansteigend
Camp Stuhlprobe 23	No Ct	25,29	No Ct	27	No Ct	30,13	No Ct	23,21	
Camp Stuhlprobe 24	29,44	21,51	No Ct	26,15	No Ct	26,5	No Ct	23,07	Salm flach ansteigend
Salm Stuhlprobe 25	25,67	No Ct	No Ct	26,67	28,71	No Ct	No Ct	24,83	
Salm Stuhlprobe 26	29,2	No Ct	No Ct	27,21	28,9	No Ct	No Ct	24,58	
Salm Stuhlprobe 27	No Ct	18,28	No Ct	26,45	No Ct	21,4	No Ct	25,64	
Salm Stuhlprobe 28	No Ct	No Ct	No Ct	28,19	No Ct	No Ct	No Ct	23,71	
Salm Stuhlprobe 29	No Ct	No Ct	No Ct	27,27	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
Salm Stuhlprobe 30	No Ct	20,6	No Ct	30,37	No Ct	18,65	No Ct	No Ct	
Salm Stuhlprobe 31	No Ct	No Ct	No Ct	28,07	No Ct	No Ct	No Ct	24,53	
Camp Stuhlprobe 32	No Ct	20,39	No Ct	26,61	No Ct	18,53	No Ct	No Ct	
Camp Stuhlprobe 33	No Ct	21,57	No Ct	24,81	No Ct	27,89	No Ct	24,64	
Camp Stuhlprobe 34	No Ct	28,5	No Ct	27,22	No Ct	33,79	No Ct	24,49	
Camp Stuhlprobe 35	No Ct	29,06	No Ct	27,63	No Ct	34,01	No Ct	24,44	
Camp Stuhlprobe 36	No Ct	18,91	No Ct	25,43	37,28	20,7	No Ct	24,13	
Camp Stuhlprobe 37	No Ct	22,51	No Ct	25,52	No Ct	26,57	No Ct	24,48	
Camp Stuhlprobe 38	No Ct	21,15	No Ct	24,42	No Ct	26,06	No Ct	24,63	
Camp Stuhlprobe 39	No Ct	23,13	No Ct	25,15	No Ct	24,25	No Ct	24,66	
Camp Stuhlprobe 40	No Ct	18,75	No Ct	25,82	No Ct	20,42	No Ct	24,07	
Camp Stuhlprobe 41	No Ct	21,18	No Ct	26,08	No Ct	22,39	No Ct	24,41	
Camp Stuhlprobe 42	No Ct	20,01	No Ct	25,8	No Ct	21,15	No Ct	24,22	
Camp Stuhlprobe 43	No Ct	24,4	No Ct	25,64	No Ct	24,24	No Ct	24,13	
Salm Stuhlprobe 44	No Ct	No Ct	No Ct	25,8	No Ct	No Ct	No Ct	26,13	
Salm Stuhlprobe 45	33,17	No Ct	No Ct	26,02	30,99	No Ct	No Ct	24,99	
Salm Stuhlprobe 46	22,52	No Ct	No Ct	26,09	35,29	No Ct	No Ct	No Ct	
Salm Stuhlprobe 47	19,6	No Ct	No Ct	25,04	16,71	No Ct	No Ct	24,03	
Camp Stuhlprobe 48	No Ct	16,5	No Ct	27,72	No Ct	19,58	No Ct	24,48	
Camp Stuhlprobe 49	No Ct	20,14	No Ct	26,74	No Ct	22,54	No Ct	24,4	
Camp Stuhlprobe 50	No Ct	23,97	No Ct	24,76	No Ct	23,16	No Ct	24,26	

Camp Stuhlprobe 51	No Ct	20,98	No Ct	28,21	No Ct	23,17	No Ct	24,43	
Camp Stuhlprobe 52	No Ct	22,5	No Ct	27,68	No Ct	24,23	No Ct	24,59	
Camp Stuhlprobe 53	No Ct	21,33	No Ct	26,7	No Ct	22,18	No Ct	24,43	
Camp Stuhlprobe 54	No Ct	23,6	No Ct	27,88	No Ct	24,43	No Ct	24,52	
Camp Stuhlprobe 55	No Ct	17,57	No Ct	26,69	No Ct	23,59	No Ct	25,02	
Camp Stuhlprobe 56	No Ct	24,05	No Ct	26,54	No Ct	31,7	No Ct	25,54	
Salm Stuhlprobe 57	32,81	No Ct	No Ct	26,36	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
Salm Stuhlprobe 58	31,29	No Ct	No Ct	27,09	34,83	No Ct	No Ct	23,65	
Salm Stuhlprobe 59	25,47	No Ct	No Ct	26,51	26,15	No Ct	No Ct	24,4	
Salm Stuhlprobe 60	33,11	No Ct	No Ct	25,5	No Ct	No Ct	No Ct	24,53	
Salm Stuhlprobe 61	27,56	No Ct	No Ct	27	25,8	No Ct	No Ct	24,24	
Salm Stuhlprobe 62	22,93	No Ct	No Ct	25,72	19,81	No Ct	No Ct	34,02	
Salm Stuhlprobe 63	No Ct	No Ct	No Ct	29,8	No Ct	No Ct	No Ct	24,48	
Salm Stuhlprobe 64	No Ct	No Ct	No Ct	26,74	26,25	No Ct	No Ct	24,56	Salm flach ansteigend
Camp Stuhlprobe 65	No Ct	21,26	No Ct	28,39	No Ct	27,2	No Ct	24,83	
Camp Stuhlprobe 66	No Ct	21,82	No Ct	25,21	No Ct	22,76	No Ct	26,78	
Camp Stuhlprobe 67	No Ct	16,15	No Ct	25,5	No Ct	18,79	No Ct	23,97	
Camp Stuhlprobe 68	No Ct	19,64	No Ct	26,6	No Ct	25,53	No Ct	25,56	
Camp Stuhlprobe 69	No Ct	21,72	No Ct	25,64	No Ct	23,58	No Ct	24,16	
Camp Stuhlprobe 70	No Ct	19,85	No Ct	26,67	No Ct	23,69	No Ct	24,28	
Camp Stuhlprobe 71	No Ct	21,35	No Ct	25,67	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	WDH nicht geklappt
Camp Stuhlprobe 72	No Ct	23,55	No Ct	24,13	No Ct	25,88	No Ct	24,55	
Camp Stuhlprobe 73	No Ct	21,8	No Ct	26,11	No Ct	22,63	No Ct	24,8	
Camp Stuhlprobe 74	No Ct	21,93	No Ct	28,2	No Ct	22,85	No Ct	23,46	
Camp Stuhlprobe 75	No Ct	17,87	No Ct	25,36	No Ct	25,71	No Ct	23,91	
Salm Stuhlprobe 76	No Ct	No Ct	No Ct	26,98	No Ct	No Ct	No Ct	23,82	
Salm Stuhlprobe 77	24,06	No Ct	No Ct	25,93	22,74	No Ct	No Ct	23,64	
Salm Stuhlprobe 78	31,68	No Ct	No Ct	26,32	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
Salm Stuhlprobe 79	32	No Ct	No Ct	26,68	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
Salm Stuhlprobe 80	No Ct	No Ct	No Ct	26,59	No Ct	No Ct	No Ct	23,98	
Salm Stuhlprobe 81	26,03	No Ct	No Ct	25,83	31,03	No Ct	No Ct	23,54	
Salm Stuhlprobe 82	34,21	No Ct	No Ct	25,76	No Ct	No Ct	No Ct	24,56	
Salm Stuhlprobe 83	No Ct	No Ct	No Ct	24,68	No Ct	No Ct	No Ct	24,32	
Salm Stuhlprobe 84	34,35	No Ct	No Ct	25,41	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
Salm Stuhlprobe 85	No Ct	No Ct	No Ct	25,47	No Ct	No Ct	No Ct	23,9	
Salm Stuhlprobe 86	31,74	No Ct	No Ct	26,87	31,1	No Ct	No Ct	24,82	
Salm Stuhlprobe 87	29,62	No Ct	No Ct	26,15	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
Salm Stuhlprobe 88	29,1	No Ct	No Ct	25,78	33,11	No Ct	No Ct	30,21	
Salm Stuhlprobe 89	27,91	No Ct	No Ct	25,97	26,29	No Ct	No Ct	24,76	
Camp Stuhlprobe 90	No Ct	20,94	No Ct	26,05	No Ct	26,91	No Ct	23,96	
Camp Stuhlprobe 91	No Ct	21,12	No Ct	27,16	No Ct	20,59	No Ct	No Ct	
Camp Stuhlprobe 92	31,78	23,07	No Ct	24,11	33,11	30,43	No Ct	23,94	Salm flach ansteigend
Camp Stuhlprobe 93	No Ct	24,32	No Ct	25,45	No Ct	24,26	No Ct	24,17	
Camp Stuhlprobe 94	No Ct	21,82	No Ct	27,25	No Ct	19,72	No Ct	23,81	
Camp Stuhlprobe 95	No Ct	19,89	No Ct	25,64	No Ct	24,93	No Ct	24,03	
Camp Stuhlprobe 96	No Ct	21,97	No Ct	28,15	No Ct	23,96	No Ct	24,54	
Camp Stuhlprobe 97	No Ct	17,66	No Ct	27,39	No Ct	18,61	No Ct	No Ct	
Camp Stuhlprobe 98	No Ct	19,3	No Ct	26,05	No Ct	16,07	No Ct	No Ct	
Camp Stuhlprobe 99	No Ct	20,07	No Ct	25,2	No Ct	17,97	No Ct	No Ct	
Camp Stuhlprobe 100	No Ct	22,15	No Ct	26,68	No Ct	25,24	No Ct	23,99	

Camp Stuhlprobe 101	No Ct	21,86	No Ct	27,39	No Ct	25,92	No Ct	23,9	
Camp Stuhlprobe 102	No Ct	25,9	No Ct	27,2	No Ct	33,98	No Ct	24,93	
Camp Stuhlprobe 103	No Ct	23,11	No Ct	25,78	No Ct	27,7	No Ct	24,02	
Camp Stuhlprobe 104	No Ct	24,6	No Ct	25,88	No Ct	28,97	No Ct	25,54	
Camp Stuhlprobe 105	No Ct	28,71	No Ct	28,91	No Ct	30,93	No Ct	25,5	
Camp Stuhlprobe 106	No Ct	No Ct	No Ct	27,39	No Ct	No Ct	No Ct	24,2	
Camp Stuhlprobe 107	No Ct	26,37	No Ct	27,1	No Ct	29,78	No Ct	24,18	
Camp Stuhlprobe 108	No Ct	No Ct	No Ct	26,5	No Ct	No Ct	No Ct	24,51	
Camp Stuhlprobe 109	No Ct	27,31	No Ct	26,17	No Ct	33,81	No Ct	22,96	
Stuhlprobe 110	No Ct	No Ct	No Ct	26,72	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
Stuhlprobe 111	No Ct	No Ct	No Ct	26,27	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
Stuhlprobe 112	No Ct	35,3	No Ct	27,07	No Ct	No Ct	No Ct	36,71	
Stuhlprobe 113	No Ct	No Ct	No Ct	26,98	No Ct	No Ct	No Ct	24,29	
Stuhlprobe 114	No Ct	34,92	No Ct	28,02	No Ct	No Ct	No Ct	24,66	
Stuhlprobe 115	No Ct	32,18	No Ct	27,08	No Ct	No Ct	No Ct	25,65	
Stuhlprobe 116	No Ct	No Ct	No Ct	26,8	No Ct	No Ct	No Ct	24,86	
Stuhlprobe 117	No Ct	No Ct	No Ct	28,6	No Ct	No Ct	No Ct	24,32	
Stuhlprobe 118	No Ct	No Ct	No Ct	28,47	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
Stuhlprobe 119	No Ct	No Ct	No Ct	29,73	No Ct	No Ct	No Ct	24,86	
Stuhlprobe 120	No Ct	No Ct	No Ct	27,81	No Ct	No Ct	No Ct	24,38	
Stuhlprobe 121	No Ct	No Ct	No Ct	27,18	No Ct	No Ct	No Ct	25,98	
Stuhlprobe 122	No Ct	No Ct	No Ct	28,03	No Ct	No Ct	No Ct	24,91	
Stuhlprobe 123	No Ct	No Ct	No Ct	27,39	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
Stuhlprobe 124	38,37	No Ct	No Ct	29,17	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	unspezifisch (neg)
Stuhlprobe 125	No Ct	No Ct	No Ct	28,81	No Ct	No Ct	No Ct	25,88	
Stuhlprobe 126	No Ct	No Ct	No Ct	29,83	No Ct	No Ct	No Ct	25,61	
Stuhlprobe 127	No Ct	No Ct	No Ct	30,75	No Ct	No Ct	No Ct	25,09	
Stuhlprobe 128	No Ct	No Ct	No Ct	28,2	No Ct	No Ct	No Ct	24,94	
Stuhlprobe 129	No Ct	No Ct	No Ct	29,05	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
Stuhlprobe 130	No Ct	No Ct	No Ct	27,73	No Ct	No Ct	No Ct	25,32	
Stuhlprobe 131	No Ct	No Ct	No Ct	28,51	No Ct	No Ct	No Ct	27,29	
Stuhlprobe 132	No Ct	No Ct	No Ct	28,49	No Ct	No Ct	No Ct	24,29	
Stuhlprobe 133	No Ct	No Ct	No Ct	28,35	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
Stuhlprobe 134	No Ct	No Ct	No Ct	28,2	No Ct	No Ct	No Ct	24,55	
Stuhlprobe 135	No Ct	No Ct	No Ct	27,37	No Ct	No Ct	No Ct	24,47	
Stuhlprobe 136	No Ct	No Ct	No Ct	28,09	No Ct	No Ct	No Ct	24,64	
Stuhlprobe 137	No Ct	No Ct	No Ct	27,74	No Ct	No Ct	No Ct	24,84	
Stuhlprobe 138	No Ct	No Ct	No Ct	29,42	No Ct	No Ct	No Ct	24,6	
Stuhlprobe 139	No Ct	No Ct	No Ct	27,04	No Ct	No Ct	No Ct	24,53	
Stuhlprobe 140	30,68	29,27	No Ct	29,75	No Ct	31,3	No Ct	24,48	unspezifisch (neg)
Stuhlprobe 141	No Ct	No Ct	No Ct	29,16	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
Stuhlprobe 142	No Ct	No Ct	No Ct	29,18	No Ct	No Ct	No Ct	24,83	
Stuhlprobe 143	No Ct	No Ct	No Ct	29,61	No Ct	No Ct	No Ct	25,65	
Stuhlprobe 144	No Ct	No Ct	No Ct	28	No Ct	No Ct	No Ct	24,55	
Stuhlprobe 145	No Ct	No Ct	No Ct	28,02	No Ct	No Ct	No Ct	28,8	
Stuhlprobe 146	No Ct	No Ct	No Ct	27,71	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
Stuhlprobe 147	No Ct	No Ct	No Ct	27,6	No Ct	No Ct	No Ct	24,4	
Stuhlprobe 148	No Ct	No Ct	No Ct	27,77	No Ct	No Ct	No Ct	26,89	
Stuhlprobe 149	No Ct	No Ct	No Ct	25,8	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
Stuhlprobe 150	No Ct	No Ct	No Ct	27,45	No Ct	No Ct	No Ct	26,25	

Stuhlprobe 151	No Ct	No Ct	No Ct	29,3	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
Stuhlprobe 152	No Ct	No Ct	No Ct	27,84	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
Stuhlprobe 153	No Ct	No Ct	No Ct	28,17	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
Stuhlprobe 154	No Ct	No Ct	No Ct	27,4	No Ct	No Ct	No Ct	24,16	
Stuhlprobe 155	No Ct	No Ct	No Ct	30,69	No Ct	No Ct	No Ct	24,77	
Stuhlprobe 156	No Ct	No Ct	No Ct	26,84	No Ct	No Ct	No Ct	23,52	
Stuhlprobe 157	No Ct	No Ct	No Ct	28,25	No Ct	No Ct	No Ct	24,37	
Stuhlprobe 158	No Ct	No Ct	No Ct	26,81	No Ct	No Ct	No Ct	23,67	
Stuhlprobe 159	No Ct	No Ct	No Ct	26,49	No Ct	No Ct	No Ct	24,72	
Stuhlprobe 160	No Ct	No Ct	No Ct	26,96	No Ct	No Ct	No Ct	24,35	
Stuhlprobe 161	No Ct	No Ct	No Ct	29,55	No Ct	No Ct	No Ct	24,3	
Stuhlprobe 162	No Ct	No Ct	No Ct	29,89	No Ct	No Ct	No Ct	24,92	
Stuhlprobe 163	No Ct	No Ct	No Ct	27,24	No Ct	No Ct	No Ct	24,75	
Stuhlprobe 164	No Ct	No Ct	No Ct	29,95	No Ct	No Ct	No Ct	26,4	
Stuhlprobe 165	No Ct	No Ct	No Ct	26,74	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
Stuhlprobe 166	No Ct	No Ct	No Ct	28,99	No Ct	No Ct	No Ct	24,18	
Stuhlprobe 167	No Ct	No Ct	No Ct	27,38	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
Stuhlprobe 168	No Ct	No Ct	No Ct	25,25	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
Stuhlprobe 169	No Ct	No Ct	25,66	26,14	No Ct	No Ct	No Ct	24,97	
Stuhlprobe 170	No Ct	No Ct	No Ct	25,56	No Ct	No Ct	No Ct	24,15	
Stuhlprobe 171	No Ct	No Ct	No Ct	27,64	No Ct	22,84	No Ct	No Ct	Camp leicht ansteigend (neg=
Stuhlprobe 172	No Ct	No Ct	No Ct	26,34	No Ct	No Ct	No Ct	23,53	
Stuhlprobe 173	No Ct	No Ct	No Ct	28,32	No Ct	No Ct	No Ct	23,74	
Stuhlprobe 174	No Ct	No Ct	No Ct	28,43	No Ct	No Ct	No Ct	24,27	
Stuhlprobe 175	No Ct	No Ct	No Ct	26,95	No Ct	No Ct	No Ct	24,11	
Stuhlprobe 176	No Ct	No Ct	No Ct	28,12	No Ct	No Ct	No Ct	24,77	
Stuhlprobe 177	No Ct	No Ct	No Ct	28,78	No Ct	No Ct	No Ct	25	
Stuhlprobe 178	No Ct	No Ct	No Ct	27,92	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
Stuhlprobe 179	No Ct	No Ct	No Ct	25,08	No Ct	No Ct	No Ct	24,28	
Stuhlprobe 180	No Ct	No Ct	No Ct	27,67	No Ct	No Ct	No Ct	24,7	
Stuhlprobe 181	No Ct	No Ct	No Ct	27,7	No Ct	No Ct	No Ct	24,51	
Stuhlprobe 182	34,13	27,06	No Ct	27,32	34,27	28,55	No Ct	24,66	
182 Stuhl WDH	32,49	29	No Ct	28	No Ct	26,58	No Ct	26,69	neue Isolation
Stuhlprobe 183	No Ct	No Ct	No Ct	27,45	No Ct	No Ct	No Ct	32,87	
Stuhlprobe 184	No Ct	No Ct	No Ct	27,41	No Ct	No Ct	No Ct	25,81	
Stuhlprobe 185	No Ct	No Ct	No Ct	28,51	No Ct	No Ct	No Ct	24,46	
Stuhlprobe 186	No Ct	No Ct	No Ct	28,61	No Ct	No Ct	No Ct	24,57	
Stuhlprobe 187	No Ct	No Ct	No Ct	27,61	No Ct	No Ct	No Ct	31,15	
Stuhlprobe 188	No Ct	No Ct	No Ct	27,02	No Ct	No Ct	No Ct	24,65	
Stuhlprobe 189	No Ct	No Ct	No Ct	27,26	No Ct	No Ct	No Ct	24,75	
Stuhlprobe 190	No Ct	No Ct	No Ct	28,37	No Ct	No Ct	No Ct	24,97	
Stuhlprobe 191	No Ct	No Ct	No Ct	25,82	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
Stuhlprobe 192	No Ct	No Ct	No Ct	25,6	No Ct	No Ct	No Ct	24,82	
Stuhlprobe 193	No Ct	No Ct	No Ct	25,59	No Ct	No Ct	No Ct	27,82	
Yersinia 194	No Ct	No Ct	33,46	26,67	No Ct	No Ct	33,33	25,16	

<i>Maxwell</i>					<i>Kochen</i>				<i>Kommentar</i>
	Salm	Camp	Yers	IC	Salm	Camp	Yers	IC	
Well Name	Ct (dR)	Ct (dR)	Ct (dR)	Ct (dR)	Ct (dR)	Ct (dR)	Ct (dR)	Ct (dR)	
Bouillon 110	No Ct	No Ct	No Ct	28,04	No Ct	No Ct	No Ct	25,74	
Bouillon 111	No Ct	No Ct	No Ct	27,48	No Ct	No Ct	No Ct	25,44	
Bouillon 112	No Ct	No Ct	No Ct	27,63	No Ct	No Ct	No Ct	25,55	
Bouillon 113	No Ct	No Ct	No Ct	26,96	No Ct	No Ct	No Ct	25,63	
Bouillon 114	No Ct	No Ct	No Ct	28	No Ct	No Ct	No Ct	25,56	
Bouillon 115	No Ct	No Ct	No Ct	26,81	No Ct	No Ct	No Ct	25,3	
Bouillon 116	No Ct	No Ct	No Ct	26,25	No Ct	No Ct	No Ct	24,71	
Bouillon 117	No Ct	No Ct	No Ct	27,45	No Ct	No Ct	No Ct	25,03	
Bouillon 118	No Ct	No Ct	No Ct	27,73	No Ct	No Ct	No Ct	24,73	
Bouillon 119	No Ct	No Ct	No Ct	26,98	No Ct	No Ct	No Ct	25,52	
Bouillon 120	No Ct	No Ct	No Ct	27,83	No Ct	No Ct	No Ct	25,4	
Bouillon 121	No Ct	No Ct	No Ct	26,44	No Ct	No Ct	No Ct	25,32	
Bouillon 122	No Ct	No Ct	No Ct	27,78	No Ct	No Ct	No Ct	25,34	
Bouillon 123	No Ct	No Ct	No Ct	26,84	No Ct	No Ct	No Ct	25,46	
Bouillon 124	No Ct	No Ct	No Ct	27,78	No Ct	No Ct	No Ct	26,36	
Bouillon 125	No Ct	No Ct	No Ct	26,55	No Ct	No Ct	No Ct	24,79	
Bouillon 126	No Ct	No Ct	No Ct	27,01	No Ct	No Ct	No Ct	25,01	
Bouillon 127	No Ct	No Ct	No Ct	26,64	No Ct	No Ct	No Ct	24,83	
Bouillon 128	No Ct	No Ct	No Ct	27,57	No Ct	No Ct	No Ct	25,34	
Bouillon 129	No Ct	No Ct	No Ct	25,8	No Ct	No Ct	No Ct	26,75	
Bouillon 130	No Ct	No Ct	No Ct	27,68	No Ct	No Ct	No Ct	25,42	
Bouillon 131	No Ct	No Ct	No Ct	27,39	No Ct	No Ct	No Ct	25,83	
Bouillon 132	No Ct	No Ct	No Ct	27,28	No Ct	No Ct	No Ct	25,35	
Bouillon 133	No Ct	No Ct	No Ct	26,61	No Ct	No Ct	No Ct	24,44	
Bouillon 134	No Ct	No Ct	No Ct	27,83	No Ct	No Ct	No Ct	24,77	
Bouillon 135	No Ct	No Ct	No Ct	27,09	No Ct	No Ct	No Ct	25,09	
Bouillon 136	No Ct	No Ct	No Ct	26,88	No Ct	No Ct	No Ct	25,2	
Bouillon 137	No Ct	No Ct	No Ct	26,64	No Ct	No Ct	No Ct	25,27	
Bouillon 138	No Ct	No Ct	No Ct	27,02	No Ct	No Ct	No Ct	26,04	
Bouillon 139	No Ct	No Ct	No Ct	26,81	No Ct	No Ct	No Ct	24,77	
Bouillon 140	No Ct	29,24	No Ct	26,24	No Ct	28,14	No Ct	24,64	
Bouillon 141	No Ct	No Ct	No Ct	27,1	No Ct	No Ct	No Ct	24,35	
Bouillon 142	No Ct	No Ct	No Ct	26,87	No Ct	No Ct	No Ct	24,51	
Bouillon 143	No Ct	No Ct	No Ct	25,94	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	
Bouillon 144	No Ct	No Ct	No Ct	26,19	No Ct	No Ct	No Ct	24,27	
Bouillon 145	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	24,93	
Bouillon 146	No Ct	No Ct	No Ct	26	No Ct	No Ct	No Ct	24,84	
Bouillon 147	No Ct	No Ct	No Ct	25,69	No Ct	No Ct	No Ct	24,78	
Bouillon 148	No Ct	No Ct	No Ct	25,47	No Ct	No Ct	No Ct	24,52	
Bouillon 149	No Ct	No Ct	No Ct	25,52	No Ct	No Ct	No Ct	24,78	
Bouillon 150	No Ct	No Ct	No Ct	25,56	No Ct	No Ct	No Ct	24,83	

Bouillon 151	No Ct	No Ct	No Ct	28,94	No Ct	No Ct	No Ct	24,5	
Bouillon 152	No Ct	No Ct	No Ct	26,42	No Ct	No Ct	No Ct	24,99	
Bouillon 153	No Ct	No Ct	No Ct	24,71	No Ct	No Ct	No Ct	25,45	
Bouillon 154	No Ct	No Ct	No Ct	25,19	No Ct	No Ct	No Ct	24,75	
Bouillon 155	No Ct	No Ct	No Ct	25,31	No Ct	No Ct	No Ct	24,73	
Bouillon 156	No Ct	No Ct	No Ct	25,79	No Ct	No Ct	No Ct	24,7	
Bouillon 157	No Ct	No Ct	No Ct	26,18	No Ct	No Ct	No Ct	24,79	
Bouillon 158	No Ct	No Ct	No Ct	26,49	No Ct	No Ct	No Ct	24,59	
Bouillon 159	No Ct	No Ct	No Ct	25,85	No Ct	No Ct	No Ct	24,84	
Bouillon 160	No Ct	No Ct	No Ct	26,57	No Ct	No Ct	No Ct	25,07	
Bouillon 161	No Ct	No Ct	No Ct	25,97	No Ct	No Ct	No Ct	24,92	
Bouillon 162	No Ct	No Ct	No Ct	25,79	No Ct	No Ct	No Ct	24,91	
Bouillon 163	No Ct	No Ct	No Ct	25,26	No Ct	No Ct	No Ct	25,12	
Bouillon 164	No Ct	No Ct	No Ct	24,98	No Ct	No Ct	No Ct	24,57	
Bouillon 165	No Ct	No Ct	No Ct	26,45	No Ct	No Ct	No Ct	24,64	
Bouillon 166	No Ct	No Ct	No Ct	25,37	No Ct	No Ct	No Ct	24,84	
Bouillon 167	No Ct	No Ct	No Ct	26,36	No Ct	No Ct	No Ct	25,6	
Bouillon 168	No Ct	No Ct	No Ct	26,06	No Ct	No Ct	No Ct	24,6	
Bouillon 169	No Ct	No Ct	26,63	26,04	No Ct	No Ct	22,18	24,43	
Bouillon 170	No Ct	No Ct	No Ct	25,94	No Ct	No Ct	No Ct	24,81	
Bouillon 171	No Ct	No Ct	No Ct	26,25	No Ct	No Ct	No Ct	25,11	
Bouillon 172	No Ct	No Ct	No Ct	25,93	No Ct	No Ct	No Ct	25,01	
Bouillon 173	No Ct	No Ct	No Ct	25,21	No Ct	No Ct	No Ct	24,9	
Bouillon 174	No Ct	No Ct	No Ct	25,24	No Ct	No Ct	No Ct	24,7	
Bouillon 175	No Ct	No Ct	No Ct	26,91	No Ct	No Ct	No Ct	24,83	
Bouillon 176	No Ct	No Ct	No Ct	25,48	No Ct	No Ct	No Ct	24,6	
Bouillon 177	No Ct	No Ct	No Ct	25,78	No Ct	No Ct	No Ct	24,51	
Bouillon 178	No Ct	No Ct	No Ct	27,33	No Ct	No Ct	No Ct	25,24	
Bouillon 179	No Ct	No Ct	No Ct	25,09	No Ct	No Ct	No Ct	24,65	
Bouillon 180	No Ct	No Ct	No Ct	23,32	No Ct	No Ct	No Ct	24,59	
Bouillon 181	No Ct	No Ct	No Ct	26,72	No Ct	No Ct	No Ct	24,93	
Bouillon 182	36,85	28,92	No Ct	25,37	No Ct	29,34	No Ct	24,82	
182 Bouillon WDH	33,2	27,88	No Ct	24,97	No Ct	26,71	No Ct	24,35	neue Isolation
Bouillon 183	No Ct	No Ct	No Ct	25,78	No Ct	No Ct	No Ct	24,81	
Bouillon 184	No Ct	No Ct	No Ct	26,52	No Ct	No Ct	No Ct	24,87	
Bouillon 185	No Ct	No Ct	No Ct	26,5	No Ct	No Ct	No Ct	24,96	
Bouillon 186	No Ct	No Ct	No Ct	25,99	No Ct	No Ct	No Ct	24,84	
Bouillon 187	No Ct	No Ct	No Ct	26,74	No Ct	No Ct	No Ct	24,57	
Bouillon 188	No Ct	No Ct	No Ct	27,01	No Ct	No Ct	No Ct	25,53	
Bouillon 189	No Ct	No Ct	No Ct	26,84	No Ct	No Ct	No Ct	25,39	
Bouillon 190	No Ct	No Ct	No Ct	26,85	No Ct	No Ct	No Ct	25,46	
Bouillon 191	No Ct	No Ct	No Ct	25,43	No Ct	No Ct	No Ct	25,72	
Bouillon 192	No Ct	No Ct	No Ct	26,15	No Ct	No Ct	No Ct	25,82	
Bouillon 193	No Ct	No Ct	No Ct	25,72	No Ct	No Ct	No Ct	25,9	

Well Name					Wiederholung 1				Wiederholung 2				Mittelwert	Standardabweichung	Variationskoeffizient
	Salm	Camp	Yers	IC	Salm	Camp	Yers	IC	Salm	Camp	Yers	IC			
	Ct (dR)	Ct (dR)	Ct (dR)	Ct (dR)	Ct (dR)	Ct (dR)	Ct (dR)	Ct (dR)	Ct (dR)	Ct (dR)	Ct (dR)	Ct (dR)			
Ursprung Salm Kultur	19,01	No Ct	No Ct	25,72	19,33	No Ct	No Ct	27,04	18,81	No Ct	No Ct	26,86	19,05	0,26	1,38
1:10 Salm Kultur	22,62	No Ct	No Ct	25,81	22,54	No Ct	No Ct	26,17	22,64	No Ct	No Ct	26,57	22,60	0,05	0,23
1:100 Salm Kultur	25	No Ct	No Ct	25,98	25,16	No Ct	No Ct	26,89	24,91	No Ct	No Ct	26,46	25,02	0,13	0,51
1:1.000 Salm Kultur	29,19	No Ct	No Ct	25,86	28,9	No Ct	No Ct	26,71	29,05	No Ct	No Ct	26,33	29,05	0,15	0,50
1:10.000 Salm Kultur	32,45	No Ct	No Ct	25,87	32,59	No Ct	No Ct	26,3	32,35	No Ct	No Ct	26,3	32,46	0,12	0,37
1:100.000 Salm Kultur	34,64	No Ct	No Ct	25,53	34,15	No Ct	No Ct	26,42	36,2	No Ct	No Ct	26,19	35,00	1,07	3,06
1:1.000.000 Salm Kultur	No Ct	No Ct	No Ct	25,46	No Ct	No Ct	No Ct	25,48	No Ct	No Ct	No Ct	26,39			
Ursprung Salm Stuhl	21,11	No Ct	No Ct	25,99	21,95	No Ct	No Ct	28,14	21,74	No Ct	No Ct	27,91	21,60	0,44	2,02
1:10 Salm Stuhl	24,62	No Ct	No Ct	26,61	24,75	No Ct	No Ct	27,94	25,19	No Ct	No Ct	28,16	24,85	0,30	1,20
1:100 Salm Stuhl	28,01	No Ct	No Ct	27,11	28,19	No Ct	No Ct	28,3	28,08	No Ct	No Ct	28,24	28,09	0,09	0,32
1:1.000 Salm Stuhl	31,4	No Ct	No Ct	27,01	32,14	No Ct	No Ct	28,09	32,1	No Ct	No Ct	28,2	31,88	0,42	1,31
1:10.000 Salm Stuhl	34,67	No Ct	No Ct	26,58	34,51	No Ct	No Ct	27,61	36,73	No Ct	No Ct	27,8	35,30	1,24	3,51
1:100.000 Salm Stuhl	No Ct	No Ct	No Ct	26,94	No Ct	No Ct	No Ct	28,04	36,53	No Ct	No Ct	28,09			
1:1.000.000 Salm Stuhl	No Ct	No Ct	No Ct	26,56	No Ct	No Ct	No Ct	27,46	No Ct	No Ct	No Ct	27,48			
Ursprung Yers Kultur	No Ct	No Ct	25,06	27,52	No Ct	No Ct	24,45	27,42	No Ct	No Ct	23,66	26,89	24,39	0,70	2,88
1:10 Yers Kultur	No Ct	No Ct	26,53	25,7	No Ct	No Ct	26,31	25,87	No Ct	No Ct	26,23	25,71	26,36	0,16	0,59
1:100 Yers Kultur	No Ct	No Ct	29,74	25,71	No Ct	No Ct	29,36	25,59	No Ct	No Ct	29,14	25,06	29,41	0,30	1,03
1:1000 Yers Kultur	No Ct	No Ct	33,21	25,81	No Ct	No Ct	32,6	25,65	No Ct	No Ct	33,11	25,81	32,97	0,33	0,99
1:10.000 Yers Kultur	No Ct	No Ct	36,34	25,59	No Ct	No Ct	34,67	25,27	No Ct	No Ct	35,43	25,49	35,48	0,84	2,36
1:100.000 Yers Kultur	No Ct	No Ct	No Ct	25,47	No Ct	No Ct	No Ct	25,42	No Ct	No Ct	No Ct	25,41			
1:1.000.000 Yers Kultur	No Ct	No Ct	No Ct	25,88	No Ct	No Ct	No Ct	25,65	No Ct	No Ct	No Ct	25,8			
Ursprung Yers Stuhl	No Ct	No Ct	23,7	27,3	No Ct	No Ct	23,23	27,53	No Ct	No Ct	23,16	27,4	23,36	0,29	1,26
1:10 Yers Stuhl	No Ct	No Ct	27,62	27,55	No Ct	No Ct	27,83	28,72	No Ct	No Ct	27,96	28,54	27,80	0,17	0,62
1:100 Yers Stuhl	No Ct	No Ct	31,57	27,6	No Ct	No Ct	31,19	28,31	No Ct	No Ct	31,35	28,07	31,37	0,19	0,61
1:1.000 Yers Stuhl	No Ct	No Ct	35,67	28,01	No Ct	No Ct	34,77	28,64	No Ct	No Ct	35,76	28,54	35,40	0,55	1,55
1:10.000 Yers Stuhl	No Ct	No Ct	No Ct	28,06	No Ct	No Ct	39,16	28,71	No Ct	No Ct	38,15	28,85			
1:100.000 Yers Stuhl	No Ct	No Ct	No Ct	27,24	No Ct	No Ct	38,54	27,71	No Ct	No Ct	No Ct	27,9			
1:1.000.000 Yers Stuhl	No Ct	No Ct	No Ct	27,89	No Ct	No Ct	No Ct	28,32	No Ct	No Ct	No Ct	28,4			
Ursprung Camp Kultur	No Ct	17,85	No Ct	26,25	No Ct	16,79	No Ct	27,1	No Ct	16,77	No Ct	26,99	17,14	0,62	3,61
1:10 Camp Kultur	No Ct	22,15	No Ct	26,07	No Ct	20,74	No Ct	26,14	No Ct	21,49	No Ct	26,61	21,46	0,71	3,29
1:100 Camp Kultur	No Ct	25,67	No Ct	26,05	No Ct	24,32	No Ct	26,19	No Ct	24,62	No Ct	26,21	24,87	0,71	2,85
1:1000 Camp Kultur	No Ct	27,26	No Ct	25,7	No Ct	26,32	No Ct	25,94	No Ct	26,18	No Ct	25,76	26,59	0,59	2,21
1:10.000 Camp Kultur	No Ct	30,34	No Ct	25,82	No Ct	28,92	No Ct	25,94	No Ct	28,71	No Ct	25,88	29,32	0,89	3,02
1:100.000 Camp Kultur	No Ct	32,7	No Ct	25,86	No Ct	31,83	No Ct	26,19	No Ct	31,77	No Ct	26,03	32,10	0,52	1,62
1:1.000.000 Camp Kultur	No Ct	37,83	No Ct	26,18	No Ct	36,62	No Ct	26,33	No Ct	36,76	No Ct	26,07	37,07	0,66	1,79
Ursprung Camp Stuhl	No Ct	17,74	No Ct	27,76	No Ct	16,86	No Ct	28,13	No Ct	17,67	No Ct	28,62	17,42	0,49	2,81
1:10 Camp Stuhl	No Ct	21,83	No Ct	26,52	No Ct	20,92	No Ct	26,75	No Ct	21,29	No Ct	26,98	21,35	0,46	2,14
1:100 Camp Stuhl	No Ct	24,92	No Ct	26,55	No Ct	24,23	No Ct	26,6	No Ct	24,16	No Ct	26,55	24,44	0,42	1,72
1:1.000 Camp Stuhl	No Ct	28,43	No Ct	26,78	No Ct	27,54	No Ct	26,93	No Ct	27,91	No Ct	27,07	27,96	0,45	1,60
1:10.000 Camp Stuhl	No Ct	31,57	No Ct	26,69	No Ct	30,24	No Ct	26,81	No Ct	30,86	No Ct	26,93	30,89	0,67	2,15
1:100.000 Camp Stuhl	No Ct	34,53	No Ct	26,82	No Ct	33,02	No Ct	26,83	No Ct	33,31	No Ct	26,95	33,62	0,80	2,38
1:1.000.000 Camp Stuhl	No Ct	No Ct	No Ct	27,37	No Ct	No Ct	No Ct	27,13	No Ct	35,55	No Ct	26,98			