

Inhaltsverzeichnis

1 Abkürzungsverzeichnis, Abbildungsverzeichnis, Tabellenverzeichnis.....13

1.1 Abkürzungsverzeichnis..... 13

1.2 Abbildungsverzeichnis 14

1.3 Tabellenverzeichnis 16

2 Einleitung17

3 Literatur19

3.1 Mikrobiologischer Status von Fischen und Fischerzeugnissen..... 19

3.1.1 Humanpathogene Mikroorganismen in Fischen und Fischerzeugnissen20

3.2 *Vibrio*..... 20

3.2.1 Eigenschaften der Vibrionen..... 20

3.2.2 Taxonomie der Vibrionen..... 21

3.2.3 Verbreitung von Vibrionen 21

3.2.4 *Vibrio* in marinen Tieren..... 22

3.2.5 *Vibrio*-Infektionen bei Menschen 22

3.2.6 *Vibrio vulnificus*..... 23

3.2.7 *Vibrio parahaemolyticus* 24

3.2.8 *Vibrio cholerae*..... 25

3.2.9 *Vibrio mimicus* 26

3.2.10 *Vibrio metoecus*..... 27

3.3 Rechtliche Situation für Lebensmittel, die pathogene *Vibrio* enthalten können
und deren Analyse im Labor 29

3.4 Nachweismethoden von *Vibrio*..... 32

3.4.1 Kulturelle Nachweis-Methoden von *Vibrio* 32

3.4.2 Molekularbiologische Nachweis-Methoden 34

3.4.3 Spektroskopische Nachweis-Methoden..... 37

3.5 Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Massspektrometry (MALDI-TOF MS)	38
3.5.1 Funktionsweise eines MALDI-TOF Massenspektrometers	39
3.5.1.1 Probenaufgabe	39
3.5.1.2 Ionisierung	40
3.5.1.3 Massentrennung	40
3.5.1.4 Detektion	41
3.5.1.5 Spektrendarstellung	41
3.5.1.6 Massenkalibrierung	42
3.5.2 Analyse von Bakterien mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie	43
3.5.2.1 Softwares zur Ergebnisinterpretation von Bakterien	44
3.5.2.2 Mögliche Lösungen zur Differenzierung von Bakterien mit ähnlichen Spektrenprofilen	45
3.5.2.3 Differenzierung verschiedener <i>Vibrio</i> spp. mittels MALDI-TOF MS	46
4 Eigene Untersuchungen	49
4.1 Material	49
4.1.1 Probenmaterial	49
4.1.2 Untersuchungsmaterial	49
4.1.2.1 Anzuchtmedien	49
4.1.2.2 Geräte	49
4.1.2.3 Verbrauchsmaterialien	50
4.1.2.4 Hilfsmittel	50
4.1.2.5 Reagenzien	50
4.1.2.6 Softwares	51
4.1.2.7 Datenbanken	55

4.2 Methoden	55
4.2.1 Konservierung der <i>Vibrio</i> -Stämme	55
4.2.2 Anzucht der <i>Vibrio</i> -Stämme	56
4.2.3 Probenvorbereitung	56
4.2.3.1 Proteinextraktion der <i>Vibrio</i> -Stämme	56
4.2.3.2 Direkttransfer	57
4.2.4 Kalibrierlösung IVD BTS	58
4.2.5 Spektrenerstellung	58
4.2.5.1 Messung in flexControl	58
4.2.6 Spektrenanalyse in flexAnalysis	59
4.2.7 Versuchsablauf für die Auswahl von potentiell speziesdiskriminierenden Peaks der Spezies <i>V. cholerae</i> und <i>V. mimicus</i>	60
4.2.7.1 Vorauswahl von potentiell speziesdiskriminierenden Peaks an 20 <i>Vibriostämmen</i>	61
4.2.7.2 Festlegung von Auswahlkriterien potentiell speziesdiskriminierender Peaks	62
4.2.7.3 Überprüfung zur Bestätigung der potentiell diskriminierenden Peaks anhand weiterer 42 Stämme	62
4.2.7.4 Validierung der Spezies <i>V. cholerae</i> und <i>V. mimicus</i> anhand der Isolate VI 79 bis VI 130	63
4.2.8 Weitere Analysen in MALDI Biotyper OC	66
4.2.8.1 Gelview in MALDI Biotyper OC	66
4.2.8.2 Dendrogramm in MALDI Biotyper OC	66
4.2.8.3 Principal Component Analysis Cluster (PCA Cluster) in MALDI Biotyper OC	66
4.2.8.4 Erstellen reduzierter Massenspektren in MALDI Biotyper OC	66
4.2.9 Weitere Analysen in ClinPro Tools	67
4.2.9.1 Beurteilung der Spektren in ClinPro Tools	67
4.2.9.2 Gelview in ClinPro Tools	67
4.2.9.3 Dendrogramm in ClinPro Tools	68
4.2.9.4 PCA Cluster in ClinPro Tools	68
4.2.9.5 ROC Curve in ClinPro Tools	68

4.2.9.6 Model Generation in ClinPro Tools	69
4.2.10 Untersuchungen mit der Direkttransfermethode	69
4.2.11 Untersuchungen an elf Isolaten aus Badegewässern mit vorberichtlich unterschiedlichen Ergebnissen	69
4.2.12 Überprüfung der verwendeten Isolate mit VibrioBase	70
5 Ergebnisse	71
5.1 Erkenntnisse während der Anzucht und Extraktion	71
5.2 Ergebnisse der Vorauswahl von potentiell speziesdiskriminierenden Peaks an 20 <i>Vibrio</i> -Isolaten	72
5.2.1 Auswertung der <i>Vibrio</i> -Isolate in flexAnalysis	72
5.2.2 Ergebnisse aus der Messung der ersten zehn <i>Vibrio</i> -Isolate	73
5.2.3 Ergebnisse aus der Messung weiterer zehn <i>Vibrio</i> -Isolate	74
5.2.4 Weitere Verarbeitung der erstellten Peaktabellen	74
5.3 Ergebnisse der Untersuchung von weiteren 42 <i>Vibrio</i> -Isolaten	76
5.4 Validierung der potentiell speziesdiskriminierenden Peaks für <i>V. cholerae</i> und <i>V. mimicus</i> anhand aller bislang untersuchten Isolate	77
5.4.1 Validierung des Parameters <i>V. cholerae</i>	78
5.4.2 Validierung des Parameters <i>V. mimicus</i>	78
5.4.3 Bewertung der Validierungsergebnisse	79
5.5 Eignung von Tools der Software MALDI Biotyper OC für die Analyse/Differenzierung der Spezies <i>V. cholerae</i> und <i>V. mimicus</i>	80
5.5.1 Gelview-Ergebnisse in MALDI Biotyper OC	80
5.5.2 Dendrogramm-Ergebnisse in MALDI Biotyper OC	81
5.5.3 PCA Cluster-Ergebnisse in MALDI Biotyper OC	82
5.5.4 Reduzierte MSP-Ergebnisse in MALDI Biotyper OC	84
5.6 Eignung von Tools der Software ClinPro Tools für die Differenzierung der Spezies <i>V. cholerae</i> und <i>V. mimicus</i>	85
5.6.1 Beurteilung der Spektren und Peaks in ClinPro Tools	85
5.6.2 Gelview-Ergebnisse in ClinPro Tools	86
5.6.3 Dendrogramm in ClinPro Tools	88
5.6.4 PCA Cluster in ClinPro Tools	89

5.6.5 ROC Curve in ClinPro Tools	90
5.6.6 Model Generation in ClinPro Tools	91
5.7 Eignung der Direkttransfermethode	91
5.7.1 Auswertung der Direkttransferspektren in der Software flexAnalysis	92
5.7.2 Direkttransfer und Tools der Software MALDI Biotyper OC	92
5.7.2.1 Gelview der Direkttransferspektren in MALDI Biotyper OC	92
5.7.2.2 Dendrogramm der Direkttransferspektren in MALDI Biotyper OC	92
5.7.2.3 PCA Cluster der Direkttransferspektren in MALDI Biotyper OC	93
5.7.2.4 Reduzierte MSP der Direkttransferspektren in MALDI Biotyper OC	93
5.7.3 Direkttransfer und Tools der Software ClinPro Tools	93
5.7.3.1 Beurteilung der Direkttransferspektren in ClinPro Tools	93
5.7.3.2 Gelview der Direkttransferspektren in ClinPro Tools	94
5.7.3.3 Dendrogramm der Direkttransferspektren in ClinPro Tools	94
5.7.3.4 PCA der Direkttransferspektren in ClinPro Tools	95
5.7.3.5 ROC Curve der Direkttransferspektren in ClinPro Tools	95
5.7.3.6 Überprüfung der Direkttransferspektren mit dem selbst generierten Model in ClinPro Tools	97
5.8 Abgleich der Isolate mit der VibrioBase Datenbank	97
5.8.1 Ergebnisse aus der Direkttransfer-Methode mit der VibrioBase Datenbank	98
5.9 Ergebnisse der elf Vibrio-Isolate aus Badegewässern	99
5.9.1 Spektrenbeurteilung der Badegewässer-Isolate in flexAnalysis	99
5.9.2 Beurteilung der Badegewässer-Isolate in MALDI Biotyper OC	99
5.9.2.1 Gelview der Badegewässer-Isolate in MALDI Biotyper OC	99
5.9.2.2 Dendrogramm der Badegewässer-Isolate in MALDI Biotyper OC	100
5.9.2.3 PCA der Badegewässer-Isolate in MALDI Biotyper OC	101
5.9.2.4 Abgleich der Badegewässer-Isolate mit reduzierten MSP in MALDI Biotyper OC	101
5.9.3 Beurteilung der Badegewässer-Isolate in ClinPro Tools	101
5.9.3.1 Gelview der Badegewässer-Isolate in ClinPro Tools	101
5.9.3.2 Dendrogramm der Badegewässer-Isolate in ClinPro Tools	101
5.9.3.3 PCA der Badegewässer-Isolate in ClinPro Tools	102

5.9.3.4 ROC Curve in ClinPro Tools verzichtet	102
5.9.3.5 Überprüfung der Badegewässer-Isolate mit dem selbst generierten Model in ClinPro Tools	102
5.9.4 Überprüfung der Badegewässer-Isolate mit und ohne VibrioBase	102
5.9.5 Abschließende Beurteilung der elf Isolate aus Badegewässern	103
6 Diskussion.....	105
6.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse	105
6.2 Diskussion der Aufarbeitungsmethoden	105
6.2.1 Anzucht und Aufbereitung der Isolate	105
6.2.2 Spektrenerstellung in flexControl	107
6.3 Spektrenanalyse und Auswahl von potentiell speziesdiskriminierenden Peaks für die Spezies <i>V. cholerae</i> und <i>V. mimicus</i> mit flexAnalysis	107
6.3.1 Vergleich der Ameisensäure-Extraktions-Spektren mit den Direkttransfer- Spektren	109
6.3.2 Validierung der Parameter <i>V. cholerae</i> und <i>V. mimicus</i>	110
6.4 Diskussion MALDI Biotyper OC und erweiterte Datenbanken	111
6.4.1 Diskussion der Tools in MALDI Biotyper OC	111
6.4.1.1 Gelview	111
6.4.1.2 Dendrogramm	111
6.4.1.3 PCA Cluster	112
6.4.1.4 Reduzierte MSP	112
6.4.2 Diskussion der Verwendung zusätzlicher Datenbanken in MALDI Biotyper OC	113
6.5 Diskussion der Tools in ClinPro Tools	115
6.5.1 Beurteilung der Spektren in ClinPro Tools	115
6.5.2 Gelview in ClinPro Tools	116
6.5.3 Dendrogramm	117
6.5.4 PCA	117
6.5.5 ROC	118
6.5.6 Model Generation	118
6.6 Diskussion der untersuchten <i>Vibrio</i> -Isolate aus Badegewässern	119

6.7 Ausblick für die künftige Differenzierung fraglicher <i>V. cholerae-mimicus</i> -Isolate und für die künftige Ermittlung potentieller spezifischer Peaks anderer Bakterienspezies ...	120
6.7.1 Künftiger Arbeitsablauf im Routinelabor der Lebensmitteluntersuchung	120
6.7.2 Auffinden potentiell diskriminierender Peaks schwer zu differenzierender Bakterienspezies	120
7 Zusammenfassung	123
8 Summary	125
9 Anhänge	127
10 Bibliographie.....	137
11 Danksagung	153