

Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 82 (1991)

Heft: 6

Artikel: Plasmidprofile zur Identifizierung einzelner Stämme von Mikroorganismen aus Lebensmitteln = Plasmid profiling for the identification of individual strains of microorganisms from foods

Autor: Teuber, M. / Sievers, M.

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-982429>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 02.02.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

M. Teuber und *M. Sievers*, Laboratorium für Lebensmittelmikrobiologie, ETH, Zürich

Plasmidprofile zur Identifizierung einzelner Stämme von Mikroorganismen aus Lebensmitteln

Plasmid Profiling for the Identification of Individual Strains of Microorganisms from Foods

Einleitung

In der Lebensmittelmikrobiologie ist es von grosser Bedeutung, die Herkunft und Identität von Mikroorganismen zu kennen.

Bei der Herstellung fermentierter Lebensmittel mit Starterkulturen brauchen wir Methoden um festzustellen, ob und welche Komponenten der zugesetzten Kultur sich im Produkt vermehren und für die gewünschten biochemischen Leistungen verantwortlich sind. Beim Vorhandensein pathogener oder unerwünschter saprophytärer Bakterien in Lebensmitteln müssen deren Quelle und der Ort der Kontamination während der Herstellung identifiziert werden.

Da wir wissen, dass es innerhalb einer Bakterienart viele Hundert, vielleicht sogar Tausende verschiedene Stämme geben kann, müssen im Sinn des oben Gesagten einzelne individuelle Stämme eindeutig erkennbar sein. Für die Belange der Praxis ist es dabei nicht immer notwendig, auch eine korrekte taxonomische Einordnung vorzunehmen.

Die vorliegende Arbeit prüft die Eignung von Plasmid-Profilen für die lebensmittelmikrobiologische Diagnostik anhand eigener Erfahrungen und Berichten der Literatur.

Definitionen/Glossar

Stamm: Ein Mikroorganismen-Stamm ist ein Klon einer Mikroorganismenart, der sich durch mindestens ein phänotypisches oder genotypisches Merkmal experimentell von anderen Klonen derselben Art unterscheiden lässt.

Plasmid: Plasmide sind extrachromosomale, autonom replizierende, genetische Elemente, die aus doppelsträngiger zirkulärer DNA bestehen (Grösse ca. 1 bis 100 kbp, gelegentlich auch einige Hundert kbp). In Bakterienarten sind sie häufig anzutreffen (siehe Tabelle 1). In Hefen sind sie eher selten und können dort auch linear gebaut sein.

Plasmid-Profil: Plasmid-Profile sind DNA-Muster, die nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fraktion von Zell-Lysaten in Agarosegelen erhalten werden. Der Logarithmus der Wanderungsstrecke eventuell vorhandener Plasmide in der «ccc-Form» im elektrischen Feld ist dabei in etwa umgekehrt proportional dem Logarithmus der Plasmidgrösse. Nach der Auftrennung werden die DNA-Banden durch Anfärben mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbonid im UV-Licht sichtbar und können so photographisch dokumentiert werden.

Kryptisches Plasmid: Funktion unbekannt, kann spontan oder durch physikalischen bzw. chemischen Stress (höhere Temperatur, UV-Strahlung, Mitomycin C, Acridinfarbstoffe) aus den Zellen eliminiert werden, ohne dass unter Laborwachstumsbedingungen ein phänotypischer Defekt nachweisbar ist.

ccc-Form: superhelikal verknäuelte Form eines Plasmids mit intakter Doppelstrang DNA (covalently closed circular DNA).

oc-Form: offen zirkuläre Form (open circular), entsteht durch Einzelstrangbruch, z. B. durch UV-Anteile des Tageslichtes, durch übermässige Scherkräfte oder durch längere Wärmeeinwirkung, läuft in der Elektrophorese langsamer als ccc-Form.

lineare Form: entsteht bei Bakterien aus ccc- oder oc-Form durch Bruch beider DNA-Stränge an einer Stelle.

kbp = «kilobasenpaar»; 1 Megadaltona (Md) entspricht etwa 1,6 kbp

Funktion von Plasmiden in Bakterien (62, 63)

Plasmide replizieren unabhängig vom Chromosom. Sie können in vielen Kopien (> 10–20) in einer Zelle vorliegen («high copy number plasmids») oder nur in einem oder zwei Exemplaren (low copy number plasmids). Verschiedene Plasmide können miteinander kompatibel oder inkompatibel sein, d.h. gleichzeitig in einer Zelle vorkommen oder sich gegenseitig ausschliessen. Plasmide sind für viele Bakterien Gen-Lokomotiven, d.h. sie können fremde Gene inkorporieren, replizieren und an andere Bakterien selbst über Art- und Gattungsgrenzen hinaus durch Konjugation weitergeben. Sie sind ein wichtiges Mittel zur Kommunikation auf zellulärer und molekularer Ebene. Zum Teil ist es bereits gelungen, Gene und DNA-Sequenzen, die für die genannten Funktionen verantwortlich sind, zu identifizieren und zu analysieren.

1. Replikasen und an der Replikation beteiligte weitere Proteine (rep. A, rep. B usw.).
2. Gene für den eigenen konjugativen Transfer (tra-Gene, z.B. Strukturgene für Pili bei *E. coli*, clumping factor bei *Lactococcus lactis*).

3. Gene für die Mobilisierung anderer Plasmide, die keine eigenen tra-Gene besitzen (mob-Gene).
4. DNA-Sequenzen, die den Einbau fremder Gene durch Rekombination ermöglichen: IS-Elemente (Insertionselemente) und Transposons.

Dass Plasmide tatsächlich als Genlokomotiven funktionieren, wird deutlich, wenn man sich die auf Plasmiden kodierten Funktionen ansieht. Vor allem die heute in vielen Gram-positiven und -negativen Bakterien in allen Biotopen verbreiteten Antibiotikaresistenzen beweisen die aktive Beteiligung konjugativer Plasmide beim Ausbreitungsprozess dieser Resistenzen nach Einführung und Anwendung von Antibiotika in der Human-, Tier- und Phytomedizin sowie der Tierfütterung. Aber auch metabolische Enzyme und andere biotechnologisch interessante Funktionen sind plasmidkodiert und erschliessen den plasmidbesitzenden Bakterien neue Lebensräume (siehe Tabelle 1). Die für die Herstellung vieler fermentierter Milchprodukte notwendigen Laktokokken haben z.B. fast alle technologisch wichtige Funktionen auf Plasmiden, was den Übergang vom Biotop Pflanze in den Biotop Milch ermöglichte.

Für die Lebensmittelhygiene hochinteressante Funktionen sind die plasmidgebundenen Synthesen von Pathogenitätsfaktoren wie das hitzelabile Toxin (HLT) oder das Hämolysin bestimmter *E. coli*-Stämme. Solche Plasmide können bereits durch spezifische Gensonden und DNA-DNA-Hybridisierung detektiert werden.

Plasmide und Plasmidprofile als taxonomische Merkmale

Voraussetzung für einen Einsatz der Plasmid-Profil-Technik für taxonomische Fragestellungen ist:

1. Vorhandensein von 1 oder mehreren, möglichst unterschiedlichen Plasmiden in möglichst allen Stämmen einer Bakterienart
2. Vorhandensein einer geeigneten Routinemethode zur schnellen und einfachen Analyse möglichst vieler Proben in einem Arbeitsgang.

Tabelle 1 gibt einen Überblick über das Vorkommen von Plasmiden in den für Lebensmittelfermentationen genutzten Bakteriengattungen und -arten. Während in den Gattungen *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Zymomonas*, *Lactococcus* und *Pediococcus* bei fast allen untersuchten Stämmen Plasmide gefunden wurden, ist dies für die restlichen aufgeführten Gattungen und Arten nicht der Fall. Es ist jedoch durchaus möglich, dass einige Stämme und Arten deswegen negativ erscheinen, weil die angewandte Extraktionsmethode noch nicht optimal ist. Gerade Gram-positive Bakterienarten sind oft schwer mit Lysozym allein zu lysieren. Eine verlängerte Inkubationszeit kann zu einer Zerstörung eventuell vorhandener Plasmide durch Nukleasen der Bakterien während der Lysisprozedur führen. Spezifische Plasmidpräparationsmethoden sind in Tabelle 3 kurz aufgeführt.

Um Plasmidprofile als taxonomisch nützliches Merkmal für verschiedene Stämme einer Bakterienart zu etablieren, bedarf es der Analyse möglichst vieler Stämme

Table 1. Plasmide in Bakterien-Gattungen, die für die Fermentation von Lebensmitteln als Starterkulturen verwendet werden

Gattung	durchschnittl. Zahl verschiedener Plasmide pro Stamm	Grösse der Plasmide (kbp)	Funktion	in allen untersuchten Stämmen	Referenz
<i>Acetobacter</i>	2 bis 6	2 bis 70	kryptisch Zellulose-Synthese	ja	(1)
<i>Gluconobacter</i>	0 bis 5	2,5 bis > 30	kryptisch	ja	(2)
<i>Zymomonas</i>	4	14,5 bis 34	kryptisch	ja	(3)
<i>Brevibacterium</i>	0 bis 1	4,3	kryptisch	nein	(4)
<i>Lactobacillus</i>	0 bis 4	2 bis 70	Antibiotika-resistenz, Maltose-Metabolismus	nein	(5, 12) (5)
<i>Lactococcus</i>	1 bis 10	2 bis 100	1. Lactose- und Citrat-Metabolismus 2. Protease 3. Bacteriocinbildung und -immunität 4. Schleimbildung 5. Bakteriophagenresistenz 6. kryptisch	ja	(6, 27)
<i>Leuconostoc</i>	0 bis 4	3 bis 80	kryptisch	nein	(7)
<i>Micrococcus</i>	0 bis 1	10	Cholesterol-Hydroxylase, Antibiotika-resistenz	nein	(8)
<i>Pediococcus</i>	3 bis 6	4,5 bis 35	Bacteriocin, Saccharosehydrolase, α -Galactosidase	ja	(9)
<i>Propriobacterium</i>	1 bis 2	4,4 bis 110	kryptisch	?	(10)
<i>Streptococcus</i>	0 bis 4	2,2 bis 15	kryptisch	nein	(11)

aus gleichen und verschiedenen Biotopen. Eine entsprechende Vielfalt ist für eine Reihe von Stämmen nachgewiesen, die folgende Gattungen und deren Arten einschliessen: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Zymomonas*, *Lactobacillus* (teilweise), *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Campylobacter*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Pasteurella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Yersinia* und *Zymomonas* (siehe Tabelle 1 und 2). Wenn, wie in einigen anderen Arten, die in Tabelle 1 und 2 genannt sind, nicht alle Stämme Plasmide tragen, lohnt es doch, im konkreten Fall einer epidemiologischen Fallstudie die isolierten Stämme auf das Vorhandensein von Plasmiden zu testen. Wenn 2 Plasmide aus verschiedenen Stämmen eine gleiche elektrophoretische Beweglichkeit aufweisen, kann deren Identität bzw. Verschiedenheit durch Restriktionsendonuklease-Fragmentlängen-Polymorphismus (RFLP) bzw. DNA-DNA-Hybridisierung weiter überprüft werden.

Konkrete Beispiele zum sinnvollen und erfolgreichen Einsatz der Plasmidprofiltechnologie in der Lebensmittelmikrobiologie

Die Plasmidprofiltechnik wurde in den letzten Jahren in unserem Labor für verschiedenste Fragen der mikrobiellen Ökologie in fermentierten Lebensmitteln eingesetzt, die im folgenden beispielhaft beschrieben werden sollen.

Acetobacter bei der industriellen Herstellung von Speiseessig (1, 13)

Die Herstellung von Essig aus Ethanol, Wein, Fruchtwein und vergorener Würze erfolgt durch spontane Fermentation in Submersfermentern oder in mit Buchenholzspänen gefüllten Spanbildnern. Die beteiligte Mikroflora ist nur schwer auf festen Nährböden züchtbar, so dass bis vor kurzem unbekannt war, welche Bakterien nun die wirklich aktiven Komponenten in industriellen Essigfermentern sind. Mit Hilfe der Plasmidprofiltechnik konnten wir zeigen, dass in Submersfermentern jeweils nur 1 Stamm dominiert, wobei die Plasmidprofile isolierter Einzelkolonien mit dem Plasmidprofil übereinstimmen, das aus der gesamten Fermentermikroflora durch Extraktion der isolierten Biomasse gewonnen werden konnte (siehe Abb. 1). Kolonien, die aus einem Spanbildner gezüchtet werden konnten, wiesen alle unterschiedliche Profile auf. Die Biomasse eines Spanbildners ergab kein distinktes Plasmidprofil, was für eine gemischte Vielstammkultur auch nicht zu erwarten ist. Distinkte Plasmidprofile in Submersfermentern erlauben Aussagen über die Stabilität solcher Kulturen in semikontinuierlich laufenden Fermentern, die über 2 Jahre bei unsteriler Belüftung und unsterilen Substraten im Industriebetrieb konstant blieben. Die individuelle Identifizierung einzelner Stämme aus industriellen Fermentern über ihr Plasmidprofil erlaubte einen mikrobiologisch eindeutigen Vergleich mit bisher beschriebenen Typ-Stämmen von *Acetobacter* und *Gluconobacter*. Das überraschende Ergebnis war, dass die Industrie mit bisher taxonomisch nicht beschriebenen Stämmen arbeitete, die der neuen Art *Acetobacter europaeus* zuzuordnen sind, die wir aufgrund von DNA-DNA-Hybridisierungen aufstellen konnten.

Tabelle 2. Beispiele für die erfolgreiche Anwendung der Plasmidprofiltechnik in der Lebensmittelmikrobiologie und -hygiene

Organismus	Bearbeitete bzw. gelöste Probleme	Referenz
<i>Acetobacter europaeus</i>	Herkunft und Zusammensetzung der Kulturen von Submersfermentern für die Essigherstellung	(1, 13)
<i>Aeromonas</i> sp.	Vorkommen und Funktion	(14)
<i>Bacillus cereus</i>	Epidemiologie von Lebensmittelvergiftungen durch Flüssigei	(15)
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Differenzierung von Stämmen aus verdorbenen Würsten	(49)
<i>Campylobacter</i> sp.	Vergleich von Arten aus Menschen, Schweinen und Schafen	(16)
<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>C. coli</i>	Differenzierung klinischer Isolate in Japan	(17)
<i>Clostridium perfringens</i>	Differenzierung von Stämmen aus Lebensmitteln	(18)
<i>Enterococcus</i> ssp.	Differenzierung von Stämmen aus Rohwurst und Käse	(19)
<i>Escherichia coli</i>	Erfolgreiche Differenzierung von intestinalen Stämmen eines menschlichen Individuums	(20)
<i>E. coli</i> 0157-H7	Systematisches Bestimmungsmerkmal	(21)
<i>E. coli</i> , enteropathogen	Differenzierung enteropathogener Stämme von Ausbrüchen und sporadischen Vorkommen	(22)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Zusammensetzung und Konstanz von Starterkulturen für die Fleischfermentation	(12)
<i>Listeria</i> ssp.	Epidemiologie verschiedener Arten in Rohmilch.	(23)
<i>Lactococcus lactis</i>	Zusammensetzung und Konstanz von Starterkulturen für Käse und Sauermilchprodukte	(24, 25, 26, 27)
<i>Mycobacterium</i> sp.	Epidemiologische Marker für klinische und Umgebungs isolate von <i>M. alvium</i> , <i>M. intracellulare</i> und <i>M. scrofulaceum</i>	(28)

Tabelle 2. Fortsetzung

Organismus	Bearbeitete bzw. gelöste Probleme	Referenz
<i>Pasteurella haemolytica</i>	Differenzierung von Isolaten aus Rindern	(29)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Epidemiologische Feinbestimmung und Verlaufsanalyse eines Ausbruches in einer Neugeborenenklinik	(30, 31)
<i>Salmonella</i> sp.	Charakterisierung von Isolaten in Milchfiltern aus Bauernhöfen	(32)
<i>Salmonella</i> sp.	Analyse eines Salmonellose-Ausbruches	(33)
<i>Salmonella</i> sp.	Vorgekochtes Roastbeef als Quelle und Vehikel einer Salmonellose	(35)
<i>S. enteritidis</i>	Unterteilung von Phagentypen	(34)
<i>S. typhimurium</i>	Epidemiologische Studien im Tessin	(36)
<i>S. typhimurium</i>	Epidemiologie der Infektion von Kälbern	(39)
<i>S. typhimurium</i>	Unterteilung von Phagentypen	(37)
<i>Shigella dysenteriae</i>	Epidemiologie eines Typ-I-Ausbruches	(41)
<i>Shigella sonnei</i>	Epidemiologische Kontrolle von Infektionen	(40)
<i>Shigella</i> sp.	Molekulare Epidemiologie	(38)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Endemisches Vorkommen in einer Hühnenschlachtere	(43)
<i>Staphylococcus</i> sp.	Ökologie der Staphylokokkenflora der menschlichen Haut	(42)
<i>S. aureus</i>	Veränderungen der Flora von Hühnchen während der Verarbeitung	(44)
<i>S. epidermis</i>	Differenzierung von infektiösen und nicht-infektiösen Stämmen	(45)
<i>S. aureus</i>	Charakterisierung von Mastitiserregern	(46)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Differenzierung von Stämmen humaner Herkunft	(47)
<i>Zymomonas mobilis</i>	Eindeutige Stammbeschreibung	(48)

Table 3. Routinemethoden zu Plasmidisolierung

Currier und Nester	(50)	präparative Isolierung von Plasmiden um 180 kbp. Zell-Lyse durch SDS, Pronase, CsCl-Gradient
Hansen und Olsen	(51)	analytische Isolierung von grossen Plasmiden in der Grössenordnung von 100–450 kbp bei Gram-negativen Bakterien
Eckhardt	(52)	Plasmidprofilanalyse von kleinen Plasmiden mit niedriger Kopienzahl und Plasmiden über 230 kbp. Zell-Lyse erfolgt im Probenrog des Agarosegels mit sofortiger Elektrophorese
Birnboim und Doly	(53)	schnelle Standardmethode für kleine und grosse Plasmide aus <i>E. coli</i> . Neutralisation und Proteinfällung durch Na-Acetat
Leblanc und Lee	(54)	Methode zum Screenen auf Plasmide in Streptokokken
Klein et al.	(55)	schnelle Aufarbeitungsmethode, entwickelt für die Untersuchung rekombinierter DNA in Klonen mit Plasmiden von 4,5–28 kbp
Holmes und Quigley	(56)	analytische Isolierung von kleinen Plasmiden in <i>E. coli</i> . Zell-Lyse durch Tritron X-100, Reinigungsschritt durch Aufkochen der Probe
Kado und Liu	(57)	analytische Isolierung von Plasmiden bei Gram-negativen Bakterien in der Grössenordnung von 4,0–530 kbp
Ish-Horowicz und Burke	(58)	Minipräparation zur Gewinnung von Plasmid-DNA mit hoher Kopienzahl für eine anschliessende Restriktionsverdauanalyse
Anderson and McKay	(59)	Standardmethode für die Isolierung von Plasmid DNA im 1,5 ml Massstab aus Laktokokken
Casey and Jimeno	(60)	Methode zur Isolierung von Plasmiden aus Lactobazillen

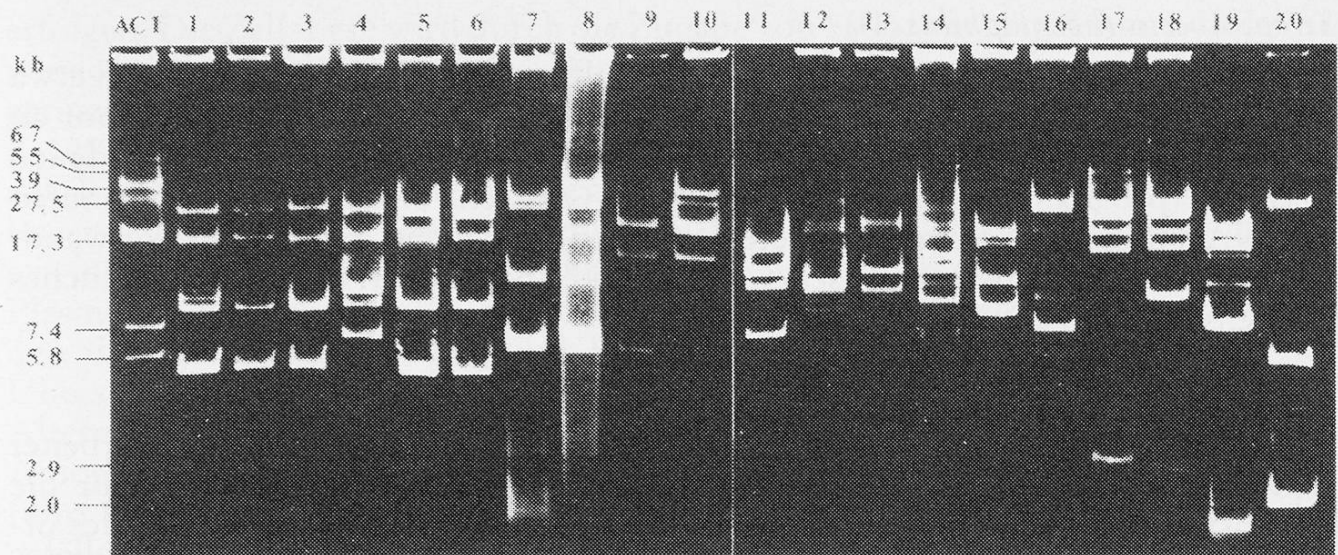


Abb. 1. Plasmidprofile verschiedener Essigsäurekulturen aus Submersfermentern der Bundesrepublik Deutschland. Die Plasmide von *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AC 1 wurden als Grössenreferenz mit aufgetrennt. Herkunft der Kulturen: (1) Bonn, (2) Düsseldorf, (3) Sommerhausen, (4) Bad Homburg, (5) Cuxhaven, (6, 7, 8) Hamburg/Stellingen, (9, 10) Kiel, (11) Hamburg-Altona, (12, 13, 14) Herongen, (15) Schweinfurt, (16) Straubing, (17) Wasserburg, (18) Pilsting, (19) Ebersbach, (20) Esslingen

Lactococcus (6, 24, 25)

Diese Bakterienart ist ein besonders schönes Beispiel für die Aussagekraft der Plasmidprofiltechnik, da diese Bakterien bis zu 10 und mehr verschiedene Plasmide enthalten können. Mit der Plasmidprofiltechnik kann heute ganz eindeutig die Zusammensetzung von Starterkulturen als Einstamm-, Mehrstamm- oder Vielstammkultur bestimmt werden (26, 27). Die grosse Zahl der vorhandenen Plasmide erlaubt auch Aussagen über die Stabilität der Plasmidprofile einzelner Stämme unter Produktions- und Lagerbedingungen. In der Regel sind auch Stammderivate, die durch Plasmidverluste oder Änderungen der Plasmidgrösse entstehen, noch gut über ihre Plasmidprofile als solche charakterisierbar.

Enterococcus und Staphylococcus

Enterokokken und Staphylokokken aus Rohmilchkäsen und fermentierten Rohwürsten konnten über ihre Plasmidprofile eindeutig unterschieden werden. Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit der Fachliteratur (42–46). Selbst der Missbrauch eines patentierten Stammes liess sich durch Vergleich der bei einer anerkannten Sammlung hinterlegten authentischen Stämme mit dem «gestohlenen» Stamm aus dem inkriminierten Produkt über das identische Plasmidprofil belegen (zusammen mit weiteren Methoden wie Phagenspektrum und Antibio-gramm).

Streptococcus thermophilus (11)

Diese für die Joghurt- und Hartkäseherstellung wichtige Art zeigt nur in etwa 20% der untersuchten Stämme Plasmide (11). Dies konnte in unserem Labor an umfangreichem Stamm-Material aus Europa bestätigt werden. Die gefundenen Plasmide (pro Stamm in der Regel nur eines in Grössen von 1,8 bis 7,4 kbp) konnten 4 DNA-Homologiegruppen zugeteilt werden, die nicht miteinander verwandt sind. Stämme mit einem identischen Plasmid können jedoch ein unterschiedliches Phagenspektrum aufweisen (64).

Enterobakterien

Obwohl diese puncto Plasmidprofile bisher nicht in unserem Labor bearbeitet wurden, soll auf einige wichtige Ergebnisse hingewiesen werden. Die für die Lebensmittelmikrobiologie und -hygiene bedeutenden Arten wurden alle des öfteren auf Plasmidprofile analysiert, deren Aussagekraft für epidemiologische Untersuchungen inzwischen unbestritten ist (siehe Tabelle 2). Hervorzuheben ist, dass nicht nur eine genügende, einen Einsatz der Methode begründende Anzahl von Plasmiden pro Stamm gefunden wird, sondern dass spezifische Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren plasmidkodiert sind und somit durch DNA-DNA-Hybridisierung mit geeigneten Gensonden in den Plasmidprofilen identifiziert werden können.

Die Analyse von 403 *Salmonella enteritidis*-Stämmen, die 1990 an 40 verschiedenen Orten in Deutschland isoliert wurden, ergab für 402 Stämme die Gegenwart von Plasmiden, die 13 verschiedenen Plasmid-Profil-Typen zugeordnet werden konnten. 86,8% dieser Stämme besaßen das 37 Md serotypspezifische Virulenzplasmid. 95,5% der Stämme vom Phagentyp 4 hatten dieses Plasmid. Stämme mit mehr als einem Plasmid stammten in erster Linie aus menschlichen Erkrankungsfällen und Umgebungsproben (65). Dieses Beispiel belegt, dass die Plasmid-Profil-Analyse inzwischen zum Routineinstrumentarium human- und veterinärmedizinischer Laboratorien gehört, da sie grundlegende epidemiologische Aussagen erlaubt.

Die wissenschaftliche Literatur ist voll von weiteren Beispielen für eine sinnvolle und erfolgreiche Anwendung (Tabelle 2), so dass man dieser Technik in Zukunft einen hohen Stellenwert zugestehen muss.

Ein Nachteil ist sicher, dass die Plasmidextraktionstechnik sehr stark von der zu bearbeitenden Bakterienart abhängt. Die häufigsten Methoden sind daher in Tabelle 3 und im nächsten Abschnitt behandelt.

Anmerkungen zur Methode der Plasmidprofilanalyse

Die Bakterienkultur wird in einem geeigneten Nährmedium unter optimalen Bedingungen vermehrt. Bei einigen Gram-positiven Bakterien wird DL-Threonin zur Destabilisierung der Zellwand zugegeben. Die Bakterienkultur wird in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet. 10^9 Zellen reichen in der Regel für eine Aufarbeitung aus. Die Extraktion kann in einem Eppendorfhütchen (2,0 ml)

erfolgen. Die Zell-Lyse wird durch die Zugabe von Lysozym eingeleitet. Die Zellen werden meist durch ein ionisches Detergenz wie SDS lysiert. Bei einigen Gram-negativen Bakterien kann eine Lyse durch nichtionische Detergenzien wie Triton X-100 erreicht werden. Der Ansatz (cleared lysate) wird durch Zugabe von NaOH auf pH 12,0–12,5 eingestellt, um offen ringförmige Plasmid-DNA (oc-Formen) und lineare chromosomale Fragmente durch Spaltung der Wasserstoffbrückenbindungen in Einzelstrangform zu überführen. Bei diesem Vorgang wird die superhelikale Plasmid-DNA (ccc-Formen) nicht angegriffen. Nach erfolgter Neutralisation werden die Einzelstrang-DNA- und Protein-SDS-Komplexe präzipitiert und der Überstand mit Phenol und Chloroform zur Entfernung der Proteine extrahiert. Alternativ kann auch eine Reinigung des «cleared lysate» über kommerzielle Anionensäulen erfolgen, falls die Lyse mit nichtionischen Detergenzien durchgeführt wurde. Die Plasmid-DNA wird mit Ethanol bzw. Isopropanol in der Kälte gefällt, die restliche RNA durch RNase verdaut und anschliessend in einem 0,65%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Um nach der alkalischen Denaturierung die Neubildung von oc- und linearen Plasmid-DNA-Formen zu vermeiden, sollte die weitere Aufarbeitung unter Kühlung im Eisbad und lichtgeschützt erfolgen. Die verschiedenen Tertiärstrukturen eines Plasmidmoleküls können im Agarosegel unterschieden werden (61). Zeitaufwand der Methode: je nach Zentrifugenkapazität können 18 bis 24 Proben innerhalb von 5 Stunden aufgearbeitet werden. Die Elektrophorese mit Ethidiumbromidfärbung dauert 3–4 Stunden. Tabelle 3 gibt eine Zusammenstellung einiger klassischer Routinemethoden.

Diskussion

Die Plasmid-Profil-Technik zur Charakterisierung einzelner Bakterienstämme aus Lebensmitteln ist für eine Reihe von Arten gut dokumentiert. Es sind dies taxonomische Gruppen, die sich durch das regelmässige Vorkommen von mehr als einer Plasmidart pro Stamm auszeichnen. Dazu gehören Produktionskeime wie *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Zymomonas*, einige Arten von Lactobacillen, *Lactococcus*, einige *Leuconostoc* und *Pediococcus* sowie Pathogene und Verderbniserreger wie *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* und *Staphylococcus*. Bei diesen Gattungen und Arten findet man in der modernen Literatur Plasmidprofile gleichrangig mit Phagenspektren, Antibiotogrammen und Membranproteinmustern angegeben (siehe Tabellen 1 und 2). Die Aussagekraft ist um so grösser, je mehr Plasmide pro Zelle vorkommen. In plasmidreichen Arten von *Lactococcus*, *Enterococcus* und *Staphylococcus* können durch Plasmidprofile allein hochsignifikante Zuordnungen und Aussagen über epidemiologische Zusammenhänge gewonnen werden. Schon klassisch zu nennen sind die Untersuchungen der Arbeitsgruppe von *Christine Dodd* (43, 44) über die Staphylokokkenflora von Hühnchen im Laufe der Schlachtung. Die Hühnchen kamen in die Schlachtereie mit einer sehr individuellen Flora. Die Schlachtkörper verliessen den Schlachtbetrieb mit einer Staphylokokkenflora, die sich in der Rupfmaschine etabliert hatte. Das belegt die Aussagekraft der

Methode für die Analyse kritischer Kontrollpunkte im Rahmen eines HACCP-Konzeptes.

Die Methoden zur Gewinnung von Plasmidprofilen sind sicher nicht soweit standardisiert und vereinfacht, dass sie in mikrobiologischen Routinelaboratorien von lebensmittelverarbeitenden Betrieben eingesetzt werden könnten. Sie sind jedoch für medizinische, veterinärmedizinische und lebensmittelmikrobiologische Forschungslaboratorien kein Problem. Sie werden mehr und mehr ein integraler Bestandteil mikrobiologisch-epidemiologischer Analysen der Lebensmittelmikrobiologie werden. Weitere methodische Fortschritte bis hin zur routinemässigen Anwendung auch in Laboratorien ausserhalb von medizinischen und Forschungsinstituten sind bis zum Jahr 2000 mit Sicherheit zu erwarten.

Zusammenfassung

Für Bakterienarten, die regelmässig in der Mehrzahl der Stämme ein oder mehrere Plasmide tragen, ist die Plasmid-Profil-Technik eine einfache und aussagekräftige Methode zur eindeutigen Charakterisierung einzelner Stämme. Diese Technik ist erfolgreich für epidemiologische Fragestellungen bei Starterkulturen (z. B. von *Acetobacter* und *Lactococcus*) oder bei unerwünschten Mikroorganismen (z. B. *Enterococcus*, *Staphylococcus* und Enterobakterien) aus Lebensmitteln eingesetzt worden. Für epidemiologische Fragen zur Kontrolle von HACCP-Konzepten wird sie weiter an Bedeutung gewinnen.

Résumé

La technique de la détermination des profils de plasmides est une méthode simple et efficace pour caractériser les bactéries dont les souches, contiennent au moins un ou plusieurs plasmides. Cette méthode est appliquée avec succès pour résoudre des problèmes épidémiologiques chez les ferments lactiques et les ferments acétiques (par ex. *Acetobacter*, *Lactococcus*) ou, chez les bactéries indésirables, présentes dans les aliments (par ex. *Enterococcus*, *Staphylococcus* et Enterobacteriaceae). Cette méthode, appliquée aux questions épidémiologiques pour le contrôle des concepts HACCP, gagnera en importance.

Summary

The plasmid-profiling technique is a simple and efficient method to characterize bacteria on a strain basis provided they contain at least one or more plasmids. The technique has been successfully applied for the solution of epidemiological problems in starter cultures (e.g. of *Acetobacter* or *Lactococcus*) or of undesirable bacteria from food including *Enterococcus*, *Staphylococcus* and enterobacteriaceae. The method will be of increasing importance regarding epidemiological investigation in the analysis of HACCP concepts.

Literatur

1. Teuber, M., Sievers, M. and Andresen, A.: Characterization of the microflora of high acid submerged vinegar fermenters by distinct plasmid profiles. *Biotechnology letters* **9**, 265–268 (1987).

2. Fukaya, M., Iwata, T., Entani, E., Masai, H., Uozumi, T. and Beppu, T.: Distribution and characterization of plasmids in acetic acid bacteria. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 1349–1355 (1985).
3. Browne, G. M., Skotnicki, M. L., Goodman, A. E. and Rogers, P. L.: Transformation of *Zymomonas mobilis* by a hybrid plasmid. *Plasmid* **12**, 211–214 (1984).
4. Santamaria, R., Gil, J. A., Mesas, J. M. and Martin, J. F.: Characterization of an endogenous plasmid and development of cloning vectors and a transformation system in *Brevibacterium lactofermentum*. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 2237–2246 (1984).
5. Liu, M. L., Kondo, J. K., Barnes, M. B. and Bartholomew, D. T.: Plasmid-linked maltose utilization in *Lactobacillus* ssp. *Biochimie* **70**, 351–355 (1988).
6. Teuber, M., Geis, A. and Neve, H.: The Genus *Lactococcus*. In: Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder W. and Schleifer K. H. (eds.) *The prokaryotes*, 2nd edition, Vol. 2, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York. 1991 (im Druck).
7. Orberg, P. K. and Sandine, W. E.: Common occurrence of plasmid DNA and vancomycin resistance in *Leuconostoc* spp. *Appl. Environm. Microbiol.* **48**, 1129–1137 (1984).
8. Verma, V., Qazi, G. N., Parshad, R. and Chopra, C. L.: Introduction of a *Micrococcus* plasmid in *Escherichia coli*. *Plasmid* **22**, 265–267 (1989).
9. Graham, D. C. and McKay, L. L.: Plasmid DNA in strains of *Pediococcus cerevisiae* and *Pediococcus pentosaceus*. *Appl. Environm. Microbiol.* **50**, 532–534 (1985).
10. Rehberger, T. G. and Glatz, B. A.: Characterization of Propionibacterium plasmids. *Appl. Environm. Microbiol.* **56**, 864–871 (1990).
11. Somkuti, G. A. and Steinberg, D. H.: Distribution and analysis of plasmids in *Streptococcus thermophilus*. *J. Ind. Microbiol.* **1**, 157–163 (1986).
12. von Husby, K. O. and Nes, I. F.: Changes in the plasmid profile of *Lactobacillus plantarum* obtained from commercial meat starter cultures. *J. Appl. Bact.* **60**, 413–417 (1986).
13. Sievers, M. and Teuber, M.: *Acetobacter europaeus* spec. nov., a main component of the microflora of industrial vinegar generators in central Europe. *Bioforum* **14**, 102 (1991).
14. Sladen, S., Connerton, I. F. and Fricker, C. R.: Plasmid presence and function in isolates of *Aeromonas* spp. *J. Appl. Bacteriol.* **65**, XIV (1988).
15. Ellison, A., Dodd, C. E. R. and Waites, W.: The use of plasmid profiling to compare strains of *Bacillus cereus* isolated from liquid whole egg and retailed foods. *J. Appl. Bacteriol.* **65**, XIV–XV (1988).
16. Boosinger, T. R., Blevins, W. T., Heron, J. V. and Sunter, J. L.: Plasmid profiles of 6 species of *Campylobacter* from human beings, swine, and sheep. *Am. J. Vet. Res.* **51**, 718–722 (1990).
17. Sagara, H., Mochizuki, A., Nakaya, R. and Okamura, N.: Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* with special reference to plasmid profiles of Japanese clinical isolates. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **31**, 713–719 (1987).
18. Jones, M. K. P., Iwanenko, L. A. and Longden, M. S.: Analysis of plasmid profiling as a method for rapid differentiation of food-associated *Clostridium perfringens* strains. *J. Appl. Bacteriol.* **67**, 243–254 (1989).
19. Labor für Lebensmittelmikrobiologie der ETH Zürich, unveröffentlichte Ergebnisse.
20. Caugant, D. A., Levin, B. R. and Selander, R. K.: Genetic diversity and temporal variation in the *Escherichia coli* population of a human host. *Genetics* **98**, 467–490 (1981).
21. Kobayashi, J. M.: Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157-H7 infections. *J. Infect. Dis.* **160**, 994–998 (1989).

22. Scotland, S. M., Willshaw, G. A., Gross, R. J., Smith, H. R. and Rowe, B.: Adhesion to cells in culture and plasmid profiles of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from outbreaks and sporadic cases of infant diarrhea. *J. Infect.* **19**, 237 (1989).
23. Fistrovici, E. and Collinsthompson, D. L.: Use of plasmid profiles and restriction endonuclease digest in environmental studies of *Listeria* spp. from raw milk. *Int. J. Food Microbiol.* **10**, 43–50 (1990).
24. Thompson, J. K. and Collins, M. A.: A comparison of the plasmid profiles of strains of lactic streptococci isolated from a commercial mixed strain starter culture with those from fermented milk. *Milchwissenschaft* **44**, 65–69 (1989).
25. Josephsen, J. and Nielsen, E. W.: Plasmid profiles and bacteriophage sensitivity of bacteria of a cheddar starter used for 5 years without rotation. *Milchwissenschaft* **43**, 219–223 (1988).
26. Andresen, A., Geis, A., Krusch, U. and Teuber, M.: Plasmid profiles of mesophilic dairy starter cultures. *Milchwissenschaft* **39**, 140–143 (1984).
27. Pechmann, H. and Teuber, M.: Plasmid pattern of group-N (lactic) streptococci. *Zentralbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg. I. Abt. Orig. C.* **1**, 133–136 (1980).
28. Meissner, P. S. and Falkinham, J. O.: Plasmid DNA profiles as epidemiological markers for clinical and environmental isolates of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*. *J. Infect. Dis.* **153**, 325–331 (1986).
29. Boyce, J. R. and Morter, R. L.: Plasmid profile analysis of bovine isolates of *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. Vet. Res.* **47**, 1204–1206 (1986).
30. Walia, S., Williamson, T., Tewari, R., Kaiser, A. and Madhavan, T.: Protein-patterns, serotyping and plasmid DNA profiles in the epidemiologic fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa*. *European J. Clin. Microbiol. & Infect. Dis.* **7**, 248–255 (1988).
31. Garcia, D. C., Botto, L., Cervetto, M., Sarubbi, M. A., Zarzopulos, J. and Trevisan, A. R.: An outbreak of multiply resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal unit – Plasmid pattern analysis. *J. Hospital Infect.* **14**, 99–105 (1989).
32. Mcewen, S. A., Tamblyn, S. W., Clarke, R. C., Martin, S. W. and Mcdermott, J. J.: The prevalence, incidence, geographical distribution, antimicrobial sensitivity patterns and plasmid profiles of milk filter *Salmonella* isolates from Ontario dairy farms. *Can. J. Vet. Res.* **52**, 18–22 (1988).
33. Whiley, S. J., Steele, T. W., Murray, C., Lanser, J. A. and Manning, P. A.: Plasmid profile analysis of a salmonellosis outbreak and identification of a restriction and modification system. *Appl. Environm. Microbiol.* **54**, 1591–1594 (1988).
34. Threlfall, E. J., Ward, L. R. and Rowe, B.: Subdivision of *Salmonella enteritidis* phage types by plasmid profile typing. *Epidemiol. Infect.* **102**, 459–465 (1989).
35. Riley, L. W., Cohen, M. L., Demelfi, T. M. and Diferdinando, G. T.: Evaluation of isolated cases of salmonellosis by plasmid profile analysis – introduction and transmission of a bacteria clone by precooked roast beef. *J. Infect. Dis.* **148**, 12–17 (1983).
36. Brunner, F., Margadant, A., Peduzzi, R. and Piffaretti, J. C.: The plasmid pattern as an epidemiologic tool for *Salmonella typhimurium* epidemics – comparison with the lysotype. *J. Infect. Dis.* **148**, 7–11 (1983).
37. Threlfall, E. J., Frost, J. A., Ward, L. R. and Rowe, B.: Plasmid profile typing can be used to subdivide phage type 49 of *Salmonella typhimurium* in outbreak investigations. *Epidemiol. Infect.* **104**, 243–251 (1990).
38. Litwin, C. M., Storm, A. L., Chipowsky, S. and Ryan, K. J.: Molecular epidemiology of *Shigella* infections – Plasmid profiles, serotype correlation, and restriction endonuclease analysis. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 104–108 (1991).

39. Wray, C., Beedell, Y., McLaren, I. and Parkinson, N.: The use of biotyping and plasmid profile analysis to study the epidemiology of *Salmonella typhimurium* infection in calves. *J. Medical Microbiol.* **23**, R6-R6 (1987).
40. Bratoeva, M. P.: Microbiological methods and plasmid pattern analysis in epidemiological control of *Shigella sonnei* infections. *Microbiol. Sci.* **3**, 216-219 (1986).
41. Palchaudhuri, S., Bhattacharya, S. K., Ghosh, S., Pal, S. C., Pal, R., Sarkar, B., Sen, D., and Kumar, R.: Molecular epidemiology of plasmid patterns in *Shigella dysenteriae* type I obtained from an outbreak in West-Bengal (India). *FEMS Microbiol. Letter.* **30**, 187-191 (1985).
42. Brown, E., Wenzel, R. P. and Hendley, J. O.: Exploration of the microbial anatomy of normal human skin by using plasmid profiles of coagulase-negative Staphylococci - Search for the reservoir of resident skin flora. *J. Infect. Dis.* **160**, 644-650 (1989).
43. Dodd, C. E. R., Chaffey, B. J. and Waites, W. M.: Plasmid profiles as indicators of the source of contamination of *Staphylococcus aureus* endemic within poultry processing plants. *Appl. Environm. Microbiol.* **54**, 1541-1549 (1988).
44. Dodd, C. E. R., Adams, B. W., Waites, W. M. and Mead, G. C.: Use of plasmid profiles to detect changes in strains of *Staphylococcus aureus* during poultry processing. *J. Appl. Bact.* **63**, 417-425 (1987).
45. Archer, G. L., Johnston, J. L., Karchmer, A. W. and Vishniavsky, N.: Plasmid pattern analysis for the differentiation of infecting from noninfecting *Staphylococcus epidermis*. *J. Infect. Dis.* **149**, 913-920 (1984).
46. Baumgartner, A., Eggimann, M. and Nicolet, J.: Plasmid profiles of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis. *J. Appl. Bact.* **56**, 159-163 (1984).
47. Bottone, E. J., Chiesa, C., Calhoun, D. H., Janda, J. M., Traub, L. and Wallen, J. W.: Assessment of plasmid profile, exoenzyme activity, and virulence in recent human isolates of *Yersinia enterocolitica*. *J. Clin. Microbiol.* **22**, 449-451 (1985).
48. Yablonsky, M. D., Lawford, H. G., Rogers, P. L., Stevnsborg, N., Eveleigh, D. E., Goodman, A. E., Delimya, O. G. and Demorais, J. O. F.: *Zymomonas mobilis*, Cp4 - a clarification of strains via plasmid profiles. *J. Biotechnol.* **9**, 71-79 (1988).
49. Dodd, E. C. R. and Waites, W.: The use of plasmid profiling to determine strains of *Brochothrix thermosphacta* important in spoilage of sausages. *J. Appl. Bacteriol.* **65**, XV (1988).
50. Currier, T. C. and Nester, E. W.: Isolation of covalently closed circular DNA of high molecular weight from bacteria. *Anal. Biochem.* **76**, 431-441 (1976).
51. Hansen, J. B. and Olsen, R. H.: Isolation of large bacterial plasmids and characterization of the P2 incompatibility group plasmids pMG1 and pMG5. *J. Bacteriol.* **135**, 227-238 (1978).
52. Eckhardt, T.: A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* **1**, 584-588 (1978).
53. Birnboim, H. C. and Doly, J.: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523 (1979).
54. Leblanc, D. J. and Lee, L. N.: Rapid screening procedure for detection of plasmids in streptococci. *J. Bacteriol.* **140**, 1112-1115 (1979).
55. Klein, R. D., Selsing, E. and Wells, R. D.: A rapid microscale technique for isolation of recombinant plasmid DNA suitable for restriction enzyme analysis. *Plasmid* **3**, 88-91 (1980).
56. Holmes, D. S. and Quigley, M.: A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**, 193-197 (1981).

57. Kado, C.I. and Liu, S.-T.: Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* **145**, 1365–1373 (1981).
58. Ish-Horowicz, D. and Burke, J. F.: Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* **9**, 2989–2998 (1981).
59. Anderson, D. G. and McKay, L. L.: Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 549–552 (1983).
60. Casey, M. G. and Jimeno, J.: *Lactobacillus delbrückii* subsp. *lactis* plasmids. *Neth. Milk Dairy J.* **43**, 279–286 (1989).
61. Hintermann, G., Fischer, H.-M., Cramer, R. and Hütter, R.: Simple procedure for distinguishing ccc, oc, and 1 forms of plasmid DNA by agarose gel electrophoresis. *Plasmid* **5**, 371–373 (1981).
62. Grinsted, J. and Bennt, P. M.: *Methods in Microbiology* **21**, Plasmid Technology, 2nd Edition, Academic Press London 1988 (1 chapter with 326 pages on identification, analysis, transformation, preparation and electrophoresis, restriction endonucleases, cloning vectors, electron microscopy, transposons, detection of gene products and DNA sequencing).
63. Helinski, D. R., Cohen, S. N., Clewell, D. B., Jackson, D. A. and Hollaender, A.: Plasmids in Bacteria. Plenum Press, New York and London, 1985 (Proceedings of a conference in Urbana, Illinois 1984 with more than 50 chapters on structure and evolution, replication, incompatibility, and partition, plasmid transfer; specialized functions, structure and evolution).
64. Kleinschmidt, J., Soeding, B., Geis, A., Teuber, M. and Neve, H.: Horizontaler Gentransfer und Stabilität von heterologer Plasmid-DNA in *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, Poster Na 110. 43. Tagung Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, 30. Sept. bis 2. Okt. 1991, Münster/Westfalen.
65. Schroeter, A., Pietzsch, O., Steinbeck, A., Bunge, C., Böttcher, U., Ward, L. R. und Helmuth, R.: Epidemiologische Untersuchungen zum *Salmonella enteritidis*-Geschehen in der Bundesrepublik Deutschland 1990. *Bundesgesundheitsbl.* **34**, 147–151 (1991).

Prof. Dr. M. Teuber
 Dr. M. Sievers
 Institut für Lebensmittelwissenschaft
 Laboratorium für Lebensmittelmikro-
 biologie
 ETH-Zentrum
 CH-8092 Zürich