

5. DISKUSSION

Im Bereich der Humanhygiene z.B. in Krankenhäusern ist die Identifizierung von Bakterienisolaten mit der wachsenden Anzahl von Methoden und der ständigen Erweiterung des Spektrums der Merkmale, daß heißt der Erkennungs-Parameter, einerseits zwar genauer, andererseits aber bezogen auf die Auswertung der erhaltenen Ergebnisse deutlich aufwendiger geworden. Um eine derartige Auswertung vornehmen zu können, bedarf es deshalb eines erfahrenen und gut ausgebildeten Fachpersonals.

Zusätzlich kommt hinzu, daß in Ländern mit einer unzureichenden Infrastruktur allein die Lagerung und Aufbewahrung der für die Identifikationsmethoden notwendigen Reagenzien, wie Medien, Salze, Nährstoffe, Aminosäuren etc. ein technisch äußerst schwieriges Problem darstellt.

Noch problematischer stellt sich die Situation im Bereich Tierproduktion, Tierhaltung und Tierhygiene dar. Dort treten weitere wichtige Aspekte bezüglich der Effizienz in der Diagnose und Bestimmung tierpathogener Feldisolate auf. Angefangen beim Herdenmanagement zur Prävention von Erkrankungen bis hin zur Isolation und Kultivierung etwaiger Krankheitserreger und deren Identifikation ist überall ein Mangel an adäquatem Instrumentarium und Personal festzustellen. Zusätzlich erschwerend kommen geographische Gegebenheiten (z.B. Entfernungen, unterschiedliche Klimazonen, etc.) des betrachteten Landes, wie in dieser Arbeit Mexiko, hinzu.

Die Suche nach zuverlässigen, einheitlichen und wenn möglich automatisierbaren Formen der Erfassung, Verarbeitung und Archivierung charakteristischer Merkmale pathogener Krankheitserreger innerhalb einer Datenbank wäre eine wichtige Aufgabe innerhalb der Epidemiologie und Epizootiologie tierseuchenrelevanter Erreger. Hier bietet die Gaschromatographie, verbunden mit speziell entwickelten Datenverarbeitungsprogrammen dem Wissenschaftler eine sehr gute und auch schnelle Möglichkeit der Klassifizierung seiner gewonnenen Bakterien-Isolate. Mittels dieser Methode lassen sich nicht nur einzelne Parameter untersuchen, sondern sie erlaubt die Bestimmung ganzer Profile von phänotypischen Merkmalen einer Spezies (Merkmalskomplexe) und versetzt den Untersuchenden damit in die Lage, anhand der erhaltenen komplexen Datenstrukturen Rückschlüsse auf eben diese genetisch festgelegten Merkmalskomplexe ziehen zu können. Damit ist man heutzutage in der Lage, auf einfache Weise vorhandene Bakterienstämme in verschiedene Gruppen einzuordnen oder bereits vorhandenen Spezies zuzuordnen.

Der Vergleich von gaschromatographischen Profilen von Feldisolaten aus Nordost-Mexiko mit einer mittels des Programms Bacterial Identification System ("BIS") und taxonomischen Methoden erhaltenen Datenbank ist Kernthema dieser Arbeit. Dargestellt werden die Möglichkeiten und Schwierigkeiten einer Identifizierung von Clostridien-Feldisolaten und deren Zuordnung zu bereits vorhandenen und bestimmten sogenannten Referenzstämmen.

5.1 Bakteriologische Untersuchungen

Die Schwierigkeiten bei der Erstellung einer vollständigen Datenbank resultierten zu Beginn der Gesamtuntersuchungen schon in der Eigenschaft verschiedener Feldisolate, sich schlecht oder gar nicht rekultivieren zu lassen. Insbesondere phosphatase-positive Clostridien ließen sich nicht oder nur schlecht wiedergewinnen.¹⁶⁶ Eine schlechte Rekultivierung kann in diesem Zusammenhang auch ein Grund für ein unvollständiges Profil der gaschromatographischen Analysen gewesen sein. In der vorliegenden Arbeit war dies vor allem bei den Bestimmungen von *C. perfringens* Isolaten der Fall. Weiterhin konnte offensichtlich keine Beweglichkeit bei den Clostridien festgestellt werden, obwohl dies von verschiedenen Autoren beschrieben wird.^{82, 160, 175} Eine Erklärung dafür könnte sein, daß die Gefriertemperatur von -30 °C

nicht ausreichend war, die Bakterienzellen vollständig intakt zu belassen. Eine andere Erklärung wäre, daß bei der Durchführung des Beweglichkeitstests ("Hängender Tropfen") Sauerstoff die vitalen, anaeroben Zellen geschädigt hat.

5.2 Gaschromatographische Untersuchungen

Die mittels der Gaschromatographie gewonnenen Ergebnisse der Identifizierung können nur, wenn auch entscheidende, Teilkriterien der Summe der insgesamt angestellten Untersuchungen sein. Allerdings können unter definierten Bedingungen vorangegangene Untersuchungen, z.B. zur Morphologie der Bakterien und Kultur und zu deren biochemischen Eigenschaften, bestätigt und zur eindeutigen Identifizierung herangezogen werden. 7, 68

Dennoch kann konstatiert werden, daß eine Klassifizierung von Clostridien innerhalb von Gruppen und auch innerhalb von Spezies nur allein mittels der Gaschromatographie möglich ist.104. Die Diskussion der Verfahrensmethodik wurde ausführlich von HEITFUSS und GIERCKE-SYGUSCH durchgeführt. 68, 79

Bei der Betrachtung eines Teils der in dieser Arbeit untersuchten Feldisolate fiel auf, daß sie in hohem Maße langkettige Fettsäuren bildeten, die nicht mit den Standard-Referenzlösungen übereinstimmten. In diesem Falle war eine Identifizierung allein mit der gaschromatographischen Methode nicht eindeutig möglich; allerdings auch nicht mit anderen Verfahren (z.B. Toxinbestimmungen).124, 125

5.3 Datenstruktur und Datenverarbeitung

CLIFFORD und STEPHENSON⁴² schrieben über das Buch "Principles of Numerical Taxonomy" von SNEATH und SOKAL folgenden Kommentar:

"It appears that the book was written with a modicum of revolutionary zeal, and some of its hopes have not been, and may never be, fulfilled".

Die Auswahl jenes Ähnlichkeitsmaßes und Klassifikationsverfahrens, das nach Art der berücksichtigten Merkmale am besten geeignet ist, repräsentiert eine der wichtigsten Erwartungen dieses Werkes, die allerdings noch nicht in Erfüllung gegangen sind. Deswegen ist bei der Anwendung des Begriffes "beste Methode" Vorsicht geboten. Einer der Faktoren, die vor allem in der Gaschromatographie eine große Rolle spielen, ist die Datenstruktur. Anhand der Literatur ist bei der Erfassung von Merkmalen mittels gaschromatographischer Verfahren eine Umwandlung der gebildeten Komponentenmengen in Prozentwerte der Gesamtmenge zu empfehlen.^{15, 17, 51, 71, 72, 90} Nach AITCHISON³ und BØE²² besteht bei dem Vergleich von Prozentwerten, vor allem mit Korrelationskoeffizienten, eine enge Abhängigkeit zwischen den verschiedenen Anteilen der untersuchten Komponenten, so daß deren Verrechnung mit anderen Proben zu erhöhten Korrelationen führen kann. Diese Beziehung kann durch eine Transformation der ursprünglichen Werte in die sog. LOGITS-Werte aufgehoben werden.¹⁰⁷

$$z = 5 + \frac{1}{2} \ln \frac{k}{1-k} \quad (5)$$

wobei k die Prozentzahl /100 ist.

Die o.g. Effekte der Umwandlung können anhand des folgenden Beispiels, siehe Tab. 5.1 und 5.2, verdeutlicht werden. Für dieses Beispiel wurden Daten von *C. botulinum* der Referenzdatenbank des Programms "BIS" entnommen. Aus den Tabellen läßt sich entnehmen, daß z.B. bei den Stämmen 1028 und 1030 die Korrelation der Prozentwerte 0,95 beträgt, während die Korrelation der LOGIT-Werte bei dem Wert 0,81 liegt. Bei der Betrachtung der Rohwerte (Tab. 5.1) erkennt man, daß z.B. die 14:0-Komponente bei Stamm 1030 quasi doppelt so hoch liegt, wie bei Stamm 1028. Daraus läßt sich folgern, daß die Korrelationswerte der Prozentwerte eine höhere Übereinstimmung der Stammmerkmale vorgibt, als sie tatsächlich vorliegt. Deshalb scheint es so zu sein, daß die Verrechnung mit den LOGIT-Werten eine feiner abgestufte Trennung ergibt. Somit stellen die LOGIT-Werte eine Art Kompromiß zwischen den relativ grob abstufenden Korrelations-Werten der Prozentwerte und den sehr feine Abstufungen suggerierenden Distanzwerten. Im Gegensatz zu HEITEFUSS79 stellt diese Arbeit fest, daß die Ergebnisse der Distanzwerte (entspricht dem Ähnlichkeits-Index bei HEITEFUSS) nicht ohne Vorbehalt betrachtet werden dürfen. Eine genauere Evaluation nur zu diesem Thema wäre für die zukünftige Weiterentwicklung von derartigen Datenbanken sinnvoll. In einer anderen Arbeit²² wurde auch der Vorteil der Verwendung von logarithmischen Transformationen festgestellt.

In dieser Arbeit und in vorangegangenen Untersuchungen wurden die Daten der Analysen auf langkettige Fettsäuren oder Alkohole und kurzkettige Fettsäuren der untersuchten Bakterienstämme aus verrechnungstechnischen Gründen getrennt berücksichtigt. Sollte ein weiterentwickeltes, leistungsstarkes Identifizierungsprogramm zur Verfügung stehen, dann sollten in der Zukunft die Daten beider o. g. genannten Analysen kombiniert werden. So kann eine Kombination der Datenblöcke durch die Z-Standardisierung der Werte erzielt werden. Hier fänden dann auch Daten aus biochemischen und anderen Tests eine Miteinbeziehung in die numerische Klassifizierung der Clostridien.

Die Eignung der verschiedenen Verrechnungsverfahren muß durch adequate Cluster- bzw. multidimensionale Ordinations-Analysen geprüft werden. Durch ein solches Verfahren ließe sich auch das Programm "BIS" modifizieren.

Tab. 5.1 Prozentwerten von *C. botulinum* Gruppe Referenzstämme

Kompnr.	1028	1028	1029	1029	1030	1030	1031	1031	1032	1032	1033	1073	1073	1085	1085	1087	1087
9:0																	
10:00						0,11		0,05	0,44	0,70							
11:00																	
2-OH 10:0																	
12:0		0,16		0,12	0,40	0,22	1,61	1,11	1,47	2,16	0,24	1,39	0,71		0,31	0,12	
13:00		0,31					1,31	1,19	0,27				0,44				
2-OH 12:0																	
3-OH 12:0		0,07					1,05				0,48						
14:0	17,91	10,57	13,84	10,54	31,84	23,54	37,37	30,92	3,84	6,19	19,94	6,97	4,21	19,10	18,90	12,96	7,78
i-15:0	1,02		0,97				2,34	3,43			2,36	8,46	4,83	2,42	2,75		1,60
a-15:0		2,02		2,72	2,65				0,81	1,08	0,22		1,78			1,99	
15:0	0,80	0,60	0,52	0,66	2,83	3,50	11,02	8,45	1,04	1,73	1,55		0,19	0,63	0,94	0,96	0,67
2-OH 14:0												2,57	1,03				0,08
3-OH 14:0	1,04		0,83	1,09			1,10	0,56	0,87	0,50	0,46		1,18			0,30	0,76
i-16:0	1,24	1,14		0,23							0,48		0,35		0,22	0,44	0,39
16:1(9)	5,90	2,89	5,69	2,60	0,46	1,80		4,25	2,77	4,35	4,14	4,97	2,96	5,03	5,54	2,11	3,65
16:0	16,67	10,88	24,36	23,85	22,12	35,59	22,57	20,86	14,67	22,50	19,44	17,25	17,37	13,56	12,81	7,72	5,55
i-17:0						0,99	1,38	0,37	0,38			7,33	8,91				0,23
17:0^	1,51	1,04	1,01	1,15	0,26	0,36		0,24	0,88	1,13	0,44			0,90	0,62	0,56	0,24
17:0				0,22	0,42	0,64	0,84	0,46	1,82	2,85							
2-OH 16:0			0,56		0,23	0,13						1,84					
18:2(9 12)			1,83		0,47		3,03		3,78	3,02		3,99	0,19				0,31
18:1(9')	1,09	0,44		0,36	0,53	1,43		1,60	0,80	1,78	1,20		1,59	1,06		0,60	1,24
18:1(9)		0,65	0,47	1,60		1,82		0,99			1,14		1,04	0,76	1,17		0,46
18:0		0,31	1,20	2,15	1,40	3,06	1,09	1,04	3,04	4,13	0,35	6,97	13,67	0,12	0,36	0,13	0,25
19:0^		0,09							3,02						0,22		1,96
19:0										5,97							
20:0						0,12							0,31				

Tab. 5.2 Vergleich der Verrechnungsmethoden Korrelation der Prozentwerte und Korrelation der Logits-Werte

	1029 FAME	1028 FAME1	1029 FAME	1029 FAME1	1030 FAME	1030 FAME1	1031 FAME	1031 FAME1	1032 FAME	1032 bFAME	1033 FAME	1073 FAME	1073 FAME1	1086 FAME	1086 bFAME	1087 FAME	1087 bFAME
	Korrelation der Prozentwerte																
1028 FAME		0,98	0,94	0,89	0,95	0,94	0,91	0,95	0,75	0,77	0,99	0,70	0,54	0,99	0,98	0,96	0,95
1028 FAME1	0,91		0,95	0,92	0,96	0,95	0,90	0,93	0,78	0,79	0,98	0,69	0,57	0,96	0,96	0,96	0,91
1029 FAME	0,91	0,86		0,98	0,87	0,98	0,81	0,85	0,91	0,91	0,95	0,81	0,68	0,89	0,88	0,84	0,85
1029 FAME1	0,84	0,93	0,88		0,83	0,97	0,75	0,80	0,92	0,93	0,91	0,78	0,72	0,82	0,81	0,79	0,77
1030 FAME	0,81	0,89	0,82	0,88		0,92	0,97	0,98	0,67	0,68	0,97	0,61	0,49	0,97	0,96	0,98	0,90
1030 FAME1	0,83	0,85	0,86	0,89	0,91		0,87	0,90	0,87	0,88	0,96	0,77	0,68	0,90	0,89	0,87	0,84
1031 FAME	0,70	0,66	0,75	0,66	0,85	0,81		0,99	0,61	0,62	0,93	0,58	0,43	0,94	0,93	0,95	0,87
1031 FAME1	0,87	0,80	0,83	0,78	0,85	0,90	0,87		0,64	0,66	0,96	0,62	0,47	0,97	0,97	0,97	0,92
1032 FAME	0,64	0,66	0,77	0,74	0,72	0,72	0,64	0,63		0,94	0,76	0,79	0,73	0,67	0,65	0,61	0,67
1032 bFAME	0,65	0,67	0,74	0,73	0,73	0,74	0,60	0,64	0,81		0,78	0,77	0,72	0,69	0,67	0,63	0,65
1033 FAME	0,95	0,90	0,91	0,87	0,85	0,90	0,78	0,94	0,63	0,65		0,72	0,57	0,98	0,98	0,96	0,94
1073 FAME	0,55	0,48	0,72	0,53	0,53	0,60	0,58	0,58	0,57	0,51	0,60		0,89	0,67	0,67	0,57	0,65
1073 FAME1	0,54	0,54	0,62	0,67	0,55	0,67	0,50	0,59	0,54	0,49	0,61	0,83		0,50	0,49	0,43	0,47
1086 FAME	0,95	0,88	0,91	0,83	0,82	0,86	0,72	0,91	0,61	0,64	0,98	0,62	0,59		1,00	0,98	0,96
1086 bFAME	0,93	0,88	0,92	0,83	0,81	0,85	0,74	0,91	0,62	0,62	0,97	0,65	0,59	0,98		0,97	0,96
1087 FAME	0,91	0,97	0,85	0,90	0,93	0,85	0,73	0,84	0,66	0,68	0,90	0,48	0,52	0,89	0,86		0,92
1087 bFAME	0,90	0,80	0,85	0,75	0,72	0,78	0,66	0,85	0,69	0,56	0,91	0,58	0,56	0,92	0,91	0,81	
	Korrelation der Logit-Werte																

5.4 Referenzdatenbank

Das System "BIS" zeichnet sich durch die Eigenschaft der Flexibilität aus. Mit ihm ist man in der Lage, Datenbanken zu erstellen und auch zu erweitern. Allerdings ist eine Datenbank nur in dem Falle verlässlich, wenn auch eine genügende Zahl an Wiederholungen der Analysen der Referenzstämme vorgenommen wurde. Ein typischer Fehler, der im schlimmsten Fall zu schweren Fehlinterpretationen führt ist z. B. wenn ein Feldstamm gegen einen Referenzstamm verrechnet wird und festgestellt wird, daß die Korrelationswerte zwischen ihm und der Referenz höher sind, als zwischen den nur z.B. zwei Wiederholungsanalysen der Referenzstämme. Für eine Anzahl der in dieser Arbeit untersuchten Verrechnungen gab es zwar einige Wiederholungen der schon vor Beginn der vorliegenden Arbeit getätigten Referenzanalysen, jedoch bleibt zu vermuten, daß einige Probleme der Zuordnung von Feldisolaten zu den Referenzen in nicht unerheblichem Maße auf eine letztendlich doch nicht ausreichende Anzahl an Wiederholungsanalysen der Referenzstämme zurückzuführen ist (ca. 20 Wiederholungen). Hier ist in der Zukunft Nacharbeit zu leisten. Es muß folglich darauf geachtet werden, daß eine vorliegende Datenbank in gleichem Maße horizontal (Daten der Analysen mehrerer Stämme von einer Spezies und ausreichende Wiederholungen eines Stammes), wie vertikal (Daten der Analysen je eines Stammes von vielen verschiedenen Spezies) wächst bzw. vergrößert wird.

5.5 Datenbank der Feldisolate

Mit der vorliegenden Arbeit stehen die Angaben von bakteriologischen und gaschromatographischen Analysen sowie photographischen Aufzeichnungen der Feldisolate potentieller Bodenseuchenerreger in Nordost-Mexiko erstmalig zur Verfügung. Dies bildet den Grundstein für den weiteren Aufbau einer Datenbank lokalspezifischer Stämme, deren weitere in den jeweiligen Teilen des Landes eingerichtet werden sollten.

Wie auch bei der Referenz-Datenbank ist bei der Erstellung einer standortspezifischen "Feldstamm-Datenbank" auf einen sorgfältigen und ausgewogenen Ausbau dieser Bank zu achten. Trotz der Zuverlässigkeit der gaschromatographischen Verfahren ist, wenn möglich, eine standardmäßige Vor- oder Nachcharakterisierung mit den bekannten bakteriologischen Verfahren zu empfehlen um die Identifikation so sicher wie möglich zu gestalten.

Die Erweiterung einer zuverlässigen Datenbank setzt eine detailgenaue Planung und akribische Organisation der Gewinnung der Proben, vor allem in Verbindung mit exakten epizootologischen Untersuchungen, voraus.

Im Fall der vorliegenden Arbeit haben interne Unstimmigkeiten innerhalb der Leitung der veterinärmedizinischen Fakultät zu unzuverlässigen und schlecht dokumentierten Untersuchungen geführt. Dieses führte dazu, daß z.B. keine brauchbaren Schlüsse aus den Untersuchungsergebnissen in Hinblick auf das Vorkommen und die Bedeutung pathogener Clostridien gezogen werden konnten. In nachfolgenden Forschungsprojekten sollte ein großer Wert auf eine harmonische Kontinuität vor allem im kooperativen Transfer wissenschaftlicher Informationen und Technologie gelegt werden.