

Aus dem
Institut für Bakteriologie und Mykologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig
und dem
Institut für molekulare Pathogenese
im Friederich-Loeffler-Institut,
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit,
Standort Jena

**Untersuchungen zu Nachweis und Differenzierung von *Campylobacter fetus*
subsp. *venerealis* beim Rind mit konventionellen und molekularbiologischen
Methoden**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Audrey Bagon
aus Mococa

Leipzig, 2006

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Professor Dr. Karsten Fehlhaber

Betreuer: Professor Dr. Monika Krüger
Priv. Doz. Dr. Irmgard Moser

Gutachter: Professor Dr. Monika Krüger, Institut für Bakteriologie und Mykologie,
Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig, Leipzig
Priv. Doz. Dr. Irmgard Moser, Institut für molekulare Pathogenese,
Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Jena
Professor Dr. Karsten Fehlhaber, Institut für Lebensmittelhygiene,
Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig, Leipzig
Professor Dr. Wolfgang Heuwieser, Tierklinik für Fortpflanzung, Freie
Universität Berlin, Berlin

Tag der Verteidigung: 26.09.2006

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Schrifttum	3
2.1	Historische Entwicklung	3
2.2	Taxonomie der Gattung <i>Campylobacter</i>	4
2.3	Zellwandaufbau	7
2.4	Virulenzfaktoren	9
2.5	Übertragung von <i>C. fetus</i>	13
2.6	Klinisches Bild beim Rind	14
2.7	Epidemiologie	14
2.8	Pathogenese	15
2.9	Die Diagnose der <i>Campylobacteriosis genitalis</i>	16
2.9.1	Differenzialdiagnostik	17
2.9.2	Biochemische Differenzierung	19
2.9.2.1	Bestimmung der Bakterienzahl	21
2.9.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	22
2.10	Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)	24
2.11	Therapie und Prophylaxe	26
3	Material und Methoden	27
3.1	Untersuchungsmaterial	27
3.2	Mikrobiologische Methode	28
3.2.1	Kultur	30
3.2.2	Gramfärbung	31
3.2.3	Biochemisch-kulturelle Differenzierung	32
3.2.3.1	Biochemische Differenzierung nach KÖTSCHE, 1993 und RAHM et al., 1999	32
3.2.3.2	Phänotypischer Differenzierung von <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> und <i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> nach ON und HARRINGTON (2001)	37
3.2.4	Anlegen einer Verdünnungsreihe	39
3.3	Molekularbiologische Methoden	39
3.3.1	DNS-Extraktion	39
3.3.1.1	Kochen	40
3.3.1.2	High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics™)	40
3.3.1.2.1	DNS-Extraktion aus Kultur	41
3.3.1.2.2	DNS-Extraktion aus Sperma	41
3.3.1.2.3	Herstellung künstlich kontaminierten Spermas	41
3.3.1.3	Isolation genomischer DNS mittels Phenol-Chloroform	42
3.3.1.4	<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i> : DNS-Isolierung mit Biotin-markierten Oligonukleotiden und Streptavidin-Beads	42

Inhaltverzeichnis

3.3.2	Fällung und Reinigung von DNS	43
3.3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	44
3.3.3.1	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC)-PCR	48
3.3.4	Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) von <i>Campylobacter</i> -Isolaten	49
4	Ergebnisse	57
4.1	Kulturell-biochemische und PCR-Untersuchungen zur Gattungs- und -Speziesbestimmung der <i>Campylobacter</i> -Isolate	57
4.2	PCR	65
4.2.1	Identifizierung der Spezies <i>C. fetus</i>	65
4.2.2	Analytische Empfindlichkeit	67
4.2.3	PCR nach DNS-Isolierung mittels Biotin-markierten-Oligonukleotiden und Streptavidin-Beads	69
4.2.4	PCR nach DNS-Isolierung mittels Phenol-Chloroform-Extraktion	69
4.2.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	70
4.3	Genetische Charakterisierung mit der ERIC-PCR	73
4.4	Ergebnisse der PFGE	79
4.4.1	Interpretationen von PFGE-Bandenmustern	79
4.4.2	Clusteranalyse der <i>Campylobacter fetus</i> -Isolate	80
4.4.3	Clusteranalyse der <i>Campylobacter fetus</i> -Isolate aus den Jahren 2000 bis 2004	84
4.4.4	Clusteranalyse der <i>Campylobacter fetus</i> -Isolate aus Baden-Württemberg	86
4.4.5	Clusteranalyse der <i>Campylobacter fetus</i> -Isolate aus Thüringen	89
5	Diskussion	90
5.1	Übertragungsrisiko durch künstliche Besamung	90
5.2	Nachweis mittels PCR	91
5.3	Schwierigkeiten bei der PCR direkt aus Spermaproben	92
5.4	Differenzierung der <i>Campylobacter</i> -Spezies	95
5.5	Epidemiologische Untersuchungen	97
6	Zusammenfassung	101
7	Summary	103
8	Literaturverzeichnis	I - XIX

Abkürzungen

Verwendete Abkürzungen

ad (lateinisch)	bis zu
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
<i>C.</i>	<i>Campylobacter</i>
ca.	circa
CO ₂	Kohlendioxid
d.h.	das heißt
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al. (lateinisch)	und andere
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
>	größer als
G + C	Guanin + Cytosin
h	Stunde
<i>H.</i>	<i>Helicobacter</i>
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
kB	Kilobasen
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
μ	mikro (10 ⁻⁶)
m	milli (10 ⁻³)
M	Mol pro Liter
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht

Abkürzungen

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
µg	Mikrogramm (10 ⁻⁶ g)
µl	Mikroliter (10 ⁻⁶ l)
µm	Mikrometer (10 ⁻⁶ m)
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
mm	Millimeter
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
Nr.	Nummer
O ₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte
p.a.	pro analysi (lateinisch)
PBS	Phosphat-gepufferte-Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pmol	Pikomol (10 ⁻¹² mol)
%	Prozent
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulphat
sog.	sogenannt
ssp./ subsp.	Subspezies
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tol.	Toleranz
Tris	Tris- (hydroxymethyl)-aminomethan

Abkürzungen

U	unit (Einheit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
z. B.	zum Beispiel

Einleitung

1 Einleitung

Campylobacter (C.) fetus subsp. *venerealis* ist der Erreger des enzootischen Abortes, der heute als bovine genitale Campylobacteriose (früher: Vibrionenseuche der Rinder) bezeichnet wird. Er ist ein Bakterium mit ausgeprägtem Tropismus für den Genitaltrakt des Rindes.

Er verursacht bei Rindern venerische Erkrankungen, die durch Infertilität, frühe embryonale Mortalität und Abort charakterisiert sind.

Durch Kälberverluste sowie reduzierte Milchleistung und Fertilitätsstörungen verursachen bovine genitale Campylobacteriosen in der Rinderzucht erhebliche wirtschaftliche Einbußen (PARVANTA 1999).

Beim Schaf führt die Infektion mit einem nahe verwandten Erreger, *C. fetus* subsp. *fetus*, zum akuten seuchenhaften Abort. In diesem Fall werden die Erreger oral aufgenommen und verursachen eine Bakteriämie. Sie treten aktiv vom Magen-Darm-Trakt in den Blutkreislauf über und siedeln sich anschließend in Uterus, Leber und Gallenblase an. Die Erregerausscheidung findet mit dem Kot statt.

C. fetus subsp. *fetus* kann beim Rind ebenfalls Aborte auslösen, allerdings im Gegensatz zu *C. fetus* subsp. *venerealis* nur sporadisch (GIORGI et al. 1986; MCLAREN u. AGUMBAH 1988).

Infektionen mit *C. fetus* subsp. *fetus* verursachen beim Menschen in Einzelfällen systemische, primär septische Erkrankungen, insbesondere bei Patienten mit chronischen Grundkrankheiten anderer Genese (WITTENBRINK 2002).

Die Erkrankung des Rindes, hervorgerufen durch *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, unterliegt der Anzeigepflicht nach dem Tierseuchengesetz. Die Erkrankung gilt in Deutschland als erloschen.

In einer Besamungsstation dürfen nur Bullen eingestellt werden, die nach Durchlaufen einer Quarantäne frei von dieser Deckinfektion sind. Es gelten die gesetzlichen Bestimmungen der EU-Samenrichtlinie 88/407, die die dreimalige Untersuchung einer Präputialspülprobe auf *C. fetus* subsp. *venerealis* vor Beginn der Samenproduktion mit negativem Ergebnis vorschreiben.

Einleitung

Es stellt sich daher die Frage nach der Sicherheit des Nachweises einer Infektion mit *C. fetus* subsp. *venerealis* im Präputialraum und im Sperma. Problematisch für den sicheren Ausschluss einer Infektion sind hierbei möglicherweise geringe Bakterienkonzentrationen.

Auch der mit Antibiotika versetzte Samen muss auf Erregerfreiheit sicher getestet werden. Nach bisheriger internationaler Auffassung können Verschleppungen von *C. fetus* subsp. *venerealis* mit Besamungssperma auch durch antibiotische Zusätze zu den Spermaverdünnern nicht verhindert werden. Diese scheinen zwar selten vorzukommen, können aber nicht ausgeschlossen werden.

Bei männlichen Tieren wurden für den *Campylobacter*-Nachweis Spülproben des Präputiums und/oder der künstlichen Scheide oder auch Spermaproben entnommen.

Bei weiblichen Tieren erfolgte die Anzüchtung aus Genitalsekreten, die durch Ansaugen, Lavage oder mittels Tampons gewonnen werden.

Bei Aborten sind die Plazenta sowie der Mageninhalt, die Lunge und die Leber des Feten das geeignete Untersuchungsmaterial.

In den letzten Jahren wurden 103 Verdachtsproben im Referenzlabor in Jena (Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit) untersucht. Eine spezifische PCR zur Identifizierung und Differenzierung der beiden *C. fetus*-Subspezies wurde etabliert. Mit dieser Methode wurde in 81 Fällen *C. fetus* subsp. *venerealis* und 22 mal *C. fetus* subsp. *fetus* identifiziert.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Methoden zum Nachweis und zur Differenzierung von *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* beim Rind mit konventionellen und molekularbiologischen Methoden direkt aus Spülproben und Sperma zu prüfen und die 103 *C. fetus*-Isolate aus den letzten Jahren molekular zu differenzieren, um eventuelle epidemiologische Zusammenhänge zu erkennen und Aussagen über die klonale Verwandtschaft machen zu können.

2 Schrifttum

2.1 Historische Entwicklung

MCFADYEAN und STOCKMAN isolierten 1913 aus Abortmaterial von Schafen und Rindern mikroaerophile Erreger. Dieser Befund wurde 1918 von SMITH bestätigt und 1919 nannten SMITH und TAYLOR diese Keime *Vibrio fetus*.

HERRICK (1949) definierte die *Campylobacteriosis genitalis* als klassische Deckseuche (nur durch den Deckakt übertragbar).

Im Jahre 1951 wiesen TERPESTRA und EISMA nach, dass die *Campylobacteriosis genitalis* nicht nur durch den natürlichen Deckakt, sondern auch durch die Besamung mit infiziertem Samen übertragen werden kann.

Bei der Feststellung der Fruchtbarkeit eines Bullen darf daher neben der klinischen Untersuchung die Überprüfung des Ejakulates oder einer Präputialspülprobe auf *Vibrio fetus* nicht fehlen.

Nach der Entdeckung der Antibiotika und der weiteren Verbreitung und Verbesserung der instrumentellen Besamung glaubte man einen Weg gefunden zu haben, die Deckinfektionen sicher verhindern zu können. Es begann eine intensive Forschung über die Wirkung der Antibiotika auf den Bakteriengehalt und dessen Vitalität im Sperma.

KING beschrieb 1957 Erkrankungen beim Menschen, die durch *Vibrio fetus* und auch durch andere, von ihr als „Related Vibrios“ bezeichnete, Erreger verursacht wurden. Diese Keime unterschieden sich durch ihr Wachstumstemperaturoptimum von 37°C-42°C von *Vibrio fetus* mit einem optimalen Wachstumstemperaturbereich von 25°C-37°C. SEBALD und VÉRON schlugen 1963 vor, die mikroaerophilen Vibrionen, welche sich durch ihren niedrigen (G + C)- Gehalt und ihren non-fermentativen Metabolismus von anderen Vibrionen unterschieden, zu einem neuen Genus, dem Genus *Campylobacter*, zusammenzufassen. Zehn Jahre später veröffentlichten VÉRON und CHATELAIN (1973) eine zusammenfassende Studie über die Taxonomie dieser *Vibrio*-ähnlichen Mikroorganismen. Danach sollte das Genus *Campylobacter* die Spezies *C. fetus*, den Erreger der infektiösen Infertilität beim Rind, sowie *C. coli*, *C. jejuni* und *C. sputorum* mit den Subspezies *sputorum* und *bubulus* enthalten.

2.2 Taxonomie der Gattung *Campylobacter*

Das Genus *Campylobacter* wurde – nach vorübergehender Einordnung in die Familie *Spirillaceae* (SMIBERT 1974) - zusammen mit anderen, morphologisch oder physiologisch ähnlichen Gattungen zur „Sektion aerober/mikroaerophiler, beweglicher, helikaler/vibrioider, Gram-negativer Bakterien“ zusammengefasst (KRIEG 1984).

Durch partielle Analysen des 16S- ribosomal- (r)- RNS- Gens zeigten ROMANIUK et al. (1987), dass *Campylobacter*-Spezies eine eigene phylogenetische Gruppe innerhalb der Eubakterien bilden, die mit anderen Gram-negativen Bakterien nur entfernt verwandt ist. Nach DNS- Sequenzierung des 16S- rRNS- Gens sind vier Genera, *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Wolinella* und *Helicobacter*, phylogenetisch eng verwandt.

Weitere Untersuchungen (THOMPSON et al. 1988) machten deutlich, dass Vertreter der Gattung *Campylobacter* innerhalb einer rRNS-Superfamilie – rRNS-Superfamilien sind Untergruppen der Klasse der *Proteobacteria* innerhalb der Eubakterien (STACKEBRANDT et al. 1988) – drei separaten rRNS-Homologie-Gruppen zuzuordnen waren, die jede einen eigenen Status verdienten. In einer ausgedehnten DNS-RNS-Hybridisierungsstudie entdeckte VANDAMME (VANDAMME u. DE LEY 1991; VANDAMME et al. 1991), dass alle *Campylobacter* und ihre Verwandten sowie einige namenlose *Campylobacter*-ähnliche Organismen zu einem separaten phylogenetischen Zweig gehörten und genetisch von den bereits bestehenden Superfamilien (I – IV) gleich weit entfernt waren. Daher schien es gerechtfertigt, *Campylobacter* in eine neue, die rRNS-Superfamilie VI, bestehend aus mehreren Homologie-Gruppen, einzuordnen. Die erste Gruppe enthielt die Spezies *C. fetus*, *C. hyointestinales*, *C. concisus*, *C. mucosalis*, *C. sputorum*, *C. coli*, *C. jejuni*, *C. lari* und *C. upsaliensis* sowie frei lebende, bisher unbenannte *Campylobacter*-ähnliche Organismen, die auch heute noch zur Gattung *Campylobacter* gehören. Die zweite Homologie-Gruppe enthielt *Arcobacter*-Spezies, die dritte Gruppe enthielt Organismen, die zur neu geschaffenen Gattung *Helicobacter* (*H.*) zusammengefasst wurden. Das Genus *Helicobacter* besteht aus 13 Spezies, und man unterscheidet zwischen den gastrischen Arten wie *H. pylori* (Mensch) und *H. felis* (Katze, Hund), und den intestinalen Arten wie z. B. *H. cinaedi*, *H. fennelliae* (Mensch, Meerschweinchen), *H. canis* (Hund) und *H. pullorum* (Huhn).

Schrifttum

Die Genera *Campylobacter* und *Arcobacter* fasste man aufgrund phäno- und genotypischer Gemeinsamkeiten zur Familie *Campylobacteraceae* zusammen (VANDAMME u. DE LEY 1991).

Wegen seiner engen Verwandtschaft mit dem Bakterium *Campylobacter* wird auch *Arcobacter* verdächtigt, beim Menschen Bauchkrämpfe, Durchfall, Erbrechen und Fieber auslösen zu können.

Heute besteht die Gattung *Campylobacter* aus 16 anerkannten Spezies, deren phylogenetische Verwandtschaft in Abbildung 1 dargestellt ist (ON 2001).

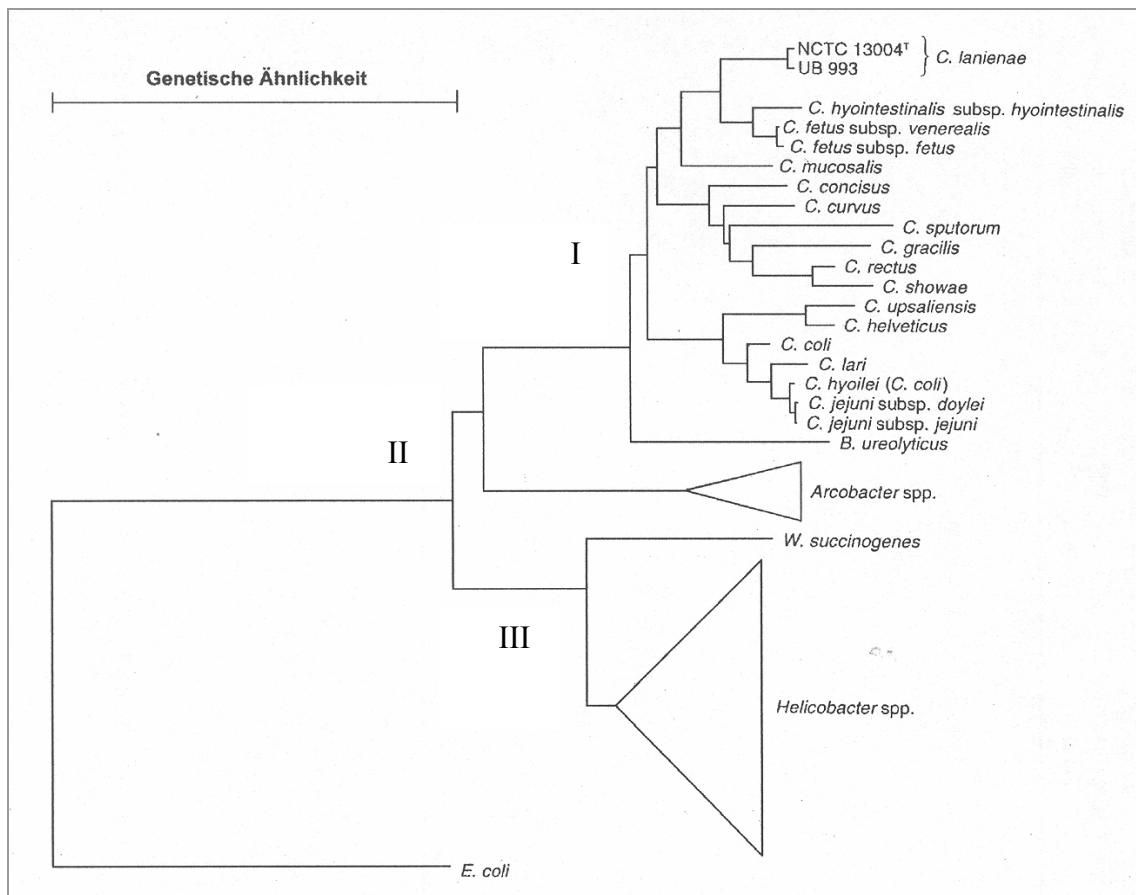


Abbildung 1: Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb des Genus *Campylobacter* auf der Basis der Analyse von 16S rRNS-Gensequenzen. Der Maßstab der genetischen Ähnlichkeit markiert 10 Basenaustausche/100 Nukleotide (mod. nach LOGAN et al. 2000).

Schrifttum

Bei *Campylobacter* handelt es sich um Gram-negative schlanke, gekrümmte bis spiralgewundene, etwa 5µm lange Stäbchenbakterien. Sie besitzen an einem oder an beiden Polen je eine Geißel. Ihre Begeißelung (Abbildung 2) macht die Keime beweglich.

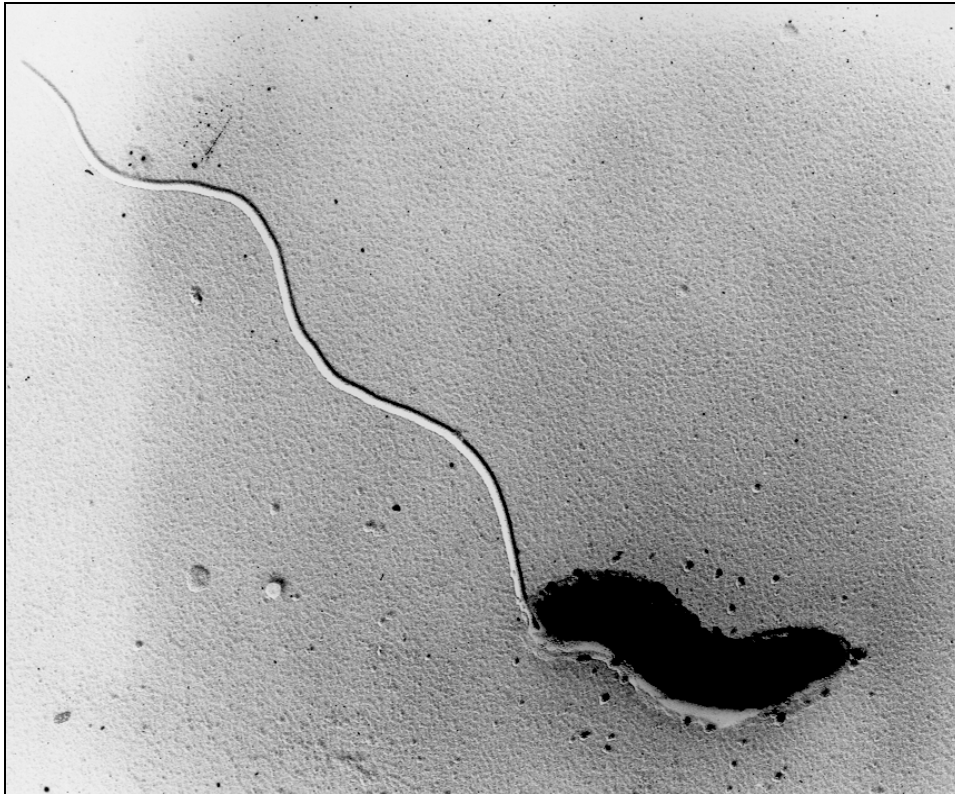


Abbildung 2: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*- Aufnahme Carl Zeiss Jena, elektronenoptische Vergr. 1: 24 000. (HUBRIG 1958).

Sie besitzen alle eine wichtige physiologische Eigenschaft, die Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff. Sie sind mikroaerophil, wobei aber eine geringe Sauerstoffkonzentration (3 – 5 %) für ihr Wachstum unentbehrlich ist. Zur Anzucht wird meist eine Gasmischung von 5 % O₂, 5-10 % CO₂ und 85–90 % N₂ verwendet. Der Sauerstoff dient dabei als Wasserstoffakzeptor für die respiratorische Energieproduktion (ANON. 2002).

Bezüglich der optimalen Wachstumstemperatur wird die Gattung in thermophile Arten (37°C-42°C) wie *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* und *C. upsaliensis* sowie mesophile Spezies (25°C-37°C) wie *C. fetus* und *C. sputorum* unterteilt.

Tabelle 1 gibt einige wichtige Gattungsmerkmale wieder.

Schrifttum

Tabelle 1: Einige wichtige phänotypische und biochemische Merkmale der Gattung *Campylobacter* (VOGT et al. 2001).

Merkm	Merkmalsausprägung
Färbeverhalten und Morphologie	Gram-negative Stäbchen; helikal
Kohlenhydratverwertung	nein
Sporenbildung	nein
Enzymaktivitäten:	
-Katalase	positiv
-Oxidase	positiv
-Nitratreduktase	positiv

2.3 Zellwandaufbau

Die Zellwand umschließt die Zelle vollständig und erfüllt verschiedene, für den Erreger lebenswichtige Aufgaben. Sie ist relativ rigide, um chemischer und mechanischer Belastung standzuhalten. Weiterhin werden durch sie Nährstoffe in die Zelle hinein und Abfallprodukte herausbefördert, denn eine konstante chemische Komposition innerhalb der Zelle ist wichtig (SCHLEGEL 1981).

Die Zellwand von Prokaryonten kann man nicht unter einem Lichtmikroskop erkennen, sie lässt sich aber leicht auf Dünnschnitten von Zellen unter dem Elektronenmikroskop betrachten.

Es gibt zwei große Gruppen von Bakterien: „Gram-positive“ und „Gram-negative“. Die Unterscheidung zwischen Gram-positiv und Gram-negativ basiert auf einer besonderen Färbemethode, der Gramfärbung (Abschnitt 3.2.2). Dem unterschiedlichen Färbeverhalten liegen Unterschiede in der Zellwandstruktur zugrunde.

Zellwände Gram-positiver Bakterien besitzen eine massive, dicke Peptidoglycan-Schicht (bis 40 Schichten), in die große Mengen von Teichonsäuren eingelagert sind. Zwischen Plasmamembran und Zellwand-Peptidoglycan liegt ein enger mit Periplasma gefüllter Raum, der sog. periplasmatische Spalt.

Zellwände Gram-negativer Bakterien enthalten eine nur dünnschichtige Peptidoglycan-Struktur (oft nur eine Schicht), die in ein großräumiges, sog. periplasmatisches Gel, eingebettet ist. Das Periplasma wird peripher begrenzt durch eine biologische Membran, die

Schrifttum

äußere Membran, ein Charakteristikum Gram-negativer Bakterien. Diese ist asymmetrisch aufgebaut und enthält als Besonderheit große Mengen Lipopolysaccharid (LPS), das auch als Endotoxin bezeichnet wird.

Gemeinsam ist beiden das Peptidoglykan, eine starre Schicht, die für die Stärke der Zellwand hauptverantwortlich ist. Diese Peptidoglykan (oder Murein) genannten Lagen sind dünne Schichten aus zwei Zuckerderivaten, N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure. Sie werden durch kurze Peptidketten, die aus L -Alanin, D -Alanin, D -Glutaminsäure und entweder Lysin oder Diaminopimelinsäure bestehen, vernetzt (MADIGAN et al. 2000a).

Abbildung 3 zeigt einen vereinfachten Zellwandaufbau Gram-negativer Bakterien.

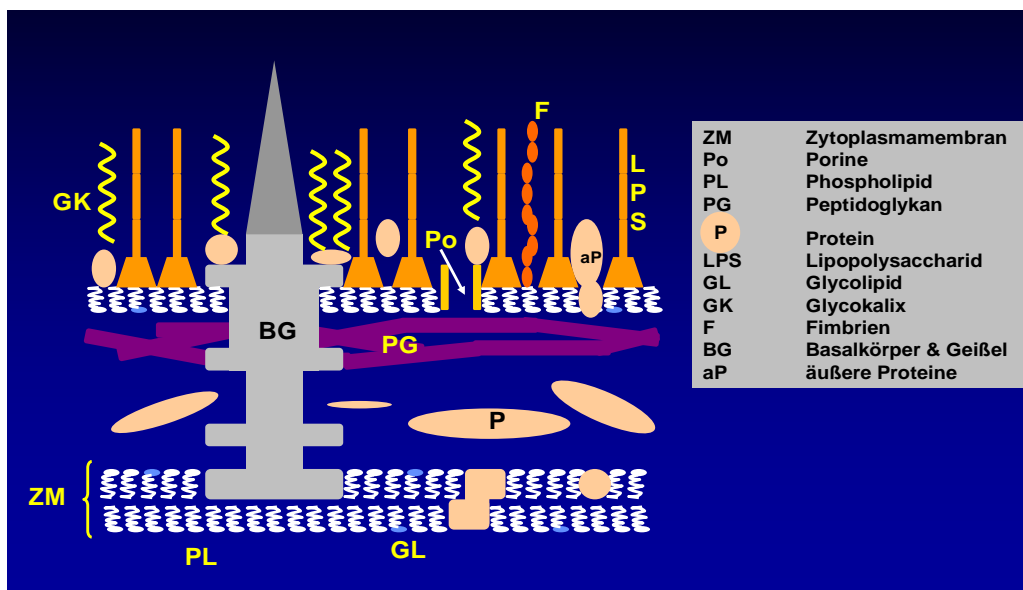


Abbildung 3: Die Zellwand Gram-negativer Bakterien. Die Lipide und Polysaccharide sind in der äußeren Schicht eng verbunden und bilden spezifische Lipopolysaccharidstrukturen. Wegen der Lipopolysaccharide wird die äußere Schicht oft Lipopolysaccharidschicht oder einfach LPS genannt.

2.4 Virulenzfaktoren

Einige der von Mikroorganismen erzeugten extrazellulären Proteine sind an der Entstehung und Aufrechterhaltung von Krankheiten beteiligt. Diese Proteine, meist Enzyme oder Toxine, werden Virulenzfaktoren genannt (MADIGAN et al. 2000c).

S-Layer:

Im Jahre 1953 berichtete HOUWINK zum ersten Mal von der Zellwand eines Bakteriums, deren Makromoleküle in einem hexagonalen Muster angeordnet waren (HOUWINK 1953).

Dies war die Entdeckung von „S-Layern“ und schien zunächst eine Kuriosität zu sein. In den folgenden Jahrzehnten wurden jedoch viele verschiedene Bakterienspezies gefunden, die einen S-Layer als äußere Zellwandkomponente besitzen. Heute wird davon ausgegangen, dass 10 bis 20% aller Bakterienspezies einen S-Layer besitzen (HOVMÖLLER et al. 1988).

Es wird vermutet, dass die S-Layer viele verschiedene Funktionen für die Zelle erfüllen, da sie häufig und bei verschiedensten Bakterienspezies vorkommen (BEVERIDGE et al. 1997). Bisher existieren jedoch nur wenige experimentelle Beweise, die die einzelnen Vermutungen stützen. Die Funktionen eines S-Layers herauszufinden, gestaltet sich schwierig, da er ein integraler Bestandteil der Zellwand ist. Seine Funktionalität kann oft nicht von der Funktionalität der anderen Zellwandbestandteile getrennt betrachtet werden.

S-Layer wurden besonders häufig bei solchen Bakterien gefunden, die in extremen Umgebungen (charakterisiert z. B. durch hohe Temperaturen oder hohe Salzkonzentrationen) überleben können. Daher wird vermutet, dass die S-Layer besonders wichtig sind, um das Bakterium vor einer unwirtlichen Umgebung zu schützen. Es ist jedoch noch unklar, wie die S-Layer das Bakterium gegen ungünstige Umgebungsbedingungen schützen.

Da die S-Layer meist die äußerste Schicht des Bakteriums bilden, sind sie hauptverantwortlich für die Eigenschaften der Oberfläche des Bakteriums und damit auch für die Adhäsion an andere Zellen.

Die Anwesenheit des S-Layers erhöht bei *Campylobacter* die Virulenz (BLASER et al. 1988; BLASER et al. 1993; PEI et al. 1990), indem der Erreger den alternativen Kom-

Schrifttum

plementweg blockiert. Der S-Layer verhindert, dass C3b an der Zelloberfläche bindet. (BLASER et al. 1987; DUBREUIL et al. 1988; DUBREUIL et al. 1990; McCOY et al. 1975; WINTER et al. 1978).

Die Funktion des klassischen Komplementweges kann ebenfalls beeinträchtigt werden, denn der S-Layer kann eine antigenetische Variation erfahren und so eine effektive Antigen-Antikörper-Bindung verhindern. Diese Eigenschaften können sich bei der Fähigkeit von *Campylobacter fetus*, langdauernd die Mukosa zu kolonisieren, als wesentlich herausstellen (WANG et al. 1993).

Lipopolysaccharide (LPS) (HAHN et al. 2001b):

Campylobacter fetus (wie alle Gram-negativen Bakterien) produziert Lipopolysaccharid - (LPS) - Moleküle mit langen Polysaccharidseitenketten (Abbildung 4).

Die Lipopolysaccharide lassen drei makromolekulare Anteile erkennen, von außen nach innen als Region I bis III bzw. als O-Antigen, Kernpolysaccharid und Lipid A bezeichnet.

Eine äußere Polysaccharidkette, bestehend aus bis zu 25 sich wiederholender Einheiten von drei bis fünf verschiedenen Zuckerbausteinen, die von Spezies zu Spezies sehr variieren können, bildet die Region I. Diese nach außen ragenden Strukturen des LPS stellen für die serologische Typisierung wichtige Antigene dar (O-Antigene).

Die O-Antigene bedingen die Oberflächen-Hydrophilie der Bakterienzelle. Sie bewirken im Wirtsorganismus die Bildung hochspezifischer Antikörper und können daher für diagnostische Zwecke genutzt werden. Bakterien, die O-Antigene besitzen, bilden in flüssigen Kulturmedien eine gleichmäßige Suspension und auf festen Kulturmedien glatte, glänzende Kolonien. Man nennt O-Antigentragende Stämme daher auch „Smooth“-Formen (S-Formen). Wenn die S-Formen durch Mutation ihre O-Antigene ganz oder partiell verlieren, so entstehen „Rough“-Formen (R-Formen). Diese Varianten exponieren neben der Kernpolysaccharidschicht das hydrophobe Lipid A. Sie wachsen in flüssigen Kulturmedien unter Aggregatbildung und bilden auf festen Kulturmedien matte, „rauhe“ Kolonien (daher der Name R-Formen).

Schrifttum

Die Unterscheidung von S- und R-Kolonien ist notwendig, um die Antigene für die Serologie herstellen zu können. Die O-Seitenketten sind potente Immunogene und stellen einen passiven Schutz gegen immunologische Effektoren, insbesondere gegen das Komplementsystem, dar. Glatte Bakterienstämme sind somit in der Regel resistent gegen die Wirkung des Komplements (sog. Serumresistenz).

Das Kernpolysaccharid ist im Gegensatz zu den O-Antigen-Seitenketten bei vielen Gram-negativen Bakterien weitgehend gleichartig aufgebaut. Es verfügt über keine bekannten biologischen Wirkungen, kann aber die Bildung von Antikörpern induzieren. Das Kernpolysaccharid (Core) besteht aus zwei Untereinheiten. Der äußere Anteil des Kernpolysaccharids baut sich bei Gram-negativen Bakterien aus Galaktose und N-Acetyl-Glucosamin auf. Das innere Kernpolysaccharid enthält als Besonderheit einen LPS-spezifischen Zucker, das KDO. Das Kernpolysaccharid ist für die Funktion der äußeren Zellmembran unentbehrlich; sein Verlust ist mit dem Leben der Gram-negativen Bakterienzelle nicht vereinbar. Es ist über das Keto desoxy oktonat (KDO) mit dem Lipidanteil des LPS, dem Lipid A, verbunden. Das Lipid A als dritter Anteil des LPS dient als Membrananker. Darüber hinaus ist es für die meisten pathophysiologischen Eigenschaften des LPS, insbesondere bei systemischen Infektionen, wie Fieber, Blutdruckabfall, Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus Makrophagen und Endothelzellen und septischen Schock verantwortlich (HAHN et al. 2001a).

Schrifttum

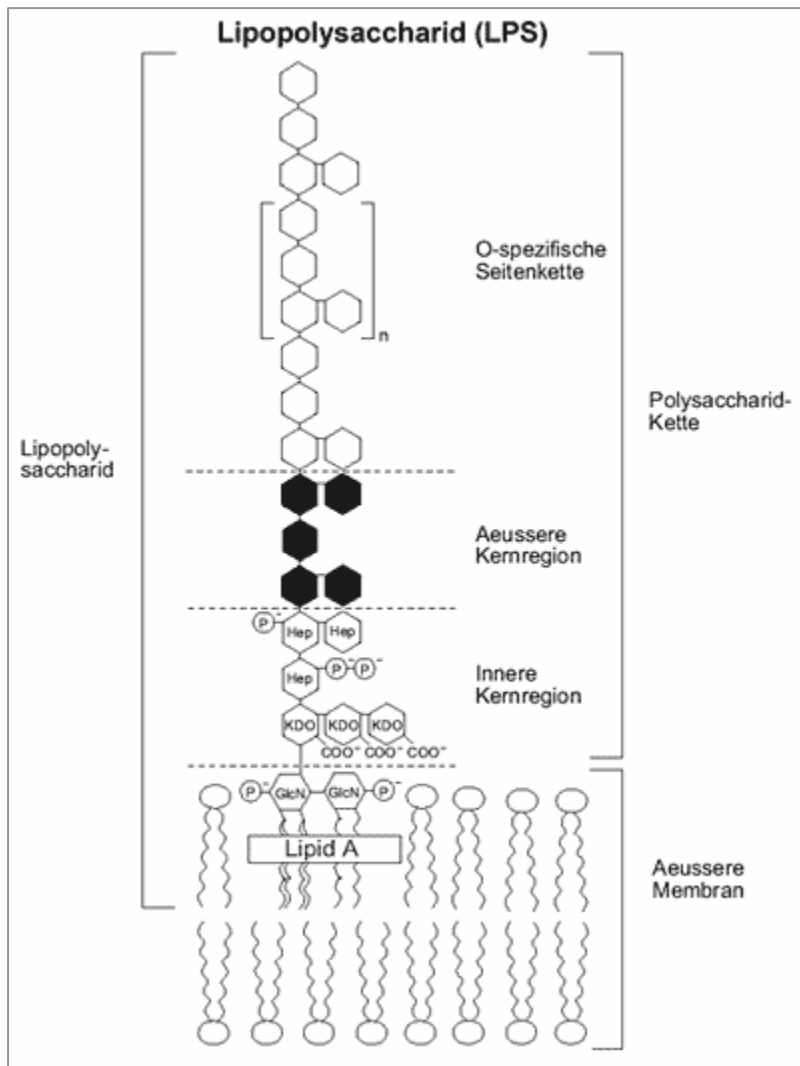


Abbildung 4: Die Struktur des Lipopolysaccharids Gram-negativer Bakterien. Die genaue chemische Zusammensetzung von Lipid A und der Polysaccharidkomponenten variiert von Spezies zu Spezies. Die Sequenz der Hauptkomponenten (Lipid A-KDO-Kern-O-spezifisch) ist aber im Allgemeinen dieselbe. Das O-spezifische Polysaccharid (O-Polysaccharid) variiert stark von Spezies zu Spezies. KDO: Ketodesoxyoctonat; Hep: Heptose; GlcN: Glucosamin; P: Phosphat (mod. nach MADIGAN et al. 2000a).

2.5 Übertragung von *C. fetus*

Kontaktinfektionen mit *C. fetus* subsp. *venerealis* können zwischen Bullen jeden Alters eintreten, wenn infizierte Tiere längere Zeit mit nicht infizierten auf engem Raum bei voller Bewegungsfreiheit gehalten werden. Das kommt z. B. in Aufzuchtstationen für Jungbullen und in Besamungsstationen vor (DEDIÉ et al. 1983).

Campylobacter fetus subsp. *venerealis* kann jedoch auch in Stroh und Dung bis zu 30 Tagen überleben. Die Überlebenszeit in gefrorenem Samen dauert mehrere Monate (ANON. 2005a).

Schmutz- und Schmierinfektionen bei Bullen in Besamungsstationen kommen vor allem über Standbullen und über Geräte bei der Samementnahme (kontaminierte künstliche Scheide und Personal) vor und können zu explosionsartiger Verbreitung der Infektion in den Stationen führen (DEDIÉ et al., 1983).

Die Erregerübertragung beim Rind erfolgt hauptsächlich durch den natürlichen Deckakt.

Da klinisch gesunde Bullen die Erreger im Samen enthalten können, besteht die Gefahr der Verbreitung dieser Krankheit auch durch künstliche Besamung mit kontaminiertem Sperma (MÜLLER et al. 2003).

Der Bulle spielt demzufolge im Infektionszyklus eine zentrale Rolle. Weibliche Tiere infizieren sich während des Deckaktes mit infizierten Bullen oder nach künstlicher Besamung mit infiziertem Sperma.

Beim natürlichen Deckakt werden die meisten (70-90%) der vorher nicht infizierten Rinder über die Keimansiedlung im Genital des Sprungtieres vom Samen und/oder durch den Kontakt mit der Penisschleimhaut und den Präputialsekreten vaginal infiziert (BIER et al. 1977).

Der *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* nahe verwandte *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* ist ein Kommensale der Darmschleimhaut beim Schaf und wird häufig aus der Gallenblase isoliert. Die Übertragung der Infektion erfolgt auf oralem Weg durch Aufnahme von Futter und Wasser, welche mit Fäzes von Ausscheidern oder mit Ausscheidungen von abortierenden Tieren kontaminiert sind. Nach einer Bakteriämie kann sich der Erreger in der Gallenblase und Darmschleimhaut oder bei trächtigen Tieren im Uterus ansiedeln, wo er Plazenta und Fötus infiziert und den Abort verursacht. Die massive Erreger-Ausscheidung beim

Abortmaterial bildet eine beträchtliche Infektionsquelle für andere Tiere.

Beim Rind kann *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* sporadische Aborte verursachen.

2.6 Klinisches Bild beim Rind

Hauptsymptome stellen Fruchtbarkeitsstörungen, Aborte und Sterilität dar.

C. fetus subsp. *venerealis* ist ein obligater Parasit des Genitaltraktes bei Rindern. Bullen sind meist lebenslang infiziert. Die Infektion ist beim Bullen ausschließlich in den Krypten der Präputialschleimhaut lokalisiert. Der Erreger kann dort über Jahre hinweg persistieren, da die lokale Immunität nicht stimuliert wird (ANON. 2002). Vibrionenhaltiges Sperma zeigt keine Abweichungen von der Norm (HUBRIG 1980).

Nach Infektion treten weder erkennbare Veränderungen am Genital noch eine Beeinträchtigung der Spermaqualität ein. Beim männlichen Tier kommt es zu verminderter Befruchtungsfähigkeit (DEDIÉ et al. 1983). Der klinische Verdacht ergibt sich aus den Symptomen bei den gedeckten Rindern.

Bei weiblichen Tieren sind geringe Veränderungen im Scheiden- und Gebärmutterbereich zu beobachten.

Leitsymptome sind 3-5maliges Umrindern, oft mit verlängertem Intervall, trüber bis eitrigem Scheidenausfluss nach dem Decken, nicht nur bei Kühen sondern auch bei Färsen, und gelegentliche Aborte. Sie treten bei frischer Verseuchung bei zahlreichen, bei chronischer Verseuchung nur bei wenigen Kühen, aber vermehrt bei Jungrindern und Färsen auf (Bild der enzootischen Sterilität; DEDIÉ et al. 1983).

2.7 Epidemiologie

C. fetus subsp. *venerealis* ist weltweit verbreitet. Die bovine genitale Campylobacteriose kann durch Handel und Verkehr verbreitet in allen Ländern auftreten, in denen Rinderzucht betrieben wird. Mit der Einführung der künstlichen Besamung ist es gelungen, diese Infektion entscheidend zurückzudrängen. Derzeit gilt die Bundesrepublik als frei von diesem Erreger. Dennoch werden sporadisch Ausbrüche festgestellt.

In Tabelle 2 ist die Anzahl der *C. fetus*- Isolate aus verschiedenen Untersuchungsämtern aus den Jahren 1999-2005 aufgeführt.

Schrifttum

Tabelle 2: Anzahl der in den Jahren 1999-2005 an das Nationale Referenzlabor für Vibrionenseuche der Rinder (Friedrich-Loeffler-Institut) eingesandten *C. fetus*-Isolate aus Verdachtsfällen der bovinen genitalen Campylobacteriose.

Jahre	Isolate	Diagnose (PCR)
1999	20	9 Isolate: <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> 11 Isolate: <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>
2000	8	7 Isolate: <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> 1 Isolate: <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>
2001	8	7 Isolate: <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> 1 Isolate: <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>
2002	10	8 Isolate: <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> 2 Isolate: <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>
2003	11	11 Isolate: <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>
2004	25	23 Isolate: <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> 2 Isolate: <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>
2005	21	16 Isolate: <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> 5 Isolate: <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>

2.8 Pathogenese

Die Infektion mit *C. fetus* subsp. *venerealis* führt beim Bullen nicht zu pathologischen Veränderungen im Genitaltrakt. Das Bakterium findet sich nur auf den äußeren Schleimhautmembranen.

Im Gegensatz zum Bullen dringen die Erreger beim weiblichen Tier tiefer in die Geschlechtswege ein. Bakteriologisch kann *C. fetus* subsp. *venerealis* in der Regel 12-14 Tage nach dem Deckakt im Uterus nachgewiesen werden. Er breitet sich über beide Uterushörner aus. In etwa 25 % der Fälle ließ er sich im Ovidukt nachweisen, in den Tuben frühestens nach 20 und spätestens nach 78 Tagen, wobei sich die Erreger noch im Uterus befanden (HUBRIG 1980).

Etwa 40–60 Tage nach der Erstinfektion wird *C. fetus* subsp. *venerealis* von den Uterushornspitzen her in Richtung Vagina eliminiert. In Zervix und Vagina hält sich *C. fetus*

subsp. *venerealis* weitaus länger (HUBRIG 1980). Durch die Bildung von Immunglobulinen (hauptsächlich IgG und auch IgA), etwa ab der 7. Woche nach der Infektion wird dann ein aktiver Selbstreinigungsprozess, von den Uterushörnern beginnend und zur Vagina hin fortschreitend, in Gang gesetzt, wobei Zervix und Vagina bis zum 10. Monat nach der Infektion infiziert bleiben können (FLORENT et al. 1958; SCHURIG et al. 1975; SCHURIG et al. 1978).

Campylobacter fetus subsp. *venerealis* verursacht eine milde katarrhalisch-eitrige Endometritis. Die Ursache der Unfruchtbarkeit nach erfolgreicher Konzeption liegt im frühen Absterben der Embryonen (2–3 Wochen alt), welche resorbiert oder unbemerkt abgestoßen werden (ANON. 2002).

Nach Abklingen der Infektion baut sich eine lokale Immunität auf, die 2 bis 3 Jahre anhält (HUBRIG 1980).

2.9 Die Diagnose der *Campylobacteriosis genitalis*

Zur Diagnose kann man sowohl traditionelle mikrobiologische Methoden als auch molekularbiologische Methoden verwenden.

Jedoch ist die Abgrenzung der beiden *C. fetus*-Subspezies allein mit konventionellen Methoden problematisch, da sie im Wesentlichen auf nur zwei Reaktionen beruhen, der Glycintoleranz und der Na-Selenit-Reduktion. Neue Untersuchungen zeigten, dass nur die unter streng standardisierten Bedingungen durchgeführten Tests zur Glycintoleranz eine eindeutige Zuordnung zu den beiden *C. fetus*-Subspezies gestatten (SCHULZE et al. 2006). Die phänotypische Charakterisierung der Erreger erfolgt nach den in Tabelle 3 aufgeführten kulturellen und biochemischen Merkmalen. Als Alternativen zu den traditionellen mikrobiologischen wurden in den letzten Jahren molekularbiologische Methoden für eine sichere Diagnostik eingeführt.

Der Erregernachweis kann kulturell aus Präputialschleimhaut-Abstrichen, Präputial-Spülproben oder Spülproben aus der künstlichen Scheide, bei weiblichen Tieren aus Tupferproben von Zervix, Vagina oder aus Vaginal-Spülproben erfolgen. Die Isolierung des Erregers wird dadurch erschwert, dass dieser auf Sauerstoff und Austrocknung sehr empfindlich reagiert. In Feten mit Eihäuten übersteht der Erreger einen Transport von 24-36 Stunden, ist am sichersten anzüchtbar und relativ wenig verunreinigt. Die Untersuchungsämter geben für

Schrifttum

Spülproben eine Thioglykolatlösung ab, die nur etwa 2 Wochen haltbar ist. Das Thioglykolat-Medium schafft ein reduzierendes Milieu und ist daher zur Kultivierung vom sauerstoffempfindlichen (anaeroben/mikroaerophilen) Erregern geeignet. Wegen der Gefahr der Kontamination müssen diese Proben bei etwa 15°C gehalten und dürfen nicht länger als 6 - 8 Stunden transportiert werden (DEDIÉ et al. 1983).

Niedrige Konzentrationen von *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in den Samenproben, und/oder das Vorhandensein von Antibiotika können jedoch dazu führen, dass das Wachstum der *Campylobacter*-Organismen in der Kultur gehemmt wird (EAGLESOME et al. 1995), auch wenn die Probenentnahme und die Transportbedingungen nach den Erfordernissen des Erregers erfolgt sind.

2.9.1 Differenzialdiagnostik (DEDIÉ et al. 1983)

Die Abgrenzung einer bestimmten Krankheit von Erkrankungen mit ähnlicher oder übereinstimmender Symptomatik aber anderer Ursache ist die Aufgabe der Differenzialdiagnostik, die mit möglichst geringem Aufwand sichere Diagnosen-Ausschlüsse erzielen soll.

Zum Beispiel hat die Trichomoniasis einen ähnlichen klinischen Verlauf wie Campylobacteriosen. Der Vorbericht gibt jedoch Hinweise auf eine Campylobacteriose z. B. bei Vorliegen verlängerter Brunstintervalle. Die eindeutige Differenzierung erfordert jedoch Laboruntersuchungen (BOLLWEIN 2005).

In größeren Deckgemeinschaften ist die Trichomonadenseuche durch Nachweis von Trichomonaden in Spülproben oder Pyometrainhalt abzugrenzen. Zu den klinisch bedeutsamen Angehörigen dieser Gruppe gehört die Spezies *Trichomonas fetus*, der Erreger der Trichomonadenseuche des Rindes. Der Erreger wird ebenfalls beim Deckakt übertragen. Während die Infektion beim Bullen in der Regel asymptomatisch verläuft, kann sie bei Kühen zu Vaginitis, Endometritis und Aborten führen. Bullen spielen eine bedeutende Rolle bei der Übertragung der Trichomonaden, da sie lebenslang Träger und Ausscheider des Parasiten sein können.

Andere spezifische Erkrankungen wie Q-Fieber, IBR/IPV oder Brucellose sind serologisch nachweisbar, aber Mischinfektionen mit *Campylobacter* oder Antikörper-Titer ohne Nachweis von Erregern können vorkommen.

Schrifttum

Als Hauptreservoir von Q-Fieber gelten Wiederkäuer, insbesondere Rinder, Schafe und Ziegen. Die Infektion mit *Coxiella burnetii* führt selten zu einer manifesten Erkrankung, ist aber vor allem bei Rindern mit Aborten, Fruchtbarkeitsstörungen und Metritiden verbunden.

Die BHV-I (bovines Herpesvirus I)-Infektion, eine hochkontagiöse virale Erkrankung der Rinder und anderer Boviden, verläuft meist akut. Sie manifestiert sich unter dem Krankheitsbild der infektiösen bovinen Rhinotracheitis (IBR; respiratorische Form im oberen Respirationstrakt mit Rhinitis und Tracheitis als häufigster Form) oder der infektiösen pustulösen Vulvo-Vaginitis und infektiösen Balanoposthitis (IPV/IBP; genitale Form als Deckseuche). Bei der genitalen Form bleibt die Infektion in der Regel auf die Vaginal- und Präputialschleimhaut begrenzt. Eine Virämie tritt selten ein. Respiratorische Erscheinungen werden dabei nur äußerst selten beobachtet. Das bovine Herpesvirus I kann bei trächtigen Rindern die Plazenta passieren; Infektionen des Fötus mit nachfolgendem Abort sind deshalb möglich. Das Intervall zwischen Infektion und Abort kann 8 Tage bis zu einigen Monaten betragen.

Die Rinder-Brucellose (*Brucella abortus*) gilt in vielen europäischen Ländern, in Australien, Neuseeland und z.T. in USA sogar als ausgerottet. Aus Afrika, Lateinamerika und Asien wird die Prävalenz unterschiedlich von niedrig bis hoch gemeldet (ANON. 2005b). In Deutschland gelten die Rinderbestände sowie die Schaf- und Ziegenbestände als amtlich frei von *Brucella abortus* bzw. *Brucella melitensis*. Auftretende Erkrankungsfälle bei Tieren sind daher durch Tierhandel importiert oder von Wildtieren auf Nutztiere übertragen (STEFFENS et al. 2005).

Die Brucellose bei Wiederkäuern wird auch als enzootischer Abort bezeichnet, weil als Hauptsymptome Aborte, Frühgeburten oder die Geburt toter, lebensschwacher und unterentwickelter Tiere zu beobachten sind.

Bei unspezifischen Fruchtbarkeitsstörungen spielen Stoffwechselbelastungen, mangelnde Geburtshygiene, falscher Besamungszeitpunkt, Spermamängel, unspezifische Infektionen oder Managementfehler eine Rolle. Auch ungenügende Mineral- und Vitaminversorgung und Fütterungsungleichgewicht schwächen das Immunsystem und können die Basis für Infektionen aller Art sein. Selbst beim Nachweis spezifischer Erreger wie *C. fetus* subsp. *venerealis* ist an unspezifische Ursachen zu denken. Während bei unspezifischen Ursachen nur einzelne Bestände über schlechte Fruchtbarkeit klagen, sind bei *C. fetus*-Infektionen meist in ganzen Deckgemeinschaften mehr oder weniger alle Rinderhalter betroffen.

2.9.2 Biochemische Differenzierung

Spezielle biochemische Reaktionen bei der Kultivierung erlauben bei der Mehrzahl der Stämme eine relativ sichere Unterscheidung auf Spezies- oder Gattungsebene. In Einzelfällen kann es Stämme geben, die durch abweichende Reaktionen nicht sicher einzuordnen sind (BISPING et al. 2000).

H₂S-Nachweis

Werden schwefelhaltige Aminosäuren durch Proteasen gespalten, so entsteht Schwefelwasserstoff, der z. B. mit Bleiacetat einen schwarzen Niederschlag (PbS), ergibt. Der Nachweis kann über entsprechende Verbindungen im Nährmedium oder empfindlicher, durch Einbringen mit Bleiacetat getränkter Papierstreifen in den Luftraum über dem Nährboden nachgewiesen werden. Da die Schwefelwasserstoffbildung nicht allein von der Bakterienart, sondern auch weitgehend von der Nährbodenzusammensetzung abhängig ist, muss man, um zu vergleichbaren Ergebnissen zu kommen, immer das gleiche Nährmedium verwenden (OTTE 1960).

Nachweis der Natrium-Selenit-Reduktase

Über die Fähigkeit von *Campylobacter*-Spezies, Na-Selenit zu reduzieren, berichteten BRYANS und SMITH (1960) zum ersten Mal. Sie fanden Stämme, welche Selenit reduzierten, während Schwefelwasserstoffbildung nicht nachweisbar war. Andererseits hielten sie die Reduktion dieses Substrates für kein nützliches Unterscheidungsmerkmal von *Campylobacter*-Kulturen, sondern sahen in der Toleranz eine Selektionsmethode für nicht pathogene Erreger.

C. fetus subsp. *venerealis* war zur Na-Selenit-Reduktion nicht in der Lage (SMIBERT 1974). Allerdings gibt es innerhalb dieser Subspezies auch einige Stämme, die diese Fähigkeit besitzen (BISPING 1979 u. HAWARI 1979). Diese Stämme gehörten zu *C. fetus* subsp. *venerealis* Biotyp *intermedius* (VÉRON u. CHATELAIN 1973).

BLUMENSCHNEIN (1980) nahm die Zuordnung zu *C. fetus* subsp. *venerealis* nach BERG et al. (1971) auch auf Grund der Selenit-Reduktion vor.

Schrifttum

DEKEYSER et al. zeigten 1972, dass die „Related Vibrios“ 0,1 % Selenit in festen Nährböden tolerierten und reduzierten. SMIBERT (1974) beschrieb dasselbe Verhalten für *C. fetus* subsp. *jejuni* und VÉRON und CHATELAIN (1973) ebenfalls für *C. jejuni* und *C. coli*.

SKIRROW und BENJAMIN (1980) zeigten die Abhängigkeit der Reaktion von der eingesetzten Testmethode. Sie arbeiteten mit Selenit-getränkten Papierblättchen („discs“). Auf Thioglykolatagar zeigten Stämme von *C. fetus* subsp. *fetus* eine deutliche Reaktion; bei einer Wiederholung auf einem Agar mit einem Eisen-Bisulfit-Pyruvat-Supplement nach GEORGE et al. (1978) war das Ergebnis sehr viel weniger deutlich bzw. die Stämme reagierten negativ. *C. fetus* subsp. *fetus* besaß aber auch auf Thioglykolatagar eine geringere Aktivität als die *C.-jejuni/C.-coli*-Gruppe.

Nachweis der Glycintoleranz

LECCE (1958) untersuchte den Einfluss von 0,9 % Glycin auf das Wachstum von *C. fetus*.

FLORENT (1959) traf unter anderem durch Unterschiede bei der Glycintoleranz die Einteilung in *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, der empfindlich gegen 1 % Glycin war, und in *Campylobacter fetus* subsp. *intestinalis* (heute *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*), welcher bei dieser Konzentration wuchs.

BRYNEN (1962) trennte auch auf Grund der Glycintoleranz *Campylobacter fetus* in Typ I, Subtyp I und Typ II, von denen der letztere ebenso wie *Campylobacter bubulus* 1 % Glycin tolerierte.

DEDIÉ, POHL und REISSHAUER fanden 1977 in Süddeutschland Stämme von *C. fetus* subsp. *fetus*, welche Glycin tolerierten. Nach ihren Untersuchungen ist die Glycintoleranz ein rein quantitatives Merkmal.

C. fetus subsp. *fetus*, *C. jejuni*, *C. coli* und *C. fecalis* tolerieren den Zusatz von 1 % Glycin (SMIBERT 1974, 1978; VÉRON u. CHATELAIN 1973).

Temperaturtoleranz

Das Wachstum von *Campylobacter* bei verschiedenen Temperaturen wurde zum ersten Mal 1957 von KING untersucht. *C. fetus* und *C. bubulus* wuchsen bei 25°C-37°C, dagegen

Schrifttum

nicht bei 42°C. Auf Grund der H₂S-Bildung und des Temperaturverhaltens wurde eine Trennung in die Spezies *C. fetus* und *C. bubulus* vorgenommen. Diese Untersuchungen wurden von WHITE (1967) und DEKEYSER et al. (1972) bestätigt.

C. fetus subsp. *fetus* und *C. fetus* subsp. *venerealis* wuchsen nach VÉRON und CHATELAIN (1973) nur bei 25°C - 37°C und nicht bei 42°C, dagegen berichtete SMIBERT (1974) über einige Stämme von *C. fetus* subsp. *fetus*, welche 42°C tolerierten.

C. jejuni und *C. coli* wachsen dagegen bei 37°C - 42°C, nicht aber bei 25°C (VÉRON u. CHATELAIN 1973; SMIBERT 1974, 1978). Das gleiche Verhalten zeigt *C. fecalis* (SMIBERT 1978; AL-MASHAT u. TAYLOR 1981).

Daneben wurden häufig leicht abgeänderte Temperaturen eingesetzt:

WEBER et al. (1981) testeten *C. jejuni* bei 42°C (positiv) und 28°C (negativ); TAYLOR et al. (1981) untersuchten *C. coli* bei 42°C und 44°C (positiv) und 25°C (negativ).

2.9.2.1 Bestimmung der Bakterienzahl (MADIGAN et al. 2000)

Die Bakterienmasse lebender *Campylobacter*-Kulturen wurde über die Kolonienzahl bestimmt. Die Bakterienkonzentration wurde in koloniebildenden Einheiten pro Milliliter (KbE/ml) angegeben. Bei hoher Ausgangskonzentration empfiehlt sich die Anfertigung einer Verdünnungsreihe, damit sich nicht zu viele Kolonien auf den Platten entwickeln. Sind die Platten zu dicht bewachsen, ist ein Auszählen der Kolonien nur fehlerhaft möglich. Andererseits ist es entscheidend, dass die Anzahl der Kolonien groß genug ist, damit die Zählung statistisch signifikant ist. Das Verfahren, das am besten geeignet ist, besteht darin, nur Platten auszuzählen, die zwischen 30 und 300 Kolonien aufweisen.

In der Regel setzt man eine dekadische Verdünnungsreihe an und plattiert mehrere Zehnerverdünnungen der Probe aus (Abbildung 5).

Schrifttum

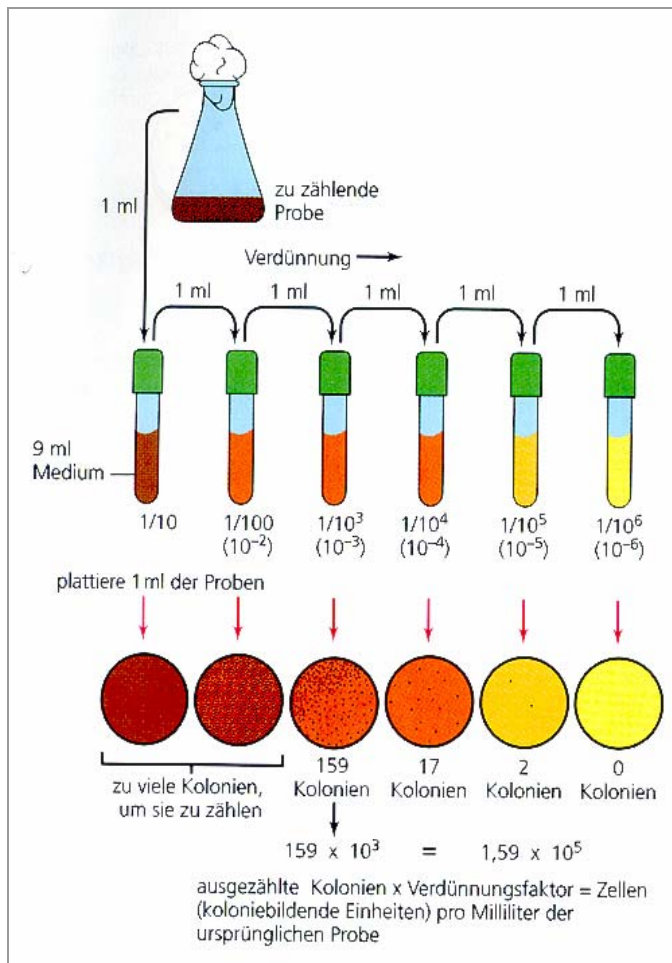


Abbildung 5: Bestimmung der Lebendzellzahl durch eine Verdünnungsreihe der Probe (MADIGAN et. al. 2000d).

2.9.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Labormethode zum Nachweis von bestimmten DNS-Abschnitten im Genom.

Sie erlaubt eine schnelle und selektive Vervielfältigung der gewünschten Nukleinsäuresequenzen. Die Reaktion besteht aus einem zyklisch ablaufenden Prozess, der sich aus drei Schritten zusammensetzt:

- Auftrennen der doppelsträngigen Nukleinsäure
- Anlagerung von Oligonukleotiden (Primer) an die komplementäre Zielsequenz
- Zweitstrangsynthese durch eine thermostabile DNS-Polymerase beginnend vom Primer aus.

Schrifttum

Die DNS liegt normalerweise doppelsträngig vor und wird zu Beginn des Prozesses durch Erhitzen auf $> 90^{\circ}\text{C}$ in Einzelstränge getrennt (BUSCH 2004). Oligonukleotid-Primer sind kurze spezifische, einzelsträngige Moleküle, die den Startpunkt für die angestrebte Neubildung der gewünschten DNS-Stücke bilden. Voraussetzung für eine Elongation ist die vorherige Senkung der Temperatur auf 37°C - 60°C je nach Zusammensetzung und Passgenauigkeit der Primer. Dadurch wird die Bindung der Oligonukleotid-Primer an ihre Zielsequenzen („Annealing“ oder Hybridisierung) ermöglicht. Durch die Elongation werden die (vorher gebildeten) DNS-Einzelstränge komplettiert, sodass ein neuer spezifischer DNS-Doppelstrang entsteht. Die Annealing-Temperatur bestimmt entscheidend über die Spezifität einer PCR.

Der erste Primer (Vorwärts-Primer) bindet an die komplementären Sequenzen des einen DNS-Stranges, der andere Primer (Rückwärts-Primer) in definierter Entfernung am Gegenstrang, ebenfalls an seiner komplementären Sequenz. Die Primer markieren den Beginn bzw. das Ende der gewählten Sequenz.

Mit Hilfe des Enzyms DNS-Polymerase wird der jeweils komplementäre DNS-Strang aufgebaut (Elongation oder Synthese). Der derart gebildete Doppelstrang wird durch Erhöhung der Temperatur auf $> 90^{\circ}\text{C}$ wieder getrennt. Damit sind die Bindungsstellen für die Primer erneut frei und der Vorgang kann nach dem Absinken der Temperatur von neuem starten (BUSCH 2004).

Der ganze Zyklus (Erhitzen zur Trennung der Stränge, Binden der Primer und Kettenverlängerung) wird etwa 30-40 mal wiederholt, damit genügend PCR-Produkt entsteht, um es durch Ethidiumbromid-Färbung im Agarosegel nachweisen zu können.

Ethidiumbromid interkaliert mit dem gebildeten DNS-Doppelstrang. Das bedeutet, Ethidiumbromid lagert sich zwischen beide Stränge der DNS ein und kann im UV-Licht als fluoreszierende Bande nachgewiesen werden.

Die PCR bietet mit dem Einsatz einer thermostabilen DNS-Polymerase die Möglichkeit, zusammen mit allen anderen Komponenten (DNS-Matrize, Oligonukleotide, dNTPs etc.) die gesamte Amplifikation (Vervielfältigung) in einem Reaktionsgefäß durchzuführen.

In dieser Arbeit wird ein Verfahren zum spezifischen Nachweis von *Campylobacter fetus* sowie zur Differenzierung der Subspezies *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* und *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* beschrieben.

2.10 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) ist eine Methode zur molekularen Differenzierung verschiedener Stämme einer Spezies und kann bei allen Bakterien-Spezies angewandt werden.

Beim Vergleich von Bakterien-Isolaten wird das gesamte Genom einbezogen. Dabei wird es durch eine Restriktionsendonuklease (DNS-schneidendes Enzym) in Fragmente geschnitten und diese können elektrophoretisch nach Größe getrennt werden. Die Größe und die Anzahl der Fragmente werden verglichen und daraus der Grad der Verwandtschaft verschiedener Isolate ermittelt.

Vor der Einführung der PFGE durch SCHWARTZ und CANTOR im Jahr 1984 war eine Auftrennung von DNS-Fragmenten nur bis zu einer Größe von 50 kB möglich. Größere Fragmente zeigen bei der konventionellen Agarose-Gel-Elektrophorese eine gleiche Wanderungsgeschwindigkeit und können nicht aufgetrennt werden. Daher war es nicht möglich, das gesamte Genom von Bakterien, das zwischen 0,8 und ca. 4,5 Millionen Basenpaare (4500 kB) umfasst, aufzutrennen, sondern nur winzige Bruchstücke davon. Weiterhin war man nicht in der Lage, intakte DNS eines vollständigen Chromosoms zu verarbeiten, die aufgrund der Scherkräfte, die beim Pipettieren und Zentrifugieren auf die langen DNS-Moleküle wirken, in unzählige kleine Fragmente zerfallen.

Mit Hilfe der PFGE konnten in der Vergangenheit regionale Häufungen von Ausbrüchen epidemiologisch aufgeklärt und eine Langzeitanalyse der Erregerdynamik durchgeführt werden (TSCHÄPE u. PRAGER 2003).

Das Problem der auftretenden Scherkräfte wurde bewältigt, indem intakte Bakterien in Gelblöckchen (Inserts) eingegossen wurden und alle Verdauungsschritte in diesen durchgeführt wurden. In die Inserts eingebettet, ist die DNS vor Scherkräften geschützt.

Die Auftrennung von DNS-Fragmenten einer Länge zwischen 50–2000 kB wurde durch die Anwendung von gepulsten elektrischen Feldern anstelle der konventionellen homogenen Felder erreicht. Gepulste Felder sind elektrische Felder, die ihre Orientierung regelmäßig nach einem bestimmten Intervall (Pulszeit) verändern. Die DNS-Fragmente werden nach jedem Wechsel des Feldes neu orientiert und können erst dann ihre Wanderung fortsetzen. Kürzere Fragmente erreichen die neue Orientierung schneller als lange und wandern daher

Schrifttum

schneller, wodurch es zu einer Auftrennung kommt. Durch Variation der Pulszeiten kann das Optimum an Trennung von Fragmenten verschiedener Größe erreicht werden.

Um verschiedene Fragmente zu gewinnen, ist es notwendig, ein intaktes Chromosom mittels einer Restriktionsendonuklease in Bruchstücke zu zerlegen. Je nach Anzahl der Erkennungssequenzen für das Enzym erlangt man zwischen 5 und 20 Fragmente, die nach der Wanderung im Gel und Färbung in Ethidiumbromid unter UV-Licht als Banden sichtbar werden.

In Abbildung 6 sind die methodischen Schritte zur Vorbereitung und Durchführung der PFGE schematisch dargestellt.

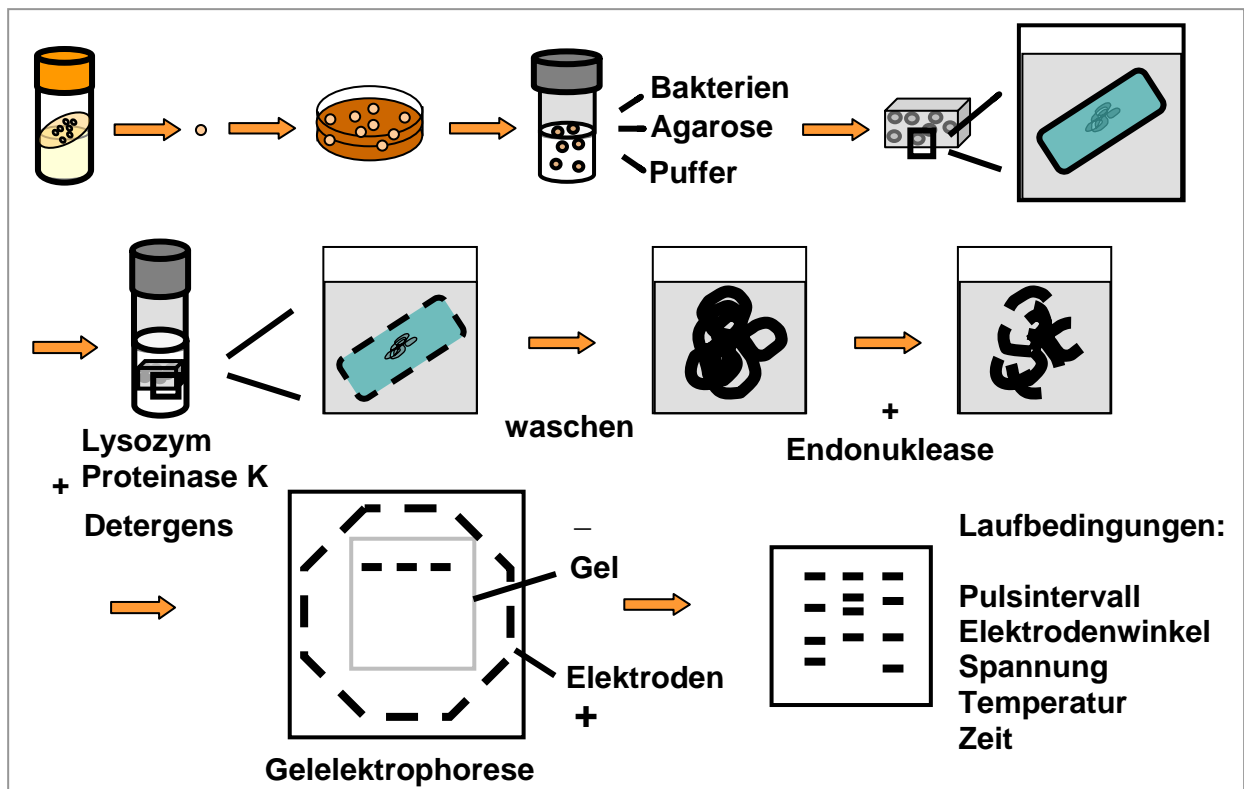


Abbildung 6: Vereinfachtes Methodendiagramm für Pulsfeld-Gelelektrophorese.

2.11 Therapie und Prophylaxe

Eine Therapie *Campylobacter*-infizierter Tiere mit Antibiotika ist möglich, aber nicht immer erfolgreich. Die antibiotische Behandlung infizierter Bullen kann zu Rückfällen führen (PARVANTA 1999; DEDIÉ et al. 1982).

C. fetus subsp. *venerealis* ist empfindlich gegen Tetracykline, Chloramphenicol, Aminoglycosid-Antibiotika (Streptomycin, Neomycin) und Makrolid-Antibiotika (Erythromycin). Es ist empfehlenswert, die lokale Behandlung durch eine parenterale Behandlung zu unterstützen. Während die Antibiotika-Behandlung bei weiblichen Tieren nur geringen Erfolg bringt, werden mit einer sorgfältigen lokalen und allgemeinen Behandlung beim Bullen gute Resultate erzielt. Problematisch bleibt allerdings die Vermeidung von Reinfektionen.

Antibiotika werden nach Vorgaben der EU-Samenrichtlinie 88/407 dem Sperma-Verdünner zugesetzt (ANON. 2002).

Bei Zusatz von 0,5 g/l Streptomycin zum Eidotter-Citratverdünner und einer Einwirkungszeit von 6 Stunden bei mindestens 5°C lässt sich die Häufigkeit von Übertragungen mit Besamungssperma von infizierten Bullen deutlich reduzieren (DEDIÉ et al. 1982).

Die aktive Immunisierung mit einer abgetöteten Adjuvans-Vakzine kann prophylaktisch wirken und wird vor allem beim Bullen, in Kombination mit einer Antibiotika-Behandlung (z.B. Erythromycin) angewandt. Sie schützt auch gegen eine Reinfektion (ANON. 2002). „Adjuvans-Vakzine“ ist eine Sammelbezeichnung für alle Vakzinen, bei denen das inaktivierte Antigen bzw. Immunogen an ein Adjuvans gebunden ist. Dadurch wird der erste Schritt der Immunreaktion, die Wechselwirkung zwischen Antigen und Gewebemakrophagen, unterstützt, was zu einer Aktivierung und Stimulierung des immunogenen Effekts führt.

Wichtig ist die systematische Überwachung und Bekämpfung der Infektion in Besamungsstationen zur weitgehenden Sicherstellung des Status seuchenfreier Herden.

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial

Das Untersuchungsmaterial muss am Tag der Entnahme bakteriologisch angelegt werden (möglichst innerhalb von 4 h), da sonst mit dem Absterben von *Campylobacter fetus* zu rechnen ist.

Der Erregernachweis kann kulturell aus Präputialspülproben oder Spülproben aus der künstlichen Scheide, bei weiblichen Tieren aus Tupferproben von Zervix, Vagina oder aus Vaginalspülproben erfolgen.

Präputialspülproben sind im allgemeinen geeigneter für die Untersuchung als Samenproben, da in ihnen die Organismen in höheren Konzentrationen vorkommen (SCHRÖDER 1980).

50-100 ml einer Spülflüssigkeit wurden mit Spritze und Schlauch in den Präputialsack gedrückt und dort längere Zeit mit mindestens 30-60 Massagebewegungen verteilt, so dass die Flüssigkeit danach milchig-trüb abläuft. Man kann auch direkt Schleim von der Präputialschleimhaut entnehmen oder die Penisschleimhaut abschaben. Keimfreies Gerät ist notwendig. Die Verlässlichkeit der Spülprobenergebnisse hängt von der Keimzahl im Präputialsack, der Sorgfalt bei Entnahme und Transport sowie der Technik des Untersuchungslabors ab.

Die Entnahme von Vaginalschleimproben zum Erregernachweis erfolgt am besten bis zu 10 Tage nach dem Decken oder bei erstmals infizierten Tieren während der nächsten Brunst. Sterile Seminetten werden tief eingeführt, Schleim aus dem zervikalen Bereich angesogen und die unter Vermeidung von Verschmutzung vorsichtig herausgezogenen Seminetten mit Klebeband verschlossen. Sie sind vor Sonnenlicht und Erwärmung zu schützen, dürfen nicht gekühlt werden, sollen bei ungefähr 15°C transportiert und innerhalb 6-8 Stunden untersucht werden (DEDIÉ et al. 1983).

Material und Methode

Zusammensetzung der Präputialspülflüssigkeit

1000 ml Aqua dest.

2,0 g Hefeextrakt (Merck™ 103753)

5,0 g Pepton aus Casein (Merck™ 107213)

1,0 g Natriumthioglykolat (Merck™ 6691)

2,5 g Natriumchlorid (Merck™ 106400)

0,25 g L-Cystin (in Lauge lösen) (Merck™ 2836)

- Zutaten außer Cystin lassen sich bei Zimmertemperatur in Aqua dest. lösen
- Cystin in 10 ml 1N Natronlauge lösen und dem restlichen Ansatz zugeben
- pH-Wert einstellen (7,2-7,4)
- Abfüllen in Fläschchen zu 80 ml
- Autoklavieren bei 121°C 10 Min

Haltbarkeit: bei +2°C bis +8°C ⇒ 8 Wochen

3.2 Mikrobiologische Methode

Geräte:

- Anaerobiergefäße bzw. Anaerobiertöpfe
- Bleiacetatstreifen (z.B. Fa. Merck™, Art. Nr. 9511)
- Brutschränke 37°C, 25°C, 42°C
- Brutschrank mit mikroaerophiler N₂/CO₂-Atmosphäre
- Bunsenbrenner
- Cephalotin-Testplättchen (30 µg)
- Dr. Lange Cadas 30 Photometer (588 nm)
- Desinfektionsmittel (Flächen/Geräte/Haut)
- Einweghandschuhe
- Gerät zum Herstellen des mikroaeroben Gasgemisches
- Glashomogenisator, 10 ml, steril
- Glasspritzen, 10 ml, steril

Material und Methode

- Kollodiumhülsen (z.B. Fa. SartoriusTM, Art. Nr. SM 13200)
- Kühlschrank
- Markierstift
- Membranfilter 0,65 µm Porendurchmesser (z.B. Fa. Schleicher & SchuellTM, Art.-Nr. ST68)
- Nalidixinsäure-Testplättchen (30 µg)
- Impföse
- pH-Meter
- Photometer
- Pipetten, 1ml, 5 ml, steril
- Reagenzglas, (10 ml), steril
- Reagenzglasständer
- Schere und Pinzette
- Schüttler (Vortex)
- Sicherheitswerkbank
- Spatel
- Tesa-Film
- Zentrifuge
- Zentrifugengläser, 50 ml

Materialien:

- Äthanol
- Columbia A-Platten ("COL A") (MerckTM 1.10455)
- Columbia B-Platten ("COL B") (MerckTM 1. 10455)
- Destilliertes Wasser
- 0,85 %-ige NaCl, steril
- Katalasereagenz (z.B. Fa. Bio MerieuxTM, Art.-Nr. 55 561)
- L-Cystin
- Leber-Leber-Bouillon
- Müller-Hinton-Blut
- NaOH
- Na-Selenit

Material und Methode

- Phenol liquid (z.B. Fa. Riedel-de HaenTM, Art.-Nr. 16018)
- Spülflüssigkeit
- Thioglykolat-Medium (DifcoTM 0256-17-2)
- Thioglykolat-Medium mit 1 % Glycin (MerckTM 4201)
- Thioglykolat-Medium mit 3,5 % NaCl (MerckTM 106400)

3.2.1 Kultur

Für die kulturelle Isolierung (SCHRÖDER 1980; KÖTSCHE 1993; RAHM et al. 1999) wurden die Präputialspülproben in Zentrifugengläser gefüllt und für 10 min bei 200 g zentrifugiert. Vom Überstand wurde mit einer sterilen Öse ein Tropfen auf eine Nährbodenplatte Columbia A (Col A) überführt und ausgestrichen. Weiterhin wurden von dem Überstand 5 ml in einer sterilen Spritze aufgezogen. Die Spritze wurde mit einem sterilen Milliporfilter der Porengröße 0,65 µm versehen und der Überstand durch diesen Filter gedrückt. Sodann wurden jeweils 3 Tropfen filtrierte Spülprobenmaterials auf Blutagar Columbia B (Col B) ausgestrichen.

Spermaproben wurden direkt auf je zwei Festnährmedien (Col A und Col B) aufgebracht.

Organmaterial von Feten (Leber, Lunge, Labmagen) wurde nach steriler Entnahme und Abflammen auf zwei Nährbodenplatten (Col A und Col B) direkt ausgestrichen.

Als Nährböden können Columbia A und Columbia B verwendet werden. Die Basisnährböden bestehen jeweils aus Columbia–Agar–Basis. Durch Zusatz von *Campylobacter*–Selektiv–Supplement nach SKIRROW (1977) erhält man Col A, durch den Zusatz von Brillantgrünlösung (nicht nur Indikator, sondern auch zur selektiven Anreicherung) Col B. Die verschiedenen Selektivnährböden unterscheiden sich in ihrer Hemmstoffzusammensetzung. So enthält das Skirrow–Selektiv–Supplement Polymyxin B, Vancomycin sowie Trimethoprim.

Die Agarplatten wurden bei 37°C in mikroaerophiler Atmosphäre in einem Gasgemisch (Campy GenTM- OXOID) aus 85% N₂, 10% CO₂ und 5% O₂ in luftdichten Gefäßen für 5 Tage inkubiert.

Material und Methoden

Der Erreger bildet flache, leicht konvexe, glatte, mitunter glänzende Kolonien, die auf feuchtem Agar zu Schwärmverhalten neigen. Unter dem Stereomikroskop erscheinen entsprechende Kolonien fein granuliert.

3.2.2 Gramfärbung

Die Gramfärbung ist die wichtigste komplexe Färbung in der medizinischen Mikrobiologie. Sie ist der erste Schritt zur Identifizierung von Bakterien (MIKSITS et al. 2001).

Zunächst erfolgt die Färbung mit Gentiana-Violett oder Kristallviolett (2 min) und, nach Abgießen der Farbe, Beizung mit Jod-Jodkalium-Lösung (Lugol; 2 min). Nach Abspülen der Lösung wird die Entfärbung mit Alkohol (Ethanol 96%) angeschlossen (ca. 1 min, bis sich kein Farbstoff mehr löst). Der Alkohol wird mit Wasser entfernt, und es folgt die Gegenfärbung der entfärbten Bakterien mit Fuchsin oder Safranin (1 min) (MIKSITS et al. 2001).

Die Gram-positiven Bakterien heißen deshalb so, weil sie den zuerst aufgebrauchten violetten Farbstoff (Kristallviolett) behalten und daher violett gefärbt sind. Die Gram-negativen Bakterien werden bei Behandlung mit Lugol-Lösung und Ethanol entfärbt und können dann mit einem roten Farbstoff (Fuchsin oder Safranin) erneut gefärbt werden.

Die Ursache dieses unterschiedlichen Färbeverhaltens liegt im Aufbau der bakteriellen Zellwände begründet (IBELGAUFTS 1990).

Unter dem Mikroskop erscheinen Gram-positive Keime blau bis dunkelviolett, Gram-negative hellrot.

Zur Auswertung des Wachstums auf den Nährböden wurden von allen verdächtigen Kolonien Gramfärbungen angefertigt. Zeigte ein Präparat im mikroskopischen Bild Gram-negative Mikroorganismen mit der für *C. fetus* typischen kommaförmig gekrümmten Morphologie, so wurde von der betreffenden Kolonie eine Subkultur angelegt. Die Subkultur wurde für 3 Tage bebrütet und danach auf ihre Katalaseaktivität untersucht.

Material und Methoden

3.2.3 Biochemisch-kulturelle Differenzierung

3.2.3.1 Biochemische Differenzierung nach KÖTSCHKE 1993 und RAHM et al. 1999

Ausgangsmaterial für die biochemische Differenzierung war eine gut bewachsene Thioglykolatbouillon.

Thioglykolatbouillonröhrchen wurden 10 Minuten im Wasserbad gekocht, um den restlichen Sauerstoff aus dem Medium zu entfernen. Nach dem Abkühlen wurde es mit einer verdächtigen Kolonie beimpft. Während dieser Erhitzung sollten Flaschen mit Durchstichstopfen mit einer Belüftungsnadel versehen werden, um einen Überdruck in der Flasche zu vermeiden. Der Erhitzungsvorgang darf nur einmal durchgeführt werden. Pro Platte bzw. Probe wurden drei Röhrchen Thioglykolatbouillon beimpft und 4-5 Tage bei 37°C inkubiert.

Der Röhrcheninhalt wurde auf eine Blutplatte sowie je einmal auf „COL A“ und „COL B“ ausgestrichen. Die Blutplatte (Reinheitskontrolle) wurde 2 Tage mikroaerob bei 37°C bebrütet. Wachstum auf dieser Platte spricht für eine Kontamination.

„COL A“- und „COL B“-Platten wurden 4-5 Tage bei 37°C in mikroaerophiler N₂/CO₂/O₂-Atmosphäre bebrütet. Falls auf der Blutplatte Keime gewachsen waren, wurde eine verdächtige *Campylobacter*-kolonie von „COL A“ oder „COL B“ subkultiviert, bis eine Reinkultur zur weiteren Verwendung zur Verfügung stand. Falls keine Reinkultur herausgezüchtet werden konnte, wurde neues Probenmaterial angefordert.

Zur Prüfung der biochemischen Eigenschaften wurden folgende Röhrchen (pro Differenzierung) 10 Minuten im Wasserbad gekocht und nach Abkühlung beimpft:

- 1 Röhrchen Leber-Leber-Bouillon
- 1 Röhrchen Thioglykolat-Medium mit 3,5 % NaCl
- 1 Röhrchen Thioglykolat-Medium mit 1 % Glycin
- 3 Röhrchen Thioglykolat-Medium ohne Zusatz.

Zur Absicherung der Identifizierung von *Campylobacter*-Spezies kann das in Tabelle 3 dargestellte biochemische Differenzierungsschema dienen.

Material und Methoden

Prüfung der Katalaseaktivität

In sauerstoffhaltiger Atmosphäre bilden sich in der Bakterienzelle toxische Sauerstoffmetaboliten.

Daher ist es nicht verwunderlich, dass Mikroorganismen Enzyme entwickelt haben, die toxische Sauerstoffprodukte zerstören. Das am weitesten verbreitete Enzym dieser Kategorie ist die Katalase, die Wasserstoffperoxyd spaltet. Durch die Reaktion: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ entstehen ungiftiges Wasser und Sauerstoff (MADIGAN et al. 2000b).

Je nach Anzahl der zur Verfügung stehenden verdächtigen Kolonien wurde entweder sofort von der Originalkultur oder nach fünftägiger Bebrütung von ihrer Subkultur Material zur Prüfung der Katalaseaktivität entnommen. Hierzu wurde mit der Impföse das Kolonienmaterial entnommen und auf einem Objektträger mit 3 Tropfen einer 3 %igen Wasserstoffperoxydlösung vorsichtig vermischt. Blasenbildung, zeigte eine positive Reaktion an.

Oxidase-Nachweis (BactidentTM Oxidase)

Die Cytochromoxidase ist ein in der Natur sehr weit verbreitetes Enzym. Es oxidiert das reduzierte Cytochrom c und wird dabei selbst in die reduzierte und inaktive Form übergeführt. Durch Übertragung der Elektronen auf molekularen Sauerstoff geht die reduzierte Cytochromoxidase wieder in die aktive Form über.

In Anwesenheit molekularen Sauerstoffs kann das Cytochromoxidase/Cytochrom c-System eine ganze Reihe von organischen Substanzen reduzieren, unter anderem das sog. NaDi-Reagenz (1-Naphthol-Dimethylparaphenylendiamin) unter Bildung des Kondensationsmoleküls Indophenolblau. Diese Reaktion wird zur Klassifizierung und Identifizierung von Bakterien verwendet. Der BactidentTM-Kit enthält auf einen Papierstreifen eine markierte Reaktionszone.

Mit der Impföse wird eine einzeln liegende, gut gewachsene Kolonie vom Nährboden entnommen, die Kolonie auf die Reaktionszone aufgebracht und mit der Impföse verrieben. Nach ca. 20 bis 60 Sekunden wurden die Papierstreifen mit der Farbskala verglichen.

Bei Cytochromoxidase-positiven *Campylobacter* färbt sich die Reaktionszone blau bis blaviolett.

Material und Methoden

H₂S-Nachweis

Der Test kann in zwei Varianten durchgeführt werden.

Bei unempfindlichem H₂S-Test (in einem Leberbouillonröhrchen) wird ein Bleiacetatstreifen in das Kulturröhrchen eingehängt. Die Bebrütungsdauer sollte 5 Tage bei 37°C unter mikroaerophilen Bedingungen betragen.

Der empfindliche H₂S-Test entspricht in der Durchführung dem „unempfindlichen“ H₂S-Nachweis, jedoch unter Verwendung einer Thioglykolatbouillion mit dem Zusatz von 0,025 % Cystein. Eine positive Reaktion ist die Schwärzung des Streifens innerhalb von 5 Tagen Bebrütung bei 37°C.

Natriumselenit-Reduktion

Eine 0,1 %ige Na-Selenitbouillon ohne Agartzusatz wurde kräftig beimpft und unter mikroaerophilen Bedingungen 5 Tage bei 37°C bebrütet. Das Na-Selenit darf der Bouillon erst nach dem Autoklavieren zugesetzt werden. Die positive Reaktion war gekennzeichnet durch Rotfärbung des Mediums.

Nachweis der Glycintoleranz

Thioglykolatbouillon mit einem Gehalt von 1 % Glycin wurde mit Kulturmaterial beimpft und 5 Tage bei 37°C bebrütet. Wachstum von *Campylobacter* wurde im Phasenkontrastmikroskop geprüft. Wurde Wachstum von *Campylobacter* festgestellt, so galt die Reaktion als positiv.

Kochsalztoleranz

Na-Thioglykolatbouillon mit 3,5 % NaCl wurde kräftig beimpft und 5 Tage bei 37°C bebrütet. Das Wachstum zeigte sich durch ringförmige Trübung dicht unter der Oberfläche. Bei der mikroskopischen Kontrolle waren bewegliche Bakterien vorhanden.

Material und Methoden

Toleranz gegenüber Nalidixinsäure und Cephalotin

Auf den Test-Agar-Platten (Thioglykolat) wurden die jeweiligen Stämme mit der Öse ausgestrichen. Das Koloniematerial stammte von einer gut bewachsenen Columbia A- oder Columbia B-Platte. Anschließend wurden die Platten für 5 Tage bei 37°C mikroaerob bebrütet. Bei einem makroskopisch sichtbaren Wachstum entlang des Impfstreiches galt der Stamm als resistent gegen Nalidixinsäure und Cephalotin.

Auswertung: Hemmzone unter 14 mm Durchmesser: resistent (R). Hemmzone über 14 mm Durchmesser: sensibel (S).

Material und Methoden

Tabelle 3: Kulturelle und biochemische Merkmale einiger *Campylobacter*-Spezies (VANDAMME u. DE LEY 1991; URSING et al. 1998; NACHAMKIN 1999).

Spezies	Katalase	H ₂ S-Bildung aus Leber-Leber (unempfindlich)	H ₂ S-Bildung aus Cystin (empfindlich)	Na- Selenit- Reduktion	Toleranz gegenüber Kochsalz 3,5%	Toleranz gegenüber Glycin 1%	Resistenz- verhalten gegenüber Nalidixinsäure	Resistenz- verhalten gegenüber Cephalotin	Wachstum bei 25°C	Wachstum bei 42°C
<i>C. fetus</i> ssp. <i>fetus</i>	+	+ / -	+	+	-	+	R	S	+	-
<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>	+	-	-	-	-	-	R	S	+	-
<i>C. sputorum</i> ssp. <i>bubulus</i>	-	+	+	+	+	+	R	S	+ / -	+ / -
<i>C. jejuni</i> ssp. <i>jejuni</i> , <i>C. coli</i>	+	+	+	+	-	+	S	R	-	+

Material und Methoden

3.2.3.2 Phänotypische Differenzierung von *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* und *C. fetus* subsp. *fetus* nach ON und HARRINGTON (2001)

In einer weiteren Veröffentlichung wurde eine leicht modifizierte Differenzierungsmethode vorgeschlagen. Auch diese wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet. Hierbei wurden sieben phänotypische Schlüsselreaktionen geprüft: Die Empfindlichkeit gegenüber Glycin, Metronidazol, Cefoperazon, Kaliumpermanganat und basischem Fuchsin. Zusätzlich prüft man die Selenitreduktion und das Wachstum bei 42°C.

Zu Beginn wurden die zu untersuchenden Bakterienkulturen makroskopisch auf eventuell vorhandene Fremdkeime kontrolliert. Reagenzgläser wurden mit jeweils 5 ml PBS-Puffer befüllt, um die Bakteriensuspension (Ausgangssuspension) herzustellen. Mit einer sterilen Impföse wurde den Platten eine kleine Menge der angezüchteten Bakterien entnommen und in 5 ml sterilen PBS-Puffer eingebracht. Anschließend wurde mit Hilfe eines Schüttlers (Vortex) alles gut homogenisiert. Die Bakteriensuspension wurde mit einem Photometer auf eine einheitliche optische Dichte von ca. 0,1 eingestellt, um später die Differenzierungsergebnisse besser miteinander vergleichen zu können. Von allen eingestellten Bakteriensuspensionen wurden die Verdünnungsstufen 1:10 und 1:100 hergestellt. Von den einzelnen Verdünnungsstufen (1:10 und 1:100) der Bakteriensuspension wurden immer zwei Tropfen (20 µl) auf die beschrifteten MH-Platten mit den verschiedenen Zusätzen (siehe unten) mittels einer Eppendorfpipette getropft und unter der Sicherheitswerkbank zum Antrocknen gelassen. Die Röhren (5 ml Oxoid-Bouillon mit den Zusätzen) wurden mit jeweils 100 µl Suspension beimpft. Die Platten und Röhren wurden unter mikroaeroben Bedingungen bei 37°C bzw. 42°C für 72h bebrütet. Von jedem Stamm der Originalsuspension wurde eine Bakterienzahlbestimmung durchgeführt.

Grundnährmedien

Oxoid-Bouillon Nr. 2

Mueller-Hinton-Agar (MH Agar)

Material und Methoden

Zusätze

Natriumselenit (0,1%-ig):

200 mg Natriumselenit in 4 ml sterilem Aqua dest. lösen
2 ml Natriumselenit-Lösung in 100 ml Oxoid-Bouillon geben
steril filtrieren

Glycin (1%-ig):

2 g Glycin auf 200 ml MH-Agar geben
Wichtig: vor dem Lösen im Dampftopf dazugeben (Sterilität und bessere Löslichkeit werden erzeugt)

Kaliumpermanganat (0,1%-ig):

200 mg Kaliumpermanganat in 4 ml sterilem Aqua dest. lösen
2 ml KMnO_4 -Lösung in 100 ml Oxoid-Bouillon geben

Metronidazol:

12 mg Metronidazol in 30 ml Dimethylacetamid lösen (=Stammlösung)
2 ml der angesetzten Stammlösung auf 200 ml MH-Agar geben

Cefoperazon:

32 mg Cefoperazon in 5 ml sterilem Aqua dest. lösen
2 ml auf 200 ml MH-Agar geben

basisches Fuchsin:

80 mg basisches Fuchsin in 5 ml Ethanol lösen (=Stammlösung)
2 ml der Stammlösung in 200 ml MH-Agar geben
0,6 ml der Stammlösung in 100 ml Oxoid-Bouillon geben

Puffer

PBS-Puffer: 10 mM Na_2HPO_4 , 10 mM NaH_2PO_4 , 0,145 M NaCl, pH= 7,0

Material und Methoden

3.2.4 Anlegen einer Verdünnungsreihe

Die Röhren wurden mit der Suspension (*Campylobacter fetus* subsp. *fetus*-Kultur und *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*-Kultur) auf dem Schüttler homogenisiert. 100 µl wurden entnommen und in das erste Röhren hineinpipettiert. Die Röhren wurden mit dem Vortexer homogenisiert. Aus diesem Röhren wurden 100 µl entnommen, in das zweite Röhren hineinpipettiert. Diese Vorgänge wurden bis zur gewünschten Verdünnungsstufe wiederholt. Die letzten 4 Verdünnungsstufen (10^{-4} - 10^{-7}) wurden auf die Nähr-Agarplatten aufgebracht.

Die Platten wurden unter mikroaeroben Bedingungen bei 37° C für 72 h bebrütet.

3.3 Molekularbiologische Methode

3.3.1 DNS-Extraktion

Material:

- Bindungspuffer (Bestandteil des Kit)
- Chloroform/Isoamylalkohol: 24:1-Volumenteile-Gemisch, p.a.-Chemikalien
- DNS-Extraktionskit: High Pure PCR Template Preparation KitTM (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)
- DynabeadsTM M-280 Streptavidin Prod. No.: 112.05 Dynal A.S., Oslo, Norwegen
- Eis
- Elutionspuffer (Bestandteil des Kit)
- Ethanol p.a. 96%, eisgekühlt
- Isopropanol p.a.
- Kaliumacetat-Lösung (5 mol/l)
- Lysozym (10 mg/ml)
- NaCl (Endkonzentration: 1 M)
- biotinylierte Oligonukleotide (MG3F-Bio/MG4R-Bio), $c = 10 \text{ pmol}/\mu\text{l}$
- PBS-Puffer (10 mM Na₂HPO₄, 10 mM NaH₂PO₄, 0,145 M NaCl, pH= 7,0)
- Proteinase K (10 mg/ml)
- Reinstwasser

Material und Methoden

- RNase A: 5mg/ml
- SDS 1% in TE-Puffer: 1g SDS in 100 ml TE-Puffer
- TE-Puffer-gesättigtes Phenol
- TE-Puffer pH 8,0: 50 mmol/l Tris, 10 mmol/l EDTA
- Wasch-Puffer (500 ml): 10mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 1 M NaCl

Methoden:

Bei allen Proben wurde DNS durch Kochen der Bakterien, High Pure PCR Template Preparation KitTM, QIAamp DNA Mini KitTM, mittels Biotin-markierten-Primern in Verbindung mit Streptavidin-Beads oder mittels Phenol-Chloroform isoliert.

3.3.1.1 Kochen

Diese Methode ermöglicht auf einfache und schnelle Weise die Gewinnung genomischer DNS aus Bakterien zur Verwendung in der PCR.

Mit einer sterilen Impföse wurden den *Campylobacter*-Kultur-Platten kleine Mengen der angezüchteten Bakterien entnommen und jeweils mit 50 µl sterilem Wasser verdünnt. Anschließend wurde mit Hilfe eines Schüttlers (Vortex) alles gut homogenisiert. Die Bakterien suspensionen wurden bei 98°C im Wasserbad gekocht und kurz abzentrifugiert (7000 g für 5 s bei Raumtemperatur). Mit den so präparierten Proben konnte direkt die PCR durchgeführt werden.

3.3.1.2 High Pure PCR Template Preparation KitTM (Roche Diagnostics)

Die Lyse von kultiviertem oder mit Erregern infiziertem Sperma erfolgt durch Inkubation in einem speziellen Puffer in Gegenwart von Proteinase K. Anschließend werden die Nukleinsäuren spezifisch in Gegenwart eines chaotropen Salzes an Glasfaseroberflächen gebunden. Die Bindungsreaktion findet innerhalb von wenigen Sekunden statt und wird durch die Zerstörung der geordneten Struktur der Wassermoleküle durch das chaotrope Agens und ihrer Wechselwirkung mit den gelösten Nukleinsäuren verursacht. Somit wird die Adsorption an das Glasfaservlies gefördert. Da nur Nukleinsäuren spezifisch gebunden werden, kann die

Material und Methoden

DNS nach der Durchführung eines einfachen Waschvorgangs frei von Begleitsubstanzen, z. B. Salzen, Proteinen oder anderen zellulären Verunreinigungen, isoliert werden.

Nach der Lyse des Probenmaterials erfolgt der Auftrag der Probe auf den Filtereinsatz des Reaktionsgefäßes und die Passage durch das Glasfaservlies mittels Zentrifugation. Durch einen Waschschrift werden restliche Verunreinigungen entfernt und anschließend die Nukleinsäuren mit Elutionspuffer gewonnen.

3.3.1.2.1 DNS-Extraktion aus Kultur

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze der PCR (analytische Sensitivität) wurden 100 µl der Bakteriensuspension, die zur Gewinnung der DNS verwendet wurde, auf Thioglykolat-Platte aufgespatelt und die Zahl der Kolonien nach einer Inkubationszeit von 5 Tagen ausgezählt. Von der Suspension wurden serielle dekadische Verdünnungen (10^7 bis 10^0) in einem Volumen von 0,5 oder 1 ml angefertigt und von jeder Verdünnung wurde DNS extrahiert.

3.3.1.2.2 DNS-Extraktion aus Sperma

50 µl Sperma in Originalkonzentration wurde mit DNS-Extraktions-Kit isoliert.

3.3.1.2.3 Herstellung künstlich kontaminierten Spermas (Zugabe einer Kultur zu Nativ-sperma)

Praktische Sensitivität

50 µl Sperma wurden mit 2µl *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*-Flüssig-Kultur durch Verdünnungsreihe ($4,3 \times 10^9$ KBE/ml Bakterien und verdünnt 1:10 bis 1:1000) versetzt. Das Gesamtvolumen von 52 µl wurde mit einem der kommerziell erhältlichen Extraktionskits zur DNS-Isolierung eingesetzt.

Material und Methoden

3.3.1.3 Isolation genomischer DNS mittels Phenol-Chloroform

Je 550 μl Sperma wurden mit 10 μl unverdünnter DNS (10 $\text{ng}/\mu\text{l}$) bzw. mit den Zehnerpotenzen der bis zu 10^{-4} -fach verdünnten *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*-DNS versetzt und daraus dann DNS wie folgt extrahiert:

100 μl der Mischungen (Sperma und DNS) wurden in 250 μl TE-Puffer resuspendiert und 15 Minuten bei 12 100 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 μl TE-Puffer resuspendiert und 1 000 μl 1% SDS in TE-Puffer zugegeben und gemischt. 10 μl RNase A wurden zugegeben und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. 10 μl Proteinase K wurden zugegeben und 10 Minuten bei 72°C inkubiert. 100 μl Kaliumacetat-Lösung wurden zugegeben und 30 Minuten auf Eis gehalten 10 Minuten bei 12 100 g wurden abzentrifugiert und Überstand abgenommen. Der Überstand wurde mit 1 Volumen TE-Puffer-gesättigtem Phenol versetzt, gemischt und 5 Minuten bei 12 100 g abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und die DNS mit 2 Volumen eiskaltem Ethanol 20 Minuten bei -20°C gefällt. Die Proben wurden 30 Minuten bei 9 300 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die DNS an der Luft getrocknet. Die DNS wurde in 200 μl bidestilliertem Wasser aufgenommen.

3.3.1.4 *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*: DNS-Isolierung mit Biotin-markierten-Oligonukleotiden und Streptavidin-Dynabeads™

Bei manchen Untersuchungen besteht einer der ersten Versuchsschritte darin, eine interessierende DNS aus einer Mischung verschiedener Nukleinsäuren zu isolieren. Eine Methode, solche Anreicherungen durchzuführen, ist die Verwendung von „Magnetic Beads“, die mit speziellen Molekülen, z. B. Biotin bedeckt sind. Das Vitamin Biotin hat die Eigenschaft, dass es von einigen Proteinen, wie dem Avidin (aus Eiklar) und dem Streptavidin (aus *Streptomyces*-Bakterien) sehr fest gebunden wird. Biotin-markierte Oligonukleotide fungieren als Fangmoleküle für komplementäre, einzelsträngige DNS. Die „Magnetic Beads“ binden über das Streptavidin an das Biotin und damit an die Oligonukleotid-hybridisierte *Campylobacter fetus*-DNS. Da das Streptavidin über einen DNS-Linker an die „Magnetic Beads“ ge-

Material und Methoden

koppelt ist, kann man die DNS durch einen kurzen DNase-Verdau wieder von den „Magnetic Beads“ befreien (STEINBRÜCK et al. 2005).

Von 1 ml Suspensionskultur wurde eine Verdünnungsreihe ($4,4 \times 10^6$ KbE/ml *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*-Kultur bis $4,4 \times 10^1$ KbE/ml *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*-Kultur) hergestellt. Die verdünnten Bakterienkulturen wurden 10 Minuten lang bei 16 100 g zentrifugiert. Dem entstandenen Pellet wurden, um die Zellwände zu zerstören, 5 μ l (10 mg/ml) Lysozym zugegeben und durch vorsichtiges Schwenken der Reaktionsgefäße gemischt. Sofort danach wurden die Proben im Wasserbad (37°C) für 15 min inkubiert. Nach Zugabe von 40 μ l Proteinase K wurden sie über Nacht bei 72°C auf dem Thermoschüttler inkubiert. Die Extrakte wurden 15 min im Ultraschallbad behandelt. Die Proben wurden bei 95°C (Denaturierung) für 15 min gekocht und anschließend auf Eis abgekühlt.

Pro Probe wurden je 10 μ l je Oligonukleotid (MG3F-Bio/MG4R-Bio; 10 μ M) auf Eis zugegeben und gemischt. Nach 3 h Inkubation bei 42°C im Thermoschüttler wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt. Danach erfolgte die Addition von je 50 mg NaCl (Endkonzentration: 1M) pro Röhrchen. Durch Zugabe von 50 μ l Beads je Röhrchen wurde die DNS unter leichtem Schütteln bei 21°C und 2 h inkubiert. Die Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden in einen Magnet-Ständer gesteckt, 5 min gewartet und der Überstand entfernt.

Die Beads wurden in 300 μ l PBS außerhalb des Magnet-Ständers suspendiert. Die Proben wurden zweimal mit PBS gewaschen und zuletzt in 20 μ l PBS suspendiert.

Vorbereitung der DynabeadsTM

Die Beads wurden vorsichtig geschüttelt und 300 μ l in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Das Reaktionsgefäß wurde für zwei Minuten in einen Magnet-Ständer gestellt. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette entfernt (Das Reaktionsgefäß ist dabei im Magnet-Ständer geblieben). Das Reaktionsgefäß wurde entnommen und die DynabeadsTM in 310 μ l Wasch-Puffer suspendiert.

3.3.2 Fällung und Reinigung von DNS

Zur Konzentrierung von Nukleinsäurelösungen wurde die DNS mit reinem Isopropanol gefällt.

Material und Methoden

Dazu wurden der Probenlösung 0,6 Volumenteile Isopropanol zugegeben und die DNS bei Raumtemperatur für 20-30 min gefällt. Nach Zentrifugation (12 000 g, 20 min) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet bei 37°C luftgetrocknet. Das getrocknete DNS-Pellet wurde in Aqua dest. gelöst.

3.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Material

- dNTP-Mix: dATP + dGTP + dCTP + dTTP (je 2mM)
- Magnesiumchlorid (MgCl_2 25 mM; QiagenTM)
- Oligonukleotid-Primer, $c = 10$ pmol/ μl (Sequenzen siehe Tabelle 4)
- 10 x PCR-Puffer (RocheTM oder QiagenTM)
- Q-Solution (5 x; QiagenTM) : Zugabe Q-Solution in das Reaktionsgemisch. Die Q-Solution trägt dazu bei, starke G/C Bindungen aufzutrennen (POMP u. MEDRANO 1991).
- *Taq* DNA Polymerase 5U/ μL (RocheTM oder QiagenTM)

Agarose-Gelelektrophorese

- Agarose (PeqGold Universal Agarose – „peqlab“) wird in 1 x TBE Puffer durch Kochen aufgelöst: 1% Gel für die PCR-Produkte mit einer Länge von 300 bis zu 1 000 Bp und 2 % Gel für die PCR-Produkte mit einer Länge weniger als 300 Bp
- DNS-Größenmarker: 100 Bp DNS-Marker (GenaxxonTM)
- Ethidiumbromid-Lösung: 1% (10 mg/ml) Lösung in Wasser
- Tris-Borsäure-EDTA-Puffer (TBE): 0,09 M Tris-Borsäure, 0,002 M EDTA, pH 8,0.
Für 1 l 10 x TBE: 108 g Tris-Base, 55g Borsäure und 80 ml 0,25 M EDTA in Wasser lösen.

Verzeichnis der Geräte

- Automatische Pipetten 0,1–1 000 μl
- Filterspitzen für PCR

Material und Methoden

- Foto-Dokumentation (Bio-Image GDS1-SystemTM–Advanced Bio Solution, Göttingen)
- Heizblock für Inkubation von EppendorfTM-Tubes (Temperatur: 30-100°C)
- Apparatur für horizontale Elektrophorese
- Plastik-Reaktionsgefäße 0,2 oder 0,5 ml, steril (EppendorfTM) für PCR
- Plastik-Reaktionsgefäße 1,5 und 2,0 ml für PCR-Vorbereitung
- Thermocycler für die PCR: T3 Thermocycler (BiometraTM Goettingen, Deutschland) und Mastercycler (EppendorfTM)
- Vortexschüttler, MS1 Minishaker (IKA WorksTM, Wilmington, DE, USA)
- UV-Transilluminator, 254 nm und /oder 312 nm
- Zentrifugen mit Eppendorf-Rotor, Modell 5415 R (EppendorfTM) max. 16 100 g
- Thermomixer comfort EppendorfTM (1,5 ml)
- Ultraschallbad
- MPC-S DynalTM – Magnetic Particle Concentrator for Microtubes

Methoden

Als Primer wurden die von HUM et al. (1997) beschriebenen Oligonukleotide verwendet (Tab. 4). Die PCR-Ansätze, Annealingtemperatur und Zyklenzahl waren für beide Primerpaare identisch (Tab. 5 und 6). Jeder PCR-Ansatz enthielt 5 µl 10 x PCR-Puffer (Roche DiagnosticsTM), 2 µl dNTP-Mix (je 2 mM; Roche DiagnosticsTM), je 1 µl Vorwärts- und Rückwärts-Primer (10 pmol/µl; JenaBioScience, Jena), 0,2 µl *Taq*-DNS-Polymerase (5 U/µl; z. B. Roche Diagnostics) und 1 µl DNS-Extrakt. Einem einleitenden Denaturierungsschritt von 60 s bei 96°C folgten 35 Zyklen mit 15 s Denaturierung bei 96°C, 60 s Annealing bei 60°C und 90 s Elongation bei 72°C sowie ein abschließender Elongationsschritt von 180 s bei 72°C. Die Amplifizierungen wurden im Thermocycler T3 (Biometra, Göttingen) durchgeführt.

Material und Methoden

Tabelle 4: PCR-Primer zur Identifizierung und Differenzierung von *C. fetus*-Subspezies (HUM et al. 1997).

Primer	Sequenz (5'-3')	Fragmentlänge
MG3F	GGTAGCCCGCAGCTGCTAAGAT	
MG4R	TAGCTACAATAACGACAACT	764 Bp
VenSF	CTTAGCAGTTTGCGATATTGCCATT	
VenSR	GCTTTTGAGATAACAATAAGAGCTT	142 Bp

PCR mit *Taq*-DNS-Polymerase (Roche DiagnosticsTM)

Tabelle 5: Mastermix-Ansatz.

Komponenten	Volumen (µl/Ansatz)
10 x PCR-Puffer mit 15 mM MgCl ₂	5 µl
Desoxynukleosid-triphosphat-Mix (je 2 mM-dATP, dCTP, dGTP, dTTP)- Lösungen	1 µl
Primer 1 (10 pmol/µl) Vorwärts	1 µl
Primer 2 (10 pmol/µl) Rückwärts	1 µl
<i>Taq</i> -DNS-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
DNS	5 µl
Steriles Wasser	ad 50 µl

Material und Methoden

PCR mit *Taq*-DNS-Polymerase (QIAGEN™)

Tabelle 6: Mastermix-Ansatz.

Komponenten	Volumen (μ l/Ansatz)
10 x PCR-Puffer mit 15 mM MgCl ₂	5 μ l
Desoxynukleosid-triphosphat-Mix (je 2mM-dATP, dCTP, dGTP, dTTP)- Lösungen	2 μ l
Primer 1 (10 pmol/ μ l) Vorwärts	1 μ l
Primer 2 (10 pmol/ μ l) Rückwärts	1 μ l
<i>Taq</i> -DNS-Polymerase (5 U/ μ l)	0,2 μ l
Q-Solution	10 μ l
MgCl ₂	2 μ l
DNS	5 μ l
Steriles Wasser	ad 50 μ l

Analyse der Amplifikate

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese in einem 1%igen Agarosegel (für das MG3F/MG4R-Amplikon) bzw. einem 2%igen Gel bei Verwendung der VenSF/VenSR-Primer je nach Größe des zu erwartenden PCR-Produktes. Die Banden der Amplifikate wurden durch Ethidiumbromid-Färbung (0,5 μ g/ml) unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem Photo Polaroid MP4+ (Polaroid Corporation, Cambridge, USA) bzw. dem Bio-Image GDS1-System (Advanced Bio Solution, Göttingen) dokumentiert (MÜLLER et al. 2003).

Material und Methoden

3.3.3.1 Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC)-PCR

ERIC-Sequenzen (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) sind sich wiederholende Elemente im Genom von Mikroorganismen, deren Funktion bisher unbekannt ist. Sie kommen als Einzelkopien von 124-127 Bp Länge über das Genom verteilt vor (MARTIN et al. 1992). Alle ERIC-Sequenzen besitzen ein hochkonserviertes Palindrom (Bezeichnung für Wort- oder Buchstabenfolgen, die in beiden Richtungen gelesen identisch sind) im Zentrum, an das die beiden Primer ERIC 1 R und ERIC 2 (VERSALOVIC et al. 1991) binden können. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 7 aufgeführt. Wird eine PCR-Reaktion mit diesen Primern durchgeführt, erhält man ein stammspezifisches, komplexes Bandenmuster.

Tabelle 7: Sequenzen und Bezeichnung der Oligonukleotid-Primer für die ERIC-PCR

Bezeichnung Primer	Sequenz (5'-3')	Ref.
ERIC 1 R	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	Versalovic et al. (1991)
ERIC 2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde in einem Thermocycler durchgeführt, der die Überschichtung der Proben mit Mineralöl erforderte. Die Ansätze sind in Tabelle 8 wiedergegeben. Einem einleitenden Denaturierungsschritt von 420 s bei 95°C folgten 30 Zyklen mit 60 s Denaturierung bei 94°C, 60 s Annealing bei 52°C und 480 s Elongation bei 72°C sowie ein abschließender Elongationsschritt von 960 s bei 72°C.

Die PCR wurde in 50 µl-Ansätzen in 0,5 µl-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Amplifikate wurden durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese (9%iges Gel) in Gegenwart von Ethidiumbromid (2,5 µl/ 100 ml) analysiert.

Material und Methoden

Tabelle 8: Mastermix-Ansatz für ERIC-PCR.

Komponenten	Volumen (μl /Ansatz)
10 x PCR-Puffer mit 15 mM MgCl_2	5 μl
Desoxynukleosid-triphosphat-Mix (je 50 mM -dATP, dCTP, dGTP, dTTP)- Lösungen	0,5 μl
Primer 1 (100 pmol/ μl) Vorwärts	2 μl
Primer 2 (100 pmol/ μl) Rückwärts	2 μl
MgCl_2	7 μl
Taq-DNS-Polymerase (5 U/ μl)	0,5 μl
DNS	10 μl
Steriles Wasser	ad 50 μl

3.3.4 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) von *Campylobacter*-Isolaten

Material

Geräte und Zubehör

- Agarose-Blöckchen-Schablone, wieder verwendbar
- Bechergläser
- Brutschrank oder Wasserbad (56°C)
- Einmalküvetten
- Elektrophoresegerät für PFGE Rotaphor (BiometraTM, Göttingen) mit Gelelektrophoresekammer, Rotor, Kühlaggregat, Netzgerät
- Eppendorf-Reaktionsgefäße
- Gel-Gießstand
- große Färbeschale
- Kamm
- Kühlschrank (5°C+)
- Mikrowelle oder Wasserbad (100°C)

Material und Methoden

- Petrischale
- Photometer
- Pipette
- Pipettenspitzen
- Skalpell
- Tiefkühlschrank (-20°C, -80°C)
- Wasserbad (56°C)
- Zentrifuge mit Eppendorf-Rotor, Modell 5415 R (Eppendorf™) max. 16 100 g

Chemikalien

- Borsäure
- EDTA
- Ethidiumbromid
- Kochsalzlösung (0,15 M)
- Molekulargewichtsmarker:
 - . Lambda Ladder PFG Marker (New England Biolabs™): N0340S
 - . Low Range PFG Marker (New England Biolabs™): N0350
- Pulsed Field Certified Agarose
- Proteinase K
- Restriktionsendonuklease: *Sma* I (Amersham Biosciences™)
- Sarkosyl (N-Lauroylsarkosine Sigma™, L-9150, Lot 61K0037)
- Tris (Trishydroxymethylaminomethan, Sigma™)

Zusammensetzung

Stamm-Lösungen

5 M NaCl

NaCl (Roth™ 3957): 292,2g

Aqua bidest.: ad 1000 ml

Material und Methoden

2 M Tris

Tris (Sigma T 1503): 242,2g

Aqua bidest.: ad 1000 ml

einstellen auf pH 8,0 mit HCl (Merck™ 1.00317)

0,5 M Di-Natrium-EDTA

Na₂-EDTA (8421, Titriplex, Merck™): 186,12g

Aqua bidest.: ad 1000 ml

einstellen auf pH 8,0 mit NaOH (Merck™)

Proteinase K

Proteinase K (Merck™ 1.24568): 20 mg

Aqua bidest.: ad 1 ml

Puffer

Pett IV-Puffer

1 M NaCl

10 mM Tris pH 8

10 mM Na₂-EDTA

Aqua bidest.

ES-Puffer

0,5 M Na₂-EDTA

einstellen auf pH 9 mit hoch konzentrierter NaOH-Lösung

1 % Sarkosyl

ESP-Puffer

0,5 M Na₂-EDTA

1 % Sarcosyl

1,8 mg/ml Proteinase K (Gibco™)

einstellen auf pH 9 mit hoch konzentrierter NaOH-Lösung

Material und Methoden

TE 10:1

10 mM Tris

1 mM Na₂-EDTA

Aqua bidest.

10 x TBE

0,9 M Tris (SigmaTM T 1503)

0,9 M Borsäure (MerckTM 165.1000)

1 mM 0,5 M EDTA (ohne Na), pH 8 (SigmaTM Ethylendiamintetraessigsäure, ED Lot 72H0124)

Aqua bidest.

Methode (MOSER 2001; ON et al. 2000):

Ein bis 4 Impfösen Bakterien (*Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* und *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*) wurden in 1 ml Kochsalzlösung (0,15 M) suspendiert. Die Suspension wurde photometrisch auf die optische Dichte $OD_{600nm} = 1,2$ eingestellt. Diese Suspension wurde zweimal bei 8000 g zentrifugiert und das Sediment mit dem erreichten Volumen resuspendiert. Anschließend wurden 500µl der Bakteriensuspension zu 700µl 1,2% gelöster, auf 56°C temperierter Agarose zugegeben. Nach intensiver Durchmischung wurde der Ansatz (ca. 100 µl) unter Vermeidung von Luftblasenbildung zügig in Gießformen für Agaroseblöckchen pipettiert. Nachdem die Blöckchen bei 4°C erstarrt waren, wurden sie aus der Gießschablone mit einem Spatel in ein Reaktionsgefäß überführt und in 1 ml ESP-Lysispuffer mit 1,0 mg/ml Proteinase K bei 56°C für 48 Stunden inkubiert. Zur Vorbereitung für eine Behandlung mit Restriktionsendonukleasen wurden die Blöckchen in eine Petrischale überführt und mit 5 ml TE-Puffer, pH 8,0 bei 4°C dreimal gewaschen. Danach wurden die Blöckchen entweder für die Restriktion vorbereitet oder in TE-Puffer bei 4°C gelagert. Für die eigentliche Restriktion wurde jedes Blöckchen in vier gleiche Stücke geteilt. Ein Blöckchenviertel wurde in den für die Endonuklease *Sma* I geeigneten Puffer überführt und in einem Volumen von 200µl dieses Puffers mit dem Enzym (2µl pro Blöckchen; 10 U/µl) über Nacht bei 30°C inkubiert. Nach Beendigung der Restriktion wurden die Blöckchen mit einem

Material und Methoden

Spatel in die Geltasche des vorbereiteten Agarose-Gels überführt. Für die geschnittenen Fragmente wurden folgende Pulsintervalle in drei Zeitblöcken gewählt: 2-10 Sekunden linear ansteigend für 4 Stunden, 10–40 Sekunden linear ansteigend für 14 Stunden, 50–60 Sekunden linear ansteigend für 4 Stunden. Auswertung und Dokumentation erfolgten nach Beendigung des Laufes nach Inkubation der Gele für 30 Minuten bei Raumtemperatur in Ethidiumbromid-lösung durch Beurteilung und Photographieren der Gele unter UV-Licht. Zunächst wurde das Gelbild als Negativ abgespeichert (Invertieren). Die Banden erschienen dadurch dunkel auf hellem Hintergrund. Die Analyse erfolgte mit dem Programm Gel Compar II (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Die genetische Verwandtschaft wurde mit dem Dice-Koeffizienten analysiert.

Die *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*-Stämme einer Gruppe von Bullen wurden mittels PFGE untersucht. Die Bullen stammten aus einem einzigen Haltungsbetrieb in Baden-Württemberg. Die Tabelle 9 zeigt zusätzliche Informationen über die Tiere.

Tabelle 9: Herkunft ausgewählter Isolate von *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*
SBT: Schwarzbunte; RBT: Rotbunte; FL: Fleckvieh; BV: Braunvieh.

Bullen	Alter (J)	Rasse	Stall
Zeunona	5	FL	III
Nexball	3	FL	I
Ohlant	5	SBT	III
Jomand	5	SBT	I
Kombi	5	RBT	I / III
Gulliver	4	BV	II
Pamir	4	FL	III
Morror	7	FL	III
Rekar	5	FL	III
Llyod	5	SBT	I
Latur	4	RBT	I
Nexolb	4	FL	IV
Zeutan	5	FL	III
Mallo	5	FL	I
Romorr	6	FL	I
Renus	5	FL	III
Harror	5	FL	III

Material und Methoden

Die folgenden Tabellen zeigen die Stämme und die entsprechenden Untersuchungen, die damit durchgeführt wurden.

Tabelle 10 : Liste von *Campylobacter fetus*-Stämmen, die im Rahmen der mikrobiologischen und molekular-epidemiologischen Untersuchungen analysiert wurden.

Stamm Nr.	Biochemische Differenzierung	PCR	ERIC-PCR	PFGE
BS208/99	X	X		X
BS209/99	X	X	X	X
BS210/99	X	X	X	
BS211/99	X	X	X	X
BS212/99	X	X	X	X
BS322/99	X	X	X	X
BS325/99		X	X	X
BS327/99	X			
BS452/99		X		X
BS454/99		X	X	
BS473/99	X	X	X	X
BS484/99		X	X	X
BS505/99	X	X	X	X
BS147/00	X	X		X
BS149/00	X	X		X
BS150/00	X	X	X	X
BS151/00	X	X		X
BS152/00	X	X	X	X
BS153/00	X	X	X	X
BS154/00	X	X	X	X
BS18/01	X	X	X	X
BS51/01	X	X	X	X
BS52/01	X	X	X	
BS53/01	X	X	X	X
BS54/01	X	X	X	X
BS55/01	X	X	X	X
BS61/01	X	X	X	X
BS135/02	X	X	X	X
BS201/02	X	X	X	X
BS202/02	X	X		X
BS206/02	X	X	X	X
BS209/02	X	X	X	X
BS210/02	X	X	X	X
BS211/02		X	X	
BS212/02	X	X	X	

Material und Methoden

Tabelle 10 : Liste von *Campylobacter fetus*-Stämmen, die im Rahmen der mikrobiologischen und molekular-epidemiologischen Untersuchungen analysiert wurden.

Stamm Nr.	Biochemische Differenzierung	PCR	ERIC-PCR	PFGE
BS213/02	X	X	X	X
BS38/03	X	X		X
BS47/03	X	X	X	
BS57/03	X	X	X	X
BS61/03	X	X	X	
BS63/03	X	X	X	
BS99/03	X	X	X	X
BS101/03	X	X	X	
BS105/03	X	X		X
BS109/03	X	X	X	X
BS111/03	X	X	X	X
BS113/03	X	X		X
BS03/04		X	X	X
BS09/04	X	X	X	X
BS38/04	X	X	X	X
BS47/03		X	X	
BS74/04	X	X	X	X
BS75/04	X	X		
BS76/04	X	X	X	X
BS83/04		X	X	
BS84/04	X	X	X	X
BS85/04	X	X	X	X
BS86/04	X	X	X	X
BS87/04	X	X	X	X
BS88/04	X	X	X	X
BS89/04		X	X	
BS90/04	X	X	X	X
BS91/04	X	X		
BS131/04		X	X	X
BS136/04	X	X		
BS137/04	X	X		
BS138/04	X	X		
BS141/04	X	X	X	
BS142/04	X	X	X	
BS143/04		X	X	
BS144/04	X	X		
BS148/04	X	X		
BS149/04	X	X		
BS150/04	X	X		
BS205/04	X	X		

Material und Methoden

Tabelle 10 : Liste von *Campylobacter fetus*-Stämmen, die im Rahmen der mikrobiologischen und molekular-epidemiologischen Untersuchungen analysiert wurden.

Stamm Nr.	Biochemische Differenzierung	PCR	ERIC-PCR	PFGE
BS214/04	X	X		
BS222/04	X	X		
BS11/05	X	X		
BS62/05	X	X		
BS63/05	X	X		
BS64/05	X	X		
BS68/05	X	X		
BS69/05	X	X		
BS70/05	X	X		
BS71/05	X	X		
BS100/05	X	X		
BS122/05	X	X		
BS134/05	X	X		
BS145/05	X	X		
BS146/05	X	X		
BS147/05	X	X		
BS151/05	X	X		
BS152/05	X	X		
BS03/04	X	X		
BS91/05	X	X		
BS93/05	X	X		
BS94/05	X	X		
BS96/05	X	X		
BS101/05	X	X		
B928		X		X

4 Ergebnisse

4.1 Kulturell-biochemische und PCR-Untersuchungen zur Gattungs- und Speziesbestimmung von *Campylobacter*-Isolaten

In den meisten konventionellen biochemischen Tests sind *Campylobacter* relativ inaktiv und es gibt keine geeigneten Methoden, die eine einfache Differenzierung aller Spezies ermöglichen. Die Tests zur Differenzierung sind bisher nur teilweise standardisiert und in der Literatur weit verstreut (ON 1996).

Die Gattungs- und Speziesbestimmung der mit Hilfe der Col A- und Col B-Nährböden isolierten Bakterien erfolgte zunächst anhand der in Kapitel 3.2.1 und 3.2.3 beschriebenen kulturell-biochemischen Kriterien und der in Tabelle 3 und 10 aufgeführten Identifikationsmatrizen. Mit Hilfe der gattungs- und speziesspezifischen PCR wurde die Zuordnung der isolierten Bakterien zur Gruppe der mesophilen *Campylobacter* sowie die Spezies-Identifizierung überprüft.

Die Bakterien wuchsen unter mikroaerophilen, nicht jedoch unter aeroben Bedingungen. Der Oxidase-Nachweis verlief jeweils positiv.

Die Unterscheidung von *C. fetus* subsp. *venerealis* von *C. fetus* subsp. *fetus* erfolgt im wesentlichen durch:

- den Nachweis der H₂S-Bildung, die bei der Subspezies *venerealis* auch im empfindlichen Test in der Regel negativ ausfällt (Abbildung 7) (abweichende Reaktionen möglich);
- den Nachweis der Glycintoleranz, die bei der Subspezies *venerealis* meist bis 0,8 % und selten bis 1 % reicht, bei der Subspezies *fetus* mindestens 1,4 % beträgt;
- den Nachweis der Na-Selenitreduktion, die bei Subspezies *fetus* positiv ausfällt und als besonders sicheres Kennzeichen gilt.

Von den genitalen *Campylobacter*-Arten ist *C. sputorum* ssp. *bubulus* leicht zu differenzieren, da er keine Katalase bildet, deutlich H₂S-positiv ausfällt und in einer 3,5 %igen NaCl-Bouillon wächst.

Der Katalasenachweis wurde ausgeführt, indem auf eine *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*-Kolonie ein Tropfen H₂O₂ gegeben wurden. Sofortige Blasenbildung war als positiv zu bewerten.

Ergebnisse

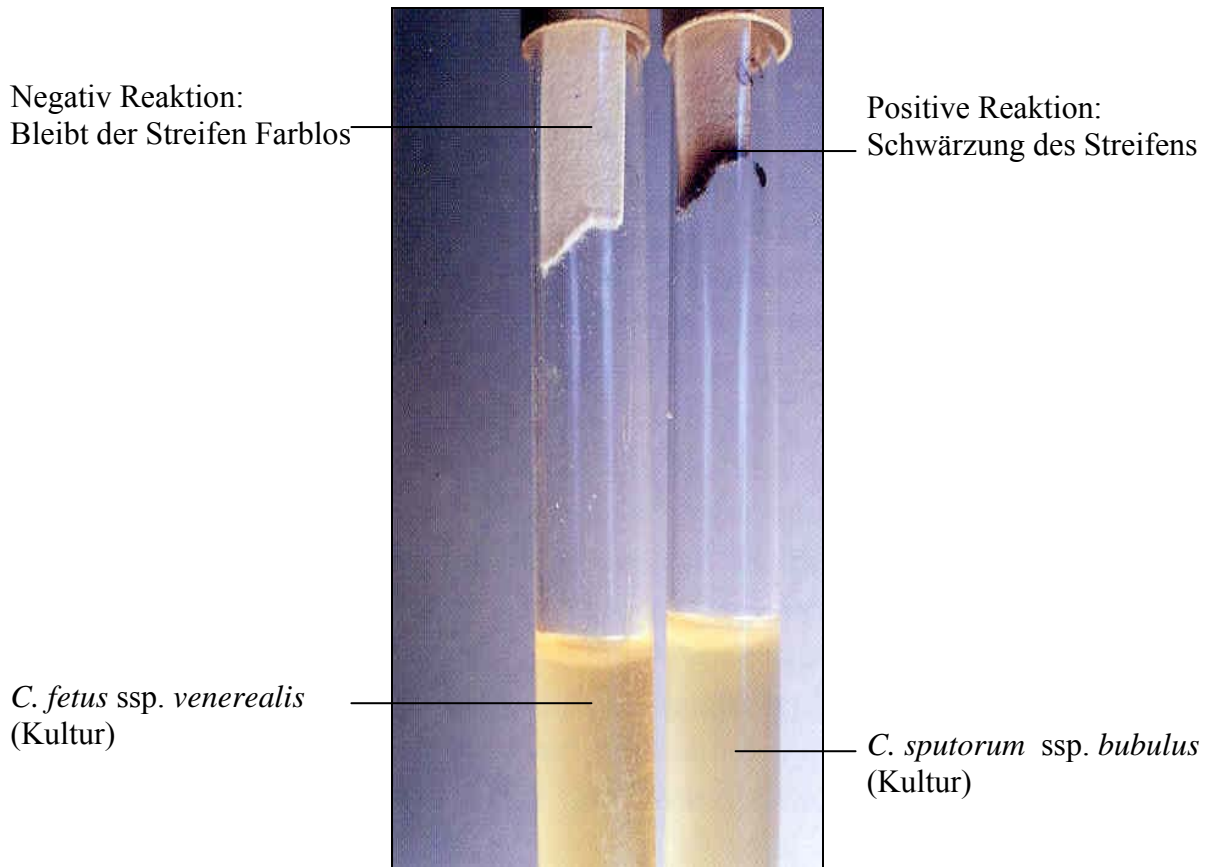


Abbildung 7: *Campylobacter*-Flüssigkulturen: rechts *C. sputorum* ssp. *bubulus*, H₂S-positiv, links *C. fetus* ssp. *venerealis*, H₂S-negativ (BISPING et al. 2000).

Die Identifizierung der *Campylobacter*-Spezies erfolgte aufgrund biochemischer und physiologischer Eigenschaften (kulturelle Merkmale und Chemotherapeutika-Empfindlichkeit; siehe Tabelle 11). Die Ergebnisse waren klassifiziert: -, (+), + als negative Reaktionen und ++, +++, ++++ als positive Reaktionen. In Abhängigkeit der Ergebnisse des Glycin-Toleranztests, wurde die Isolate von *C. fetus* subsp. *venerealis* als intolerant und die von *C. fetus* subsp. *fetus* als tolerant klassifiziert. Auf diese Weise konnten die 103 *C. fetus*-Isolate in 81 *C. fetus* subsp. *venerealis* und 22 *C. fetus* subsp. *fetus* getrennt werden. Varianten, wie die Toleranz von *C. fetus* subsp. *venerealis* und Intoleranz von *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*, gegen Glycin wurden nicht beobachtet (SCHULZE et al. 2006). Die hemmenden Wirkungen von Kaliumpermanganat und basischem Fuchsin gegen *C. fetus*-Isolate waren nicht reproduzierbar. Zahlreiche Änderungen dieser Tests verbesserten nicht die Vergleichbarkeit. Diese Ergebnisse sind deshalb gar nicht erst aufgeführt.

Ergebnisse

Tabelle 11: Herkunft der *Campylobacter fetus*-Isolate und Ergebnisse phänotypischer und PCR-Differenzierung.

-: kein Wachstum; (+): schwaches Wachstum; +: einzelne Kolonien; ++: viele Kolonien; +++: dichtes bakterielles Wachstum; massives bakterielles Wachstum; V: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*; F: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*.

Subspezies-Identifikation								
Proben-Nr. (FLI)	Herkunft	Phänotypisierung						PCR
		1% Glycin	Na-Selenit- Reduktion	Metro- nidazole	Cefope- razone	Wachstum bei 42°C	Ergebnisse	Ergebnisse
BS473/99	Vaginalschleimprobe (NCTC* 010354)	-	-	-	+	+	V	V
BS208/99	Fetus (C51/88)	-	-	-	-	-	V	V
BS209/99	Fetus (C50/88)	-	-	(+)	(+)	-	V	V
BS210/99	Fetus (C1/85)	-	-	(+)	-	-	V	V
BS211/99	Fetus (C93/87)	-	-	(+)	(+)	-	V	V
BS212/99	Fetus (C49/88)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	V	V
BS322/99	unbekannt	-	-	-	-	-	V	V
BS327/99	Präputialspülung (P757/93)	-	-	(+)	(+)	(+)	V	V
BS505/99	Präputialspülung (P783/93)	-	-	(+)	(+)	(+)	V	V
BS147/00	künstliche Vagina (D71/106)	-	-	(+)	-	(+)	V	V
BS149/00	künstliche Vagina (D71/03)	-	-	(+)	-	-	V	V
BS150/00	künstliche Vagina (D71/96)	-	-	-	-	(+)	V	V
BS151/00	künstliche Vagina (D71/100)	-	-	-	-	(+)	V	V
BS152/00	künstliche Vagina (D71/103)	+	-	-	-	(+)	V	V
BS153/00	künstliche Vagina (D71/84)	(+)	-	(+)	-	+	V	V
BS154/00	künstliche Vagina (D71/115)	-	-	-	(+)	-	V	V
BS18/01	Fetus (RD15)	-	-	(+)	(+)	(+)	V	V
BS51/01	künstliche Vagina (D23/48)	-	-	-	(+)	-	V	V
BS52/01	künstliche Vagina (D23/59)	-	-	-	-	(+)	V	V

Ergebnisse

Tabelle 11: Herkunft der *Campylobacter fetus*-Isolate und Ergebnisse phänotypischer und PCR-Differenzierung.

-: kein Wachstum; (+): schwaches Wachstum; +: einzelne Kolonien; ++: viele Kolonien; +++: dichtes bakterielles Wachstum; massives bakterielles Wachstum; V: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*; F: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*.

Subspezies-Identifikation								
Proben-Nr. (FLI)	Herkunft	Phänotypisierung						PCR
		1% Glycin	Na-Selenit- Reduktion	Metro- nidazole	Cefope- razone	Wachstum bei 42°C	Ergebnisse	Ergebnisse
BS53/01	künstliche Vagina (D23/68)	-	-	(+)	(+)	+	V	V
BS54/01	künstliche Vagina (D23/154)	(+)	-	-	-	(+)	V	V
BS55/01	künstliche Vagina (D23/225)	-	-	(+)	-	(+)	V	V
BS61/01	künstliche Vagina (D38/6)	(+)	-	(+)	-	+	V	V
BS135/02	Präputialspülung (D66/17)	-	-	(+)	-	+	V	V
BS201/02	Präputialspülung (D80/325)	-	-	+	(+)	(+)	V	V
BS202/02	Präputialspülung (D80/340)	-	-	(+)	(+)	-	V	V
BS206/02	Präputialspülung (B4-670)	-	-	-	(+)	+	V	V
BS209/02	Präputialspülung (D80/191)	-	-	+	-	+	V	V
BS210/02	Präputialspülung (D80/392)	(+)	-	+	(+)	(+)	V	V
BS212/02	Vaginalschleimprobe (D88/3)	-	-	(+)	(+)	(+)	V	V
BS213/02	Vaginalschleimprobe (D80/245)	(+)	-	(+)	(+)	+	V	V
BS38/03	Präputialspülung (D37/2)	-	-	(+)	(+)	(+)	V	V
BS47/03	Fetus (D61)	-	-	-	(+)	-	V	V
BS57/03	Präputialspülung (D77/13)	-	-	-	-	-	V	V
BS61/03	Vaginalschleimprobe (D71/2)	-	-	-	-	-	V	V
BS63/03	Vaginalschleimprobe (D71/9)	-	-	-	-	-	V	V
BS99/03	Plazenta (Bru 141/N6)	(+)	-	+	(+)	-	V	V
BS101/03	Präputialspülung (D104/18)	(+)	-	+	(+)	(+)	V	V

Ergebnisse

Tabelle 11: Herkunft der *Campylobacter fetus*-Isolate und Ergebnisse phänotypischer und PCR-Differenzierung.

-: kein Wachstum; (+): schwaches Wachstum; +: einzelne Kolonien; ++: viele Kolonien; +++: dichtes bakterielles Wachstum; massives bakterielles Wachstum; V: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*; F: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*.

Subspezies-Identifikation									
Proben-Nr. (FLI)	Herkunft	Phänotypisierung					Wachstum bei 42°C	Ergebnisse	PCR Ergebnisse
		1% Glycin	Na-Selenit- Reduktion	Metro- nidazole	Cefope- razone				
BS105/03	Präputialspülung (D115)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	V	V	
BS109/03	Vaginalschleimprobe(D133/1-03)	-	-	(+)	(+)	(+)	V	V	
BS111/03	Vaginalschleimprobe (D142/7)	-	-	-	(+)	-	V	V	
BS113/03	Vaginalschleimprobe (D142/8)	-	-	-	-	(+)	V	V	
BS09/04	Fetus (B3-47)	-	-	-	-	(+)	V	V	
BS38/04	Fetus (B3-186)	(+)	-	+	(+)	++	V	V	
BS74/04	Spermaprobe (Z3030)	(+)	-	(+)	(+)	++	V	V	
BS75/04	Präputialspülung (B/Zu2424-5)	(+)	-	(+)	(+)	++	V	V	
BS76/04	Fetus (B3-317)	-	-	(+)	-	++	V	V	
BS84/04	Fetus (Bru-42-04)	(+)	-	-	(+)	+	V	V	
BS85/04	Präputialspülung (B/Zu3717-2)	(+)	-	(+)	(+)	+	V	V	
BS86/04	Präputialspülung (B/Zu3717-4)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	V	V	
BS87/04	Präputialspülung (B/Zu3717-10)	-	-	(+)	(+)	(+)	V	V	
BS88/04	Präputialspülung (B/Zu3717-11)	(+)	-	(+)	(+)	-	V	V	
BS90/04	Fetus (Bru-51-04)	(+)	-	(+)	(+)	+	V	V	
BS91/04	Präputialspülung (B4142/20)	(+)	-	(+)	(+)	++	V	V	
BS136/04	Präputialspülung (B4-434)	-	-	-	(+)	++	V	V	
BS137/04	Präputialspülung (B4-470)	(+)	-	(+)	(+)	++	V	V	

Ergebnisse

Tabelle 11: Herkunft der *Campylobacter fetus*-Isolate und Ergebnisse phänotypischer und PCR-Differenzierung.
 -: kein Wachstum; (+): schwaches Wachstum; +: einzelne Kolonien; ++: viele Kolonien; +++: dichtes bakterielles Wachstum; massives bakterielles Wachstum; V: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*; F: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*.

Subspezies-Identifikation								
Phänotypisierung								PCR
Proben-Nr. (FLI)	Herkunft	1% Glycin	Na-Selenit- Reduktion	Metro- nidazole	Cefope- razone	Wachstum bei 42°C	Ergebnisse	Ergebnisse
BS138/04	Präputialspülung (B4-473)	(+)	-	(+)	(+)	++	V	V
BS141/04	Präputialspülung (B4-582)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	V	V
BS142/04	Vaginalschleimprobe (B4-610)	(+)	-	-	-	(+)	V	V
BS144/04	Fetus (Bru-129/04)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	V	V
BS148/04	unbekannt	(+)	-	(+)	(+)	(+)	V	V
BS149/04	Präputialspülung (B4-1108)	-	-	(+)	(+)	(+)	V	V
BS150/04	Präputialspülung (B4-1109)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	V	V
BS205/04	Präputialspülung (B4-1627)	-	-	(+)	(+)	(+)	V	V
BS214/04	Präputialspülung (D108/130-04)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	V	V
BS11/05	Präputialspülung (B4-2)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	V	V
BS62/05	Präputialspülung (B4-183)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	V	V
BS63/05	Präputialspülung (B4-187)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	V	V
BS64/05	Präputialspülung (B4-189)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	V	V
BS68/05	Präputialspülung (B4-277)	-	-	-	-	-	V	V
BS69/05	Präputialspülung (B4-279)	-	-	-	-	-	V	V
BS70/05	Präputialspülung (B4-280)	-	-	-	-	+	V	V
BS71/05	Präputialspülung (B4-281)	-	-	-	-	-	V	V

Ergebnisse

Tabelle 11: Herkunft der *Campylobacter fetus*-Isolate und Ergebnisse phänotypischer und PCR-Differenzierung.

-: kein Wachstum; (+): schwaches Wachstum; +: einzelne Kolonien; ++: viele Kolonien; +++: dichtes bakterielles Wachstum; massives bakterielles Wachstum; V: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*; F: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*.

Subspezies-Identifikation								
Phänotypisierung								PCR
Proben-Nr. (FLI)	Herkunft	1% Glycin	Na-Selenit- Reduktion	Metro- nidazole	Cefope- razone	Wachstum bei 42°C	Ergebnisse	Ergebnisse
BS100/05	Fetus (B3-425)	-	-	-	-	-	V	V
BS122/05	Fetus (Bru76-05)	-	-	+	++	-	V	V
BS134/05	Fetus (172aZ05056)	-	-	(+)	-	(+)	V	V
BS145/05	Präputialspülung (AZ178a-Z-05490/1)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	V	V
BS146/05	Präputialspülung (AZ178a-Z-05490/3)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	V	V
BS147/05	Präputialspülung (AZ178a-Z-05490/7)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	V	V
BS151/05	Präputialspülung (AZ178a-Z05842/1)	(+)	-	(+)	(+)	-	V	V
BS152/05	Präputialspülung (AZ178a-Z05842/2)	-	-	(+)	(+)	-	V	V
BS484/99	Fetus, Schaf (DSMZ 5361)	++++	++++	++++	++++	++++	F	F
BS325/99	Fetus, Schaf (F286/94)	+++	++++	+++	++++	++++	F	F
BS452/99	Fetus, Schaf (C48/86)	++++	++	+	+++	++++	F	F
BS453/99	Präputialspülung C56/88	++++	++	-	(+)	+++	F	F
BS454/99	Uterus, Kuh (C63/88)	++++	++++	++++	++++	++++	F	F
BS455/99	Fetus, Schaf (C33/89)	++++	-	++++	++++	++++	F	F
BS456/99	Fetus, Schaf (C293/89)	++++	-	(+)	-	+++	F	F
BS457/99	Fetus, Schaf (C76/90)	+++	++++	-	++++	-	F	F
BS458/99	Fetus, Rind (C44/91)	++++	(+)	+++	++++	++++	F	F
BS459/99	Fetus, Schaf (C1/92)	++++	+++	++++	++++	+	F	F

Ergebnisse

Tabelle 11: Herkunft der *Campylobacter fetus*-Isolate und Ergebnisse phänotypischer und PCR-Differenzierung.
 -: kein Wachstum; (+): schwaches Wachstum; +: einzelne Kolonien; ++: viele Kolonien; +++: dichtes bakterielles Wachstum; massives bakterielles Wachstum; V: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*; F: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*.

Subspezies-Identifikation									
Proben-Nr. (FLI)	Herkunft	Phänotypisierung					Wachstum bei 42°C	Ergebnisse	PCR Ergebnisse
		1% Glycin	Na-Selenit- Reduktion	Metro- nidazole	Cefope- razone	Ergebnisse			
BS460/99	Fetus, Schaf (C4/99)	++++	++++	+++	++++	++++	F	F	
BS155/00	künstliche Vagina (D71/279)	+++	+++	-	+	-	F	F	
BS56/01	künstliche Vagina (D23/193)	++++	++	-	++++	++++	F	F	
BS1/02	Fetus, Schaf (E159/01)	++++	-	-	++++	++++	F	F	
BS211/02	Präputialspülung (D75/5)	++++	++	++++	+++	++++	F	F	
BS03/04	Fetus, Rind (Bru 141)	++++	++++	+	++++	++++	F	F	
BS222/04	Spermaprobe, Rind (Z3030)	+++	++	(+)	++++	++	F	F	
BS91/05	Präputialspülung (ZU3854/24/1)	++++	++	(+)	++++	++	F	F	
BS93/05	Präputialspülung (ZU3854/24/3)	+++	++	(+)	++++	++	F	F	
BS94/05	Präputialspülung (ZU3930/3/1)	++++	++	(+)	++++	+++	F	F	
BS96/05	Präputialspülung (ZU3930/3/2)	+++	++	(+)	++++	++	F	F	
BS101/05	Fetus, Rind (B3445)	+++	++	++	++++	+	F	F	

4.2 PCR

4.2.1 Identifizierung der Spezies *C. fetus*

Campylobacter fetus-Isolate von insgesamt 103 Proben wurden mit Hilfe der spezies-spezifischen PCR als *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* oder *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* identifiziert.

Insgesamt wurden 22 *Campylobacter*-Isolate anhand des PCR-Ergebnisses als *C. fetus* subsp. *fetus* und 81 als *C. fetus* subsp. *venerealis* identifiziert.

Wie aus Abbildung 8 ersichtlich, wurde mit dem Primerpaar MG3F/MG4R für die hier untersuchten Isolate einschließlich der Typstämme ein Amplifikat bei ca. 750 Bp gebildet.

Aus Abbildung 9 wird ersichtlich, dass mit den Primern VenSF/VenSR nur beim Vorliegen von *C. fetus* subsp. *venerealis*-DNS ein 142-Bp-Fragment amplifiziert wurde (Spur 2-4 und Spur 7 für den Typstamm), während *C. fetus* subsp. *fetus*-DNS kein Amplifikat ergab (Spur 5). Damit konnte die eindeutige Differenzierung der *C. fetus* subsp. *fetus*-Isolate von den *C. fetus* subsp. *venerealis* erreicht werden.

Um die molekulare Identifizierung von *C. fetus* im Direktnachweis aus Sperma- und Präputialspülproben erfolgreich durchführen zu können, genügte es jedoch nicht, die erregerehaltigen Präputialspülproben der produzierenden Bullen an sich zu verwenden. Das Ergebnis war für jede Probe negativ. Wurden die Präputialspülproben einer mikrobiologisch Kultivierung unterzogen, zeigte sich mikrobielles Wachstum und die PCR von den angezüchteten Erregern lieferte auswertbare Ergebnisse.

Ergebnisse

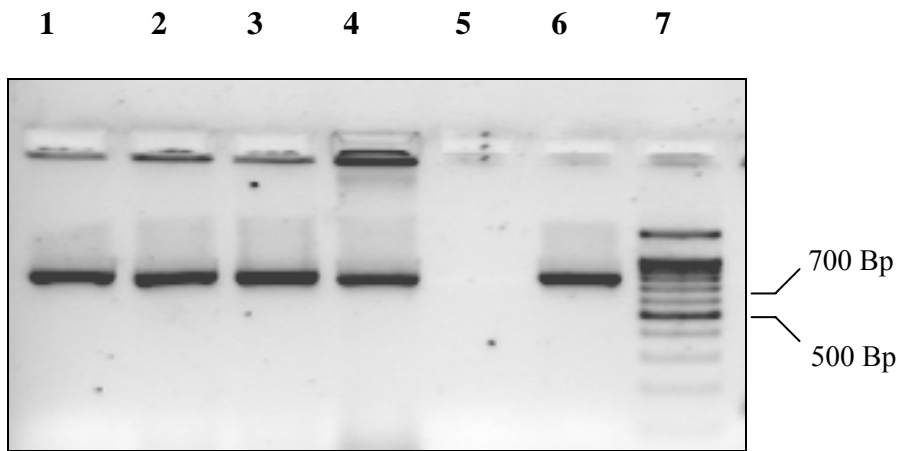


Abbildung 8: Identifizierung der Spezies *C. fetus* mit den Primern MG3F/MG4R in der PCR. Spur 1-3: *C. fetus* subsp. *venerealis*-Feldstämme BS20/05, BS21/05 und BS22/05. Spur 4: *C. fetus* subsp. *fetus*-Feldstamm BS23/05. Spur 5: negative PCR-Kontrolle. Spur 6: positive PCR-Kontrolle Typstamm *C. fetus* subsp. *fetus* BS484/99. Spur 7: DNS-Größenstandard (100-Bp-Leiter).

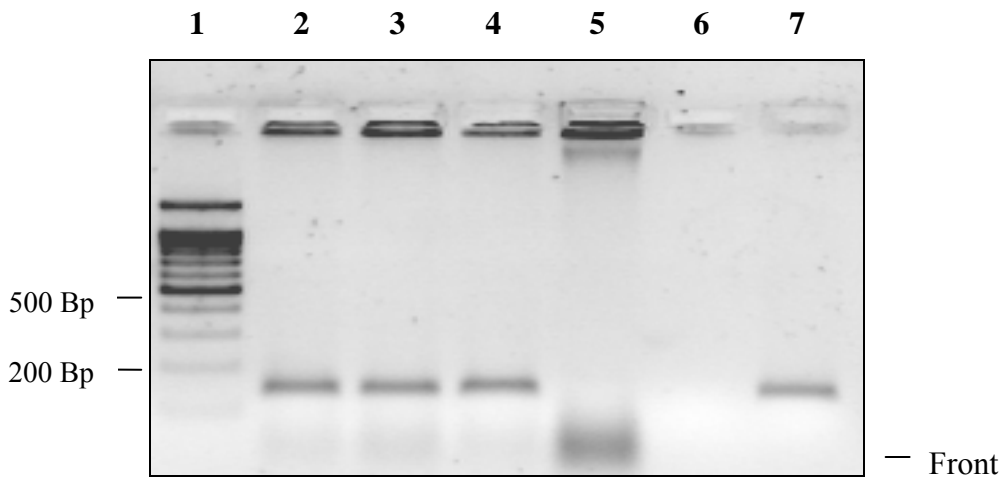


Abbildung 9: Differenzierung der Subspezies *fetus* und *venerealis* mit dem Primerpaar VenSF/VenSR in der PCR. Spur 1: DNS-Größenstandard (100-Bp-Leiter). Spur 2-4: *C. fetus* subsp. *venerealis*-Feldstämme BS20/05, BS21/05 und BS22/05. Spur 5: *C. fetus* subsp. *fetus*-Feldstamm BS23/05. Spur 6: negative PCR-Kontrolle. Spur 7: positive PCR-Kontrolle Typstamm BS473/99.

Ergebnisse

4.2.2 Analytische Empfindlichkeit

Um die Sensitivität der PCR-Systeme zu ermitteln, wurde wie beschrieben eine dekadische Verdünnungsreihe der jeweiligen genomischer DNS hergestellt und in der PCR eingesetzt.

Der Vergleich der Auszählung der Kolonien mit den PCR-Ergebnissen zeigt an, dass die untere Nachweisgrenze der PCR für Reinkulturen aus Thioglykolat-Bouillon mit den Primern MG3F/MG4R und VenSF/VenSR, für *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* bei $4,4 \times 10^4$ KbE/ml (Abbildung 10) und für *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* bei $3,3 \times 10^5$ KbE/ml (Abbildung 11) lag. Die Amplifikation höher konzentrierter DNS von *Campylobacter fetus*-Subspezies in beiden Abbildungen ($4,4 \times 10^7$ KbE/ml in Abbildung 10 und $3,3 \times 10^8$ KbE/ml in Abbildung 11), erbrachte im Agarosegel intensive Banden

Für DNS von *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* gemischt mit DNS von Samenproben wurde mit denselben Primern (MG3F/MG4R) eine Nachweisgrenze von $4,3 \times 10^2$ KbE/ml (Abbildung 12) und für DNS verdünnt in AndromedTM-Verdünnung eine Nachweisgrenze von 2×10^3 KbE/ml (ohne Abbildung) ermittelt.

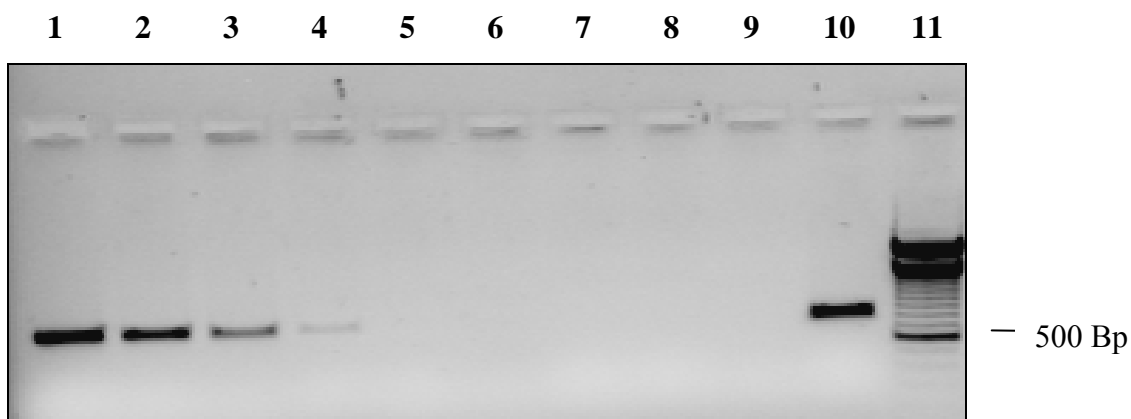


Abbildung 10: PCR der *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*-Kulturen mit dem Primerpaar MG3F/MG4R

Spur 1: $4,4 \times 10^7$ KbE/ml, Spur 2: $4,4 \times 10^6$ KbE/ml, Spur 3: $4,4 \times 10^5$ KbE/ml, Spur 4: $4,4 \times 10^4$ KbE/ml, Spur 5: $4,4 \times 10^3$ KbE/ml, Spur 6: $4,4 \times 10^2$ KbE/ml, Spur 7: $4,4 \times 10^1$ KbE/ml, Spur 8: $4,4 \times 10^0$ KbE/ml, Spur 9: negative PCR-Kontrolle, Spur 10: positive PCR-Kontrolle Typstamm *C. fetus* subsp. *fetus* BS484/99, Spur 11: DNS-Größenstandard (100-Bp-Leiter).

Ergebnisse

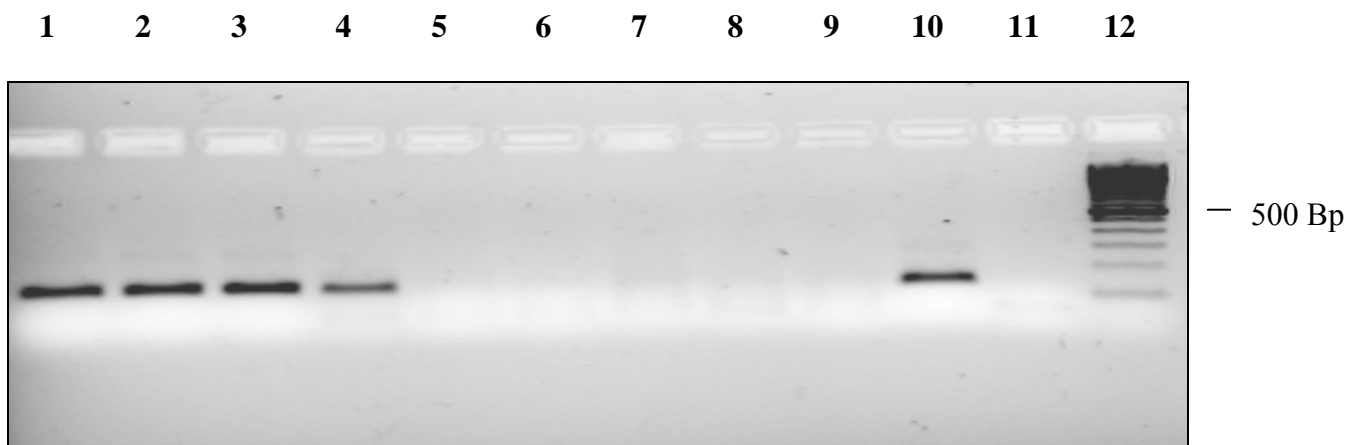


Abbildung 11: PCR der *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*-Kulturen mit dem Primerpaar VenSF/VenSR (-Primern)

Spur 1: $3,3 \times 10^8$ KbE/ml, Spur 2: $3,3 \times 10^7$ KbE/ml, Spur 3: $3,3 \times 10^6$ KbE/ml, Spur 4: $3,3 \times 10^5$ KbE/ml, Spur 5: $3,3 \times 10^4$ KbE/ml, Spur 6: $3,3 \times 10^3$ KbE/ml, Spur 7: $3,3 \times 10^2$ KbE/ml, Spur 8: $3,3 \times 10^1$ KbE/ml, Spur 9: $3,3 \times 10^0$ KbE/ml, Spur 10: positive PCR-Kontrolle Typstamm *C. fetus* subsp. *venerealis* 473/99, Spur 11: negative PCR-Kontrolle, Spur 12: DNS-Größenstandard (100-Bp-Leiter).

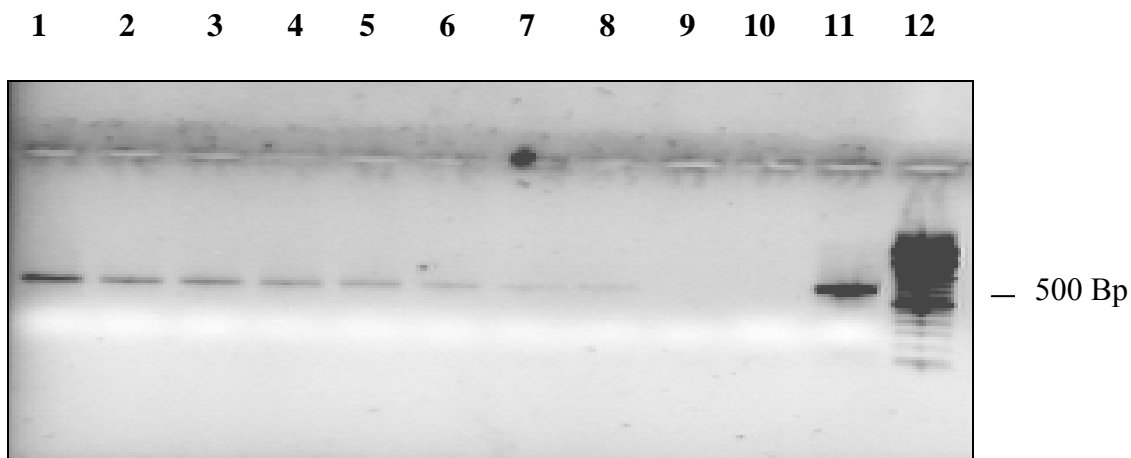


Abbildung 12: PCR mit gespiktem Bullensperma als Probenmaterial (DNS von Sperma und DNS von *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* zugemischt)

Spur 1: DNS von Sperma und DNS von Kultur $4,3 \times 10^9$ KbE/ml, Spur 2: DNS von Sperma und DNS von Kultur $4,3 \times 10^8$ KbE/ml, Spur 3: DNS von Sperma und DNS von Kultur $4,3 \times 10^7$ KbE/ml, Spur 4: DNS von Sperma und DNS von Kultur $4,3 \times 10^6$ KbE/ml, Spur 5: DNS von Sperma und DNS von Kultur $4,3 \times 10^5$ KbE/ml, Spur 6: DNS von Sperma und DNS von Kultur $4,3 \times 10^4$ KbE/ml von, Spur 7: DNS von Sperma und DNS von Kultur $4,3 \times 10^3$ KbE/ml, Spur 8: DNS von Sperma und DNS von Kultur $4,3 \times 10^2$ KbE/ml, Spur 9: DNS von Sperma, Spur 10: negative PCR-Kontrolle, Spur 11: positive PCR-Kontrolle Typstamm *C. fetus* subsp. *fetus* 484/99, Spur 12: DNS-Größenstandard (100-Bp-Leiter).

Ergebnisse

4.2.3 PCR nach DNS-Isolierung mittels Biotin-markierten Oligonukleotiden und Streptavidin-Beads

4,4 x 10⁶ KbE/ml-*Campylobacter fetus* subsp. *fetus*-Kultur wurde bis 4,4 x 10⁰ KbE/ml verdünnt und deren DNS, wie in Kapitel 3.3.1.2.1 beschrieben, isoliert. Eine PCR wurde mittels Biotin-markierten-Primern und Streptavidin-Beads durchgeführt. Für alle Proben war das Ergebnis negativ. Die DNS-Kontrolle 484/99 (*Campylobacter fetus* subsp. *fetus*-Typstamm), isoliert mit dem High Pure PCR Template Preparation KitTM war dagegen positiv (Positivkontrolle).

4.2.4 PCR nach DNS-Isolierung mittels Phenol-Chloroform

Alle mit dieser Methode extrahierten Proben verblieben in der PCR negativ (außer positiver Kontrolle), d.h. es konnte keine DNS amplifiziert werden.

Ergebnisse

4.2.5 Zusammenfassung die Ergebnisse

Die Tabelle 12 zeigt die analytische Sensitivität von *Campylobacter fetus*-Spezies verschiedener DNS-Extraktionsmethoden.

Tabelle 12: Sensitivität der PCR aus verschiedenen DNS-Extraktions-Methode. Legende: C.f.f.: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*; C.f.v.: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*; +: und; Sperma (-): Sperma ist *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* negativ; Sperma (+): Sperma ist *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* positiv; AndromedTM: Kryoprotektive Verdünnung auf Soja-Lecithin-Basis.

Probe	DNS-Extraktion	Analytische Sensitivität / Ergebnisse (KbE/ml)	Bemerkung
C.f.f. Kultur (Verdünnungsreihe)	QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) TM	10 ⁵	
C.f.f. Kultur (Verdünnungsreihe)	QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) TM	10 ⁷	Umfällen der DNS mit Isopropanol
C.f.f. Kultur (Verdünnungsreihe)	Roche Diagnostics Kit TM	10 ⁷	Umfällen der DNS mit Isopropanol
C.f.f. Kultur (Verdünnungsreihe)	Roche Diagnostics Kit TM	10 ⁴	
C.f.f. Kultur (Verdünnungsreihe)	Biotin-markierten Primer und Streptavidin-Beads	negativ	
C.f.v. Kultur (Verdünnungsreihe)	QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) TM	10 ⁵	
C.f.v. Kultur (Verdünnungsreihe)	Roche Diagnostics Kit TM	10 ⁵	
C.f.v. Kultur (Verdünnungsreihe)	Kochen	10 ⁵	
C.f.v. Kultur + Sperma (-)	Roche Diagnostics Kit TM	10 ⁴	
C.f.v. Kultur + Sperma (-)	Phenol-Chloroform Extraktion	negativ	
Sperma (+)	Roche Diagnostics Kit TM	negativ	
Sperma (+) verdünnt mit Andromed TM	Roche Diagnostics Kit TM	negativ	
Präputialspülung	Kochen	negativ	
Präputialspülung	Roche Diagnostics Kit TM	negativ	
DNS C.f.v. (Verdünnungsreihe)	QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) TM	10 ³	
DNS C.f.f. Kultur + DNS Sperma (-)	QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) TM	10 ⁰	
DNS C.f.f. Kultur + DNS Sperma (-) verdünnt mit Andromed TM	QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) TM	10 ⁰	

Ergebnisse

Die Konzentrationen von Primern, Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs), Mg-Ionen, DNS-Template und Q-Solution wurden gegeneinander optimiert, um eine größtmögliche Empfindlichkeit und Spezifität in der PCR-Reaktion zu erreichen (Tabelle 13).

Tabelle 13: PCR-Optimierung (50 µl Ansätze).

C.f.v.: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*;

C.f.f.: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*;

Sperma (-): Sperma ist *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* negativ;

Sperma (+): Sperma ist *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* positiv;

AndromedTM: Kryoprotektive Verdünnung auf Soja-Lecithin-Basis;

Roche^{TM*}: Taq DNA Polymerase (RocheTM);

Roche^{TM**}: Taq Expand High Fidelity (RocheTM);

+: und.

Probe	PCR (Ansatz: 50 µl)	Puffer (10 X)	dNTP (2mM)	Primer 1/2 (10 pmol)	Q-Solution (5 X)	Zusätzlich MgCl ₂ (25mM)	Taq-Polymerase	H ₂ O	DNS	Sensitivität
C.f.v.- Kultur (Verdünnungsreihe)	5 µl	1 µl	1 µl	1 µl	-	-	0,2 µl (Roche ^{TM*})	ad 50 µl	5 µl	10 ⁵
C.f.f. - Kultur (Verdünnungsreihe)	5 µl	1 µl	1 µl	1 µl	-	-	0,2 µl (Roche ^{TM*})	ad 50 µl	5 µl	10 ⁴
DNS C.f.f. Kultur + DNS Sperma (-)	5 µl	1 µl	1 µl	1 µl	-	-	0,2 µl (Roche ^{TM*})	ad 50 µl	5 µl	10 ⁰
DNS C.f.f. Kultur + DNS Sperma (-) verdünnt mit Andromed TM	5 µl	1 µl	1 µl	1 µl	-	-	0,2 µl (Roche ^{TM*})	ad 50 µl	5 µl	10 ⁰
DNS C.f.v. (Verdünnungsreihe)	5 µl	2 µl	2 µl	2 µl	10 µl	-	0,2 µl (Qiagen TM)	ad 50 µl	2 µl	10 ⁷
DNS C.f.v. (Verdünnungsreihe)	5 µl	2 µl	2 µl	2 µl	10 µl	2 µl	0,2 µl (Qiagen TM)	ad 50 µl	2 µl	10 ⁶
DNS C.f.v. (Verdünnungsreihe)	5 µl	2 µl	4 µl	4 µl	10 µl	2 µl	0,2 µl (Qiagen TM)	ad 50 µl	2 µl	10 ³

Ergebnisse

Tabelle 13: PCR-Optimierung (50 µl Ansätze).

C.f.v.: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*;

C.f.f.: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*;

Sperma (-): Sperma ist *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* negativ;

Sperma (+): Sperma ist *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* positiv;

AndromedTM: Kryoprotektive Verdünnung auf Soja-Lecithin-Basis;

Roche^{TM*}: Taq DNA Polymerase (RocheTM);

Roche^{TM**}: Taq Expand High Fidelity (RocheTM);

+: und.

Probe \ PCR (Ansatz: 50 µl)	Puffer (10 X)	dNTP (2mM)	Primer 1/2 (10 pmol)	Q- Solution (5 X)	Zusätzlich MgCl ₂ (25mM)	Taq-Polymerase	H ₂ O	DNS	Sensitivität
DNS C.f.v. (Verdünnungsreihe)	5 µl	2 µl	4 µl	10 µl	4 µl	0,2 µl (Qiagen TM)	ad 50 µl	2 µl	10 ⁶
DNS C.f.v. (Verdünnungsreihe)	5 µl	2 µl	4 µl	10 µl	6 µl	0,2 µl (Qiagen TM)	ad 50 µl	2 µl	10 ⁴
DNS C.f.v. (Verdünnungsreihe)	5 µl	2 µl	4 µl	10 µl	2 µl	0,2 µl (Qiagen TM)	ad 50 µl	2 µl	10 ⁶
DNS C.f.v. (Verdünnungsreihe)	5 µl	2 µl	2 µl	10 µl	6 µl	0,2 µl (Qiagen TM)	ad 50 µl	2 µl	10 ⁶
DNS C.f.v. (Verdünnungsreihe)	5 µl	2 µl	2 µl	10 µl	4 µl	0,2 µl (Qiagen TM)	ad 50 µl	2 µl	10 ⁶
DNS C.f.v. (Verdünnungsreihe)	5 µl	2 µl	4 µl	-	-	0,2 µl (Roche ^{TM**})	ad 50 µl	2 µl	10 ⁸
DNS C.f.v. (Verdünnungsreihe)	5 µl	2 µl	2 µl	10 µl	-	0,2 µl (Roche ^{TM**})	Ad 50 µl	2 µl	10 ⁸
DNS C.f.v. (Verdünnungsreihe)	5 µl	2 µl	2 µl	-	-	0,2 µl (Roche ^{TM**})	Ad 50 µl	2 µl	10 ⁵
DNS C.f.v. (Verdünnungsreihe)	5 µl	2 µl	4 µl	-	-	0,2 µl (Roche ^{TM**})	Ad 50 µl	2 µl	10 ⁶
DNS C.f.v. (Verdünnungsreihe)	5 µl	2 µl	2 µl	-	2 µl	0,2 µl (Roche ^{TM*})	Ad 50 µl	2 µl	10 ⁶

Ergebnisse

4.3 Genetische Charakterisierung mit der ERIC-PCR

Bei verschiedenen *Campylobacter-fetus*-Spezies-Stämmen aus unterschiedlichen Regionen Deutschlands (Baden-Württemberg, Bayern, Mecklenburg-Vorpommern und Thüringen) wurde die Variabilität genotypischer Merkmale untersucht. Die typischen Stämme aus Deutschland zeigten überwiegend PCR-Muster von großer Ähnlichkeit.

In Abbildung 13 weisen alle Isolate identische Bandenmuster auf, außer des Bandenmusters von Stamm Nr. BS 51/01 aus Baden-Württemberg, lokalisiert in Spur Nr. 7.

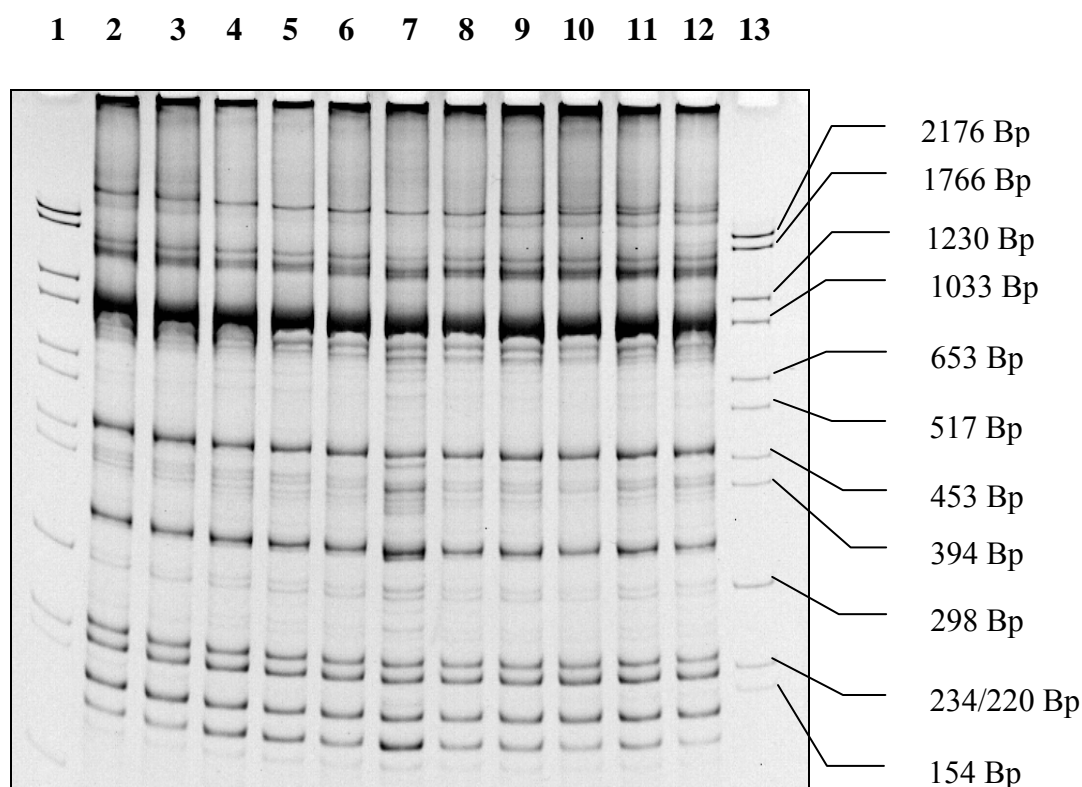


Abbildung 13: ERIC-PCR von *C. fetus* subsp. *venerealis*.

1: DNS Molekular Weight Marker VI, 2: Stamm Nr.: BS 54/01 (aus Baden-Württemberg); 3: Stamm Nr.: BS 52/01 (aus Baden-Württemberg); 4: Stamm Nr.: BS 18/01 (Mecklenburg-Vorpommern); 5: Stamm Nr.: BS 75/04 (aus Thüringen); 6: Stamm Nr.: BS 74/04 (aus Thüringen); 7: Stamm Nr.: BS 51/01 (aus Baden-Württemberg); 8: Stamm Nr.: BS 209/02 (aus Baden-Württemberg); 9: Stamm Nr.: BS 206/02 (aus Bayern); 10: Stamm Nr.: BS 135/02 (aus Baden-Württemberg); 11: Stamm Nr.: BS 152/00 (aus Baden-Württemberg); 12: Stamm Nr.: BS 150/00 (aus Baden-Württemberg); 13: DNS Molekular Weight Marker.

Ergebnisse

Zur die Unterscheidung von nahe verwandten Erregern wie *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* und *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, können Primer eingesetzt werden, die speziesspezifisch Gene oder Genregionen nachweisen (MG3F, MG4R, VenSF und VenSR). Zum anderen können Primer verwendet werden, die multipel vorkommende Gensequenzen, erkennen und bei den untersuchten Spezies unterschiedliche Bandenmuster (Fingerprint) generieren. Ein Beispiel für diese zweite Möglichkeit sind die sog. ERIC-Sequenzen, kurze repetitive Sequenzen, die multipel auf dem Chromosom vieler Bakterien-Spezies vorkommen (THANOS et al. 1996).

Die PCR-Fingerprint-Technik wurde auch für die Charakterisierung fraglicher *C. fetus*-Stämme genutzt, bei denen die konventionelle Diagnostik auf Grund atypischer biochemischer Eigenschaften unsicher war.

Im Folgenden sind alle Ergebnisse der Untersuchungen zur molekularen Typisierung von 57 *C. fetus*- Stämmen tabellarisch zusammengefasst (Tab. 14 und 15). Die Stämme sind in der Reihenfolge aufgelistet, in welcher sie in Abbildung 14 im Dendrogramm erscheinen.

Ergebnisse

Gruppe I (ERIC-PCR):

Tabelle 14: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* und *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*-Stämme. (Reihenfolge wie in Abbildung 14).

Nr.	Herkunft	Spezies
BS 212/02	Baden-Württemberg	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 86/04	Thüringen	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 505/99	Thüringen	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 142/04	Bayern	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 87/04	Thüringen	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 47/03	Baden-Württemberg	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 90/04	Baden-Württemberg	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 88/04	Thüringen	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 210/99	Thüringen	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 76/04	Bayern	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 131/04	Thüringen	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 211/02	Baden-Württemberg	<i>C. fetus</i> ssp. <i>fetus</i>
BS 454/99	Thüringen	<i>C. fetus</i> ssp. <i>fetus</i>
BS 325/99	Thüringen	<i>C. fetus</i> ssp. <i>fetus</i>
BS 63/03	Baden-Württemberg	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 83/04	Baden-Württemberg	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 473/99	Typ. NCTC 010354	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 141/04	Bayern	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 99/03	Baden-Württemberg	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 484/99	Typ. DSMZ 5361	<i>C. fetus</i> ssp. <i>fetus</i>
BS 09/04	Bayern	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 85/04	Thüringen	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 38/04	Bayern	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 153/00	Baden-Württemberg	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 201/02	Baden-Württemberg	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 211/99	Thüringen	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 322/99	unbekannt	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 03/04	Baden-Württemberg	<i>C. fetus</i> ssp. <i>fetus</i>

Ergebnisse

Gruppe II (ERIC-PCR):

Tabelle 15: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* – Stämme. (Reihenfolge wie in Abbildung 14).

Nr.	Herkunft	Spezies
BS 212/99	Thüringen	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 202/02	Baden-Württemberg	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 89/04	Baden-Württemberg	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 101/03	Baden-Württemberg	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 57/03	Baden-Württemberg	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 209/99	Thüringen	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 210/02	Baden-Württemberg	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 84/04	Baden-Württemberg	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 61/03	Baden-Württemberg	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 47/03	Baden-Württemberg	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 143/04	Baden-Württemberg	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 111/03	Baden-Württemberg	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 53/01	Baden-Württemberg	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 55/01	Baden-Württemberg	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 109/03	Baden-Württemberg	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 154/00	Baden-Württemberg	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 213/02	Baden-Württemberg	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 152/00	Baden-Württemberg	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 150/00	Baden-Württemberg	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 206/02	Bayern	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 135/02	Baden-Württemberg	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 61/01	Baden-Württemberg	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 74/04	Thüringen	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 209/02	Baden-Württemberg	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 51/01	Baden-Württemberg	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 52/01	Baden-Württemberg	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 18/01	Mecklenburg-Vorpommern	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
BS 54/01	Baden-Württemberg	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>

Ergebnisse

Abbildung 14 zeigt das zugehörige Dendrogramm der Elektropherogramme, geordnet nach Ähnlichkeit der DNS-Bandenmuster. Die Reihenfolge der Isolate ist aus Tabellen 14 und 15 zu entnehmen.

Die Analyse der Beziehungen zwischen den Fingerprint-Genotypen mit der Pearson-Korrelation-Distanz-Methode ergab, dass die meisten Stämme zwei großen Gruppen, zugeordnet werden könnten.

In Gruppe I kamen sowohl *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* als auch *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* vor, wohingegen in Gruppe II ausschließlich *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* beobachtet worden sind.

In Gruppe I waren überwiegend Stämme aus Thüringen und Baden-Württemberg und in Gruppe II fast ausschließlich Stämme aus Baden-Württemberg vertreten.

Ergebnisse

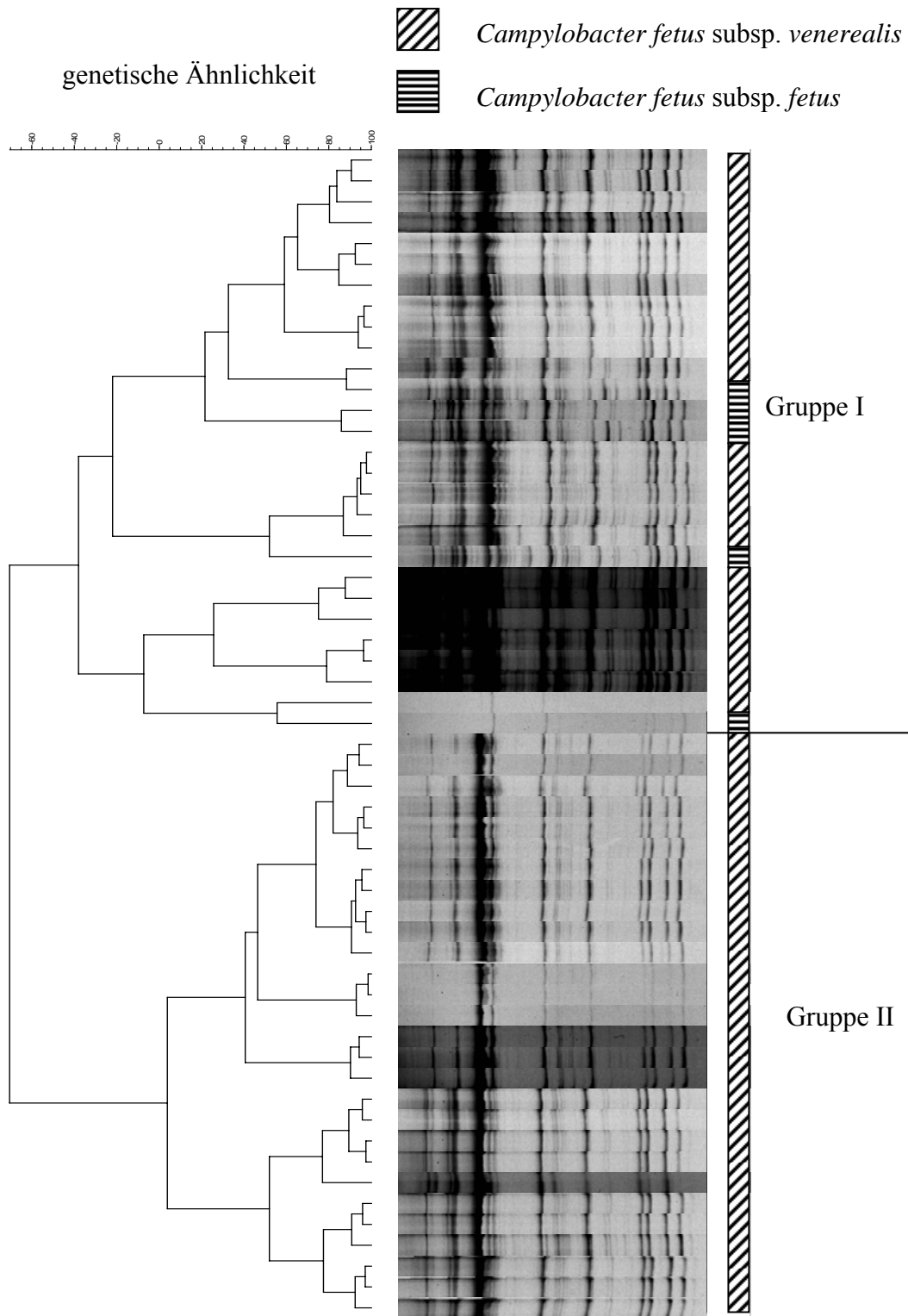


Abbildung 14: Dendrogramm der genetischen Ähnlichkeit der ERIC-PCR-Amplifikate.

4.4 Ergebnisse der PFGE

4.4.1 Interpretationen von PFGE-Bandenmustern (MRASS et al. 2000)

Wie schon darauf hingewiesen wurde, lässt sich der Verwandtschaftsgrad verschiedener Bakterienstämme einer Spezies (*Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*) durch den Vergleich der Bandenmuster, die durch ein genotypisches Typisierungsverfahren wie der PFGE geliefert werden, erkennen. Aufgrund von spontanen Mutationen ist es möglich, dass sich das Bandenmuster der Nachkommen von dem ihres Ursprungsstammes unterscheidet.

In Abbildung 15 sind beispielhaft die Bandenmuster von 8 Stämmen dargestellt. *C. fetus* subsp. *venerealis*-Stämme hatten generell 7 bis 13 Banden. Identische Stämme werden als Zeichen enger klonaler Verwandtschaft gewertet.

Die Spuren 3, 4, 5, 7 und 8 (aus Baden-Württemberg) weisen identische Bandenmuster auf. Die Muster der Spuren 2 (aus Baden-Württemberg), 9 (aus Bayern) und 10 (aus Thüringen) unterscheiden sich davon vollständig. Die Spuren 1, 6 und 11 sind Molekulargewichtsmarker.

Ergebnisse

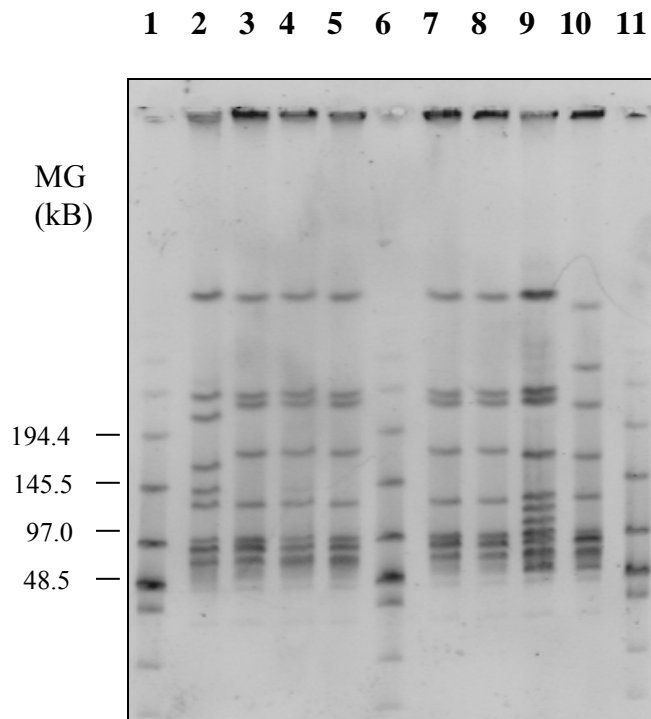


Abbildung 15 : Makrorestriktionsanalyse mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese.

1: Molekulargewichtsmarker Low Range, 2: Stamm-Nr: 57/03 (aus Baden-Württemberg), 3: Stamm-Nr: BS 210/02 (aus Baden-Württemberg), 4: Stamm-Nr: BS 212/02 (aus Baden-Württemberg), 5: Stamm-Nr: BS 99/03 (aus Baden-Württemberg), 6: Stamm-Nr: Molekulargewichtsmarker Low Range, 7: Stamm-Nr: BS 101/03 (aus Baden-Württemberg), 8: Stamm-Nr: BS 105/03 (aus Baden-Württemberg), 9: Stamm-Nr: BS 76/04 (aus Bayern), 10: Stamm-Nr: BS 75/04 (aus Thüringen), 11: Molekulargewichtsmarker Low Range.

MG: Molekulargewicht; kB: Kilobasen

4.4.2 Clusteranalyse der *Campylobacter fetus*-Isolate

Insgesamt wurden 50 Stämme der Spezies *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* und *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* mittels PFGE untersucht. Diese umfassten Typstämme (Tabelle 16) und Feldstämme (Tabelle 17).

Zur besseren Kennzeichnung der Stämme wurden Angaben der Herkunft vermerkt. Darunter waren 28 Stämme aus Baden-Württemberg, 13 aus Thüringen, vier aus Bayern, einer aus Mecklenburg-Vorpommern, einer aus Brasilien, einer mit unbekannter Herkunft (Deutschland) und zwei Typstämme.

Ergebnisse

Ein direkter Vergleich der Fragmentmuster (auch Makrorestriktionsprofile genannt) einzelner Isolate war so möglich. Zur Beurteilung der genetischen Ähnlichkeit der insgesamt 50 untersuchten Stämme wurde jedoch eine computergestützte objektive Analyse durchgeführt.

Durch eine Clusteranalyse der Makrorestriktionsprofile mit Hilfe des Computerprogramms GelComparTM wurde die genetische Verwandtschaft der *Campylobacter*-Stämme berechnet und in Form von Dendrogrammen dargestellt (Abbildung 16). Zur Berechnung der genetischen Ähnlichkeit der *C. fetus*-Stämme wurden der Algorithmus nach Ward (1963) und der Dice-Korrelationskoeffizient (1945) sowie die Parameter Tolerance = 1 %, Optimization = 0,5 %, Minimal Area = 0 verwendet.

Im Dendrogramm wurden die Bandenmuster der Isolate zu Clustern zusammengestellt. Ähnlichkeitsgrade wurden durch die Höhe der vertikalen Verbindungslinie zwischen zwei Gruppen oder Stämmen ausgedrückt und konnten auf einer Skala in Prozent abgelesen werden.

Nach Restriktion mit *Sma* I war das gesamte Stammkollektiv in zwei Gruppen unterteilt. So ergaben sich zwei Gruppen, die durch eine interne Übereinstimmung (Skala von -20% bis 100%) von ca. 5 % (Gruppe I) und 15 % (Gruppe II) charakterisiert waren.

In der Gruppe I waren überwiegend Stämme aus Baden-Württemberg und in den Gruppen II waren überwiegend Stämme aus Thüringen vertreten.

Campylobacter fetus subsp. *venerealis*-Stämme sind in beiden Gruppen vertreten. Gruppe I, die Gruppe mit der größten genetischen Übereinstimmung, beinhaltet überwiegend *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*-Stämme.

Campylobacter fetus subsp. *fetus*-Stämme kamen hingegen überwiegend in den Gruppen II vor.

Tabelle 16: *Campylobacter* – Typstämme (Typ).

*National Collection of Type Cultures

**Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

Stamm	Spezies	Typstämme	Herkunft
473/99	<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>	Typ	NCTC* 010354
484/99	<i>C. fetus</i> ssp. <i>fetus</i>	Typ	DSMZ** 5361

Ergebnisse

Tabelle 17: *Campylobacter*-Feldstämme.*Stamm wurde von Eliana Scarcelli Pinheiro vom Instituto Biológico-S.P.(Brasilien) zur Verfügung gestellt.

Proben-Nr. (FLI)	Herkunft		Subspezies	
BS 208/99	Fetus, Rind	C 51/88	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 209/99	Fetus, Rind	C 50/88	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 211/99	Fetus, Rind	C 93/87	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 212/99	Fetus, Rind	C 49/88	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 322/99	unbekannt		<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 325/99	Fetus, Schaf	F 286/94	<i>fetus</i>	<i>fetus</i>
BS 452/99	Fetus, Schaf	C 48/86	<i>fetus</i>	<i>fetus</i>
BS 505/99	Präputialspülprobe	P 783/93	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 147/00	Spülprobe, künstliche Vagina	D 71/106	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 149/00	Spülprobe, künstliche Vagina	D 71/83	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 150/00	Spülprobe, künstliche Vagina	D 71/96	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 151/00	Spülprobe, künstliche Vagina	D 71/100	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 152/00	Spülprobe, künstliche Vagina	D 71/103	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 153/00	Spülprobe, künstliche Vagina	D 71/84	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 154/00	Spülprobe, künstliche Vagina	D 71/115	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 18/01	Fetus, Rind	RD 15	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 51/01	Spülprobe, künstliche Vagina	D 23/48	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 53/01	Spülprobe, künstliche Vagina	D 23/68	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 54/01	Spülprobe, künstliche Vagina	D 23/154	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 55/01	Spülprobe, künstliche Vagina	D 23/225	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 61/01	Spülprobe, künstliche Vagina	D 38/6	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 135/02	Präputialspülprobe	D 66/17	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 201/02	Präputialspülprobe	D 80/325	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 202/02	Präputialspülprobe	D 80/340	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 206/02	Präputialspülprobe	B4-670	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 209/02	Präputialspülprobe	D 80/191	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 210/02	Präputialspülprobe	D 80/392	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 213/02	Präputialspülprobe	D 80/245	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 38/03	Präputialspülprobe	D 37/2	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 57/03	Präputialspülprobe	D 77/13	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 99/03	Rinderplazenta	Bru 141/NG	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 105/03	Präputialspülprobe	115/1, 115/2	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 109/03	Vaginalschleimprobe, Kuh	D 133/1	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 111/03	Vaginalschleimproben, Kuh	D 142/7	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 113/03	Vaginalschleimprobe, Kuh	D 142/8	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 03/04	Fetus, Rind	Bru 141	<i>fetus</i>	<i>fetus</i>
BS 09/04	Fetus, Rind	B3-47	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 38/04	Fetus, Rind	B3-186	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 74/04	Spermprobe	B/zu 2424	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 76/04	Fetus, Rind	B3-317	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 84/04	Fetus, Rind	Bru 42-04	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 85/04	Präputialspülprobe	3717-2	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 86/04	Präputialspülprobe	3717-4	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 87/04	Präputialspülprobe	3717-10	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 88/04	Präputialspülprobe	3717-11	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 90/04	Fetus, Rind	Bru 51/04	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
BS 131/04	Präputialspülprobe	P 757	<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>
B 928*	Präputialspülprobe		<i>venerealis</i>	<i>venerealis</i>

Ergebnisse

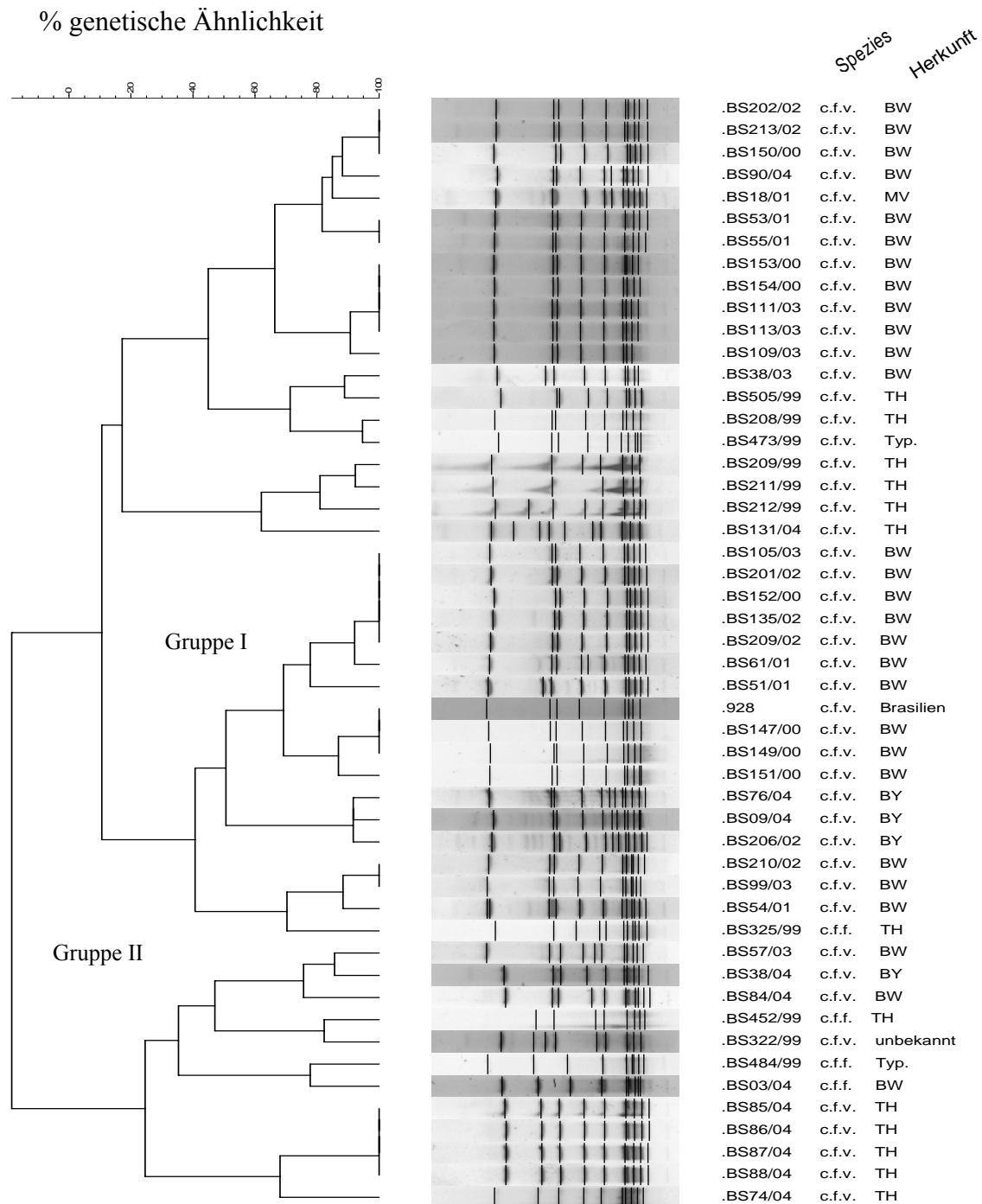


Abbildung 16: Makrorestriktionsanalyse *C. fetus* subsp. *fetus* und *C. fetus* subsp. *venerealis* mit der Endonuklease *Sma* I. c.f.v.: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*; c.f.f.: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*; Typ: Typstamm; BW: Baden-Württemberg; MV: Mecklenburg-Vorpommern; TH: Thüringen; BY: Bayern.

Ergebnisse

4.4.3 Clusteranalyse der *Campylobacter fetus*-Isolate aus den Jahren 2000 bis 2004

Die folgenden Dendrogramme stellen die Ergebnisse der Analyse der Stämme von *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* von 2000 bis 2003 dar (Abbildungen 17 bis 20). Sie zeigen eine Übereinstimmung von ca. 75% bis 100%.

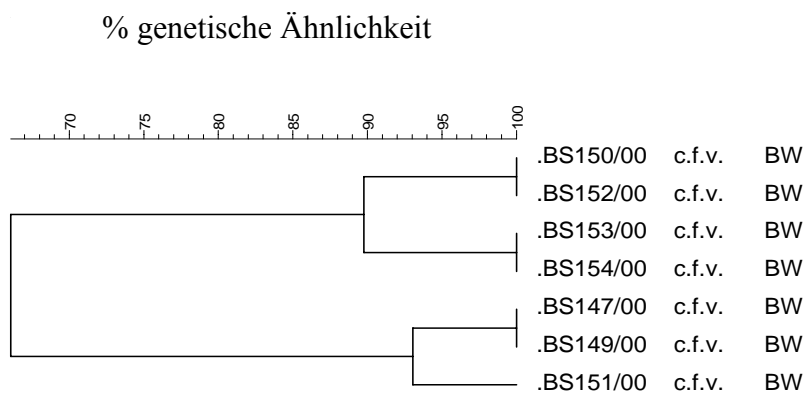


Abbildung 17: Dendrogramm von *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*-Isolaten von 2000 abgeleitet aus der Makrorestriktionsanalyse mit *Sma I*.

c.f.v.: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*; BW: Baden-Württemberg.

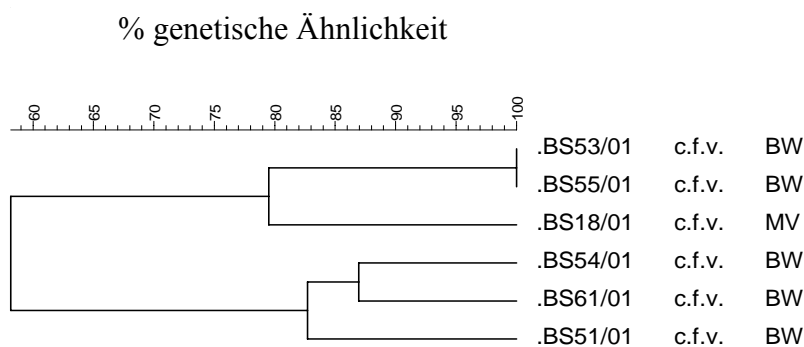


Abbildung 18: Dendrogramm von *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*-Isolaten von 2001 abgeleitet aus der Makrorestriktionsanalyse mit *Sma I*.

c.f.v.: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*; BW: Baden-Württemberg; MV: Mecklenburg-Vorpommern.

Ergebnisse

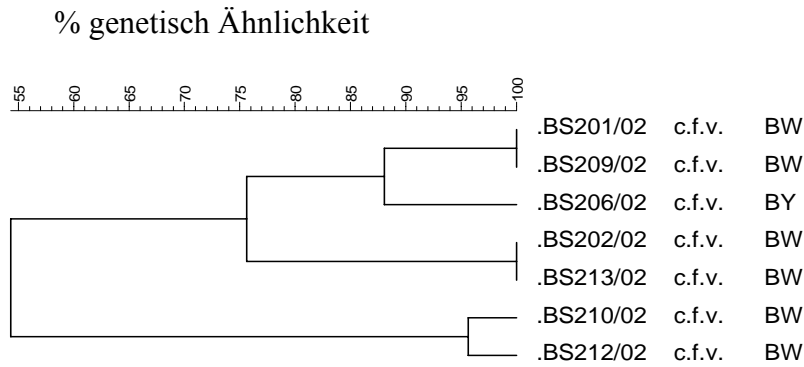


Abbildung 19: Dendrogramm von *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*-Isolaten von 2002 abgeleitet aus der Makrorestriktionsanalyse mit *Sma* I.

c.f.v.: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*; BW: Baden-Württemberg; BY: Bayern.

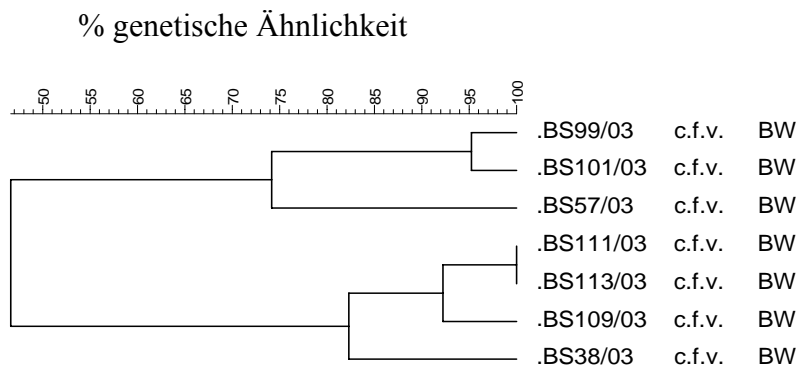


Abbildung 20: Dendrogramm von *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*-Isolaten von 2003 abgeleitet aus der Makrorestriktionsanalyse mit *Sma* I.

c.f.v.: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*; BW: Baden-Württemberg;

Ergebnisse

Das Dendrogramm in Abbildung 21 zeigt eine Übereinstimmung von 35% bis 100% zueinander. Der Stamm Nr. BS 03/04 war ein Isolat von *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* aus dem Jahr 2004. Er wies 50% Übereinstimmung mit anderen *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*-Stämmen auf.

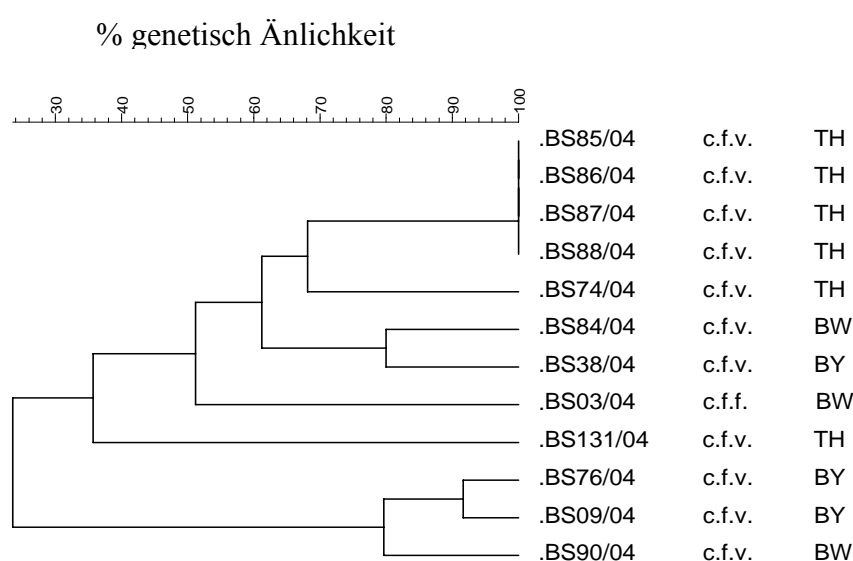


Abbildung 21: Dendrogramm von *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*-Isolaten von 2004 abgeleitet aus der Makrorestriktionsanalyse mit *Sma* I.

c.f.v.: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*; c.f.f.: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*; TH: Thüringen; BW: Baden-Württemberg; BY: Bayern.

4.4.4 Clusteranalyse der *Campylobacter fetus*-Isolate aus Baden-Württemberg

Nach Restriktion mit *Sma*I war das gesamte Stammkollektiv aus Baden-Württemberg in zwei klonale Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe zeigte eine Übereinstimmung von ca. 30% bis 100%. Der Stamm Nr. BS 03/04 war ein *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*, und in Gruppe I lokalisiert. Die Gruppe II enthielt *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* – Isolate mit einer Übereinstimmung von ca. 60% bis 100% (Abbildung 22).

Ergebnisse

In Abbildung 23 sind Isolate charakterisiert, die von Bullen aus einem einzigen Haltungsbetrieb stammten. Auffallend ist die starke Heterogenität der Isolate. Die Tiere standen auf verschiedene Ställen (Tabelle 9; Abschnitt 3.3.4.).

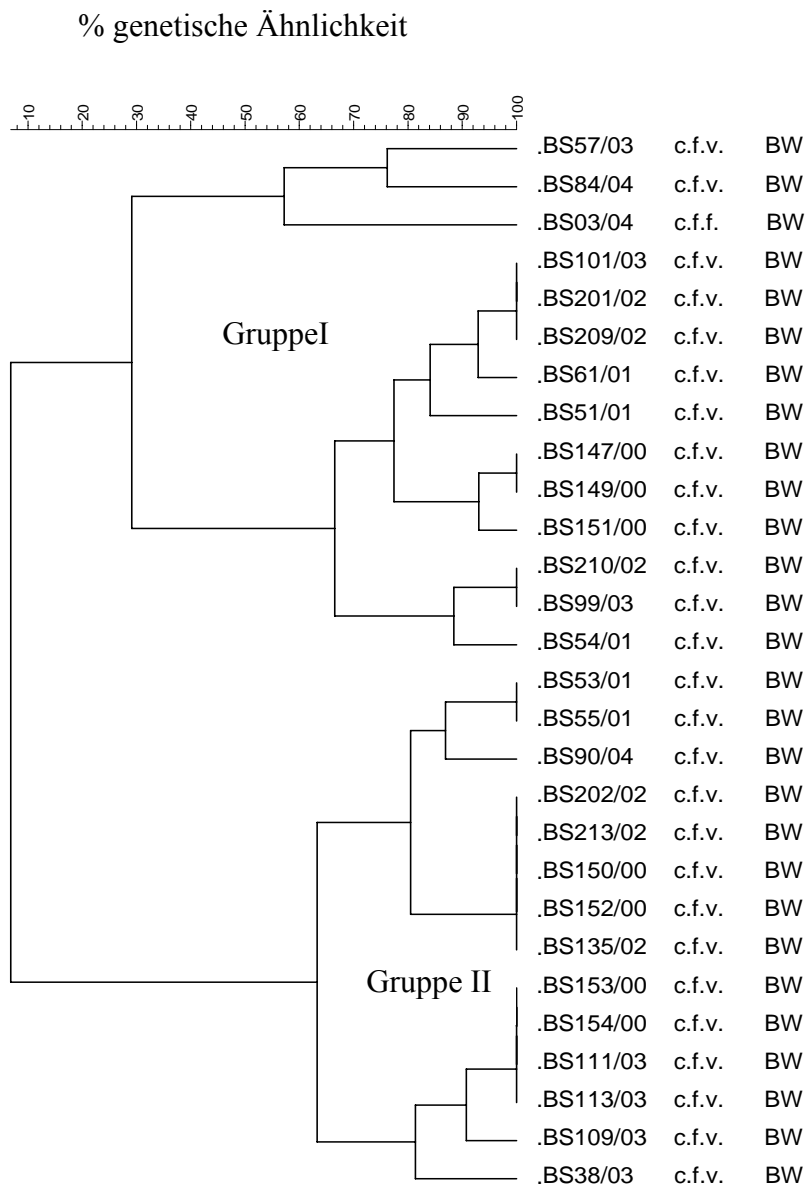


Abbildung 22: Dendrogramm der Clusteranalyse der *Campylobacter fetus*-Subspezies-Isolate aus Baden-Württemberg.

c.f.v: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*; c.f.f.: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*; BW: Baden-Württemberg.

Ergebnisse

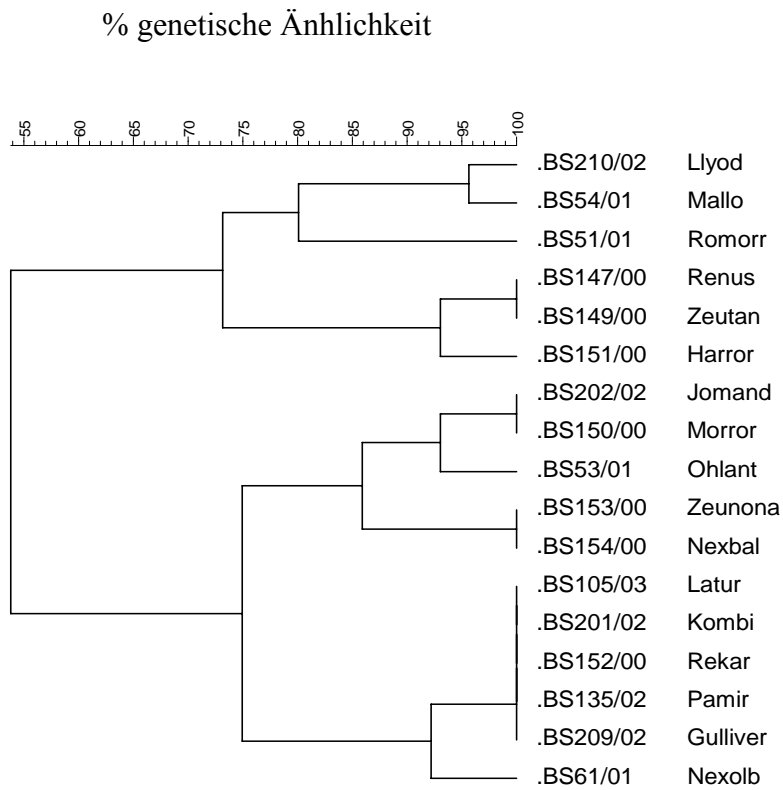


Abbildung 23: Stammbaum *C. fetus* subsp. *venerealis*-Isolate, errechnet auf der Basis der genotypischen Ähnlichkeit nach Restriktion mit *Sma I*.

Ergebnisse

4.4.5 Clusteranalyse der *Campylobacter fetus*-Isolate aus Thüringen (Abbildung 24)

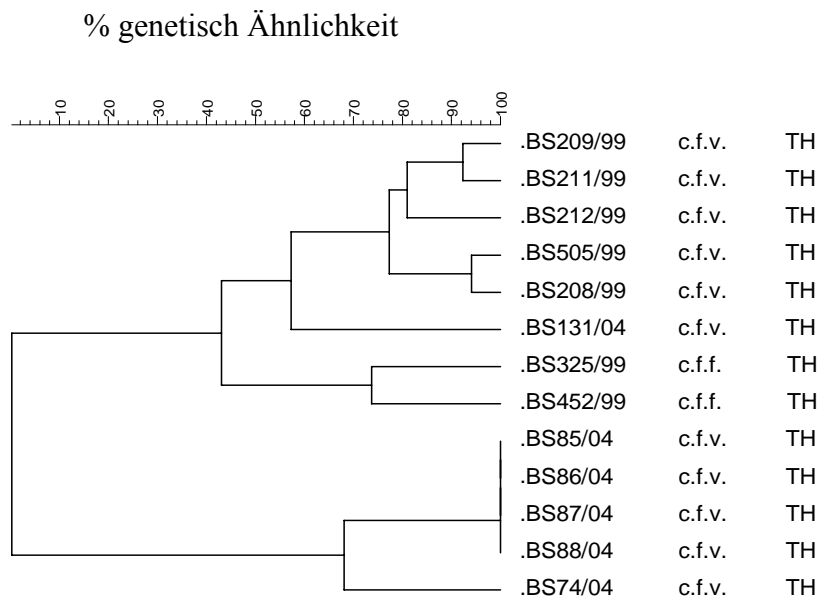


Abbildung 24: Dendrogramm der Clusteranalyse der *Campylobacter fetus*-Subspezies-Isolate aus Thüringen. c.f.v.: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*; c.f.f.: *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*; TH: Thüringen.

5 Diskussion

Im Ergebnis dieser Studie wurden Aussagen dazu erwartet, ob molekularbiologische Methoden eine sinnvolle Ergänzung der konventionellen Diagnostik bei Problemfällen und bei epidemiologischen Studien über Genital-Campylobacteriosen darstellen können.

5.1 Übertragungsrisiko durch künstliche Besamung

Wie hoch ist das Übertragungsrisiko durch die künstliche Besamung zu beurteilen?

Die Gesundheit der Besamungsbullen ist eine Voraussetzung für ein gutes Besamungsergebnis.

Die Ausmerzung der Genital-Campylobacteriose galt zu Beginn als der wertvollste Effekt der künstlichen Besamung. Bei der Werbung für die Besamung wurde immer wieder auf diesen Vorzug hingewiesen und die Bauern sahen in der Zusicherung der Gefährlosigkeit der Besamung auch einen wichtigen Punkt, von dem Besamungsangebot Gebrauch zu machen.

Die Wahrscheinlichkeit, dass *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* über die Besamung verbreitet wird, ist sehr klein. Infolge der strengen Überwachung sind Besamungsbullen sicher nur in Ausnahmefällen infiziert. Sollte dennoch einmal ein Besamungsbulle infiziert sein, ist allerdings die Gefahr gegeben, dass die Krankheitserreger über große Strecken verbreitet werden (GRUPP et al. 2003).

Übertragungsmöglichkeiten der Infektion mit dem Sperma infizierter Bullen sind grundsätzlich bewiesen (PHILPOTT 1969; ROSENBERGER 1970; DEDIÉ et al. 1982). Nach GRUNERT und BERCHTOLD (1982) besitzt *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* die Fähigkeit, neben der typischen Lokalisation im Präputium auch den Anfangsteil der Harnröhre zu besiedeln, wodurch eine Kontaktmöglichkeit mit dem Ejakulat gegeben ist.

Es wird angenommen, dass eine Infektionsdosis von 10^3 bis 10^4 Keimen/ml Sperma eine Manifestation der Deckseuche zur Folge hat. Dennoch muss gesagt werden, dass das Angehen einer Infektion von der Resistenzlage des Tieres und von Umweltfaktoren maßgeblich beeinflusst wird, sodass es nicht regelmäßig zu klinischen Symptomen bei Rindern kommt.

Eine Übertragung des Erregers durch künstliche Besamung auf das weibliche Tier kann jedoch auch deshalb nicht sicher verhindert werden, weil bei Temperaturen bis -196°C

Diskussion

C. fetus subsp. *venerealis* nicht vollständig inaktiviert wird. Als Konsequenz ist der Samen erkrankter Bullen unschädlich zu beseitigen (§ 4 der Deckinfektionen-Verordnung-Rinder).

5.2 Nachweis mittels PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erlaubt in der Regel die Produktion genügend großer Mengen spezifischer Nukleinsäuremoleküle *in vitro*, um den Nachweis eines Erregers mit größerer Sicherheit als mit konventionellen Methoden zu ermöglichen (ANON. 1998).

Die vorliegende Arbeit hatte unter anderem zum Ziel, die moderne Methode der „Direkt-PCR aus Nativpräparaten“ im Fall von Bullensperma zu untersuchen und gegebenenfalls zu etablieren. Für ein diagnostisches Routinelabor wäre die PCR-Untersuchung auf *Campylobacteriose* leichter und schneller durchführbar als die bakterielle Kultivierung. Außerdem wäre sie auch für den Besamungstierarzt wesentlich weniger gefährlich, da keine zusätzlichen Proben in Form von Präputialspülungen, wie von der Deckinfektionen-Verordnung gefordert, entnommen werden müssten.

Der molekulare Nachweis von *Campylobacter fetus*-Spezies durch PCR aus Sperma, insbesondere aus verdünntem, einmal tiefgefrorenem Sperma, hat bis heute Grenzen. Dies wurde auch durch die vorliegende Untersuchung bestätigt. Um sichere Ergebnisse über die Präsenz von *C. fetus* subsp. *venerealis* zu erhalten, müssen die Proben vor der PCR-Untersuchung immer noch kultiviert werden.

Die unterschiedlichsten Einflüsse können dazu führen, dass bei Untersuchung von infiziertem Sperma kein PCR-Produkt erhalten wird. Sowohl biologische Faktoren (Matrize, Inhibitoren, pH-Bedingungen, Konzentrationen verschiedenster Substanzen) wie auch physikalische und technische Parameter (Geräte, Temperatur, Anzahl der Zyklen) können die PCR prinzipiell beeinflussen. Auf Matrizeneigenschaften und Inhibitoren der Proben hat man keinen Einfluss, muss aber versuchen, bei der DNS-Extraktion diese Einflüsse zurückzudrängen, um möglichst hochgereinigte Nukleinsäuren zu erhalten.

5.3 Schwierigkeiten bei der PCR direkt aus Spermaproben

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Nachweisgrenze der PCR für die DNS von *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* und *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* mit einer der Literatur entnommenen Primerkombination ermittelt. Zur Charakterisierung der *C. fetus*-Subspezies wurde die von HUM et al. (1997) entwickelte PCR eingesetzt. Dabei wurde mit den Primern MG3F und MG4R ein 764-Bp-Amplikon für beide Subspezies von *C. fetus* amplifiziert. Die Differenzierung beider Subspezies von *C. fetus* erfolgte mit dem Primerpaar VenSF und VenSR, wobei nur bei *C. fetus* subsp. *venerealis* ein 142-Bp-Amplikon erhalten wird. Der größte Teil des Genoms wurde noch nicht sequenziert, folglich ist das zugehörige Gen gegenwärtig unbekannt.

Um eine PCR von zufriedenstellender Sensitivität zu ermöglichen, ist es wichtig, die DNS-Extraktions- und Reinigungsmethoden optimal zu wählen (BERRI et al. 2000). Bedauerlicherweise existieren in der Literatur keine standardisierten Angaben bezüglich dieser Methoden und der damit erreichbaren Sensitivität, was einen Vergleich erheblich erschwert. Einige Autoren beziehen sich auf die geringste Menge von DNS, die detektiert werden kann, andere hingegen auf die DNS-Menge, die für eine Amplifikation eingesetzt werden muss oder auf die Zellanzahl pro Milliliter oder pro Reaktion (SCHEU, 1990). Dabei kann sich das verwendete Reaktionsvolumen ebenfalls unterscheiden.

Um die Sensitivität und Spezifität zu überprüfen, wurde DNS von *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* mit DNS von Sperma gemischt, eine Verdünnungsreihe hergestellt und eine PCR durchgeführt. Die enorm hohe Sensitivität von einem Kbe/ml lässt sich durch die das Experiment begünstigende künstliche Situation erklären und war für Nativproben nicht reproduzierbar (siehe Tabelle 12).

Der Direktnachweis des Erregers mittels PCR aus Sperma und Spülproben war in der vorliegenden Untersuchung deutlich weniger sensitiv als der Nachweis nach der Kultivierung. In Nativpräparaten wie Sperma gelingt der PCR-Nachweis nur bei hohen Erregerkonzentrationen.

Qualität und Reinheit der DNS sind für die PCR-Analyse von entscheidender Bedeutung (MAUEL et al. 1999). Durch geeignete Extraktionsverfahren sollte die nachzuweisende DNS in möglichst hochmolekularer Form isoliert und von hemmendem Begleitmaterial be-

Diskussion

freit werden. Dazu wurden physikalisch-chemische Techniken oder enzymatische Verdauungsschritte (z.B. Proteinase K) eingesetzt, um Zellwände und störende Proteine zu entfernen. Der Aufwand für diese Arbeitsschritte richtet sich stark nach der Art des Probenmaterials. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sechs unterschiedliche DNS-Extraktionsmethoden getestet, wie QIAamp DNA Mini KitTM, High Pure PCR Template Preparation KitTM, Biotin-markierten Oligonukleotiden und Streptavidin-DynabeadsTM, Phenol-Chloroform-Extraktion und Hitze-Behandlung, um genomische DNS aus Reinkulturen und aus „Realproben“ verschiedener Isolate zu präparieren.

Dabei wurden je nach verwendeter DNS-Extraktionsmethode unterschiedliche Sensitivitäten in der PCR erreicht. Im Vergleich zu den im Rahmen der Untersuchungen ebenfalls getesteten DNS-Extraktionsmethoden waren die Roche Diagnostics KitTM und QIAamp DNA Mini KitTM sensitiver als die anderen Methoden. Die Verwendung solcher Kits ist in der Regel einfacher und führt zu besseren Ausbeuten als weiter oben genannte Methoden, welche zudem noch langsamer oder umständlicher durchführbar sind.

Das Seminalplasma ist ein komplex zusammengesetztes Sekret mit Makromolekülen wie Glykoproteinen, Enzymen, Prostaglandinen, Phospholipiden und kleineren Molekülen wie Fruktose, Citrat, Laktat und verschiedenen Aminosäuren (SCHÜLKE 1991). Daher ist es eine Herausforderung, daraus möglichst qualitativ hochwertige DNS zu gewinnen.

Gerade wenn man zu diagnostischen Zwecken Spermaproben benutzt, kann man keine aufwendige Reinigung durchführen, ohne den teilweise oder totalen Verlust des Materials zu riskieren. Biochemische Verunreinigungen, z.B. andere Makromoleküle, stören häufig nicht. Kleinere Moleküle können hingegen empfindliche Störungen verursachen (KRÖGER et al. 2006).

In einigen Versuchen wurde getestet, ob man den Reinheitsgrad der gewonnenen DNS erhöhen kann, wenn eine Präzipitation der DNS mit Isopropanol an die Extraktion angeschlossen wird. Die daraufhin gewonnenen PCR-Ergebnisse wiesen eine geringere Sensitivität auf als die Ergebnisse der PCR, die mit DNS ohne Isopropanol-Fällung erreicht wurden (Sensitivität von 10^5 und 10^4 ohne Umfällen der DNS mit Isopropanol und 10^7 mit Umfällen der DNS mit Isopropanol; siehe Tabelle 12). Das lässt sich möglicherweise durch den schon oben diskutierten DNS-Verlust erklären.

Ausgangspunkt waren in der vorliegenden Arbeit verschiedene Extraktionsmethoden bei Verwendung eines spezies-spezifischen PCR-Assays, wobei zur Optimierung die

Diskussion

jeweiligen PCR-Bedingungen mehr oder weniger stark modifiziert wurden. Um eine größtmögliche Empfindlichkeit und Spezifität in der PCR-Reaktion zum Nachweis der jeweiligen Erreger zu erreichen, wurden die Konzentration von Primern, von Desoxynukleosidtriphosphaten, von Magnesiumionen und von der *Taq*-DNS-Polymerase variiert. Ferner wurde das Temperaturprofil durch Variation der Zykluszeiten, der Zykluszahlen und der verwendeten Annealing-Temperaturen verändert (KOHLHAUSSEN 2001).

Die Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)-Konzentration beeinflusst die Anlagerung der Primer, Trennung der Stränge bei Denaturierung, Produktspezifität, Bildung von Primerdimeren und die Fehlerrate. Im Seminalplasma ist bereits ein breites Spektrum an Mineralien und Spurelementen (insbesondere auch Magnesium) enthalten - hier tun sich weitere schwer beeinflussbare Versuchsfaktoren und mögliche Fehlerquellen auf.

Weil Primer, Nukleotide und eventuell vorhandenes EDTA die Mg^{2+} -Ionen wegfangen, muss eigentlich für jede PCR die optimale Mg^{2+} -Konzentration ermittelt werden. Bei zu hohen Konzentrationen sinkt die Ausbeute spezifischer Produkte wieder ab, unspezifische Banden aller Größen dominieren das Bild. Niedrige Konzentrationen führen zu einer geringen PCR-Produktausbeute (MÜLHARDT 2000).

Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde auch der Einfluss verschiedener DNS-Polymerasen überprüft. Dabei erwiesen sich sowohl die *Taq*-DNA-Polymerase der Firma QiagenTM als auch die *Taq*-DNA-Polymerase und *Taq* Expand High Fidelity der Firma RocheTM als geeignete Enzyme.

Als Störgrößen können bei der zyklischen Amplifikation inhibitorische Bestandteile der Probenmatrix bzw. der abbauenden Enzyme und kontaminierende DNS auftreten. Hier müssen falsch-negative Ergebnisse jedoch ebenfalls berücksichtigt werden, die zum einen durch eine unzureichende Probenaufbereitung oder durch Inhibitoren im Untersuchungsgut verursacht werden und zum anderen durch mangelnde Sensitivität aufgrund suboptimaler Reaktionsparameter bedingt sein können (CONE et al. 1992).

PCR-Hemmstoffe (z.B. SDS, Heparin) können meist durch die Probenbehandlung in die PCR-Reaktion gelangen (MÜLLER 2001). Die hier genannten Hemmstoffe sollen als Beispiel gelten. Gerade sie sind in Spermaproben nicht vorhanden, dafür aber möglicherweise andere unbekannt Substanzen.

Diskussion

Die PCR amplifiziert DNS aus toten und lebenden Bakterien. Die Schwierigkeit des Nachweises von nichtkultivierbaren im Gegensatz zu kultivierbaren Mikroorganismen mittels PCR lässt sich teilweise umgehen, wenn die Keime einerseits direkt und andererseits nach einem Anreicherungsschritt in einem Medium nachgewiesen werden. Mehr Entwicklungsarbeit ist aber noch nötig, um kultivierbare von nichtkultivierbaren und toten Keimen zu unterscheiden (Nachweis in eingefrorenem Sperma) (ANON. 1998).

Es gibt allerdings verschiedene Substanzen (Additive), die die Effektivität der PCR modifizieren und verbessern können. Die Konzentration an Additiven, die von einigen Autoren auch als Supplime bezeichnet werden, wird vor Reaktionsbeginn empirisch ermittelt und variiert von Fall zu Fall erheblich.

Zu den Additiven gehören auch die Pufferreagenzien. Die Stabilisierung des pH-Werts ist bei der PCR mindestens genauso wichtig wie auch bei anderen biochemischen Reaktionen. Gerade weil hier mit großen Temperaturschwankungen gearbeitet wird, muss eine besonders hohe Pufferkapazität gewählt werden. In der Praxis liefern die Hersteller die speziellen Puffer und Additive mit.

Bestimmte Additive, wie Q-SolutionTM, Betain, Bovine Serum Albumin (BSA), Detergenzien, Dimethylsulfoxid (DMSO), die häufig bei der klassischen PCR benutzt werden, um die Amplifizierung zu erleichtern, wurden ebenfalls getestet, damit ein eventueller Einfluss auf die PCR festgestellt werden kann. In dieser Arbeit ergab die PCR unter Verwendung von Q-SolutionTM aus verdünnten Reinkulturen stark voneinander abweichende Sensitivitäten.

5.4 Differenzierung der *Campylobacter*-Spezies

Die Spezies *Campylobacter fetus* umfasst die beiden Subspezies *venerealis* und *fetus*, die sich in ihrer Epidemiologie und klinischer Bedeutung unterscheiden.

Campylobacter fetus subsp. *venerealis* ist in hohem Maße an die Genitalschleimhaut von Rindern adaptiert. Er kann nicht deren Intestinaltrakt überleben und wurde nur sehr selten mit menschlichen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. Die Bedeutung von *C. fetus* subsp. *venerealis* ergibt sich als Abort-Erreger beim Rind (PARVANTA 1999). Die Subspezies *fetus* und *venerealis* sind aber auch gelegentlich bei Erkrankungen des Menschen mit überwiegend septikämischem Charakter wie Abort, Endokarditis, Meningitis, Zellulitis,

Diskussion

Bakteriämie, Implantat-assoziierten Infektionen und Enteritis nachgewiesen worden. Hierbei handelt es sich offenbar um einen Keim, dessen wahre Bedeutung als Zoonoseerreger nur unzureichend bekannt ist (BLASER 1998).

C. fetus subsp. *fetus* dagegen hat den Standort hauptsächlich im Intestinaltrakt von Rindern und Schafen und kann bei beiden Tierarten sporadische Aborte auslösen (SKIRROW 1994).

Die Unterschiede zwischen den *C. fetus*-Subspezies erfordern deren exakte Identifizierung und Differenzierung. Dies ist mit den traditionellen mikrobiologischen Methoden schwierig, da die Organismen bezüglich ihrer Wachstumsbedingungen anspruchsvoll sind und sich außerdem biochemisch relativ inaktiv verhalten. Die Unterscheidung der Subspezies beruht nur auf zwei Reaktionen, die bei *C. fetus* subsp. *venerealis* negativ ausfallen (Toleranz gegen Glycin, Na-Selenit-Reduktion). Jedoch sind beide Reaktionen in ihrer Aussagekraft eingeschränkt, da für *C. fetus* subsp. *venerealis* Glycin-tolerante Varianten beschrieben wurden und viele Isolate in der Na-Selenit-Reduktion positiv reagieren (ON et al. 2001).

Zur Absicherung der Differenzierungsergebnisse mit konventionellen biochemischen Methoden sollten dann die gattungs- und speziesspezifischen PCR-Untersuchungen abgeschlossen werden.

Nach gegenwärtigem Kenntnisstand ist auch die Differenzierung der beiden Subspezies auf DNS-Ebene schwierig. So zeigen wohl das 16S rRNS-Gen als auch die 23S rRNS als häufig verwendete speziesspezifische Genorte nahezu 100%ige Homologie. Trotzdem ist eine Differenzierung mittels PCR möglich.

Die DNS-Sequenzierung des Genproduktes aus der PCR mit den Primern MG3F und MG4R erbrachte eine exakte Amplikonlänge von 764 Bp für beide *C. fetus*-Subspezies. Die Sequenzen unterschieden sich lediglich in Position 181. *C. fetus* subsp. *venerealis* hat an dieser Stelle ein Adenin, *C. fetus* subsp. *fetus* ein Guanin.

HUM et al. (1997) entwickelten eine PCR, welche die Identifizierung der *C. fetus*-Subspezies in zwei Schritten ermöglicht. Dabei wurde mit den Primern MG3F und MG4R ein 960 Bp großes Amplikon für beide Subspezies amplifiziert. Die Differenzierung zwischen *C. fetus* subsp. *fetus* und *C. fetus* subsp. *venerealis* erfolgt mit dem Primerpaar VenSF und VenSR, wobei nur mit der Subspezies *venerealis* ein 142-Bp-Amplikon erhalten wird. Die Spezifität der Primerpaare wurde von Müller et al. bei Untersuchungen durch Verwendung der DNS von 8 weiteren Typstämmen verschiedener *Campylobacter*-Spezies geprüft

Diskussion

(MÜLLER et al. 2003). Die Diskrepanz der Amplikonlänge, die bei Verwendung der Primer MG3F und MG4R erhalten wurde, kann nicht erklärt werden. Das Genom von *Campylobacter*-Spezies hat eine Größe von etwa 1,6-1,7 Millionen Basenpaaren und einem GC-Anteil zwischen 29% und 47% (KETLEY 1997; VANDAMME 2000). Das gesamte Genom von *Campylobacter fetus* ist jedoch bisher nicht sequenziert. Ein Problem bei einer PCR kann in der Bindung des Primers an andere als die beabsichtigten Zielsequenzen bestehen. HUM et al. (1997) erhielten ein 960-Bp-PCR-Produkt bei der Untersuchung australischer *C. fetus*-Stämme, ebenso wie ON und HARRINGTON (2001) bei Verwendung von Material aus den verschiedensten Erdteilen, darunter auch aus Europa. Bei unserer Studie wurden dagegen 764 Bp große Amplifikate bei Vorliegen von *C. fetus*-DNS erhalten, ebenso wie sie WAGENAAR et al. (2001) beschrieben hatten. PANACCIO et al. (1993) geben leider nur eine unvollständige Sequenz an, die zur Ableitung der verwendeten Primer MG3F und MG4R verwendet wurde. Unabhängig von diesen Betrachtungen haben die PCR-Systeme ihre Eignung für die Unterscheidung von Isolaten der beiden *C. fetus*-Subspezies bewiesen. Sofern diese Isolate phänotypisch differenziert waren, konnten die Differenzierungsergebnisse bestätigt werden. In Einzelfällen wurden *Campylobacter*-Isolate mit fraglichem oder unbekanntem Typisierungsergebnis untersucht und konnten mittels PCR eindeutig differenziert werden. Trotzdem bleiben auch weiterhin die traditionelle phänotypische Charakterisierung der *C. fetus*-Subspezies unverzichtbar. Deren Befunde werden jedoch durch diese PCR als wertvolle Methode ergänzt und bestätigt.

5.5 Epidemiologische Untersuchungen

Campylobacter fetus subsp. *venerealis* als Erreger der bovinen genitalen Campylobacteriose wurde in den letzten Jahren in steigendem Maße in Deutschland nachgewiesen.

Die Epidemiologie der *Campylobacter*-Verbreitung ist noch nicht vollständig erforscht.

Die Problematik besteht darin, dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass sich Bullen schon im Herkunftsbetrieb (vor Ankauf für die Besamungsstation) oder im Deckeinsatz während der Wartebullenphase die Infektion erwerben können.

Diskussion

Die Problematiken, die sich aus Transport, Tierverkehr allgemein, Umställen und Neugestalten von Tiergruppen ergeben, haben Einfluss aufeinander und sind oftmals nicht strikt voneinander zu trennen. Somit stellt insbesondere der Rinderzukauf einen kritischen Punkt in der Epidemiologie von *Campylobacter*infektketten dar.

Der Zukauf von infizierten Tieren gilt als größter Risikofaktor für den Eintrag von *Campylobacter* in Betriebe. Insgesamt erhöht das Umställen von Tieren die Infektionsgefahr erheblich. In der Studie aus Baden-Württemberg stellte sich die untersuchte Besamungsstation als bedeutende Eintragsquelle für *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* heraus. Durch Untersuchungen mittels PFGE und ERIC-PCR, in der 17 Bullenisolate von *C. fetus* subsp. *venerealis* untersucht wurden, konnte gezeigt werden, dass Eintrag und Verbreitung dieses Mikroorganismus im Betrieb zum großen Teil durch den Zukauf von Bullen verursacht worden war. Wäre die Besamungsstation Infektionsquelle, so würde man erwarten, dass zwischen den einzelnen Isolaten ein höherer Verwandtschaftsgrad, möglicherweise gar Identität besteht.

Um die Erregerausbreitung zu verhindern, ist es wichtig, das jeweilige landwirtschaftliche Managementsystem und die Handelsbeziehungen in die Diagnostik und Verhütung der Bildung neuer Infektionsherde mit einzubeziehen. Das Risiko einer *Campylobacter*infektion stieg in den letzten Jahren in Deutschland, was mit der Steigerung der Herdengröße einhergeht. Ein unbedingter Zusammenhang ist dabei nicht auszuschließen, da Handel und Stallwechselraten besonders in den Besamungsstationen in gleichem Maße mitwuchsen.

In kontinuierlichen Systemen ist die Infektion der Tiere durch ältere denkbarer als bei Rein/Raus-Verfahren, auch wenn kein direkter Kontakt, sondern nur ein solcher beispielsweise über Stallpersonal besteht (DAHL u. WINGSTRAND, 2000).

Eine weitere Zielstellung in der vorliegenden Arbeit war deshalb eine vergleichende phänotypische und genotypische Charakterisierung von *C. fetus*-Spezies-Isolaten aus Deutschland. Wenig ist bisher über den Grad der Variabilität innerhalb der Spezies oder über eine eventuell unterschiedliche geographische Verteilung bestimmter Isolate bekannt. Epidemiologische Untersuchungen sollten Erkenntnisse über die Verbreitung und über Infektionswege der Erregers vermitteln. Dies setzt voraus, dass man über Methoden verfügt, die in der Lage sind, stammspezifische Charakteristika aufzudecken.

In der Regel ändern sich Genotypen nicht, wenn die Isolate gelagert, kultiviert oder in vivo passagiert werden. Jedoch wurde in Ausnahmefällen genetische Instabilität bei *Campylobacter* beschrieben und konnte mit verschiedenen Genotypisierungsmethoden nach-

Diskussion

gewiesen werden. Es gibt Hinweise auf eine Instabilität und damit verbundene Änderungen in der Genom-Struktur, die auf die Einwirkung von Stressfaktoren zurückgeführt werden konnten (WASSENAAR et al. 1998; 2000).

Vielfach verwendete Verfahren stellen dabei die PFGE (Pulsfeld-Gelelektrophorese) sowie die ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus)-PCR dar.

Die Methode der PFGE (auch Makrorestriktionsanalyse genannt) ermöglicht die Einbeziehung des gesamten Genoms bei der Bestimmung von Gemeinsamkeiten oder Unterschieden zwischen Isolaten einer Spezies. Der Vergleich von Größe und Anzahl bei der Restriktion entstandener DNS-Fragmente bei verschiedenen Stämmen trifft zwar nur eine Aussage über Anzahl und Verteilung bestimmter, sehr kurzer DNS-Sequenzen (4-6 Basenpaare) im gesamten Genom, dennoch kann die Ähnlichkeit von Restriktionsfragmentmustern als Maß für die genetische Verwandtschaft angesehen werden (TENOVER et al. 1995). Diese Erkennungssequenzen für die jeweilige Restriktionsendonuklease geben allerdings keine Auskunft über die Struktur der dazwischen liegenden weit größeren Fragmente.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde die Restriktionsendonuklease *Sma* I verwendet. Die Endonuklease *Sma* I erkennt DNS spezifisch in Bereichen mit besonders hohem (G+C)-Gehalt (5'-CCC-GGG-3'), und generiert daher im (G+C)-armen *Campylobacter*-Chromosom nur wenige, gut analysierbare Fragmente. Das Enzym erwies sich daher für die Diskriminierung verschiedener *Campylobacter*-Spezies als hervorragend geeignet.

Zur Klärung der epidemiologischen Zusammenhänge wurde eine Genotypisierung mittels PFGE vorgenommen, in die *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*- und *Campylobacter fetus* ssp. *venerealis*-Stämme einbezogen wurden. Die Ergebnisse der Untersuchungen bestätigen die Eignung der PFGE zum Erkennen klonaler Verwandtschaftsbeziehungen bei *Campylobacter*-Stämmen, die in einem epidemiologischen Zusammenhang stehen (BARTELT et al. 2003).

TENOVER et al. (1995) gibt einen Leitfaden, wie PFGE-Bandenmuster verschiedener Bakterien-Stämme in Hinblick auf die genetische Ähnlichkeit bewertet werden sollten. Generell ist eine gewisse Mindestanzahl von Banden erforderlich, um einen aussagekräftige Bewertung vorzunehmen. Die Ähnlichkeit des Bandenmusters hinsichtlich Anzahl und Molekulargewicht der Banden wurde als Maß für die genetische Ähnlichkeit angesehen.

Das diskriminatorische Potential der PFGE war in der vorliegenden Untersuchung größer als das der ERIC-PCR. Die PFGE erwies sich als die Methode der Wahl zur molekula-

Diskussion

ren Charakterisierung von *C. fetus*-Isolaten. Untersuchungen von 50 Isolaten aus den verschiedensten Teilen der Bundesrepublik zeigten bereits eine Heterogenität von *C. fetus*-Isolaten in ihren PFGE-Mustern.

Die Stämme aus den verschiedenen Regionen zeigten 20 bis 100%ige Verwandtschaft. Beim klonalen Vergleich der *Campylobacter fetus*-Stämme gegeneinander bildeten sich näher miteinander verwandte Untergruppen heraus, die allerdings heterogen über die untersuchten Bundesländer verteilt sind (siehe Abbildung 16). Es ließen sich also keine lokalisierbaren Infektionsherde ausmachen. Wahrscheinlich hat eine Ausbreitung gemäß der schon oben diskutierten Ausbreitungswege stattgefunden. Weiterhin fielen Isolate auf, die in ihrem Bandenmuster vollkommen übereinstimmten. Um verlässliche Aussagen über die derzeitige epidemiologische Situation treffen zu können, wäre es erforderlich, weitergehende statistische Untersuchungen vorzunehmen, was den Rahmen dieser Dissertation allerdings bei weitem überträte.

Die ERIC-PCR sollte in der vorliegenden Arbeit als zweite Methode der Analyse des Gesamtgenoms zur weiteren Stützung der Ergebnisse der Makrorestriktionsanalyse beitragen. ERIC-Sequenzen sind evolutionsgeschichtlich alte, hochkonservierte Sequenzen, die sich bei anderen Mikroorganismen zur Durchführung klonaler Analysen als gut geeignet erwiesen haben.

Bei der ERIC-Methode wird im Gegensatz zur PFGE nicht das Gesamtgenom, sondern das Auftreten repetitiver Sequenzen analysiert. Da die Anzahl und Lokalisation der repetitiven Elemente von Stamm zu Stamm variabel sind, können die mit der ERIC-PCR ermittelten verschieden großen und zahlreichen Banden zur Differenzierung herangezogen werden.

Die Analysen mittels ERIC-PCR machte ein hohes Maß an Heterogenität innerhalb der einzelnen Spezies sichtbar, lässt jedoch keine Assoziation zwischen Bandenprofilen und einer Zuordnung zum Krankheitsbild oder zur geographischen Herkunft zu.

Weitere Untersuchungen mit ERIC-PCR und PFGE müssen zeigen, in wie weit die Methoden miteinander vergleichbar sind. Unterschiedliche Arten von Untersuchungen erforschen unterschiedliche Aspekte des Problems. Hierzu kann aufgrund der geringen Zahl der untersuchten Stämme keine abschließende Bewertung erfolgen. Will man die epidemiologischen Daten richtig verstehen und angemessene Schlussfolgerungen ziehen, sowie das Problem der regionalen Verteilung für Deutschland lösen, so ist es notwendig, die epidemiologische Forschung zu intensivieren.

Zusammenfassung

6 Zusammenfassung

Audrey Bagon

Untersuchungen zu Nachweis und Differenzierung von *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* beim Rind mit konventionellen und molekularbiologischen Methoden

Institut für Bakteriologie und Mykologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig und Institut für molekulare Pathogenese, Friederich-Loeffler-Institut, Jena

Eingereicht im Mai 2006

(104 S., 24 Abb., 17 Tab., 142 Lit.)

Schlüsselwörter: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, PCR, Rind, Samen

Campylobacter fetus subsp. *venerealis* ist der Erreger der bovinen genitalen Campylobacteriose, einer anzeigepflichtigen Tierseuche. Er hat sein natürliches Reservoir im Präputialsack klinisch gesunder Bullen und ist in der Lage, Aborte zu verursachen (enzootischer Abort). Davon abzutrennen sind Infektionen mit *C. fetus* subsp. *fetus*, welcher natürlicherweise im Intestinaltrakt des Rindes auftritt und ebenfalls Aborte auszulösen vermag (sporadischer Abort). Während *C. fetus* subsp. *venerealis* einen ausgeprägten Tropismus für die Genitalschleimhaut des Rindes aufweist, handelt es sich bei der Subspezies *fetus* um einen Zoonoseerreger, der beim Menschen schwerwiegende Erkrankungen mit zumeist septikämischen Charakter verursachen kann. Die Übertragung von *C. fetus* subsp. *venerealis* erfolgt hauptsächlich durch den natürlichen Deckakt, es besteht aber auch die Gefahr der Verbreitung durch künstliche Besamung, da klinisch gesunde Bullen den Erreger im Samen enthalten können.

Die Unterschiede in der Epidemiologie und die klinische Bedeutung der beiden *C. fetus*-Subspezies erfordern eine exakte Identifizierung und Differenzierung. Der erste Teil der Untersuchung befasst sich daher mit den Möglichkeiten des molekularen Erregernachweises. Im zweiten Teil wurden 50 Isolate aus den vergangenen fünf Jahren mit molekularen Methoden auf ihre genetische Ähnlichkeit untersucht. Eine Abgrenzung durch traditionelle mikrobiologische Methoden ist sehr problematisch, da sie im Wesentlichen auf nur zwei Reaktionen beruht: die Glycin-Toleranz und die Na-Selenit-Reduktion, wobei neueste Untersuchungen

Zusammenfassung

unter standardisierten Bedingungen nur die Glycin-Toleranz als eindeutig charakterische Reaktion für beide Subspezies übrigließe.

Aus diesem Grunde wurden PCR-Untersuchungen zur Identifizierung und Differenzierung beider *C. fetus*-Subspezies eingeführt. In einem ersten Schritt wurde *Campylobacter fetus* spezifisch nachgewiesen. Danach erfolgte die Differenzierung der Subspezies durch eine weitere PCR, in der nur bei Vorliegen der DNS von *C. fetus* subsp. *venerealis* ein Amplikon erhalten wurde.

Insgesamt wurden 103 *C. fetus*-Isolate untersucht, einschließlich der Typenstämmen von *C. fetus* subsp. *fetus* und *C. fetus* subsp. *venerealis*. Auf Grund der Ergebnisse des Glycintoleranztests konnten 81 *C. fetus* subsp. *venerealis* (Glycin intolerant) und 22 *C. fetus* subsp. *fetus* (Glycin tolerant) identifiziert werden. Die Ergebnisse des Glycintoleranztests und der PCR stimmten bei allen 103 *C. fetus* Isolaten überein.

Versuche zum Direktnachweis von *C. fetus* subsp. *venerealis* aus Bullensperma durch Anwendung von fünf unterschiedlichen DNS-Extraktionsmethoden waren in ihren Ergebnissen hinsichtlich ihrer Sensitivität nicht zufrieden stellend (10^4 KBE/ml). Daraus ergibt sich zwingend, dass die Kultivierung des Erregers vor seiner phäno- und genotypischen Charakterisierung weiterhin unverzichtbar bleibt.

Durch Untersuchungen mittels PFGE wurde gezeigt, dass die *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*-Population, die in Deutschland vorkommt, genetisch nicht einheitlich ist. Eine strenge Gruppierung nach geografischen Regionen war nicht möglich. Innerhalb größerer Gruppen genetisch ähnlicher Stämme fielen Isolate mit identischen Mustern auf, was auf gemeinsame Infektionsquellen hindeutet.

Die ERIC-PCR sollte in der vorliegenden Arbeit als zweite Methode der Analyse des Gesamtgenoms zur weiteren Stützung der Ergebnisse der Makrorestriktionsanalyse beitragen. Die Analysen mittels ERIC-PCR machte ein hohes Maß an Heterogenität innerhalb der einzelnen Spezies sichtbar, lässt jedoch keine Assoziation zwischen Bandenprofilen und einer Zuordnung zum Krankheitsbild oder zur geographischen Herkunft zu.

Summary

7 Summary

Audrey Bagon

Studies on the identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in cattle using conventional and molecular biological methods

Institute of Bacteriology and Mycology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig and Institute of molecular pathogenesis, Friederich-Loeffler-Institut, Jena

Submitted in May 2006

(104p., 24 fig., 17 tab., 142 ref.)

Keywords: *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, PCR, cattle, semen

C. fetus subsp. *venerealis* is the causative agent of bovine genital campylobacteriosis, a notifiable animal disease. Its natural reservoir is the prepuce of clinically healthy bulls and it is able to cause abortions (enzootic abortion). To be separated from this are infections with *C. fetus* subsp. *fetus*, which occur naturally in the intestinal tract of the cattle and likewise are able to cause abortions (sporadic abortion). While *C. fetus* subsp. *venerealis* shows a pronounced tropism for the genital mucous membrane of cattle, the subspecies *fetus* is a zoonotic agent, which can cause serious illnesses in humans with septicaemic character. In addition to the transmission of *C. fetus* subsp. *venerealis* by coitus, there is a danger of the spreading by artificial insemination, since clinically healthy bulls can carry the agent in the semen.

The differences in epidemiology and the clinical significance of the two *C. fetus* subspecies require an accurate identification and differentiation, which is very problematic when traditional micro-biological methods are used. Differentiation is based substantially on only two reactions: the glycine tolerance and the sodium-selenite-reduction. However recent investigations under standardized conditions left only the glycine tolerance as clearly characterising reaction for both subspecies. Therefore, the first part of investigation was concerned with the possibilities of molecular detection of the agent. In the second part 50 isolates from the past five years were tested for their genetic similarity with molecular methods.

In total, 103 *C. fetus* isolates were investigated, including the types strain of *C. fetus* subsp. *fetus* and *C. fetus* subsp. *venerealis*. According to the results of the glycine

Summary

tolerance test, the 103 isolates could be separated into 81 *C. fetus* subsp. *venerealis* (glycine intolerant) and 22 *C. fetus* subsp. *fetus* (glycine tolerant). The results from the glycine tolerance test and PCR agreed completely for all *C. fetus* isolates.

PCR differentiation of *C. fetus* subspecies was carried out in two-step process. In the first step *Campylobacter fetus* was identified on species level. Afterwards the differentiation of the subspecies was performed using a further PCR, in which an amplicon was received only when DNA from *C. fetus* subsp. *venerealis* was present.

Attempts to identify *C. fetus* subsp. *venerealis* directly from bull sperm by application of different DNA extraction methods followed by PCR did not give satisfactory results regarding the sensitivity of the methods. Therefore, it is still necessary to cultivate isolates before pheno- and genotypic characterisation.

Investigations by means of PFGE show that German *C. fetus* subsp. *venerealis* strains are not genetically identical. A strict grouping by geographical regions was not possible. Within larger groups of genetically similar strains, isolates with identical patterns were noticed, indicating common sources of infection.

The ERIC PCR was used as second method to analyse genetic heterogeneity with the isolates. The analyses by means of ERIC PCR show a high heterogeneity within the individual species. However, there was no association of the PCR patterns with the geographical origins of the strains.

Literaturverzeichnis

8 Literaturverzeichnis

Al-Mashat RR., Taylor DJ. Production of enteritis in calves by the oral inoculation of pure cultures of *Campylobacter fecalis*. Vet Rec. 1981;109:97-101.

Anon. Arbeitsgruppe Wiederkäuer des Österreichischen Tiergesundheitsdienstens. Programm zur Bekämpfung von Fruchtbarkeitsstörungen in der österreichischen Rinderhaltung zur Verbesserung des Gesundheits – und Leistungszustandes der Rinderbestände. Amtliche Veterinärnachrichten. 2004;10a:1-68.

Anon. Brucellosen. 2005b (zitiert vom März 2005):1-2

<http://www.bvet.admin.ch/tiergesundheit/00178/00181/00430/index.html?lang=de>

Anon. *Campylobacter*, *Arcobacter* und *Helicobacter*. 2002 (zitiert vom 27.03.2002):1-10

<http://www.vetmed.unibe.ch/vbi/downloads/Kompemd04%20Campylobacter-27-03-02.pdf>

Anon. Deckinfektionen der Rinder: *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis*. 2005a (zitiert vom März 2005):1

http://www.bvet.admin.ch/suche/index.html?keywords=Deckinfektionen+der+Rinder&url_limiter=%2F&page_num=0&lang=de&senden.x=5&senden.y=8

Anon. Molekularbiologische Methoden. SLMB, Bundesamt für Gesundheit, Bern, Schweiz. 1998 (zitiert vom 05.09.2004):1-59.

http://66.249.93.104/search?q=cache:eiEOFH3vIxEJ:www.bag.admin.ch/slmb/online/d/SLMB/Data%2520SLMB_MSDA/Version%2520D/52B_Molekularbiol.%2520Methoden.pdf

Anon. Robert Koch Institut. Zwei Gastroenteritis-Ausbrüche durch *Campylobacter jejuni* nach dem Genuss von Rohmilch. Epidemiologisches Bulletin. 2000;18:143-7.

Literaturverzeichnis

Bartelt E., Beckmann L., Klein G., Luber P., Müller M., Vogt P. Erarbeitung von Methoden zur Identifizierung und Isolierung von *Campylobacter* spp. und deren Resistenzbestimmung. 2003 (zitiert vom 14.08.2003):1-7

http://www.bfr.bund.de/cm/220/erarbeitung_von_methoden_zur_identifizierung_und_isolierung_von_campylobacter_spp.pdf.pdf

Bergeron MG, Boissinot M, Huletsky A, Menard C, Ouellette M, Picard F J, Roy PH. Highly conserved genes and their use to generate species-specific, genus-specific, family-specific, group-specific and universal nucleic acid probes and amplification primers to rapidly detect and identify algal, archaeal, bacterial, fungal and parasitological microorganisms from clinical specimens for diagnosis. Patent WO 0123604-A. 2001.04.05.

Berg RL, Jutila JW, Firehammer BD. A revised classification of *Vibrio fetus*. Am J Vet Res. 1971;32:11-22.

Berri M, Laroucau K, Rodolakis A. The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. Vet Microbiol. 2000;72:285-93.

Beveridge TJ, Pouwels PH, Sara M, Kotiranta A, Lounatmaa K, Kari K, Kerosuo E, Haapasalo M, Egelseer EM, Schocher I, Sleytr UB, Morelli L, Callegari ML, Nomellini JF, Bingle WH, Smit J, Leibovitz E, Lemaire M, Miras I, Salomitou S, Beguin P, Ohayon H, Gounon P, Matuschek M, Koval SF. Functions of S-layers. FEMS Microbiology Reviews. 1997;20:99-149.

Beyer W, Böhm R. Der Einsatz von molekularen Fingerprinttechniken in der Umwelthygiene. Münch. Tierärztl. Wschr. 1999;112:435-43.

Bier PJ, Hall CE, Duncan JR, Winter AJ. Experimental infections with *Campylobacter fetus* in bulls of different ages. Vet Microbiol. 1977;2:13-27.

Literaturverzeichnis

Bisping W, Amtsberg G. Farbatlas zur Diagnose bakterieller Infektionserreger der Tiere. Berlin, Hamburg: Paul Parey Verlag; 1988.

Bisping W. Kompendium der veterinärmedizinischen Mikrobiologie II Spezielle Bakteriologie und Mykologie. 3. Auflage. Hannover: Schaper Verlag; 1979.

Bisping W. Zur bakteriologischen Diagnose der *V. fetus*-Infektion beim Bullen. Berl Münch Tierärztl Wschr. 1974;87:330-3.

Blaser MJ. *Campylobacter fetus* – emerging infection and model system for bacterial pathogenesis at mucosal surfaces. Clin Infect Dis. 1998;27(2):256-8.

Blaser MJ, Pei Z. Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections: critical role of the high molecular weight S-layer proteins in virulence. J Infect Dis. 1993;167:696-706.

Blaser M, Povers BW, Cravens J, Wang WL. *Campylobacter* enteritis associated with canine infection. Lancet II. 1978;2(8097):979-81.

Blaser MJ, Smith PF, Hopkins JA, Heinzer I, Bryner JH, Wang WL. Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections: serum resistance associated with high-molecular-weight surface proteins. J Infect Dis. 1987;155:696-706.

Blaser MJ, Smith PF, Repine JE, Joiner KA. Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections: failure of encapsulated *Campylobacter fetus* to bind C3b explains serum and phagocytosis resistance. J Clin Invest. 1988;81:1434-44.

Blumenschein W. Untersuchungen über das Vorkommen von *Campylobacter fetus* in Darm und Galle bei Rindern und Kälbern in Baden-Württemberg unter besonderer Berücksichtigung der Biotypen *intestinalis* und *venerealis* [Dissertation med. vet.]. München: Univ. München; 1980.

Literaturverzeichnis

Bollwein H. Gynäkologie und Andrologie beim Rind. Klinik für Rinder Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover. 2005.

Bryans JT, Smith AG. Physiological Properties of pathogenic and nonpathogenic *Vibrio* species isolated from cattle. Vet. 1960;50:331-338.

Bryner JH, Frank AH, O'Berry PA. Dissociation studies of vibrios from the bovine genital tract. Am J Vet Res. 1962;23:32-41.

Busch U. Arbeitsschritte für die Durchführung einer PCR-Analyse (Fachinformation). 2004 (zitiert vom 17.03.2004):1

http://www.lgl.bayern.de/de/left/fachinformationen/lebensmittel/gentechnik/pcr_analyse.htm

Butzler JP, Skirrow MB. *Campylobacter* enteritis. Clinics in Gastroenterology. 1979;8:737-765.

Cone RW, Hobson AC, Huang ML. Coamplified positive control detects inhibition of polymerase chain reactions. J Clin Microbiol. 1992;30:3185-89.

Dahl J, Wingstrand A. Salmonellenreduktion in Dänemark, Risikofaktoren und Durchführung. 2000 (zitiert vom 01.04.2000): Federation of Danish pig producers and slaughterhouses, Copenhagen.

www.pigpool.de/archive/artikel.asp?Nummer=60.

De Andrade MVDP. Identifizierung von *Candida*-Spezies und Stämmen durch den Nachweis von polymorphen DNA-Regionen in der PCR [Dissertation med.]. Berlin: Univ. Berlin; 1999.

Dedié K, Fischer A, Pohl R, Schababerle H. Bekämpfung und Verhütung der venerischen *Campylobacteriose* in Besamungsstationen. Tierärztliche Umschau. 1982;37:604-12.

Dedié K, Jahn J, Romer H. Die venerische *Campylobacteriose* des Rindes aus der Sicht des praktizierenden Tierarztes. Tierärztl. Pax. 1983;11:441-48.

Literaturverzeichnis

Dedié K, Pohl R, Kreissbauer K. (1977): Vorkommen und Pathogenität glycin-positiver Stämme des *C. fetus* Serotyp 01. Zbl Vet Med. 1977; B 24:767-70.

Dedié K, Pohl R, Romer H, Wagenseil F, Albrecht E, Hühnermund G. Zur Verbreitung, Ermittlung und Bekämpfung der venerischen Campylobacteriose (*Vibriosis genitalis*) beim Rind in Beständen mit Bullenhaltung. Tierärztl. Umschau. 1982;37:80-96.

Dekeyser P, Gossuin-Detrain, Butzler JP, Sternon J. Acute enteritis due to related *Vibrio*. J Infect Dis. 1972;125:390-93.

Dice LR. Measure of the amount of ecological association between species. Ecology. 1945; 26:297-302.

Dubreuil JD, Kostrzynska M, Austin JW, Trust TJ. Antigenic differences among *Campylobacter fetus* S-layer proteins. J Bacteriol. 1990;172:5035-43.

Dubreuil JD, Logan SM, Cubagge S, Eidhin DN, McCubbin WD, Kay CM, Beveridge TJ, Ferris FG, Trust TJ. Structural and biochemical analyses of a surface array protein of *Campylobacter fetus*. J. Bacteriol. 1988;170:4165-4173.

Eaglesome MD, Sampath MI, Garcia MM (1995): A detection assay for *Campylobacter fetus* in bovine semen by restriction analysis of PCR amplified DNA. Veterinary Research Communications. 1995;19:253-63.

Florent A. Les deux vibrioses génitales : La vibriose due à *V. fetus intestinalis*. Meded. Veerartsenijschr. Rijksuniv. Gent. 1959;3:1-60.

Florent A, Vandeplassche M, Huysman A. Evolution de l'infection à *Vibrio fetus* chez la génisse à la suite d'une primo – infection unique. Rec Méd Vét. 1958;134:97-104.

Georg HA, Hoffmann PS, Smibert RM, Krieg NR. Improved media for growth and aerotolerance of *C. fetus*. J Clin Microbiol. 1978; 8:36-41.

Literaturverzeichnis

Giorgi W, Genovez ME, Scarcelli E, Picone ABB. Infertilitade e abortamentos em rebanho bovino causados por *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*: profilaxia e tratamento. Rev Microbiol. 1986;17:342-45.

Grunert, E., und Berchtold, M. Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind. 2. Auflage. Berlin, Hamburg: Verlag Paul Parey; 1982.

Grupp T, Baumgärtel P, Kampschulte J. Hygieneprogramm. Fleckvieh-Welt. 2003;100:32.

Guetta F, Ruckaberle E, Weiß MC. Diagnostik und Verlaufskontrolle der caninen Leishmaniose. Newsletter Forschung und Industrie. 2002;1-4.

Hahn H, Bockemühl J. Enterobakterien. In: Klein P, Hrsg. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. New York: Springer Berlin-Heidelberg; 2001a;251.

Hahn H, Klein P, Giesbrecht P. Bakterien: Definition und Morphologie. In: Klein P, Hrsg. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. New York: Springer Berlin-Heidelberg; 2001b;177-78.

Hawari A. Untersuchungen über die Verbreitung von Bakterien der Gattung *Campylobacter* beim Rind und deren kulturell-biochemische Differenzierung. [Dissertation med. vet.] Hannover: Univ. Hannover; 1979.

Herrick JB. Laboratory and field technique to determine fertility in the bull. J Am Vet Med Assoc. 1949;115:87-90.

Houwink AL. A macromolecular monolayer in the cell wall of *Spirillum* spec. Biochimica Et Biophysica Acta. 1953;10:361-66.

Hovmöller S, Sjögren A, Wang DN. The structure of crystalline bacterial surface layers. Progress in Biophysics and Molecular Biology. 1988;51:131-63.

Literaturverzeichnis

Hubrig T. Bakteriologische und serologische Untersuchungen zur Diagnostik der *Vibriosis genitalis* in Thüringen [Habilischr. med. vet.]. Berlin: Univ. Berlin; 1958.

Hubrig T. Infektions-Krankheiten der Haustiere. 2. Auflage. Jena: VEB Gustav Fischer; 1980.

Hum S, Quinn K, Brunner J, On SLW. Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. Aust Vet J. 1997;75:827-31.

Ibelgaufts H. Gentechnologie von A bis Z. Studienausgabe. Weinheim; New York; Basel; Cambridge: VCH;1990.

Jones FS, Orcutt M, Little RB. Vibrios (*vibrio jejuni* n. sp.) associated with intestinal disorders of cows and calves. J Exp Med. 1931;53:853-64.

Karmali MA, Fleming PC. *Campylobacter* enteritis. Can Med Associat J. 1979;120:1525-35.

Ketley JM. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. Microbiology. 1997;143:5-21.

King EO. Human Infections with *Vibrio fetus* and a closely related *Vibrio*. J Infect Dis. 1957;101:119-28.

Köhler W, Mochmann H. Grundriß der Medizinischen Mikrobiologie. 5. überarbeitete Auflage. Jena: Gustav Fischer Verlag; 1980.

Kohlhaußen S. Entwicklung von spezifischen PCR-ELISA Nachweissystemen für *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis* und Orthopockenviren [Dissertation Dr. sc. agr. hc]. Stuttgart: Univ. Hohenheim; 2001.

Kötsche W. *Campylobacter fetus*. AVID-Mitteilung II. 1993;1-10.

Literaturverzeichnis

Krieg NR. Aerobic/microaerophilic, motile, helical/vibrioid Gram-negative bacteria. In: Krieg NR, Holt JG, Hrsg. Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1. Baltimore: The Williams & Wilkins Co; 1984;71-72.

Kröger M, Kriese J, Meyer-Rogge K. PCR Grundlagen der Polymerasekettenreaktion. 2006 (zitiert vom 31.03.2006): 1

<http://www.chemgapedia.de/vsengine/printvlu/vsc/de/ch/5/bc/vlus/pcr.vlu.html>

Lecce GHK, Rowland AC. Some biochemical characteristics of *V. fetus* and other related vibrios isolated from animals. J Bacteriol. 1958;76:312-16.

Logan JMJ, Burnens A, Linton D, Lawson AJ, Stanley J. *Campylobacter lanienae* sp. nov., a new species isolated from workers in an abbatoir. Int J Syst. And Evol Microbiol. 2000;50: 865-72.

Madigan MT, Martinko JM, Parker, J. Die Zellwand der Prokaryonten: Peptidoglykan und verwandte Moleküle. In: Goebel W, Hrsg. Brock Mikrobiologie. Berlin: Spektrum, Akad. Verl.; 2000a;76-86.

Madigan MT, Martinko JM, Parker, J. Einfluss des Sauerstoffes auf das mikrobielle Wachstum. In: Goebel W, Hrsg. Brock Mikrobiologie. Berlin: Spektrum, Akad. Verl.; 2000b; 176-82.

Madigan MT, Martinko JM, Parker, J. Kolonisierung und Wachstum. In: Goebel W, Hrsg. Brock Mikrobiologie. Berlin: Spektrum, Akad. Verl.; 2000c;878-80.

Madigan MT, Martinko JM, Parker, J. Wachstumsmessung. . In: Goebel W, Hrsg. Brock Mikrobiologie. Berlin: Spektrum, Akad. Verl.; 2000d.;157-62.

Literaturverzeichnis

Martin B, Humbert O, Camara M, Guenzi E, Walker J, Mitchell T, Andrew P, Prudhomme M, Alloing G, Hackebeck R, Morrison DA, Boulnois GJ, Clavers J. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. Nucl Acids Res. 1992;20(13):3479-83.

Mauel MJ, Carlton SJ, Mather TN. Polymerase chain reaction detection efficiency of the human granulocytic ehrlichiosis agent (*Rickettsiaceae: Ehrlichieae*) in ticks (*Acari: Ixodidae*) is dependent on the DNA extraction method. J Med Entomol. 1999;36:649-52.

McCoy EC, Doyle D, Burda K, Corbeil LB, Winter AJ. Superficial antigens of *Campylobacter (Vibrio) fetus*: characterization of an antiphagocytic component. Infect Immun. 1975;11:517-25.

McFadyean J, Stockman S. Report of the departement committee appointed by the Board of Agriculture and Fisheries to inquire into epizootic abortions. Appendix to part III. Abortion in sheep. London: His Majesty's Stationery Office; 1913;1-29.

Maclaren APC, Agumbah GJO. Infertility in cattle in south-west Scotland caused by an „intermediate“ strain of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. Br Vet J. 1988;144:29-44.

Miksits K, Böttger EC. Prinzipien der mikrobiologischen Labordiagnose. In: Klein P, Hrsg. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie/Begr. New York: Springer Berlin-Heidelberg; 2001:890-912.

Moser I. Untersuchungen zur Makro- und Mikrodiversität caniner, feliner und humaner *Campylobacter*-Spezies im Hinblick auf deren klinische Bedeutung sowie Identifizierung eines Adhäsins von *Campylobacter jejuni* [Habilschr. med. vet.]. Berlin: Univ. Berlin; 2001.

Mrass PE, Gattringer R, Graninger W, Georgopoulos A. Pulsfeld-Gel-Elektrophorese, molekulare Analyse zur Typisierung von Mikroorganismen. 2000 (zitiert vom 05.06.2000): 1 http://www.ahc-net.at/0001/antibiotika_monitor/56_00/56_00_7.htm

Literaturverzeichnis

Mülhardt C. Der Experimentator: Molekularbiologie. 2. Aufl. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag; 2000.

Müller HJ. PCR - Polymerase-Kettenreaktion: das Methodenbuch. Heidelberg; Berlin: Spektrum, Akad. Verl; 2001.

Müller W, Hotzel H, Schultze F. Identifizierung und Differenzierung der *Campylobacter fetus*-Subspezies mittels PCR. Dtsch Tierärztl Wschr. 2003;110:41-80.

Nachamkin I. *Campylobacter* and *Arcobacter*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editors. Manual of Clinical Microbiology. Washington, D.C.: ASM Press; 1999;716-26.

On SLW, Atabay HI, Corry JEL, Harrington CS, Vandamme P. Emended description of *Campylobacter sputorum* and revision of its infrasubspecific (biovar) divisions, including *C. sputorum* biovar *parareolyticus*, a urease-producing variant from cattle and humans. Int J System Bact. 1998;48:195-206.

On SLW, Hänninen ML, Carter FT. "Campynet" Prototype standardised protocol for pulse-field gel electrophoresis-based DNA typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. 2000 (zitiert vom 06.07.2000): 1
<http://campynet.vetinst.dk/PFGE.html>

On SLW, Harrington CS. Evaluation of numerical analysis of PFGE-DNA profiles for differentiating *Campylobacter fetus* subspecies by comparison with phenotypic, PCR and 16S rDNA sequencing methods. J Appl Microbiol. 2001;90:285-293.

On SLW. Identification methods for Campylobacters, Helicobacters, and related organisms. Clin Microbiol Rev. 1996;9:405-22.

Literaturverzeichnis

On SLW, Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. J Appl Microbiol. 2001;90:1S-15S.

Otte HJ. Die bakteriologischen Nachweismethoden. In: Otte HJ, Hrsg. Leitfaden der Medizinischen Mikrobiologie. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1960;10-39.

Parvanta FM. Durch *Campylobacter cryaerophila* und *Campylobacter fetus* ssp. *venerealis* verursachte Aborte in niederrheinischen Rinderbetrieben. Tierärztl Umschau. 1999;54:364-71.

Pei Z, Blaser MJ. Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections. Role of surface array proteins in virulence in a mouse model. J Clin Invest. 1990;85:1036-43.

Philpott M. Studies on vibriosis in an A. I. Stud. Vet Rec. 1969;85:404-08.

Pomp D, Medrano JF. Organic solvents as facilitators of polymerase chain reaction. Biotechniques. 1991;10(1):58-9.

Rahm C, Schädler R, Bracknies S, Falk D. Untersuchung auf *Campylobacter* mittels Direktausstrich aus Abortmaterial von Rind und Schaf und Schleim- und Spülproben von Rindern. Prüfverfahren Untersuchung auf *Campylobacter*, Code: PV009BA01, Staatliches Tierärztliches Untersuchungsamt Aulendorf. 1999.

Romaniuk PJ, Zoltowska B, Trust TJ, Lane DJ, Olsen GJ, Pace NR, Stahl DA. *Campylobacter pylori*, the spiral bacterium associated with human gastritis, is not a true *Campylobacter* sp. J Bact. 1987;169:2137-41.

Rosenberger G. Krankheiten des Rindes. 1. Aufl. Berlin, Hamburg: Verlag Paul Parey; 1970.

Scheu P. Entwicklung eines spezifischen Nachweissystems für Salmonellen in Lebensmitteln auf Grundlage der PCR. Aachen: Shaker Verlag; 1999.

Literaturverzeichnis

Schlegel HG. Allgemeine Mikrobiologie. 5. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 1981.

Schmidt BL. PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections. Clin Microbiol Rev. 1997;10:185-201.

Schröder UB. Die *Campylobacteriosis genitalis* des Rindes in Süd-West-Afrika mit einem Beitrag zur Typisierung ihrer Erreger sowie ihrer Bekämpfung durch Impfung [Dissertation med. vet.]. Hannover: Univ. Hannover; 1980.

Schülke B, & Quot. Grundstruktur der Spermienzelle und Biochemische des Spermas. In: Busch, W., Löhle, K., Peter, W. (Hrsg.). Künstliche Besamung bei Nutztieren. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag Jena; 1991;209-37.

Schultze F, Bagon A, Müller W, Hotzel H. Identification of *Campylobacter fetus* subspecies by phenotypic differentiation and PCR. J Clin Microb. 2006;44(6):2019-24.

Schultze F, Hotzel H, Müller W. Diagnostik und Bekämpfung der Bovinen Genitalen Campylobacteriose. Jahresbericht 2004. Friedrich-Loeffler-Institut Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Jena. 2004;277:77-83.

Schurig GGD, Hall CE, Corbeil LB, Duncan JR, Winter AJ. Bovine venereal vibriosis: cure of genital infection in females by systemic immunization. Infect Immun. 1975;11:245-51.

Schurig GD, Duncan JR, Winter AJ. Elimination of genital vibriosis in female cattle by systemic immunization with killed cells of cell free extracts of *Campylobacter fetus*. J Infect Dis. 1978;138:463-72.

Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNA by pulsed field gradient gelelectrophoresis. Cell. 1984;37:67-75.

Sebald M, Véron M. Base DNA content and classification of vibrios. Ann Inst. Pasteur (Paris). 1963;105:897-910.

Literaturverzeichnis

Skirrow MB (1977): *Campylobacter* enteritis: a “new” disease. Br Med J. 1977;2(6078):9-11.

Skirrow MB, Benjamin J. “1001” *Campylobacters*: cultural characteristics of intestinal *campylobacters* from man and animals. J Hyg Camb. 1980;85:427-42.

Skirrow MB. Diseases due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and related bacteria. J Comp Path. 1994;111:113-49.

Smibert RM. *Campylobacter*. In: Buchanan RE, Gibbons NE (editors) Bergey's Manual of determinative bacteriology. Baltimore: The Williams & Wilkins Co.; 1974;207-11.

Smibert RM. Genus II. *Campylobacter* Sebald and Véron 1963. In: Krieg NR, Holt HG. (editors.) Bergey's Manual of systematic bacteriology. Baltimore: The Williams & Wilkins Co.; 1984;11-118.

Smibert RM. The Genus *Campylobacter*. Ann Review, Microbiol. 1978;32:673-705.

Smith T. Spirilla associated with disease of the fetal membranes in cattle (infectious abortion). J Exp Med. 1918;28:701-19.

Smith T, Taylor MS. Some morphological and biochemical characters of the spirilla (*Vibrio fetus* n. sp.) associated with disease of the fetal membranes in cattle. J Exp Med. 30. 1919; 299-311.

Stackebrandt E, Murray RGE, Trüper HG. *Proteobacteria* classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the “purple bacteria and their relatives”. Int J Syst Bacteriol. 1988;38:321-25.

Steffens I, Kiehl W, Marcus U, Fehrmann S. Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte. Epidemiologisches Bulletin. 2005;4:21-30.

Literaturverzeichnis

Steinbrück G, Nordheim A. Grundpraktikum ZMG Zellbiologie, Mikrobiologie, Genetik. Teil I: Zellbiologie. 2004 (zitiert vom 2004):1-43.

http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxm/Courses/documents/ZMG04_05.pdf

Sticht-Groh V. *Campylobacters* in pig faeces. *Vet Rec.* 1981;108-42.

Taylor DJ, Olubumni PA. A re-examination of the role of *Campylobacter fetus* subspecies *coli* in enteric disease of the pig. *Vet Rec.* 1981;109:112-15.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaninathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis. Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33(9):2233-39.

Terprestra JE, Eisma WA. *Vibrio foetus* infection in cattle and enzootic infertility. *Tijdschr Diergeneesk.* 1951;76:433-47.

Thanos M, Schönian G, Meyer W, Schweynoch C, Gräser Y, Mitchell TG, Presber W, Tietz HJ. Rapid identification of *Candida* species by DNA fingerprint with PCR. *J Clin Microbiol.* 1996;34:615-21.

Thompson LM, Smibert RM, Johnson JL, Krieg NR. Phylogenetic study of the genus *Campylobacter*. *Int. J System Bact.* 1988;38:190-200.

Tschäpe H, Prager R. Genetischer Fingerabdruck (PFGE) von Bakterienisolaten für ihre epidemiologische Subdifferenzierung. Robert Koch Institut, Nationales Referenzzentrum für Salmonellen u. andere Enteritiserreger, Wernigerode, Deutschland. 2003.

Ursing JB, Lior H, Owen RJ. Proposal of minimal standards for describing new species of the family *Campylobacteraceae*. *Int. J System Bact.* 1994;44:842-45.

Literaturverzeichnis

Vandamme P. Taxonomy of the family *Campylobacteriaceae*. In: Nachamkin I., Blaser MJ, editors. *Campylobacter jejuni*. Washington: American Society for Microbiology; 2000;3-26.

Vandamme P, DeLey J. Proposal for a new family, *Campylobacteraceae*. Int J System Bact. 1991;41:451-55.

Vandamme P, Falsen E, Rossau R, Hoste B, Segers P, Tytgat R, DeLey J. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. Int J Syst Bacteriol. 1991;41:88-103.

Véron M, Chatelain R. Taxonomic Study of the Genus *Campylobacter* Sebald and Véron and designation of the Neotyp Strain for the Type Species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron. Int J Syst Bacteriol. 1973;23:122-34.

Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucl Acids Res. 1991;19(24):6823-31.

Vogt K, Suerbaum S, Hahn H, Miksits K. *Campylobacter*. In: Klein P, Hrsg. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. New York: Springer Berlin-Heidelberg; 2001:304-07.

Wagenaar JA, Bergen MAP, Newell DG, Grogono-Thomas R, Duim B. Comparative study using amplified fragment length polymorphism fingerprint, PCR genotyping, and phenotyping to differentiate *Campylobacter fetus* strains isolated from animals. J Clin Microbiol. 2001;39:2283-86.

Wang E, Garcia MM, Blake MS, Pei Z, Blaser MJ. Shift in S-layer protein expression responsible for antigenic variation in *Campylobacter fetus*. J Bacteriol. 1993;175:4979-84.

Literaturverzeichnis

Ward JL. Hierarchic grouping to optimize an objective function. J Am Statist Assoc. 1963; 58:236-44.

Wassenaar TM, Geilhausen B, Newell DG. Evidence of genomic instability in *Campylobacter jejuni* isolated from poultry. Appl Environ Microbiol. 1998;64:1816-21.

Wassenaar TM. Molekularmethoden als Nachweis, Spezifizierung und Subtypisierung von *Campylobacter* spp. Lohmann Information. 2000;2:17-24.

Weber A, Lembke C, Kettner A. Nachweis von *Campylobacter jejuni* in Kotproben von klinisch gesunden Brieftauben. Berl Münch Tierärztl Wochenschr. 1981;94:449–51.

White WD. Human Vibriosis: Indigenous Cases in England. Br Med J. 1967;2:283–87.

Willoughby K, Nettleton PF, Quirie M, Maley M, Foster G, Toszeghy M, Newell DG. A multiplex polymerase chain reaction to detect and differentiate subspecies *venerealis*: use on UK isolates of *Campylobacter fetus* and other *Campylobacter* spp. Unpublished. 2004.

Winter AJ, McCoy EC, Fullmer CS, Burda K, Bier PJ. Microcapsule of *Campylobacter fetus*: chemical and physical characterization. Infect Immun. 1978;22:963-71.

Wittenbrink MM. *Campylobacter*: Vorkommen und pathogene Bedeutung bei Mensch und Tier. Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene. 2002;93:12-16.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Monika Krüger, für die freundliche Überlassung dieses Dissertationsthemas bedanken.

Es gibt wohl niemanden am Friedrich-Löffler-Institut (FLI) Jena, der mir während der Durchführung meiner Arbeit nicht irgendwann in irgendeiner Art und Weise geholfen hat. Daher bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern ganz herzlich.

Insbesondere bei der Gruppe der Molekularbiologie am FLI möchte ich mich für die immer freundliche und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre bedanken. Wer weiß, ob ich ohne diese Menschen jemals eine Dissertation zu schreiben in der Lage gewesen wäre. Ein spezieller Dank geht an Dr. Konrad Sachse, Simone Bettermann, Dr. Helmut Hotzel, Byrgit Hofmann, Dr. Jens Müller, Dr. Wolfgang Müller, Karola Zmuda, Christine Grajetzki, Stephanie Göllner, Uta Pfeil, Dr. Frank Schultze und Dr. Irmgard Moser.

Großen Dank schulde ich Dr. Irmgard Moser, der geduldigsten Frau der Welt, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und mir vor allem bei den Programmieraufgaben, die im Rahmen dieser Arbeit anfielen, geholfen hat. Ich danke auch für das aufmerksame Korrekturlesen meiner Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich Dr. Frank Schultze die geduldige Beantwortung meiner Fragen und Hilfe danken.

Auch möchte ich mich bei Dr. Konrad Sachse, der mich stets freundlich beriet und unterstützte, für die Möglichkeit, diese Arbeit am FLI durchführen zu können bedanken.

Mein Dank gilt Dr. Helmut Hotzel für die vielen Anregungen, Zusammenarbeit (mit guter Musik!), Korrektur und die Beantwortung von Tausenden von Fragen!

Christine, Byrgit und Simone, ihr Lieben, ich danke für den gezeigten Einsatz, für Eure Bereitschaft über die großen und vor allem kleinen Dinge des Lebens so offen zu reden. Ihr wart bei allen auftretenden Schwierigkeiten immer ansprechbar und habt mir durch konstruktive Vorschläge sehr weitergeholfen. Ich bin für Eure Unterstützung und Geduld sehr dankbar.

Jens, Uta, Frau Kühner, Thomas und Helder danke ich für die hervorragende Hilfe am Computer.

Bei Herr Heinz Nüsse und Rinderunion-Baden-Württemberg möchte ich mich für die Finanzierung und Ermöglichung dieser Arbeit bedanken.

Danksagung

Weiterhin gilt mein Dank Dr. Anne Rose Fischer, die sehr viel Geduld bewiesen hat und mir jederzeit behilflich war. Sie hat stets sehr viel Verständnis für meine Arbeit gezeigt.

Ein besonderes Dankeschön geht an Hans Dr. Koll für seine Hilfe und Freundschaft. Mein Dank geht auch an die hier nicht erwähnten Mitarbeiter an der Besamungsstation.

Dankbar anerkennen möchte ich die ersten Anregungen zum Thema Campylobacteriosis und die fortwährende Unterstützung während der Arbeit durch Dr. Sabine Bracknies.

Und schließlich ein besonderes Dankeschön an meine Familie, die immer für mich da ist und stets bereit war und ist, wichtige und unwichtige Probleme zu lösen.

Nicht zuletzt möchte ich allen Freunden insbesondere Sabrina (für die Hilfe und Freundschaft, sowie die Vermittlung des Praktikums in Deutschland), Dehbora und Martin (für die Hilfe an meinem ersten Tag in Deutschland), Thomas, Luís und Linda (für ihre Hilfe bei sprachlichen Problemen) und Roland (auch für die Hilfe und fast immer guten Humor!) danken.