

Universität Ulm

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Stenger

**Die Fluoreszenz- in- situ- Hybridisierung zur Identifizierung
und Differenzierung von Campylobacterspezies
sowie zum Nachweis einer Erythromycinresistenz**

Dissertation zur Erlangung Doktorgrades

der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Vorgelegt von Michaela Haas

geboren in Schwäbisch Gmünd

2009

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. S. Stenger

2. Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. F. Oswald

Tag der Promotion: 19. Juni 2009

Meinen Eltern
und Großeltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	III-V
1. Einleitung	1
1.1 Historisches	1
1.2 Charakterisierung	2
1.3 Taxonomie	3
1.4 Campylobacter als Krankheitserreger	3
1.5 Nachweisverfahren	10
1.6 Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	11
1.7 Zielsetzung der Arbeit	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Chemikalien und Reagenzien	15
2.2 Geräte	16
2.3 Materialien	17
2.4 Lösungen und Puffer	19
2.5 Nährmedien	21
2.6 Bakterienstämme	22
2.7 Sonden	24
2.8 Bakterienkultur	27
2.9 Paraformaldehydherstellung	27
2.10 Herstellung der Präparate	28
2.11 Design der Sonden	28
2.12 FISH	28
2.13 Formamidreihe	30
2.14 Bewertungsmaßstab	31
2.15 Resistenzbestimmung	32

3. Ergebnisse	35
3.1 Fixierungsmethoden	35
3.2 Konzept und Auswahl der Sonden	39
3.3 Formamidverdünnungsreihe	40
3.4 Nachweis und Differenzierung von Campylobacterspezies	42
3.5 Evaluation der Sonden	44
3.6 Resistenzuntersuchungen und Zusammenfassende Darstellung	54
4. Diskussion	59
5. Zusammenfassung	69
6. Literaturverzeichnis	71
7. Danksagung	81
8. Lebenslauf	82

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
‰	Promille
A	Adenin
<i>A. butzleri</i>	<i>Arcobacter butzleri</i>
<i>A. cryaerophilus</i>	<i>Arcobacter cryaerophilus</i>
<i>A. nitrofigilis</i>	<i>Arcobacter nitrofigilis</i>
Abb.	Abbildung
AFLP	Amplified fragment-length polymorphism
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ARB- Software	Eigennamen, stammt vom lateinischen Arbor (= Baum) ab
API	Analytical Profile Index
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
<i>C. coli</i>	<i>Campylobacter coli</i>
<i>C. consisus</i>	<i>Campylobacter consisus</i>
<i>C. curvus</i>	<i>Campylobacter curvus</i>
<i>C. fetus</i>	<i>Campylobacter fetus</i>
<i>C. gracilis</i>	<i>Campylobacter gracilis</i>
<i>C. helveticus</i>	<i>Campylobacter helveticus</i>
<i>C. hominis</i>	<i>Campylobacter hominis</i>
<i>C. hyointestinalis</i>	<i>Campylobacter hyointestinalis</i>
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>C. lanienae</i>	<i>Campylobacter lanienae</i>

<i>C. lari</i>	<i>Campylobacter lari</i>
<i>C. mucosalis</i>	<i>Campylobacter mucosalis</i>
<i>C. rectus</i>	<i>Campylobacter rectus</i>
<i>C. showae</i>	<i>Campylobacter showae</i>
<i>C. sputorum</i>	<i>Campylobacter sputorum</i>
<i>C. upsaliensis</i>	<i>Campylobacter upsaliensis</i>
ca.	Circa
Camp.	Campylobacter
<i>Campylobacter</i> <i>spp.</i>	<i>Campylobacter spezies</i>
CDT	Cytolethal distending toxin
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cm	Zentimeter
comp.	Kompetitor
Cy3	Carbocyanin 3
d. h.	das heißt
DAPI	Diamidinophenylindoldihydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM/DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
E- Test	Epsilometertest
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et altera
EUB	Eubakteriell
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
g	Gramm
G	Guanin
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HCl	Salzsäure

HIV	Human immunodeficiency virus
IfSG	Infektionsschutzgesetz
ISH	in-situ-Hybridisierung
kb	Kilobasen
KBE	Koloniebildende Einheit
M	molar
MH- Agarplatte	Müller-Hinton-Agarplatte
MHK	Minimale Hemmkonzentration
min	Minute
ml	Mililiter
mm	Milimeter
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
R	resistent
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
S	sensibel
s.	siehe
SDS	sodium dodecyl sulfate
ssp.	subspezies
T	Thymin
Tris HCl	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol hydrochloride

1. Einleitung

1.1 Historisches

Im Jahre 1886 wurden erstmals spiralförmige Darmbakterien bei an Durchfall ("Cholera infantum") erkrankten Kindern in einem Kinderspital in München von Escherich beobachtet und beschrieben. Die Bezeichnung der Durchfallerkrankung als Cholera infantum kam dadurch zustande, dass die damals entdeckten Bakterien den mikroaerophilen Vibrionen, zu denen auch der Erreger der Cholera gehört, zugeordnet wurden. Escherich publizierte seine Entdeckung in der Münchener Medizinischen Wochenschrift. Da eine Anzüchtung dieser Bakterien zu diesem Zeitpunkt jedoch noch nicht möglich war, geriet sie schnell wieder in Vergessenheit [13;42].

Die ersten tierpathogenen *Campylobacter spp.* konnten 1909 beim Schaf durch McFadyean und Stockmann und 1919 beim Rind durch Smith und Taylor isoliert werden, welche dem Bakterium den Namen *Vibrio fetus* gaben.

Die Gattungsbezeichnung *Campylobacter* wurde 1963 von Sebald und Veron eingeführt und löste damit die Zuordnung als "mikroaerophile Vibrionen" zur Familie der Vibrionaceae ab. Zu diesem Zeitpunkt enthielt die Gattung lediglich zwei Spezies, *Campylobacter fetus* und *Campylobacter bulbulus*, welcher heute *C. sputorum* genannt wird [60].

Die kulturelle Isolierung von humanpathogenen *Campylobacter spp.* aus Stuhl wurde erstmals 1968 von Dekeyser mittels einer speziellen Filtration einer Stuhlprobe einer an schwerem Durchfall und hohem Fieber erkrankten 20jährigen Frau durchgeführt.

Die Einführung antibiotikahaltiger Selektivnährböden durch Skirrow (1977) vereinfachte entscheidend den kulturellen Nachweis von *Campylobacter* und ermöglichte damit den Nachweis dieser Bakterien in der Routinediagnostik mikrobiologischer Laboratorien [42].

Der Nachweis, dass eine Infektion mit *Campylobacter spp.* durch Lebensmittel erfolgt, wurde erst Anfang der 80er Jahre unter anderem durch Vogt et al. erbracht [86].

1.2 Charakterisierung

1.2.1 Morphologie

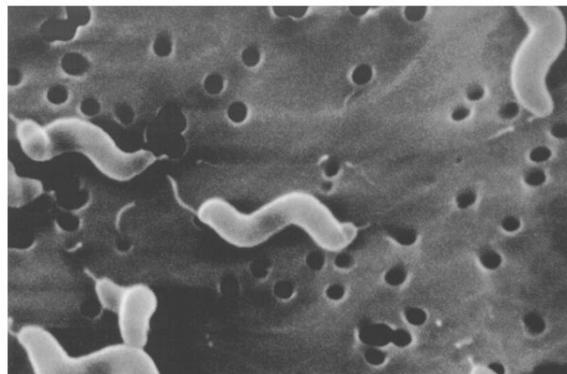
Campylobacter stellen sich in der Gramfärbung als gram-negative Stäbchen mit einer Größe von 0,2-0,5 x 0,5-5 μm dar. Diese schlanke, spiralig gekrümmte Form hat dem Bakterium auch seinen Namen gegeben, der sich vom griechischen campylo (= gebogen) ableitet (s. Abb. 1).



(Abb. 1: Gramfärbung eines Campylobacter fetus,

Quelle: <http://www.usda.gov/oc/photo/b99c0650.jpg>)

Campylobacter tragen uni- oder bipolar jeweils eine Geißel und zeigen eine lebhaft kornenzieherartige Beweglichkeit (s. Abb. 2). Allerdings können sie in älteren Kulturen auch eine kokkoide Degenerationsform annehmen. Zur Sporenbildung sind sie nicht befähigt.



(Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Campylobacter jejuni

Quelle: <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol5no1/altek2b.jpg>)

1.2.2 Biologie

Bakterien der Gattung *Campylobacter* wachsen mikroaerophil, d. h. in Gegenwart von ca. 5% Sauerstoff. Sie werden damit sowohl durch eine absolut aerobe als auch durch eine anaerobe Atmosphäre im Wachstum gehemmt. Für die Identifizierung der Bakterien können einige wichtige Stoffwechseleigenschaften für die mikrobiologische Diagnostik von Campylobacterinfektionen genutzt werden. *Campylobacter spp.* sind Oxidase-positiv, reduzieren in der Regel Nitrat und verwenden Aminosäuren und Intermediärprodukte des Tricarbonsäurezyklus als Energiequelle. Kohlenhydrate werden weder fermentiert noch oxidiert. Die meisten Spezies bilden Katalase.

Das Genom der *Campylobacter spp.* ist mit 1500-1700 kb vergleichsweise klein [42].

1.3 Taxonomie

Zur Familie der *Campylobacteriaceae* zählen die drei eng miteinander verwandten Gattungen *Campylobacter*, *Arcobacter* und *Sulfurospirillum*. Momentan zählen zur Gattung *Campylobacter* 16 Spezies und 6 Subspezies.

Die Zuordnung der Erreger zur jeweiligen Gattung und Spezies erfolgt mittels biochemischer Differenzierung und Analyse der 16S rRNA. Da *Campylobacter* aber vielen anderen Erregern genetisch sehr ähnlich sind, ist es oftmals schwierig sie der richtigen Gattung zuzuordnen. So ist zum Beispiel bis heute nicht endgültig geklärt, ob *Bacteroides urealyticus* nicht doch zur Gattung der *Campylobacter* gezählt werden sollte [59;60].

1.4 Campylobacter als Krankheitserreger

1.4.1 Spezies

Von den 16 bekannten *Campylobacter spp.* sind vor allem die sogenannten thermophilen *Campylobacter* von medizinischem Interesse, da diese Verursacher teils schwerer Durchfallerkrankungen sind. In diese Gruppe gehören folgende vier *Campylobacter spp.*:

- *C. jejuni*
- *C. coli*

- *C. lari*
- *C. upsaliensis*

Alle anderen Spezies werden zur Gruppe der nicht-thermophilen Campylobacter zusammengefasst. Einige davon kommen als Kommensalen in der menschlichen Mundhöhle vor, wie zum Beispiel *C. consisus* und *C. sputorum*. Ihre Pathogenität ist noch nicht abschließend geklärt, es wird jedoch vermutet, dass sie für Periodontalkrankheiten verantwortlich sind. Weitere nicht-thermophile *Campylobacter spp.* sind *C. curvus*, *C. fetus*, *C. gracilis*, *C. helveticus*, *C. hominis*, *C. hyointestinalis*, *C. lanienae*, *C. mucosalis*, *C. rectus*, und *C. showae*.

Aus der Gruppe der nicht-thermophilen Spezies ist vor allem *C. fetus* von humanmedizinischem Interesse, welcher in der Regel extraintestinale Infektionen verursacht und gelegentlich aus Blutkulturen isoliert werden kann.

1.4.2 Epidemiologie

Die Campylobacteriose ist eine weltweit vorkommende Zoonose.

Gemäß § 7 Infektionsschutzgesetz (IfSG) besteht in Deutschland eine Meldepflicht beim Labornachweis von *Campylobacter spp.* Diese besteht aus epidemiologischem Interesse, um immer eine möglichst genaue Datenlage zur Häufigkeit von Campylobacterinfektionen zu haben. Eine Meldepflicht von Krankheitsverdacht und Erkrankung an einer Campylobacterinfektion besteht laut §6 IfSG nur bei einer Häufung von Erkrankungsfällen oder bei im Lebensmittel-Bereich beschäftigten Personen.

In Deutschland zählen bakterielle Gastroenteritiden zu den am häufigsten gemeldeten Infektionskrankheiten. In den letzten Jahren konnte man bei den durch Campylobacter verursachten Fällen eine deutlich steigende Tendenz erkennen. So wurden im Jahr 2007 (Stand 19. Dezember 2007) bundesweit 62.406 Campylobacterinfektionen gemeldet, das sind 14.060 Fälle mehr als im Vorjahr. Damit liegen Campylobacter als Verursacher von Durchfallerkrankungen deutlich vor den Salmonellen, welche 52.716-mal gemeldet wurden [75].

Diese hohe Prävalenz lässt sich auch in anderen Industrienationen, wie zum Beispiel den USA [1], und ebenso europaweit beobachten [91].

In Entwicklungsländern stellen Infektionen mit *Campylobacter spp.* ein besonderes Problem dar, da hier der lebensmittelhygienische Standard oft sehr niedrig ist. Darüber hinaus finden sich aufgrund der höheren HIV-Infektionsrate und niedrigeren Entwicklungsständen auch höhere Morbiditäts- und Mortalitätsraten [16].

Vor allem im Sommer und Herbst lässt sich eine saisonale Häufung der Campylobacter-Erkrankungen beobachten. Wie die folgende Abbildung zeigt, lässt die Verteilung der altersspezifischen Inzidenzen zwei Gipfel erkennen: Die höchste Inzidenz findet man bei 1- bis 4-jährigen Kindern, einen zweiten, allerdings kleineren Gipfel, bei 20- bis 29-jährigen [74] (s. Abb. 3).

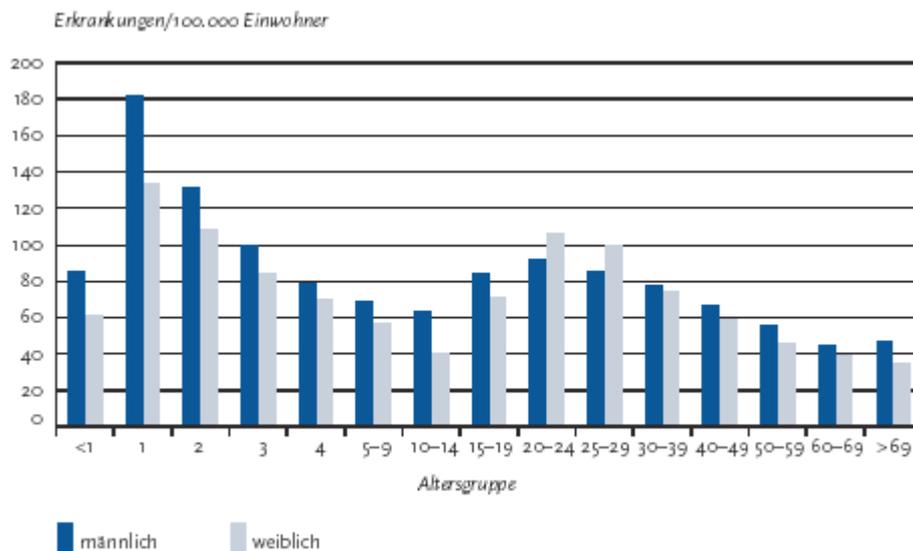


Abb. 3: Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten 2006, Übermittelte *Campylobacter*-Enteritiden pro 100.000 Einwohner nach Alter und Geschlecht, Deutschland 2006 (n = 51.974)

Im Jahr 2006 lagen zu 41.828 *Campylobacter*-Erkrankungen (80%) genauere Angaben zur Spezies vor. Davon wurden 30.665 (73,3%) als *C. jejuni*, 2.615 (6,3%) als *C. coli*, 7.872 (18,8%) als *C. coli/C. jejuni* (nicht differenziert) und 374 (0,9%) als *C. lari* gemeldet. Unter den übrigen 0,8% wurden 0,4% als *C. fetus ssp. fetus*, *C. butzleri*, *C. jejuni ssp. doylei*, *C. upsaliensis* und *C. hyointestinalis ssp. hyointestinalis* spezifiziert. Für 0,4% wurde unter Spezies "andere/sonstige" angegeben [74].

1.4.3 Reservoir und Infektionsweg

Campylobacter spp. sind bei Mensch und Tier weit verbreitet. Sie sind darüber hinaus in der Lage auch bei niedrigen Temperaturen einige Zeit in der Umwelt oder in Lebensmitteln zu überleben.

Campylobacter kolonisieren als enterale Kommensalen ein breites Spektrum von Wild- und Haustieren wie freilebende Vögel und Säugetiere, aber auch Nutztiere, vor allem Geflügel und mit geringerer Prävalenz Milchrinder und Schweine. Haushunde und Katzen sind ebenfalls betroffen.

C. jejuni findet man vor allem in Geflügel, wie zum Beispiel Hühner oder Truthähne, aber auch in Rohmilch von Rindern konnte dieser Erreger bereits als Auslöser einer Enteritis nachgewiesen werden [31;33;63].

Der zweithäufigste Verursacher der Campylobacteriose, *C. coli*, kommt dagegen hauptsächlich in Schweinen vor.

Die mit Campylobacter kolonisierten Tiere weisen zum Teil eine sehr hohe Kolonisationsdichte von über 10^6 KBE/g Kot auf.

Hauptinfektionsquelle für den Menschen sind Lebensmittel. Dabei ist es vor allem kontaminiertes oder unzureichend erhitztes Geflügelfleisch, das zu einer Campylobacter-Enteritis führt. Als weitere Infektionsquellen kommen unpasteurisierte Milch, kontaminiertes Trinkwasser oder auch Haustiere in Betracht [2;39;63].

1.4.4 Pathogenese

Bislang konnte die Pathogenese einer Campylobacterinfektion noch nicht genau geklärt werden. Fest steht allerdings, dass bereits eine sehr kleine Menge an aufgenommenen Erregern (500 Bakterien) ausreicht, eine manifeste Infektion zu verursachen. Im Vergleich dazu wird bei einer Salmonellen- Enteritis von einer weitaus höheren Infektionsdosis von ca. 10^5 Bakterien ausgegangen.

C. jejuni weißt ein Zytotoxin, welches cytolethal distending toxin (CDT) genannt wird, auf. Dieses Toxin führt über eine direkte Schädigung der DNA dazu, dass die betroffenen Zellen in der G1- oder G2-Phase des Zellzyklus verharren oder auch ganz absterben [53]. Welche Rolle dieses Toxin bei der Pathogenese spielt konnte bislang allerdings nicht abschließend geklärt werden [72].

Ein wichtiger Pathogenitätsfaktor scheinen die Motilität und die Spiralform des Bakteriums zu sein, welche es ihm ermöglichen, die schützende Mukosaschicht des Darmes sehr schnell zu durchdringen. Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass der Kontakt von *C. jejuni* mit eukaryontischen Zellen zu einer Ausschüttung von Zytokinen führt [65].

1.4.5 Klinik

Intestinale Infektionen

Campylobacter spp. können beim Menschen für verschiedene Erkrankungen verantwortlich sein, wobei die akute Enteritis, verursacht durch die thermophilen *Campylobacter spp.*, allen voran *C. jejuni*, die mit Abstand häufigste ist.

Nach einer mittleren Inkubationszeit von ca. 2-4 Tagen beginnt das Prodromalstadium, welches meist 12-24 Stunden dauert und sich zunächst durch ein unspezifisches Krankheitsgefühl zeigt, gefolgt von Frösteln mit Kopf- und Gliederschmerzen.

Am ersten Krankheitstag kommt es dann zu einem raschen Fieberanstieg mit Temperaturen bis zu 40° C. Gleichzeitig treten krampfartige abdominale Schmerzen, Schwindel und andere Kreislaufsymptome auf. Erbrechen wird nur selten beobachtet. Während dieses fieberhaften Frühstadiums können passagere Bakteriämien auftreten. Gelegentlich ist das akute Stadium von schweren Arthralgien begleitet.

Nach dem plötzlichen Einsetzen der Diarrhoe werden bis zu 20 Stühle pro Tag abgesetzt. Dabei ist die Beschaffenheit des Stuhls meist von wässriger Konsistenz, wobei in schweren Fällen auch Blutauflagerungen auftreten können. In der Regel sistieren die Durchfälle nach 5-7 Tagen. Im Vergleich zu den Salmonellen ist die mittlere Ausscheidungsdauer mit 14 Tagen deutlich kürzer. Dauerausscheidertum wird nur selten beobachtet, wenn überhaupt, dann vor allem bei AIDS-Patienten.

Extraintestinale Infektionen

In Ausnahmefällen verursacht *C. jejuni* auch extraintestinale Erkrankungen. Das Spektrum reicht von der Cholezystitis, über den septischen Abort und die Neugeborenenmeningitis bis hin zur Septikämie bei Abwehrschwäche.

In den letzten Jahren wird zunehmend häufiger über durch *C. jejuni* verursachte Peri- und Myokarditiden und Arthritiden berichtet [4].

Der nicht-thermophile *C. fetus* verursacht ein breites Spektrum an Erkrankungen, welches von einer fieberhaften Septikämie, über Endokarditis, Meningitis, Phlebitis, Arthritis bis hin zum fieberhaften Abort reicht. Insgesamt sind Infektionen durch *C. fetus* selten und vor allem bei Personen mit prädisponierenden Faktoren, wie zum Beispiel Leukämie, Alkoholismus oder auch immunsuppressiver Therapie zu finden.

Folgekrankheiten

Als Folge einer Campylobacter-Infektion können nach 2-3 Wochen eine aseptische reaktive Arthritis, Exantheme der Haut oder auch das Reiter-Syndrom (Konjunktivitis, Arthritis, Urethritis) auftreten.

Zwei neurologische Krankheitsbilder, die mit Campylobacter assoziiert werden sind das Fisher-Syndrom und das Guillain-Barré-Syndrom [84]. Sie stellen die am schwersten verlaufenden Folgeerkrankungen einer Campylobacterinfektion dar. Beim Fisher-Syndrom handelt es sich um eine Polyneuritis mit beidseitiger Ophthalmoplegie und Ataxie kombiniert mit einem Erlöschen der Eigenreflexe, zum Teil auch mit schlaffen Lähmungen.

Das Guillain-Barré-Syndrom äußert sich in einer aufsteigenden Parese bis hin zur Atemlähmung und wird nach 1-3‰ der manifesten Campylobacteriosen beobachtet.

1.4.6 Therapie einer Campylobakterinfektion

Meistens zeigt die Erkrankung einen selbstlimitierenden Verlauf, so dass es nicht notwendig ist, die Infektion mit einem Antibiotikum zu behandeln. In solchen Fällen ist es ausreichend, dafür zu sorgen, dass der Patient entsprechend des Wasser- und Elektrolytverlustes rehydriert und gegebenenfalls das Elektrolytdefizit substituiert wird.

Schwere Verläufe treten vor allem bei Kleinkindern und im höheren Alter auf, da diese Personengruppen unter dem teilweise enormen Flüssigkeitsverlust besonders leiden und dadurch stärker gefährdet sind als ein gesunder

Erwachsener. In solchen Fällen kann es notwendig werden eine antibiotische Therapie einzuleiten.

Wenn eine solche Therapie erforderlich ist, dann gilt Erythromycin aus der Gruppe der Makrolide als Mittel der Wahl. Der Wirkmechanismus der Makrolide besteht in einer Bindung an die 50S-Untereinheit der bakteriellen Ribosomen, wo sie die Elongation der Peptidketten bei der Proteinbiosynthese blockieren.

In den letzten Jahren wird zunehmend über Resistenzen der *Campylobacter spp.* gegenüber Erythromycin [17;48] und inzwischen auch gegenüber Ciprofloxacin berichtet [21].

Dieses Problem betrifft vor allem *C. coli*-Stämme. Diese werden wie oben bereits erwähnt hauptsächlich bei Schweinen isoliert. Damit die Tiere bei der Mast gesund und kräftig bleiben wird immer öfter ein Antibiotikum ins Futtermittel gemischt. Die Folge ist eine steigende Zahl an Resistenzmeldungen.

Der wichtigste Mechanismus dieser Resistenz liegt in einer Punktmutation an Position 2059 auf der 23S RNA Untereinheit der ribosomalen DNA, bei welcher in Peptiden eine Adenosin-Base durch eine Guanin-Base ersetzt wurde [37].

Vier seltenere Mutationen betreffen die Position 2058. Dabei wurde auch jeweils im Peptid eine Adenosin-Base ersetzt, und zwar einmal durch Guanin, einmal durch Cytosin und einmal durch Thymin. Beim vierten Resistenzmechanismus liegen gleich zwei Mutationen vor. Auf beiden Positionen, 2058 und 2059, wurde die Adenosin-Base durch eine Guanin-Base ersetzt.

Eine weitere Resistenzform ist der sogenannte Effluxmechanismus. Dieser führt dazu, dass das Bakterium das Antibiotikum aktiv ausschleust. Dieser Mechanismus kann allerdings durch eine entsprechende Dosiserhöhung überwunden werden.

1.5 Nachweisverfahren

Um *Campylobacter* aus Stuhlproben zu isolieren werden die Proben auf Butzler Selektivnährmedium ausgestrichen, welcher antibiotische Zusätze enthält um die normale Darmflora zu unterdrücken. Diese Agarplatte wird dann anaerob bebrütet und nach 1 und 2 Tagen abgelesen.

Bei Wachstum verdächtiger Kolonien wird dann ein Grampräparat angefertigt. Fällt dieses positiv aus, dann sieht man kleine gramnegative gebogene, teilweise auch gewundene Stäbchen. Außerdem werden die verdächtigen Bakterien auf Oxidase und Katalase getestet, welche bei *Campylobacter* beide positiv sein müssen.

Zur Differenzierung der einzelnen *Campylobacter*spezies werden biochemische Reaktionen herangezogen. In manchen Laboren wird lediglich unter Zuhilfenahme der Hippurathydrolyse zwischen *Campylobacter spp.* und *C. jejuni* unterschieden. Soll die Differenzierung genauer sein, sind weitere Reaktionen nötig. Dabei macht man sich die verschiedenen Eigenschaften der *Campylobacter*spezies bezüglich ihrer Stoffwechseleistungen zunutze (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Stoffwechseleigenschaften der *Campylobacter*spezies.

R = resistent; S = sensibel

C. jejuni = *Campylobacter jejuni*, *C. coli* = *Campylobacter coli*, *C. lari* = *Campylobacter lari*,
C. upsaliensis = *Campylobacter upsaliensis*, *C. fetus* = *Campylobacter fetus*

* Subspezies *C. jejuni ssp. doylei* wächst nicht bei 43°C, kann Hippurat-negativ sein, ist S für Cephalotin.

**Zunehmend treten Nalidixinsäure-resistente *C. jejuni* und *C. coli* in Erscheinung

Eigenschaft	<i>C. jejuni</i> *	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>C. fetus</i>
Katalase	+	+	+	-	+
Hippurathydrolyse	+	-	-	-	-
Indoxylacetat	+	+	-	+	-
Cephalotin	R	R	R	S	S
Nalidixinsäure	S (evt. R)**	S (evt. R)**	R	S	R
Wachstum bei 25°C	-	-	-	-	+
Wachstum bei 43°C	+	+	+	+	-

Diese biochemische Differenzierung ist nicht nur sehr aufwendig, sondern vor allem schwierig und unsicher. Es treten immer häufiger Nalidixinsäure-resistente *Campylobacter* auf, was die Unterscheidung der einzelnen Spezies zusätzlich erschwert. Die Abgrenzung zur Spezies *Arcobacter* ist ebenfalls schwierig, so dass es häufiger vorkommt, dass ein *Campylobacter* fälschlicherweise als *Arcobacter* differenziert wird.

Neben diesen biochemischen Verfahren kommen zunehmend auch molekularbiologische Methoden, wie zum Beispiel AFLP fingerprinting [19;], die PCR [9;22;33;35;41] oder noch aufwendigere Verfahren wie die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation-Flugzeit-Massenspektrometrie als Nachweis- und Differenzierungsverfahren zum Einsatz [43].

Doch auch diese Verfahren sind sowohl zeit- als auch kostenintensiv und bedürfen entsprechender Geräte, so dass sie nicht in jedem Labor durchgeführt werden.

Dies alles zeigt, dass es erstrebenswert wäre, eine einfachere, schnellere und günstigere Methode zum Nachweis von *Campylobacter*spezies zu etablieren. Ein Verfahren, welches diese Vorzüge vereint, ist die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Sie wird bereits seit einigen Jahren in verschiedenen Bereichen der Mikrobiologie eingesetzt, wie zum Beispiel bei der Untersuchung von Meersediment oder auch zum Nachweis von pathogenen Bakterien in klinischem Material [40;57].

1.6 Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die Geschichte der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) beginnt im Jahr 1969 als zwei Forschergruppen Pardue et al. und John et al. unabhängig voneinander die sogenannte in situ Hybridisierung (ISH) beschreiben. Präparierte Zellen vom *Xenopus* wurden mit radiomarkierter DNA oder 18S-RNA hybridisiert und mit Hilfe des Microautoradiographen nachgewiesen [38;61]. Seitdem wird die ISH für Chromosomenanalysen bei Tumoren und Leukämien und pränatale Diagnostik genutzt.

Das besondere an dieser neuen Methode war, dass man damit erstmals in der Lage war, RNA- bzw. DNA-Sequenzen in Geweben, Zellkernen und

Mikroorganismen unter Beibehaltung ihrer morphologischen Integrität zu identifizieren [5].

Ihren Einsatz im Bereich der Bakteriologie fand die ISH 1988 zum ersten Mal durch Giovanni, der damit ein Verfahren etablierte, das schnell, spezifisch und vor allem kulturunabhängig (in situ= vor Ort) war.

Im Laufe der Weiterentwicklung dieser Methode wurden die Sonden durch Landegent und Pinkel mit Fluoreszenzfarbstoffen versehen, wodurch die radioaktive Markierung immer mehr in den Hintergrund trat [45].

Bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung finden Sonden Verwendung, die aus Einzelstrang-Nukleinsäuren bestehen und die höchst spezifisch auf eine komplementäre Zielregion der DNA oder RNA gerichtet sind. Die Sonden transportieren Markermoleküle, meist am 5'-Ende kovalent gebundene Fluoreszenzfarbstoffe. Da Oligonukleotide mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen mit Maxima bei unterschiedlichen Wellenlängen markiert werden können, ist es möglich unterschiedliche Zielsequenzen in einem Hybridisierungsschritt nachzuweisen.

Zur Darstellung aller Zellen eines Präparates kann das Material zusätzlich mit einem blauen Fluoreszenzfarbstoff, DAPI (4'-6-Diamidino-2'-phenylindoldihydrochlorid), gegengefärbt werden, der mit sehr großer Affinität an DNA bindet.

In der mikrobiologischen Diagnostik ist die Zielsequenz der FISH die ribosomale RNA. Prokaryonten besitzen Ribosomen, die aus einer 30S- und einer 50S-Untereinheit bestehen. Jede dieser Untereinheiten besitzt eine ribosomale RNA-Struktur. Auf der 30S-Untereinheit liegt die 16S-RNA und auf der 50S-Untereinheit die 23S-RNA. Komplementär zu dieser RNA können Sonden entwickelt werden, welche dann an die entsprechende Stelle binden.

Zum einen bieten sich Ribosomen wegen ihrer genetischen Stabilität und ihrer Domänenstruktur mit variablen und konstanten Regionen an. Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass die Ribosomen in bis zu 20 000 Kopien pro Zelle vorliegen [5]. Dadurch kann bei der Durchführung einer FISH auf den Amplifikationsschritt, wie er zum Beispiel bei der PCR nötig ist, verzichtet werden.

Mit einer Länge von 3000 Nukleotiden ist die 23S-RNA spezifischer, als die 16S-RNA, welche nur 1500 Nukleotide aufweist. Daher wäre es am besten, die Sonden

komplementär zu diesem Abschnitt zu entwerfen. Da aber in den letzten Jahren vor allem die 16S-RNA von Bakterien sequenziert wurde, liegen darüber weit mehr Informationen vor, als über den 23S-RNA-Abschnitt. Deshalb wurden die meisten Sonden komplementär zum 16S-Abschnitt entworfen und nur einige wenige sind komplementär zur 23S-RNA.

Molekularbiologische Verfahren wie PCR und Sequenzierung haben in den vergangenen Jahren eine große Bedeutung erlangt, da hiermit eine genaue Identifizierung und eine sensitive Aufzeichnung möglich sind. Vor allem in der klinischen Diagnostik von langsam wachsenden und schlecht kultivierbaren Bakterien, sowie zum Nachweis von Resistenzgenen und Pathogenitätsfaktoren, wird die PCR eingesetzt. Ein Nachteil dieser Methoden besteht allerdings nach wie vor in den hohen Kosten und der großen Störanfälligkeit.

Der mikroskopische Nachweis mittels einer Gramfärbung stellt zwar eine günstigere und schnellere Methode dar, jedoch ist keine zuverlässige Identifizierung möglich. Dieser Mangel könnte durch eine Immunfluoreszenz mit artspezifischen mononukleären Antikörpern ausgeglichen werden. Allerdings kommt es hier häufig zu unspezifischen Bindungen.

Im Gegensatz dazu kombiniert die FISH die Präzision der PCR mit der visuellen Information durch die Mikroskopie [57]. Außerdem kommt es nicht zu falsch positiven Reaktionen, wie sie zum Beispiel bei der PCR auftreten können, da bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung kein Amplifikationsschritt nötig ist.

Desweiteren ist die FISH kompatibel mit direkten Zählmethoden von Mikroorganismen in Suspensionen [51]. Mit Hilfe der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie kann die FISH mit einem Minimum an Hintergrundfluoreszenz digitalisiert werden. Dadurch können auch komplexe räumliche Anordnungen analysiert werden [57].

In der Medizin findet die FISH ein breites Anwendungsspektrum bei der Untersuchung von komplexen mikrobiellen Populationen, wie sie zum Beispiel die gastrointestinale Flora [11;77] und die Mundflora [88] darstellen. Auch im Rahmen der klinisch- mikrobiologischen Diagnostik kommt die FISH immer häufiger zum Einsatz. So gelang bisher beispielsweise der Nachweis von Bakterien aus Blutkulturen [40;89] und aus dem Respirationstrakt bei Patienten mit cystischer Fibrose [32;90].

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Wie aus dem oberen Abschnitt ersichtlich wird, sind sowohl der Nachweis als auch die Differenzierung einer *Campylobacter*-Infektion bislang schwierig, zeitintensiv und unsicher. Deshalb sind auch nur wenige Labore in der Lage, eine solche Untersuchung durchzuführen.

Da Infektionen mit *Campylobacter* häufig auftreten und es bislang nicht gelang zu klären, wie häufig die beiden Spezies *C. lari* und *C. upsaliensis* beim Menschen für Durchfallerkrankungen verantwortlich sind, besteht sowohl ein klinisches als auch ein epidemiologisches Interesse, eine einfache und schnelle Methode zum Nachweis von *Campylobacter* zu etablieren.

Im Vergleich zu den bisher üblichen Methoden könnte man mit der FISH schon innerhalb eines Tages alle nötigen Informationen bezüglich des Vorliegens einer Infektion und ihrer Therapie erhalten.

Die erste Zielsetzung dieser Arbeit bestand deshalb darin, einen entsprechenden hierarchischen SONDENSATZ zu entwickeln, der es ermöglicht *Campylobacter* schnell nachzuweisen und gegenüber den Spezies *Arcobacter* und *Helicobacter* abzugrenzen. Außerdem sollte mit Hilfe der Sonden eine Zuordnung der *Campylobacter* zur thermophilen, Enteritis verursachenden Gruppe möglich sein.

Das zweite Ziel war, nach erfolgter Identifizierung eines *Campylobacter*, eine genauere Zuordnung zu einer der vier thermophilen Spezies *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* und *C. upsaliensis* vornehmen zu können. Eine entsprechende Sonde für jede dieser Spezies wurde entworfen.

Da in den letzten Jahren zunehmend über eine Resistenz der *Campylobacter* gegenüber Erythromycin - dem Antibiotikum der Wahl für *Campylobacter*-Infektionen - berichtet wurde, betraf die dritte Zielsetzung den Nachweis der Punktmutation auf dem Ribosom, welche zu dieser Resistenz führt. Auch dafür wurden Sonden entworfen und in dieser Arbeit getestet.

Die Arbeit gliederte sich in mehrere Schritte: 1.) Zunächst wurden entsprechende Sonden entworfen und diese dann an Referenzstämmen getestet. 2.) Aus den getesteten Sonden wurde eine Auswahl getroffen, je nachdem, ob die Sonde funktioniert hat, oder nicht. 3.) Von dieser Auswahl wurden dann Sensitivität und Spezifität anhand von 90 klinischen Isolaten ermittelt.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien

Bezugsquelle

DAPI	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
EDTA	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Eindeckmedium Citifluor	Citifluor Ltd., London, Großbritannien
Eindeckmedium Vectashield mit DAPI	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Ethanol	Riedel-de Haën AG, Seelze
Formamide	Sigma –Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
HCl 1 mol/l	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
NaCl 0,9%	Delta-Pharma GmbH, Pfullingen
NaOH 1 mol/l	Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, USA
Paraformaldehyd	Sigma –Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
PBS- Tabletten	Gibico, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Phenylendiamin	Sigma –Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
SDS (Laurylsulfat)	Sigma –Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tris	USB™, Cleveland, Ohio, USA

2.2 Geräte

Geräte

Bezugsquelle

Anaerobier- Brutschrank	Scholzen Technik, Kriens, Schweiz
Brutschrank 46 °C, Heraeus function line	Kendro, Hanau
Brutschrank 36 °C, 5% CO ₂	Kendro, Hanau
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Fön silencio 1100	Braun GmbH, Kronberg/Taunus
Gefrierschrank (-18 °C) Bosch economic	Robert Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe
Gefrierschrank (-74 °C) Hera freeze	Kendro, Hanau
Genetic Analyzer ABI Prism 310	Applied Biosystems, Foster City, USA
Kamera Axiophot 2	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Kühl- Gefrierkombination	Liebherr, Ochsenhausen
Lamin Air Flow	Kendro, Hanau
Magnetrührer, Ikamag Rec-G	Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen i. Br.
pH- Meter digital WTW pH 525	Wissenschaftlich- Technische Werkstätten GmbH, Weilheim i. Obb.
Pipetboy	Tecnomara Deutschland GmbH, Fernwald
Pipetboy plus	Integra Biosciences AG, Chur, Schweiz
Pipetten:	
- Eppendorf, fest (50 µl, 100 µl)	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
- Eppendorf, variabel (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
- Gilson Pipetman (P 2, P 10, P 20, P100, P 200, P 1000)	Abimed GmbH, Langenfeld

Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Waage	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	GFL (Gesellschaft für Labortechnik mbH), Burgwedel
Zentrifuge Heraeus biofuge fresco	Kendro, Hanau

2.3 Materialien

Materialien

Anaer indicator	bioMérieux® Sa, Marcy l'Etoile, Frankreich
Anaerocult® C	Merck KGaA, Darmstadt
Anaerocult- Topf	Merck KGaA, Darmstadt
Anaerotest	Merck KGaA, Darmstadt
BBL™ GasPak™ Plus	Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA
Cryobank	Mast diagnostika, Laboratoriums-Präparate GmbH, Reinfeld
Einmal- Küvetten 1,5 ml halbmikro PS	BRAND GmbH, Wertheim
Deckgläser „Menzel-Gläser“ 24 x 50 mm	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig
Glasküvetten	VWR International, Ulm
Glasschrott (3 mm Durchmesser)	VWR International, Ulm
H.C. Gene Frame 10 x 10 mm (für 25 µl)	Thermo Life Sciences, Egelsbach
H. C. Gene Frame Deckgläser	Thermo Life Sciences, Egelsbach
Hybridisierungsgefäße seaFAST	seapro Theranostics International, Niederlande

Bezugsquelle

Objektträger:

- gereinigt, Kanten geschnitten, beidseitiger Mattrand, ca. 76 x 26 x 1 mm Paul Marienfeld GmbH & Co KG, Lauda-Königshofen
- gereinigt, geschnitten, Mattrand, ca. 76 x 26 mm Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig
- Cytoslide (schwarz beschichtet, Öffnung \varnothing 13 mm) Thermo Shandon, Pittsburgh, USA
- Schwarz beschichtet, Öffnung \varnothing 15 mm AdvantX, Boston, USA
- Diagnostika 12 Felder, blau, benetzbar Dade Behring, Vertriebs GmbH & Co OHG, Schwalbach

Pipettenspitzen für PIPETBOY

und Pipetboy plus:

- costar® Stripette 5 ml Corning Incorporated, NY
- costar® Stripette 10 ml Corning Incorporated, NY
- costar® Stripette 25 ml Corning Incorporated, NY

Pipettenspitzen mit Filter:

- Biosphere Filter Tips (100 μ l, 1000 μ l) type Eppendorf/ Gilson SARSTEDT, Nümbrecht

Pipettenspitzen ohne Filter:

- Filterspitzen UNITIPS (10 μ l, 200 μ l, 1000 μ l) Abimed GmbH, Langenfeld
- Filterspitzen 1000 μ l Greiner Labortechnik GmbH, Kremsmünster, Österreich

PSIpettes

bioMérieux® Sa, Marcy l'Etoile, Frankreich

Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)

Eppendorf AG, Hamburg

Sterile Impfnadeln	Nalge Nunc International
Sterile Impfschlingen (10 µl)	Greiner Labortechnik GmbH, Kremsmünster, Österreich
Sterile Wattestäbchen	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen:	Falcon®, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
- Bluecap (15 ml, 50 ml)	

2.4 Lösungen und Puffer

2.4.1 Stocklösungen

EDTA 0,5M	Ethylendiamintetraacid, Molekulares Gewicht: 292,3 g/mol in 1000 ml auflösen → 1M
NaCl 5M	Natriumchlorid, Molekulares Gewicht : 58,44 g/mol
PBS (1x)	1 Tablette in 500 ml Aqua bidest auflösen
PFA (4%)	Paraformaldehyd, Molekulares Gewicht: 30,03 g/mol; 8 g in 100 ml Aqua bidest auflösen
SDS 10%	Dodecylsulfat- Na- Salz, Molekulares Gewicht: 288,4 g/mol 10 g mit 90 g Aqua bidest auffüllen
Tris HCl 1M	Molekulares Gewicht (Tris): 121,14 g/mol, pH- Einstellung auf pH= 8 mit 1M NaCl
Eindeckmedium	für 50 ml: 50 mg p- Phenylendiamin in 50 mg p- Phenylendiamin in 5 ml phosphat- gepuffertes NaCl- Lösung lösen, zu 45 ml Glycerin

geben, pH von 8,0 mit Karbonat- Bicarbonatpuffer einstellen

2.4.2 Sondenlösungen

Fluorescein- markierte Sonden X µg /500 → Y ml Aqua dest.

Cy 3- markierte Sonden X µg / 300 → Y ml Aqua dest.

mit Hybridisierungspuffer auf 10% verdünnen

2.4.3 Puffer

Die Hybridisierungspuffer wurden nach dem Schema in Tabelle 2 in 2 ml Reaktionsgefäße pipettiert und konnten bei -18°C für einige Wochen aufbewahrt werden.

Tabelle 2: Herstellung von Hybridisierungspuffer

M = molar, NaCl = Natriumchlorid,

Tris HCl = 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol hydrochloride

SDS = sodium dodecyl sulfate

Hybridisierungspuffer für 100 ml

Formamid-Konzentration in %	5M NaCl (ml)	1M Tris HCl (ml)	Formamid (ml)	Aqua bidest (ml)	10% SDS (ml)
10	18	2	10	70	0, 1
20	18	2	20	60	0, 1
30	18	2	30	50	0, 1
40	18	2	40	40	0, 1
50	18	2	50	30	0, 1

Die Waschpuffer wurden in größeren Mengen, meist 500 ml oder 1000 ml, hergestellt, weil damit Blue Caps oder Küvetten gefüllt werden mussten. Bei + 4°C waren sie für einige Wochen haltbar. Das Pipettierschema zeigt Tabelle 3.

Tabelle 3: Herstellung von Waschpuffer

M = molar, NaCl = Natriumchlorid, EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure

Tris HCl = 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol hydrochloride

SDS = sodium dodecyl sulfate

Waschpuffer für 100 ml

Formamid in Hybridisierungspuffer in %	5M NaCl (µl)	0,5M EDTA (µl)	1M Tris HCl (µl)	10% SDS (µl)
10	9000	0	2000	100
20	4300	1000	2000	100
30	2040	1000	2000	100
40	920	1000	2000	100
50	360	1000	2000	100

2.5 Nährmedien

Nährmedium

CASO- Blutagar, Tryptic Soy BAP

Schädler Blutagar

Butzler Selektive Medium

BBL Enriched Thioglycollate,
Medium with Vitamin K + Hemin

Bezugsquelle

heipha Dr. Müller GmbH, Eppelheim

heipha Dr. Müller GmbH, Eppelheim

Oxoid GmbH, Wesel

Becton, Dickinson and Company,
Sparks, USA

2.6 Bakterienstämme

Referenzstämme

C. jejuni subsp. jejuni DSM 4688

DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Braunschweig

C. coli DSM 4689

DSMZ, Braunschweig

C. upsaliensis DSM 5365

DSMZ, Braunschweig

C. lari DSM 11375

DSMZ, Braunschweig

C. fetus subsp. fetus DSM 5361

DSMZ, Braunschweig

C. sputorum DSM 10535

DSMZ, Braunschweig

C. consisus DSM 9716

DSMZ, Braunschweig

A. butzleri DSM 8739

DSMZ, Braunschweig

A. cryaerophilus DSM 8739

DSMZ, Braunschweig

A. nitrofigilis DSM 7299

DSMZ, Braunschweig

H. pylori DSM 4867

DSMZ, Braunschweig

H. pylori DSM 7492

DSMZ, Braunschweig

Klinische Isolate

1 *C. lari*

Bundesinstitut für Risikobewertung
Berlin

7 *C. jejuni*

Bundesinstitut für Risikobewertung
Berlin

26 *C. coli*

Bundesinstitut für Risikobewertung
Berlin

1 *C. jejuni*

Animal Sciences Group, Lelystad,
Niederlande

10 <i>C. upsaliensis</i>	Animal Sciences Group, Lelystad, Niederlande
10 <i>C. lari</i>	Animal Sciences Group, Lelystad, Niederlande
1 <i>C. jejuni</i>	Laboratoire de Bactériologie, Université Victor Segalen Bordeaux 2, France
1 <i>C. coli</i>	Laboratoire de Bactériologie, Université Victor Segalen Bordeaux 2, France
3 <i>C. coli</i>	Medizinische Mikrobiologie, Universität Freiburg
5 <i>C. upsaliensis</i>	Medizinische Mikrobiologie, Universität Freiburg
1 <i>C. coli</i>	Medizinische Mikrobiologie Universität Ulm
13 <i>C. jejuni</i>	Medizinische Mikrobiologie Universität Ulm
11 <i>Helicobacter pylori</i>	Medizinische Mikrobiologie Universität Ulm

2.7 Sonden

Die im Folgenden aufgeführte Sequenz der Sonden ist immer vom 5'- zum 3'-Ende notiert, wobei die einzelnen Buchstaben jeweils für den Anfangsbuchstaben der Base stehen. A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin.

Es handelt sich bei allen Sonden um DNA- Sonden.

Tabelle 4: Übergreifende Sonden

FITC = Fluorescein-5-isothiocyanat, Cy3 = Carbocyanin 3

A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin

Zielorganismus	Name der Sonde	Markierung	Sequenz	Ribosomale Unter-einheit
alle Bakterien	EUB	FITC, Cy3	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	16 S
alle Campylobacter	Camp. spez. 414	FITC, Cy3	TTT ACG CTC CGA AAA GTG	16 S
alle Campylobacter + Arcobacter	Camp. spez. 1620	FITC, Cy3	GAA TAC TCA TCC CAC CCA	23 S
alle Campylobacter + Helicobacter	Hel. camp. 1760	FITC, Cy3	AAC AGT CGG GAG GGA CTC	23 S
alle Campylobacter + Helicobacter	Hel. camp. 324	FITC, Cy3	CCT CGC GGC GTT GCT GCT TC	16 S
alle thermophilen Campylobacter	Camp. path. 1419	FITC, Cy3	GCC CTA AGC GTC CTT CCA	23 S

Tabelle 5: Spezies-spezifische Sonden

C. jejuni = *Campylobacter jejuni*, *C. coli* = *Campylobacter coli*, *C. upsaliensis* = *Campylobacter upsaliensis*, *C. lari* = *Campylobacter lari*,

FiTC = Fluorescein-5-isothiocyanat, Cy3 = Carbocyanin 3

A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin

Zielorganismus	Name der Sonde	Markierung	Sequenz	Ribosomale Unter-einheit
<i>C. jejuni</i>	C. jejuni 1693	Cy3	AGC TAA CCA CAC CTT ATA CCG	23 S
<i>C. jejuni</i>	C. jejuni 1695	Cy3	AGC TAA CCA CAC CTT ATA C	23 S
<i>C. jejuni</i>	C. jejuni doyl 1710 eyers	Cy3	GTC AAT CCT AGT ACG AAG CT	23 S
<i>C. jejuni</i>	C. jejuni jej. 1710 eyers	Cy3	GTA AAT CCT AAT ACA AAG CT	23 S
Helfer- Sonde I für <i>C. jejuni</i>	C. alle Helfer I	FITC	AAG ATA CGG TGC TAT TTT GCA GAG	23 S
Helfer- Sonde II für <i>C. jejuni</i>	C. jej Helfer II	FITC	GCT TTC A/GGA GTA AAT CCT AAT ACA A	23 S
<i>C. coli</i>	C. coli 1544	Cy3	TCG ATG GCA TCA GGG GTT	23 S
Kompetitor	C. coli 1544 comp.	KEINE	TCG ACG GCA TCA GGG GTT	23 S
<i>C. upsaliensis</i>	C. ups. 1211	Cy3	CGT GTG TCG CCC TAG GCG TA	16 S
<i>C. upsaliensis</i>	C. ups. 1695	Cy3	AGG GAG GCA CAC CTT ATA C	23 S
<i>C. upsaliensis</i>	C. ups. 995	Cy3	CTC TAC AGA ATT TGT TGG AT	16 S
<i>C. upsaliensis</i>	C. ups eyers mod 1144	Cy3	CTA AAG CTT CGG TAC TTA C	23 S
<i>C. lari</i>	C. lari 622	Cy3	TCC CAA GCA GTT CAA CGG T	16 S
<i>C. lari</i>	C. lari 1126	Cy3	GTG CTC ACC CGA AGT GTT AGC	16S
<i>C. lari</i>	C. lari 1118	Cy3	GAA GTG TTA GCA ACT AAA T	16S
<i>C. lari</i>	C. lari 1137	Cy3	CTA TTT AGA GTG CTC ACC CG	16 S

Tabelle 6: Resistenz-Sonden

FITC = Fluorescein-5-isothiocyanat, Cy3 = Carbocyanin 3

A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin

Zielorganismus	Name der Sonde	Markierung	Sequenz	Ribosomale Unter-einheit
Wildtyp	Wild 2045	FITC, Cy3	CGG GGT CTT TCC GTC TT	23 S
Resistenz (Mutation 2059 A > G)	Resistenz 2059	FITC, Cy3	CGG GGT CTC TCC GTC TT	23 S
Resistenz (Mutation 2058 A > G)	Cla 1	Cy3	CGG GGT CTT CCC GTC TT	23 S
Resistenz (Mutation 2058 A > C)	Cla 3	Cy3	CGG GGT CTT GCC GTC TT	23 S
Resistenz (Mutation 2058 A > T)	Cla 4	Cy3	CGG GGT CTT ACC GTC TT	23 S
Resistenz (Mutation 2058 A > G und Mutation 2059 A > G)	Cla 5	Cy3	CGG GGT CTC CCC GTC TT	23 S

Methoden

2.8 Bakterienkultur

Sowohl die Campylobacter-Referenzstämme als auch die klinischen Isolate wurden nach dem Auftauen entweder auf Blutagar oder Schädleragar angezüchtet. Blutagar konnte direkt verwendet werden, Schädleragar wurde zuvor für mindestens sechs Stunden in einem Anaerobiertopf mit einem BBL Gas Pack vorbereitet.

Bei Stämmen, die direkt aus einem Patientenstuhl isoliert wurden, erfolgte die Anzüchtung zunächst auf Butzleragar, ein spezieller Agar, dem diverse Antibiotika zugesetzt sind, um die natürliche Darmflora im Wachstum zu hemmen.

Die thermophilen Stämme wurden bei 42°C oder 37°C, die nicht-thermophilen bei 37°C in Anaerobiertöpfen mit Gas Packs bebrütet.

Die Langzeitlagerung der einzelnen Stämme erfolgte bei -74°C auf Cryobanks. Dazu wird das gesamte Material einer Agarplatte mit einer sterilen Impföse in eine Cryobank gegeben und mit der darin enthaltenen Flüssigkeit und den Kügelchen gut vermischt. Danach wird die glycerinhaltige Flüssigkeit abpipettiert. Die Zellen heften sich während des Mischens an der Oberfläche der Kügelchen an. Danach können die Röhrchen direkt bei -74°C tiefgefroren werden.

2.9 Paraformaldehydherstellung

Zur Herstellung von 4%igem Paraformaldehyd (PFA) wurden zunächst zwei PBS-Tabletten in 500 ml Aqua bidest gelöst.

Dann wurden 8 g Paraformaldehyd in 100 ml Aqua bidest gelöst und im Wasserbad auf 60°C erwärmt. Anschließend wurde solange NaOH hinzugefügt bis sich das PFA vollständig gelöst hatte und man eine klare Flüssigkeit erhielt. Diese Lösung musste dann auf Raumtemperatur abkühlen. Danach wurden 100 ml des anfangs hergestellten 2x PBS hinzugefügt und der pH-Wert mit HCl und NaOH mittels pH-Meter auf einen Wert zwischen 7,2 und 7,4 eingestellt.

Die Aufbewahrung des 4%igen PFA erfolgte für kurze Zeit im Kühlschrank bei +4°C. Zur längerfristigen Lagerung wurde es bei -18°C eingefroren.

Um das zum Fixieren benötigte 2%ige PFA zu erhalten wurde das 4%ige PFA mit 1x PBS im Verhältnis 1:1 verdünnt.

2.10 Herstellung der Präparate

Zunächst wurde eine Bakteriensuspension mit 0,9%igem NaCl hergestellt. Von dieser wurden je 15 µl auf einen Objektträger aufgebracht. Anschließend wurden die Präparate luftgetrocknet, und dann entsprechend fixiert:

- a) Hitzefixierung: Der Objektträger wurde dreimal durch die Flamme eines Bunsenbrenners gezogen.
- b) Methanolfixierung: Die Objektträger wurden alle für 10 min in eine Küvette mit 100% Methanol gehängt.
- c) Ethanolfixierung: Bei dieser Art der Fixierung wurden alle Präparate für 10 min in 80%iges Ethanol gegeben.
- d) PFA-Fixierung: Alle Präparate wurden für eine Stunde in 2%iges PFA gegeben.

Bei dieser Arbeit wurde die PFA-Fixierung als Standardmethode festgelegt.

Eine gute Fixierung zeigt sich durch eine gute Penetration der Sonde ins Zellinnere, eine möglichst hohe Anzahl an 16S- rRNA und durch den Erhalt der Zellstruktur. Um eine hohe Zahl an 16S- rRNA zu erhalten, muss die rRNA vor dem Abbau durch die zelleigene RNase geschützt werden.

Nach der Fixierung wurden nicht sofort benötigte Präparate bei -18°C über mehrere Wochen gelagert.

2.11 Design der Sonden

Mit Hilfe einer kostenlosen Software der Universität München (erhältlich unter www.arb-home.de) und mit Hilfe der Genbank konnten die entsprechenden Sonden entworfen werden.

2.12 FISH

Vorbereitung der FISH

Alle Präparate wurden zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 80%, 100%) für jeweils 3 Minuten entwässert und anschließend luftgetrocknet.

Währenddessen wurde der benötigte Hybridisierungspuffer entsprechend Tabelle 2 hergestellt. Dabei galt es zu beachten, dass SDS als letzte Substanz hinzugefügt wird, um eine übermäßige Schaumbildung oder eine Ausflockung zu vermeiden.

Die Reihenfolge der anderen Substanzen spielte keine Rolle.

Alle Sonden und der Hybridisierungspuffer wurden während der Vorbereitung auf Eis und mit möglichst wenig Lichtkontakt gelagert, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu vermeiden.

Die Hybridisierungspuffer-Sonden-Gemische wurden in 0,5 ml Reaktionsgefäßen im Verhältnis 1:10 hergestellt.

Durchführung der FISH:

Die eigentliche Fluoreszenz-in-situ-hybridisierung erfolgte in zwei Schritten:

1. Hybridisierungsreaktion:

Um das Hybridisierungspuffer-Sonden-Gemisch auftragen zu können, benötigt man eine kleine Vertiefung auf dem Objektträger. Diese erhält man durch verschiedene Hybridisierungssysteme:

- a) **Gene-Frames.** Diese Rahmen sind in verschiedenen Durchmessern erhältlich. Sie sind auf beiden Seiten selbstklebend, so dass man sie direkt auf den Objektträger aufkleben kann. Nachdem die Sonde in den Rahmen pipettiert wurde, klebt man eine passende Folie auf.
- b) **Cytoslide-Objektträger.** Dabei handelt es sich um schwarz beschichtete Objektträger, welche entweder direkt als solche verwendet wurden, oder man legte sie als Deckgläser auf die Objektträger mit dem Hybridisierungspuffer- Sonden- Gemisch. Wenn sie als Deckgläser eingesetzt wurden, sind sie nach gründlicher Reinigung mehrfach verwendbar.

Bei der vorliegenden Arbeit wurde die Hybridisierung hauptsächlich mit dieser Methode durchgeführt.

Das Hybridisierungspuffer-Sonden-Gemisch wurde dann in die entsprechende Vertiefung gegeben und die Objektträger in Präparatemappen bei 46°C für 90 bis 120 min in den Brutschrank gelegt.

Während der Inkubationszeit wurde der Waschpuffer in Glasküvetten gegeben und zum Vorwärmen ins Wasserbad bei 48°C gestellt.

2. Waschen: Nach der Hybridisierungsreaktion mussten die übrigen Sonden wieder abgewaschen werden. Dazu wurden die Objektträger in Küvetten mit dem entsprechenden Waschpuffer gegeben. Der Waschpuffer wurde zuvor gemäß Tabelle 3 hergestellt, wobei auch hierbei SDS als letztes Reagenz hinzugefügt

wurde. Die Küvetten wurden dann für 20 min in das 48°C warme Wasserbad gestellt.

Anschließend wurde der Waschpuffer mit Aqua bidest abgespült und die Präparate schnellstmöglich getrocknet. Dazu wurde ein Fön verwendet, da sich die Sonden auf nassen Objektträger sonst verflüchtigen könnten.

Danach wurden die Präparate mit einem Eindeckmedium und Deckgläsern versehen. Das Abdeckmedium enthält Glycerin, um ein Ausbleichen der Sonden zu verhindern. Bei Bedarf kann ein Eindeckmedium mit DAPI-Farbstoff zur Visualisierung aller DNA-haltigen Zellen verwendet werden.

Dokumentation:

Für die Dokumentation wurde ein Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss, welches zusätzlich mit einer Kamera versehen war, verwendet.

2.13 Formamidreihe

Die Stärke der komplementären (Hydrogen-) Bindung kann sowohl durch eine Änderung der Formamid-Konzentration als auch durch eine Änderung der Hybridisierungstemperatur variiert werden. Bei einer Erhöhung der Formamid-Konzentration nimmt die Stärke der Bindung an die rRNA ab. Das soll verhindern, dass Sonden an Nicht-Zielorganismen binden, sogenannte Kreuzreaktionen.

Allerdings wird mit steigender Formamidkonzentration auch die Anlagerung der Sonde an den Zielorganismus erschwert.

Das heißt, es muss für jede Sonde diejenige Formamidkonzentration festgelegt werden, bei welcher sie am Zielorganismus noch gut bindet, aber gleichzeitig keine Kreuzbindung mit genetisch ähnlichen Bakterien aufweist.

Für gewöhnlich zeigt das Bindungsverhalten einer Sonde einen monophasischen Verlauf. Am Anfang liegt sie auf einem Plateau, und fällt dann, meist bei 30%iger oder 40%iger Formamidkonzentration, steil ab (s. Abb. 4).

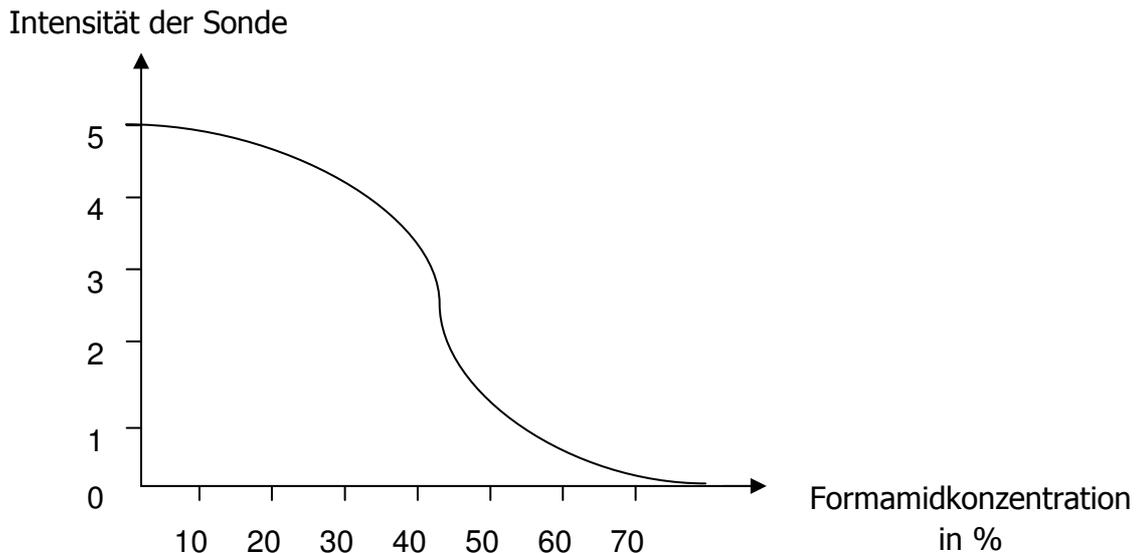


Abb. 4: Intensität einer Sonde bei verschiedenen Formamidkonzentrationen

In seltenen Fällen gibt es auch Sonden, die einen biphasischen Verlauf aufweisen. Dabei fällt die Sonde wie üblich in ihrer Bindungsstärke ab, steigt dann aber bei höheren Formamidkonzentrationen nochmals an.

Für jede Sonde wurde mittels einer Formamidverdünnungsreihe mit Formamidkonzentrationen im Hybridisierungspuffer von 10%, 20%, 30%, 40%, 50% und 60% diejenige Konzentration ermittelt, bei der die Sonde ein optimales Bindungsverhalten aufzeigte.

2.14 Bewertungsmaßstab

Zur Auswertung der FISH wurden die Zahlenwerte 0-5 festgelegt, und zwar in Bezug auf die Intensität mit welcher die Sonde geleuchtet hat.

Den einzelnen Zahlenwerten wurden folgende Aussagen zugeordnet:

0 = auf dem Objektträger ist nichts zu sehen (s. Abb. 5)

1 = es sind gerade noch Bakterien auf dem Objektträger zu erkennen (s. Abb. 6)

2 = die Bakterien heben sich klar vom Hintergrund ab, leuchten aber nicht (s.

Abb. 7)

3 = die Sonde hat an den Zielorganismus gebunden und leuchtet (s. Abb. 8)

4 = die Sonde leuchtet stark (s. Abb. 9)

5 = die Sonde leuchtet maximal hell (s. Abb. 10)

Werte von 0-2 gelten als negativ, das heißt, die Sonde hat nicht gebunden. Werte von 3-5 dagegen bedeuten ein positives Ergebnis.

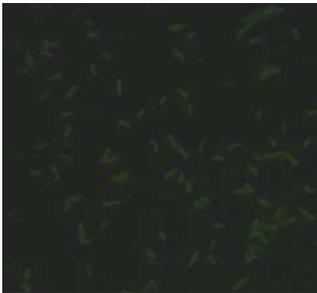


Abb. 5: Zahlenwert 0

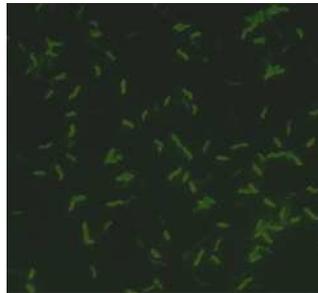


Abb. 6: Zahlenwert 1

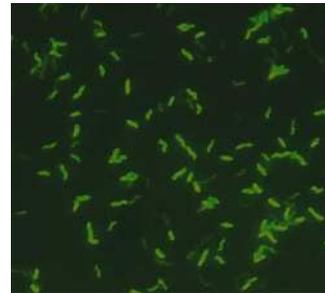


Abb. 7: Zahlenwert 2

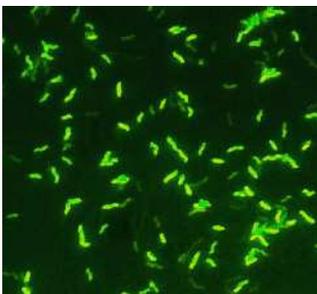


Abb. 8: Zahlenwert 3

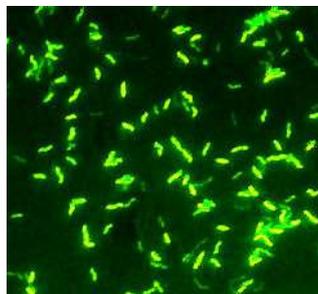


Abb. 9: Zahlenwert 4

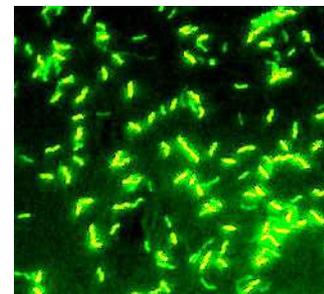


Abb. 10: Zahlenwert 5

2.15 Resistenzbestimmung

Um eine Aussage über die Resistenzlage der klinischen Isolate treffen zu können, wurde bei 15 Isolaten der MHK (= minimale Hemmkonzentration) mittels E-Test ermittelt. Eine MHK ist die minimale Konzentration eines Antibiotikums, welche in vitro verabreicht werden muss, um ein Wachstum der Bakterienkultur zu verhindern. Diese MHK korreliert gut mit erreichten Wirkstoffkonzentrationen im Blut oder anderen Körperkompartimenten, so dass hiermit eine verlässliche Aussage über die klinische Wirksamkeit getroffen werden kann.

Eine Methode, um die MHK zu bestimmen, ist der sogenannte E-Test. Das Prinzip ist die Prüfung von Sensibilität bzw. Resistenz von Bakterien gegenüber relevanten Antibiotika mit entsprechenden Teststreifen im Agardiffusionstest. Es werden minimale inhibitorische Konzentrationen der Antibiotika angegeben, die das Bakterienwachstum verhindern. Der E-Test-Streifen ist etwa 5 mm breit und 6 cm

lang und enthält je nach Antibiotikum Konzentrationen von 0,002-32 µg/ml, 0,016-256 µg/ml oder 0,064-1024 µg/ml.

Durchführung eines E-Test mit *Campylobacter spp.*:

1. Mit einer sterilen Öse wird von einer 18-24 stündigen Reinkultur eine Bakterienkolonie abgenommen und in 5 ml steriler NaCl-Lösung (0,9 %) homogenisieren. Trübung visuell auf 0,5 Mc Farland einstellen.
2. Sterilen Wattetupfer in Inokulum-Suspension tauchen und die beschriftete MH-Agarplatte mit Blut in drei Richtungen gleichmäßig ausstreichen.
3. Einwirken der Flüssigkeit bei Raumtemperatur für 10-15 Minuten.
4. Je 1 bis 2 E-Testplättchen mit einer sterilen Pinzette auf die Mitte einer ausgestrichenen Agaroberfläche auflegen.
5. Bebrütung der Agarplatte mikroaerophil im Campylobacter-Fach des Anaerobierbrutschranks bei 42 °C für 24 (-48) Stunden. Die Tests werden mit den Grenzwerten nach CLSI ausgewertet (s. Tabelle 7).

Tabelle 7: Grenzwerte für Erythromycin und Levofloxacin

MHK = Minimale Hemmkonzentration

Antibiotika	Sensibel (MHK in µg/ml)	Resistent (MHK in µg/ml)
Erythromycin	≤ 8	≥ 32
Levofloxacin	≤ 1	≥ 4

Beim Nachweis einer Resistenz gegenüber Erythromycin und Levofloxacin werden Clindamycin und Doxycyclin nachgetestet (s. Tabelle 8).

Tabelle 8: Grenzwerte für Clindamycin und Doxycyclin

MHK = Minimale Hemmkonzentration

Antibiotika	Sensibel (MHK in µg/ml)	Resistent (MHK in µg/ml)
Clindamycin	≤ 8	≥ 32
Doxycyclin	≤ 2	≥ 8

Die Befundinterpretation erfolgt je nach Erreger nach 24 bis 72 Stunden. Der ovale Hemmhof wird anhand der Kolonien beurteilt, die bis zum Teststreifen hinwachsen. Der Wert darüber wird abgelesen (Punkt der kompletten Wachstumshemmung).

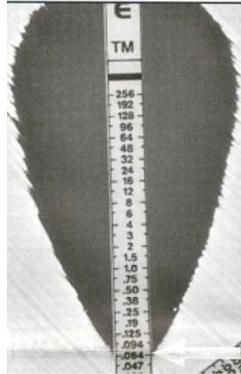


Abb. 11: E-Test (Epsilometertest).

3. Ergebnisse

3.1 Fixierungsmethoden

Da *Campylobacter* sehr empfindliche Bakterien sind, war es zunächst wichtig, die optimale Fixierungsmethode zu finden. Dazu wurden ein *C. jejuni*-Stamm und ein *C. coli*-Stamm jeweils mit Hitze, Ethanol, Methanol oder Paraformaldehyd fixiert.

Die FISH-Versuche wurden exemplarisch mit den Sonden EUB 338 (FITC-markiert) und Camp. Spez. 1620 (Cy3-markiert) durchgeführt. Um zu überprüfen, ob sich Bakterien auf dem Objektträger befinden, wurde zusätzlich ein Eindeckmedium mit DAPI verwendet, ein DNA-Farbstoff, welcher alle Zellen blau anfärbt.

Nach dem zuvor festgelegten Bewertungsmaßstab (s. Methoden 3.7) wurden die Präparate mit den Zahlenwerten 0-5 bewertet, wobei ein Wert ≥ 3 als positiv galt. Die besten Ergebnisse wurden bei 2%iger Paraformaldehydfixierung mit beiden Stämmen und Sonden erzielt (s. Tabelle 9).

Tabelle 9: Ergebnisse der einzelnen Fixierungsmethoden

C. coli = *Campylobacter coli*, *C. jejuni* = *Campylobacter jejuni*,

FITC = Fluorescein-5-isothiocyanat, Cy3 = Carbocyanin 3, DAPI =

Diamidinophenylindoldihydrochlorid, PFA = Paraformaldehyd

Präparat	Helligkeit der Sonde bzw. des Farbstoffes		
	EUB (FITC)	Camp. Spez. 1620 (Cy3)	Eindeckmedium (DAPI)
<i>C. coli</i> Hitze-fixierung	2	2	2
<i>C. jejuni</i> Hitze-fixierung	2	3	3
<i>C. coli</i> Ethanol-fixierung (80%)	2	2	2
<i>C. jejuni</i> Ethanol-fixierung (80%)	2	4	3
<i>C. coli</i> Methanol-fixierung (100%)	2	2	2
<i>C. jejuni</i> Methanol-fixierung (100%)	3	4	3
<i>C. coli</i> PFA 4%	4	4	3
<i>C. jejuni</i> PFA 4%	3	3	3
<i>C. coli</i> PFA 2%	4	4	3
<i>C. jejuni</i> PFA 2%	4	4	3

Nachdem 2%iges Paraformaldehyd als Standardfixierlösung festgelegt wurde, musste anschließend die Fixierzeit optimiert werden. Dazu wurden Präparate mit demselben *C. jejuni*- und *C. coli*-Stamm unterschiedlich lange in Paraformaldehyd fixiert und anschließend eine FISH mit den gleichen Sonden wie beim vorherigen Versuch (EUB 338 und Camp. spez. 1620) durchgeführt.

Die besten Ergebnisse wurden bei einer Fixierzeit von einer Stunde erzielt (s. Tabelle 10).

Tabelle 10: Ergebnisse der unterschiedlichen Fixierzeiten

C. coli = *Campylobacter coli*, *C. jejuni* = *Campylobacter jejuni*,

FITC = Fluorescein-5-isothiocyanat, Cy3 = Carbocyanin 3, DAPI =

Diamidinophenylindoldihydrochlorid, PFA = Paraformaldehyd

Präparat	Helligkeit der Sonde bzw. des Farbstoffes		
	EUB (FITC)	Camp. Spez 1620 (Cy3)	Eindeckmedium (DAPI)
<i>C. coli</i> PFA 2% 10 min	3	4	2
<i>C. jejuni</i> PFA 2% 10 min	2	2	0
<i>C. coli</i> PFA 2% 20 min	3	5	2
<i>C. jejuni</i> PFA 2% 20 min	2	2	1
<i>C. coli</i> PFA 2% 30 min	4	4	3
<i>C. jejuni</i> PFA 2% 30 min	2	4	1

Fortsetzung auf Seite 38

Fortsetzung Tabelle 10

<i>C. coli</i> PFA 2% 1 h	4	4	3
<i>C. jejuni</i> PFA 2% 1 h	3	5	1
<i>C. coli</i> PFA 2% 5 h	4	4	3
<i>C. jejuni</i> PFA 2% 5 h	3	3	2
<i>C. coli</i> PFA 2% 24 h	5	4	3
<i>C. jejuni</i> PFA 2% 24 h	3	3	3

Damit wurden folgende Standardbedingung für alle Experimente definiert:

- Fixierungsmethode: PFA 2%,
- Fixierzeit: 1 Stunde.

3.2 Konzept und Auswahl der Sonden

Es wurden drei Ziele für diese Arbeit definiert:

1. Es sollte ein SONDENSATZ entwickelt werden, um thermophile *Campylobacter* nachzuweisen und von *Arcobacter* und *Helicobacter* zu unterscheiden. Dazu wurden vier Sonden ausgewählt, mit denen eine Abgrenzung der Spezies voneinander möglich ist.
2. Die Differenzierung der vier humanpathogenen Campylobacterspezies *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* und *C. upsaliensis* mittels spezies-spezifischer Sonden.
3. Die Entwicklung eines SONDENSATZES zum Nachweis einer Erythromycin-Resistenz.

Um alle diese Anforderungen zu erfüllen, wurde mit Hilfe der ARB-Software ein SONDENSATZ entworfen, welcher insgesamt 5 übergreifende Sonden, 16 Spezies-Sonden und 6 Resistenz-Sonden enthielt. Es wurde zunächst eine relativ große Anzahl an Sonden untersucht, um dann die besten Sonden auszuwählen und diese in weiteren Versuchsreihen zu evaluieren. Sonden, welche bereits in den ersten Vorversuchen nicht funktionierten, wurden auch nicht weiter untersucht.

Diese Vorversuche bestanden darin, dass zunächst jede Sonde bei 10%iger oder 30%iger Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer an einem der Referenzstämme exemplarisch getestet wurde. Fiel das Ergebnis negativ aus, so wurde diese Sonde an zwei weiteren Referenzstämmen getestet. Erhielten wir erneut nur negative Ergebnisse, wurden mit dieser Sonde keine weiteren Versuche mehr durchgeführt.

Von den übergreifenden Sonden hat lediglich die Camp. spez. 414-Sonde nicht funktioniert. Bei den spezies-spezifischen Sonden gab es drei Sonden, welche sich an *C. jejuni*-Stämme anlagern sollten, die jedoch nicht gebunden haben: *C. jejuni* 1695, *C. jejuni* doyl 1710 eyers, *C. jejuni* jej. 1710 eyers. Außerdem wurden zwei sogenannte Helfer-Sonden entworfen, die eine Anlagerung der *C. jejuni* 1695-Sonde unterstützen sollten. Diese Sonden sind kürzere Sonden, als die spezifischen Sonden. Das Prinzip solcher Helfer-Sonden besteht darin, dass sie sich an der RNA-Sequenz unmittelbar vor bzw. nach der eigentlichen Sonde anlagern, und damit RNA-RNA-Bindungen oder RNA-Protein-Bindungen so auflockern, dass die spezifische Sonde sich besser anlagern kann. Damit sollen Verknotungen, wie sie manchmal durch solche Bindungen vorkommen, aufgelöst

werden, damit das Anlagern der Spezies-Sonde doch noch möglich ist. Aber auch die Helfer-Sonden C. alle Helfer I und C. jej Helfer II haben nicht am Zielorganismus gebunden. Desweiteren gab es noch negative Ergebnisse für jeweils zwei Sonden für die Spezies *C. upsaliensis* und *C. lari*: C. ups 995, C. ups eyers mod 1144, C. lari 1118 und C. lari 1137.

Alle anderen Sonden funktionierten in diesen Vorversuchen und konnten so weiteren Tests unterzogen werden.

Zu dieser Auswahl gehörten folgende übergreifende Sonden:

- **Hel. Camp. 1760 und Hel. Camp. 324**, welche alle *Helicobacter*-, *Arcobacter*- und *Campylobacter*- Spezies erfassen sollten,
- **Camp. spez. 1620**, eine Sonde für *Campylobacter*- und *Arcobacter*- Spezies und
- **Camp. path. 1419**, welche an alle thermophilen *Campylobacter*- Spezies binden sollte.

Von den spezies- spezifischen Sonden wurden die folgenden weiter untersucht:

- **C. jejuni 1693** (für *C. jejuni*-Stämme),
- **C. coli 1544 (+ comp.)** (für *C. coli*-Stämme),
- **C. ups. 1211 und C. ups 1695** (für *C. upsaliensis*-Stämme),
- **C. lari 622 und C. lari 1126** (für *C. lari*-Stämme).

3.3 Formamidverdünnungsreihe

Für diese Sondenauswahl wurden im nächsten Schritt die optimalen Hybridisierungsbedingungen für jede einzelne Sonde bestimmt. Mit Hilfe einer Formamidverdünnungsreihe wurde die Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer ermittelt, bei welcher die Sonde am Zielorganismus optimal bindet (s. Methoden 3.6).

Tabelle 11 zeigt ein Beispiel einer solchen Verdünnungsreihe. Bei dieser Verdünnungsreihe wurde die Sonde Hel. Camp. 324 am Referenzstamm *C. upsaliensis* DSM 5365 getestet. Es lässt sich erkennen, dass die Sonde ihr Optimum bei 20% und 30% Formamid hat und ab 40% Formamid in ihrer

Leuchtkraft langsam abfällt. Nach dieser Verdünnungsreihe wurde eine 30%ige Formamidkonzentration für diese Sonde als Optimum festgelegt.

Tabelle 11: Beispiel für eine Formamidverdünnungsreihe

C. upsaliensis = *Campylobacter upsaliensis*

DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

Referenzstamm	Konzentration des Hybridisierungspuffers	Intensität der Sonde	
		EUB 338	Hel. Camp. 324
<i>C. upsaliensis</i> DSM 5365	10%	3	3
<i>C. upsaliensis</i> DSM 5365	20%	3	4
<i>C. upsaliensis</i> DSM 5365	30%	3	4
<i>C. upsaliensis</i> DSM 5365	40%	3	3
<i>C. upsaliensis</i> DSM 5365	50%	3	2
<i>C. upsaliensis</i> DSM 5365	60%	3	2

Eine solche Formamidverdünnungsreihe wurde für jede einzelne Sonde durchgeführt. Tabelle 12 zeigt dass für alle Sonden die optimale Formamidkonzentration 30% betrug, was eine Kombination der übergreifenden Sonden mit den speziesspezifischen Sonden vereinfachte.

Tabelle 12: Formamidkonzentration für die einzelnen Sonden

Sonde	Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer in %
Camp. Spez. 1620	30
Hel. Camp. 1760	30
Hel. Camp. 324	30
Camp. Path. 1419	30
C. jejuni 1693	30
C. coli 1544	30
C. coli 1544 comp.	30
C. ups. 1211	30
C. ups. 1695	30
C. lari 1126	30
C. lari 622	30

3.4 Nachweis und Differenzierung von *Campylobacter*- Spezies

Nachdem die optimale Formamidkonzentration für jede Sonde festgelegt worden war, wurde diese Auswahl an Sonden im ersten Schritt zur Ermittlung von Spezifität und Sensitivität an Referenzstämmen getestet. Im Anschluss daran wurde jeweils eine übergreifende Sonde mit einer speziesspezifischen Sonde kombiniert (multiple probe concept, s. Tabelle 13), und alle Sonden wurden an 90 klinischen Isolaten evaluiert.

Tabelle 13: Multiple probe concept der speziesspezifischen Sonden

C. jejuni = *Campylobacter jejuni*, *C. coli* = *Campylobacter coli*, *C. lari* = *Campylobacter lari*,
C. upsaliensis = *Campylobacter upsaliensis*,

Sonden						Identifizierung
C. jejuni 1693	C. coli 1544 + comp.	C. lari 1126	C. lari 622	C. ups 1211	C. ups 1695	
+	-	-	-	-	-	<i>C. jejuni</i>
-	+	-	-	-	-	<i>C. coli</i>
-	-	+	+	-	-	<i>C. lari</i>
-	-	+	-	-	-	<i>C. lari</i>
-	-	-	+	-	-	<i>C. lari</i>
-	-	-	-	+	+	<i>C. upsaliensis</i>
-	-	-	-	+	-	<i>C. upsaliensis</i>
-	-	-	-	-	+	<i>C. upsaliensis</i>

Der Einsatz der Sonden nach dem Ausschlussverfahren machte es möglich, *Helicobacter*-, *Arcobacter*- und thermophile *Campylobacter*-Spezies mittels FISH voneinander zu unterscheiden.

Bei der Differenzierung dieser Spezies ging man folgendermaßen vor: Wenn ausschließlich die Sonden Hel. Camp. 1760 und Hel. Camp 324 gebunden hatten, dann lag ein *Helicobacter* vor. Analog dazu kamen ein *Arcobacter* oder ein nicht-thermophiler *Campylobacter* in Frage, wenn bis auf die Sonde für die thermophilen *Campylobacter*, alle übergreifenden Sonden ein positives Ergebnis zeigten. Haben alle vier übergreifenden Sonden gebunden, dann handelte es sich um einen thermophilen *Campylobacter*. Tabelle Nr. 14 soll diesen Ansatz verdeutlichen.

Tabelle 14: Prinzip des Ausschlussverfahrens der übergreifenden Sonden

Sonden				Identifizierung
Hel. Camp. 1760	Hel. Camp. 324	Camp. spez. 1620	Camp. path. 1419	
+	+	-	-	<i>Helicobacter</i>
+	+	+	-	<i>Arcobacter</i> oder nicht-thermophiler <i>Campylobacter</i>
+	+	+	+	thermophiler <i>Campylobacter</i>

3.5 Evaluation der Sonden

3.5.1 Evaluation der übergreifenden Sonden an Referenzstämmen

Im ersten Schritt der Evaluation der übergreifenden Sonden sollten diese an Referenzstämmen getestet werden. Zusätzlich zu der getroffenen Auswahl an übergreifenden Sonden wurde eine eubakterielle Sonde (EUB 338) als Positivkontrolle eingesetzt.

Da bei allen übergreifenden Sonden die optimale Formamidkonzentration bei 30% lag, konnten sie alle bei gleicher Hybridisierungspufferkonzentration eingesetzt werden.

Die Sonden Hel. Camp. 1760 und Hel. Camp. 324 haben an allen acht Referenzstämmen gebunden.

Camp. spez. 1620 hat ebenfalls bei allen Referenzstämmen funktioniert.

Die Sonde für die thermophilen *Campylobacter*- Spezies hat an allen vier Zielorganismen gebunden und zeigte weder bei den nicht-thermophilen *Campylobacter* Spezies *C. sputorum* und *C. consisus* noch bei *Arcobacter butzleri* eine Kreuzbindung (s. Tabelle 15).

Tabelle 15: Ergebnisse der Evaluation der übergreifenden Sonden an Referenzstämmen

C. jejuni = *Campylobacter jejuni*, *C. coli* = *Campylobacter coli*, *C. upsaliensis* = *Campylobacter upsaliensis*, *C. lari* = *Campylobacter lari*, *C. fetus* = *Campylobacter fetus*, *C. sputorum* = *Campylobacter sputorum*, *C. consisus* = *Campylobacter consisus*, *A. butzleri* = *Arcobacter butzleri*, *A. cryaerophilus* = *Arcobacter cryaerophilus*, *A. nitrofigilis* = *Arcobacter nitrofigilis*, *H. pylori* = *Helicobacter pylori*, subsp. = Subspezies,

DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

Referenzstamm	Intensität der Sonde			
	Camp. Spez. 1620	Hel. Camp. 1760	Hel. Camp. 324	Camp. Path. 1419
<i>C. jejuni subsp. jejuni</i> DSM 4688	5	4	5	5
<i>C. coli</i> DSM 4689	4	4	3	5
<i>C. upsaliensis</i> DSM 5365	4	4	4	4
<i>C. lari</i> DSM 11375	3	4	3	3
<i>C. fetus subsp. fetus</i> DSM 5361	5	4	5	0
<i>C. sputorum</i> DSM 10535	4	5	5	0
<i>C. consisus</i> DSM 9716	4	4	4	0
<i>A. butzleri</i> DSM 8739	4	4	4	0
<i>A. cryaerophilus</i> DSM 8739	4	3	5	0
<i>A. nitrofigilis</i> DSM 7299	4	3	4	0
<i>H. pylori</i> DSM 4867	0	5	4	0
<i>H. pylori</i> DSM 7492	0	5	5	0

3.5.2 Evaluation der übergreifenden Sonden an klinischen Isolaten

Nachdem die Sonden an Referenzstämmen getestet worden waren, wurden im nächsten Schritt die Sensitivität und Spezifität der einzelnen Sonden ermittelt. Dies erfolgte anhand von klinischen Isolaten. Um möglichst viele Isolate untersuchen zu können, wurden freundlicherweise zusätzlich zu den 25 Stämmen aus Ulm, 34 Stämme aus Berlin, 21 Isolate aus den Niederlanden, 8 aus Freiburg und 2 aus Frankreich zur Verfügung gestellt.

Von diesen insgesamt 90 klinischen Isolaten konnten sowohl die Isolate aus Ulm, als auch alle fremden Stämme der Gattung *Campylobacter* beziehungsweise *Helicobacter* durch die übergreifenden Sonden zugeordnet werden. Außerdem konnten alle thermophilen *Campylobacter* durch die FISH der Gruppe der thermophilen *Campylobacter* zugeordnet werden.

Fremde Isolate

Die eubakterielle Sonde (EUB 338), die als Positivkontrolle eingesetzt wurde, hat an allen 90 klinischen Isolaten gebunden. Bei den beiden Sonden Hel. Camp. 1760 und Hel. Camp. 324, welche alle *Arcobacter*-, *Helicobacter*- und *Campylobacter*-Spezies erfassen sollen, hat die Sonde Hel. Camp. 1760 100% der Isolate als *Campylobacter* erkannt. Die Sonde Hel. Camp. 324 war bei einem *C. coli* aus Berlin negativ, das heißt, sie hat 98,8% der Isolate als *Campylobacter* bzw. als *Helicobacter* identifiziert.

Die Sonden Camp. spez. 1620 und Camp. path. 1419 lieferten jeweils zu 100% ein positives Ergebnis.

Damit identifizierte die FISH alle 65 fremden klinischen Isolate als thermophile *Campylobacter* (s. Tabelle 16).

Tabelle 16: Ergebnisse der fremden Isolate mit den übergreifenden Sonden

C. jejuni = Campylobacter jejuni, *C. coli* = Campylobacter coli, *C. lari* = Campylobacter lari,
C. upsaliensis = Campylobacter upsaliensis

Spezies	biochemische Differenzierung	Sondensatz				
		EUB 338	Camp. spez. 1620	Hel. Camp. 1760	Hel. Camp. 324	Camp. path. 1419
<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	27/27 (100%)	27/27 (100%)	27/27 (100%)	27/27 (100%)	27/27 (100%)
<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	31/31 (100%)	31/31 (100%)	31/31 (100%)	30/31 (96,8%)	31/31 (100%)
<i>C. lari</i>	<i>C. lari</i>	11/11 (100%)	11/11 (100%)	11/11 (100%)	11/11 (100%)	11/11 (100%)
<i>C. upsaliensis</i>	<i>C. upsaliensis</i>	10/10 (100%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)

Isolate aus Ulm

Von den 25 Stämmen aus Ulm war 1 biochemisch als *C. coli*, 13 als *C. jejuni* und 11 als *H. pylori* identifiziert worden.

An den *C. jejuni*-Isolaten und am *C. coli*-Stamm haben alle übergreifenden Sonden gebunden. An den 11 *Helicobacter-pylori*-Isolaten haben die Sonden Hel. Camp. 1760 und Hel. Camp. 324 gebunden. Gleichzeitig zeigten die Sonden Camp. spez. 1620 und Camp. path. 1419 keine falsch positiven Reaktionen. Das heißt, die *Helicobacter*-Stämme wurden richtig als *Helicobacter spp.* identifiziert, und konnten gleichzeitig von den thermophilen *Campylobacter* abgegrenzt werden (s. Tabelle 17).

Tabelle 17: Ergebnisse der Isolate aus Ulm mit den übergreifenden Sonden
C. jejuni = *Campylobacter jejuni*, *C. coli* = *Campylobacter coli*, *H. pylori* = *Helicobacter pylori*

Spezies	biochemische Differenzierung	Sondensatz				
		EUB 338	Camp. spez. 1620	Hel. Camp. 1760	Hel. Camp. 324	Camp. path. 1419
<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	1/1 (100%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)
<i>C. jejuni</i>	<i>C. jejuni</i>	13/13 (100%)	13/13 (100%)	13/13 (100%)	13/13 (100%)	13/13 (100%)
<i>H. pylori</i>	<i>H. pylori</i>	11/11 (100%)	0/11 (0%)	11/11 (100%)	11/11 (100%)	0/11 (0%)

3.5.3 Evaluation der spezies-spezifischen Sonden an Referenzstämmen

Um nach erfolgreicher Identifizierung eines *Campylobacter* auch eine Zuordnung des Erregers zu einer der vier thermophilen Spezies zu ermöglichen wurde je eine Sonde für die Spezies *C. jejuni* (*C. jejuni* 1693) und *C. coli* (*C. coli* 1544) und jeweils zwei Sonden für *C. lari* (*C. lari* 622 und *C. lari* 1126) und *C. upsaliensis* (*C. ups.* 1211 und *C. ups.* 1695) ausgewählt.

Bei der Testung der spezies-spezifischen Sonden an den Referenzstämmen zeigte sich, dass die *C. coli*-Sonde sich nicht nur an der Spezies *C. coli* anlagerte, sondern gleichzeitig auch an *C. jejuni* band. Deshalb wurde ein sogenannter Kompetitor benötigt. Dies ist eine spezielle Sonde, welche in Konkurrenz mit der sich fälschlicherweise anlagernden Sonde steht. Beide Sonden konkurrieren dabei um den gleichen Platz am Ribosom des Nicht-Zielorganismus. Dieser Kompetitor ist in Bezug auf diese Stelle am Ribosom allerdings noch genauer auf den Nicht-Zielorganismus abgestimmt, so dass sich der Kompetitor anlagert bevor die falsche Sonde binden kann. Damit ist die Stelle am Ribosom blockiert und es kann sich keine weitere Sonde mehr anlagern. Ein solcher Kompetitor wurde für *C. jejuni* entworfen, so dass dadurch eine Anlagerung der *C. coli*-Sonde an *C. jejuni*-Stämme verhindert wurde. Die Kompetitor-Sonde wurde nicht mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert.

Alle anderen Sonden haben am jeweiligen Zielorganismus gebunden und zeigten keine Reaktionen mit Nicht-Zielorganismen (s. Tabelle 18).

Tabelle 18: Ergebnisse der Evaluation der spezies-spezifischen Sonden an Referenzstämmen

C. jejuni = *Campylobacter jejuni*, *C. coli* = *Campylobacter coli*, *C. upsaliensis* = *Campylobacter upsaliensis*, *C. lari* = *Campylobacter lari*, *C. fetus* = *Campylobacter fetus*, *C. sputorum* = *Campylobacter sputorum*, *C. consisus* = *Campylobacter consisus*, *A. butzleri* = *Arcobacter butzleri*, *A. cryaerophilus* = *Arcobacter cryaerophilus*, *A. nitrofigilis* = *Arcobacter nitrofigilis*, *H. pylori* = *Helicobacter pylori*, subsp. = Subspezies,

DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

Referenzstamm	Intensität der Sonde					
	C. jejuni 1693	C. coli 1544 + comp.	C. lari 1126	C. lari 622	C. ups 1211	C. ups 1695
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> DSM 4688	4	0	1	0	0	0
<i>C. coli</i> DSM 4689	1	5	0	0	0	0
<i>C. upsaliensis</i> DSM 5365	0	0	0	0	5	5
<i>C. lari</i> DSM 11375	1	0	4	3	1	0
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i> DSM 5361	0	0	0	0	0	0
<i>C. sputorum</i> DSM 10535	0	0	0	0	0	1
<i>C. consisus</i> DSM 9716	0	0	0	0	0	0
<i>A. butzleri</i> DSM 8739	0	0	0	0	0	0
<i>A. cryaerophilus</i> DSM 7289	0	0	0	0	0	0
<i>A. nitrofigilis</i> DSM 7299	0	n.d.	0	0	0	0
<i>H. pylori</i> DSM 4867	0	n.d.	0	0	0	0
<i>H. pylori</i> DSM 7492	0	n.d.	0	0	0	0

3.5.4 Evaluation der spezies-spezifischen Sonden an klinischen Isolaten

Im Anschluss an die Testreihen mit den Referenzstämmen wurden nun die Sensitivität und Spezifität der spezies-spezifischen Sonden anhand von klinischen Isolaten ermittelt. Es wurden die gleichen Isolate wie bei den Experimenten mit den übergreifenden Sonden verwendet.

Fremde Isolate (außer Freiburg)

Von den insgesamt 34 Isolaten aus Berlin handelte es sich bei 26 Stämmen um *C. coli*, 7 Stämme waren als *C. jejuni* differenziert worden und 1 Stamm gehörte zur Spezies *C. lari*.

Unter den 21 Stämmen aus den Niederlanden waren 10 *C. upsaliensis*, 10 *C. lari* und 1 *C. jejuni*.

Bei den beiden Isolaten aus Frankreich handelte es sich jeweils um 1 *C. jejuni* und 1 *C. coli*.

Das heißt, dass uns 27 *C. coli*, 9 *C. jejuni*, 10 *C. upsaliensis* und 11 *C. lari* zur Verfügung standen.

Bei 16 von 27 *C. coli*-Stämmen war mit den Speziessonden keine Zuordnung zu einer Campylobacterspezies möglich, da keine der Sonden gebunden hat. In einem Fall hat fälschlicherweise die Sonde für *C. jejuni* gebunden. Zehn der Isolate konnten mit diesem SONDENSATZ richtig der Spezies *C. coli* zugeordnet werden.

Dagegen gab es bei den *C. jejuni*-Stämmen nur einen Fall bei dem mittels FISH keine Aussage zur Spezieszugehörigkeit getroffen werden konnte, da sich keine der Sonden anlagerte. Die restlichen 8 Isolate wurden- wie auch durch die Biochemie- als *C. jejuni*-Stämme identifiziert.

An den 11 *C. lari*-Stämmen hat sich in zwei Fällen keine Sonde angelagert, so dass bezüglich der Spezies keine Aussage getroffen werden konnte. Die restlichen 9 Isolate wurden als *C. lari* identifiziert. In zwei Fällen lagerten sich beide Sonden an. An sieben Isolaten lagerte sich je eine der Sonden an, davon 5-mal die Sonde *C. lari* 622 und 2-mal die Sonde *C. lari* 1126.

Eine Zusammenfassung der fremden Isolate zeigt Tabelle 19.

Tabelle 19: Ergebnisse der Evaluation der spezies-spezifischen Sonden an fremden Isolaten

C. jejuni = Campylobacter jejuni, *C. coli* = Campylobacter coli, *C. lari* = Campylobacter lari,
C. upsaliensis = Campylobacter upsaliensis

Spezies	biochemische Differenzierung	Sondensatz					
		C. jejuni 1693	C. coli 1544 + comp.	C. lari 1126	C. lari 622	C. ups 1211	C. ups 1695
<i>C. jejuni</i>	C. jejuni	7/8 (87,5%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)
<i>C. coli</i>	C. coli	1/27 (3,7%)	10/27 (37%)	0/27 (0%)	0/27 (0%)	0/27 (0%)	0/27 (0%)
<i>C. lari</i>	C. lari	0/11 (0%)	0/11 (0%)	4/11 (36,4%)	7/11 (63,6%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)
<i>C. upsaliensis</i>	C. upsaliensis	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)

Isolate aus Freiburg

Bei diesen Isolaten handelte es sich laut der biochemischen Differenzierung in 3 Fällen um *C. coli*-Stämme und bei 5 Isolaten um *C. upsaliensis*.

Keines der *C. coli*-Isolate konnten durch die FISH einer Spezies zugeordnet werden, da sich keine der Spezies-Sonden anlagerte.

Bei den *C. upsaliensis*-Stämmen widersprach die FISH in allen 5 Fällen der Biochemie. Sie wurden alle als *C. jejuni* identifiziert (s. Tabelle 20).

Tabelle 20: Ergebnisse der Evaluation der spezies-spezifischen Sonden an den Isolaten aus Freiburg

C. jejuni = Campylobacter jejuni, *C. coli* = Campylobacter coli,

C. upsaliensis = Campylobacter upsaliensis

Spezies	biochemische Differenzierung	Sondensatz					
		C. jejuni 1693	C. coli 1544 + comp.	C. lari 1126	C. lari 622	C. ups 1211	C. ups 1695
<i>C. jejuni</i>	<i>C. upsaliensis</i>	5/5 (100 %)	0/5 (0 %)	0/5 (0 %)	0/5 (0 %)	0/5 (0 %)	0/5 (0 %)
<i>C. coli</i>	<i>C. coli</i>	0/3 (0 %)	0/3 (0 %)	0/3 (0 %)	0/3 (0 %)	0/3 (0 %)	0/3 (0 %)

Isolate aus Ulm

Alle 14 *C. jejuni*-Isolate wurden durch die spezifische *C. jejuni*-Sonde 1693 als *C. jejuni*-Stämme erkannt.

Der einzige *C. coli*-Stamm konnte mittels FISH keiner Spezies zugeordnet werden, da keine der Spezies-Sonden an diesem Isolat gebunden hat.

Es zeigten sich keine falsch positiven Reaktionen bei den Isolaten aus Ulm mit den Campylobacter-Spezies-Sonden (s. Tabelle 21).

Tabelle 21: Ergebnisse der Evaluation der spezies-spezifischen Sonden an den Isolaten aus Ulm

C. jejuni = Campylobacter jejuni, *C. coli* = Campylobacter coli, *H. pylori* = Helicobacter pylori

Spezies	biochemische Differenzierung	Sondensatz					
		C. jejuni 1693	C. coli 1544 + comp.	C. lari 1126	C. lari 622	C. ups 1211	C. ups 1695
<i>C. coli</i>	C. coli	0/1 (0%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)
<i>C. jejuni</i>	C. jejuni	13/13 (100%)	0/13 (0%)	0/13 (0%)	0/13 (0%)	0/13 (0%)	0/13 (0%)
<i>H. pylori</i>	H. pylori	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass alle übergreifenden Sonden mit einer Spezifität von 100 % und einer Sensitivität von 100 % an den insgesamt 90 klinischen Isolaten gebunden haben.

Für die spezies-spezifischen Sonden wurde jeweils eine Spezifität zwischen 98,5 und 100 % erreicht. Bezüglich der Sensitivität unterschieden sich die Sonden deutlich: *C. jejuni* 96%, *C. coli* 32%, *C. lari* 36% und 63%, bei gemeinsamem Einsatz beider *C. lari*- Sonden 91%, *C. upsaliensis* jeweils 100%.

3.6 Resistenzuntersuchungen

3.6.1 Resistenz-Sonden

Das Makrolid-Antibiotikum Erythromycin bindet an die 50S-Untereinheit des bakteriellen Ribosoms und blockiert somit die Proteinbiosynthese.

Eine solche 50S-Untereinheit teilt sich nochmals in eine 5S RNA-Untereinheit und eine 23S-RNA-Untereinheit auf. Die am häufigsten vorkommende Resistenz gegenüber dem Antibiotikum beruht auf einer Punktmutation der ribosomalen RNA an Position 2059 auf der 23S RNA-Untereinheit, so dass in Peptiden eine Adenosin-Base durch eine Guanin-Base ersetzt wird. Daher wurde jetzt eine entsprechende Sonde entworfen, mit der Erythromycin-resistente *Campylobacter*-Stämme erkannt werden.

Die Sonde für den sensiblen Wildtyp wurde "Wild 2045" genannt und die Sonde für die am häufigsten zur Resistenz führende Punktmutation (Austausch einer Adenosin-Base durch eine Guanin-Base an Abschnitt 2059) wurde "Resistenz 2059" genannt.

3.6.2 Evaluation der Resistenz- Sonden

Diese Versuche wurden an allen Stämmen durchgeführt, von denen eine Resistenzbestimmung vorlag.

Fremde Isolate

Von den insgesamt 90 fremden Stämmen war bei 49 Isolaten ein MHK bekannt.

Bei den Stämmen aus Berlin lag zu allen 34 Isolaten ein MHK (s. Material und Methoden) vor. Davon hatten 31 einen $\text{MHK} \geq 16$, was einer Resistenz gegenüber Erythromycin entspricht, und 3 Isolate hatten einen MHK von 8, was als sensibel gilt.

Die FISH bestätigte in 31 Fällen den MHK, indem sich an diesen Stämmen die Resistenz- Sonde anlagerte und die Wildtyp- Sonde keine Bindung zeigte.

An den 3 sensiblen Stämmen hat die Wildtyp- Sonde gebunden, die Resistenz- Sonde nicht.

An 13 Stämmen aus den Niederlanden wurde in Ulm ein E-Test durchgeführt, welcher ergab, dass es sich bei allen Isolaten um Erythromycin-sensible *Campylobacter* handelte.

Die Wildtyp-Sonde hat an allen 13 Isolaten gebunden, die Resistenz-Sonde an keinem. Damit war das Ergebnis des E-Testes an allen Isolaten durch die FISH bestätigt worden (s. Tabelle 22).

Von den Freiburger Stämmen wurden 4 zufällig ausgewählte Isolate mittels E-Test auf das Vorliegen einer Resistenz untersucht. Alle stellten sich als sensibel gegenüber Erythromycin heraus. Zum selben Ergebnis kamen auch die Sonden, es lagerte sich an allen 4 Stämmen nur die Wildtyp-Sonde an (s. Tabelle 22)

Der *Campylobacter jejuni* aus Frankreich galt als resistent, was durch die FISH bestätigt wurde (s. Tabelle 22).

Tabelle 22. Ergebnisse der Resistenztestung an fremden Isolaten.

(Cut-off-Werte für MHK-Bestimmung siehe Methoden 3.8)

MHK = Minimale Hemmkonzentration, *C. jejuni* = Campylobacter jejuni, *C. coli* = Campylobacter coli, *C. lari* = Campylobacter lari, *C. upsaliensis* = Campylobacter upsaliensis

Stamm	MHK	sensibel/ resistent	Sonden	
			Wild 2045	Resistenz 2059
<i>C. jejuni</i>	> 16	resistent	0/6 (0%)	6/6 (100%)
<i>C. jejuni</i>	0,38	sensibel	2/2 (100%)	0/2 (0%)
<i>C. jejuni</i>	0,75	sensibel	1/1 (100%)	0/1 (0%)
<i>C. jejuni</i>	1	sensibel	1/1 (100%)	0/1 (0%)
<i>C. jejuni</i>	2	sensibel	1/1 (100%)	0/1 (0%)
<i>C. coli</i>	> 16	resistent	0/23 (0%)	23/23 (100%)
<i>C. coli</i>	2	sensibel	1/1 (100%)	0/1 (0%)
<i>C. coli</i>	6	sensibel	1/1 (100%)	0/1 (0%)
<i>C. lari</i>	0,5	sensibel	1/1 (100%)	0/1 (0%)
<i>C. lari</i>	1	sensibel	2/2 (100%)	0/2 (0%)
<i>C. lari</i>	1,2	sensibel	1/1 (100%)	0/1 (0%)
<i>C. lari</i>	1,5	sensibel	2/2 (100%)	0/2 (0%)
<i>C. upsaliensis</i>	1	sensibel	1/1 (100%)	0/1 (0%)
<i>C. upsaliensis</i>	1,5	sensibel	5/5 (100%)	0/5 (0%)
<i>C. upsaliensis</i>	2	sensibel	1/1 (100%)	0/1 (0%)

Isolate aus Ulm

An 12 Isolaten aus Ulm wurde ein E-Test durchgeführt, wobei sich bei allen ein Wert < 8 ergab und somit die *Campylobacter* als sensibel galten.

Dies wurde durch die FISH in allen 12 Fällen bestätigt, da ausschließlich die Wildtyp-Sonde band (s. Tabelle 23).

Tabelle 23: Ergebnisse der Resistenztestung an den Isolaten aus Ulm

MHK = Minimale Hemmkonzentration, *C. jejuni* = *Campylobacter jejuni*, *C. coli* = *Campylobacter coli*

Stamm	MHK	sensibel/ resistent	Sonden	
			Wild 2045	Resistenz 2059
<i>C. jejuni</i>	< 8	sensibel	11/11 (100%)	0/11 (0%)
<i>C. coli</i>	< 8	sensibel	1/1 (100%)	0/1 (0%)

Bei den Versuchen zur Ermittlung der Resistenzlage der klinischen Isolate mittels FISH, wurden sowohl die sensiblen, als auch die resistenten Stämme zu jeweils 100% von den Sonden richtig erkannt.

Zum Abschluss des Ergebnisteils soll anhand der folgenden Abbildung (s. Abb. 12) der mögliche Einsatz der getesteten Sonden in der Routine-Diagnostik einer Campylobacter-Infektion veranschaulicht werden:

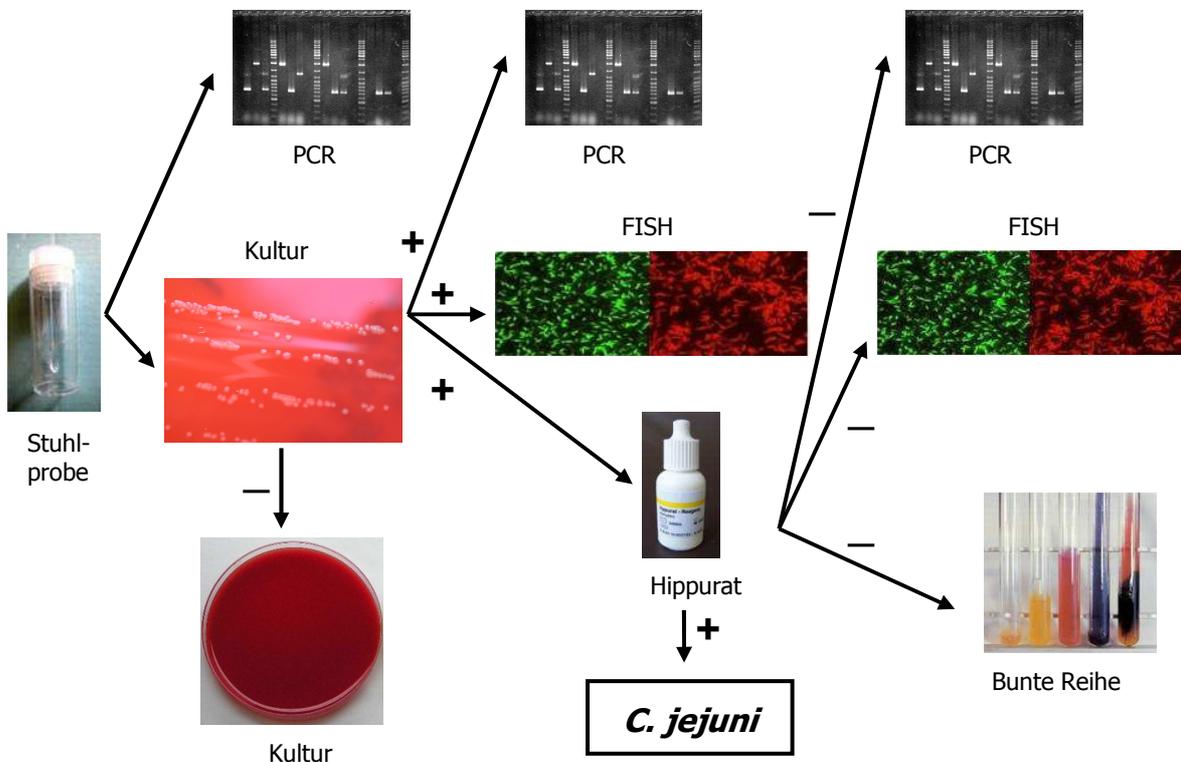


Abb. 12: Einsatz der FISH in der Routine- Diagnostik

(FISH = Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, PCR = polymerase chain reaction, *C. jejuni* = Campylobacter jejuni)

Zunächst erhält das Labor eine Stuhlprobe des Patienten. Von dieser Probe kann dann entweder direkt eine PCR durchgeführt werden (obere Bilderreihe) oder aber es wird zunächst eine Kultur angelegt.

Bei positiver Kultur kann anschließend die FISH zum Einsatz kommen, oder es kann wiederum eine PCR gemacht werden.

Bislang wird in den meisten Laboratorien ein Hippurattest durchgeführt, welcher nur bei *C. jejuni* positiv ausfällt. Bei negativem Hippurattest, kann man zur weiteren Differenzierung entweder wieder eine PCR, eine bunte Reihe (d.h. biochemische Verfahren) oder erneut eine FISH durchführen.

4. Diskussion

Die Gruppe der thermophilen *Campylobacter* stellt derzeit mit Abstand den häufigsten Erreger der bakteriellen Enteritiden sowohl in Deutschland, als auch weltweit dar [16;18;54]. Dennoch ist es bislang nicht gelungen, ein Nachweisverfahren zu etablieren, welches sowohl technisch leicht durchführbar ist, als auch schnell zu einem Ergebnis führt. Zurzeit werden vor allem Diagnoseverfahren eingesetzt welche auf kulturellen und biochemischen Methoden beruhen. Diese Verfahren sind zum einen relativ langwierig und zum anderen nicht besonders zuverlässig, vor allem wenn es sich um seltenere *Campylobacter*-Spezies, wie zum Beispiel *C. lari* und *C. upsaliensis* handelt. Daher wurden alternative molekularbiologische Verfahren konzipiert, die allerdings den Nachteil haben, dass sie sehr aufwendig und teuer sind. Aufgrund dessen konnten sich diese Methoden bislang nicht in der Routine-Diagnostik durchsetzen.

Deshalb war es ein Ziel dieser Arbeit mit Hilfe der FISH-Methode sowohl ein einfaches als auch ein kostengünstiges Verfahren zu entwickeln, um *Campylobacter* und die eng verwandten *Arcobacter* und *Helicobacter* voneinander zu differenzieren, thermophile *Campylobacter* zu identifizieren und diese auf Speziesebene weiter zu unterscheiden.

Zunächst wurde ein Sondenpool entworfen, aus welchem die besten Sonden ausgewählt wurden. Von allen getesteten Sonden haben insgesamt zehn Sonden nicht funktioniert.

Ein möglicher Grund dafür, dass eine Sonde nicht am entsprechenden Zielorganismus bindet, kann ein zu niedriger CG-Gehalt der DNA-Sonde sein. Diese beiden Basen binden stärker als Adenin oder Thymin und nehmen somit Einfluss auf die Bindungsstärke einer Sonde. Das heißt, je höher der CG-Gehalt einer Sonde ist, desto besser bindet diese an die komplementäre ribosomale RNA.

Eine weitere Möglichkeit, warum die Sonden nicht binden konnten, kann auch darin liegen, dass die Zielregion aufgrund der Tertiärstruktur der RNA nicht zugänglich ist. Aufgrund der dreidimensionalen Struktur der ribosomalen RNA durch RNA-RNA- oder RNA-Protein-Interaktionen sind nicht alle Sequenzen, die bei denaturierter RNA erfolgreich sequenziert werden können, gleichermaßen in situ ausreichend zugänglich [25;26].

Auch bei bekannter Tertiärstruktur können Veränderungen, welche durch die Fixierung entstehen, die Zielregion einfrieren [6].

Mit Hilfe unmarkierter Oligonukleotide ("Helfersonden") kann man versuchen, die Zielregion besser zugänglich zu machen [24]. Diese Oligonukleotide binden an benachbarten Sequenzen der Zielregion und sollen dadurch ein Öffnen von RNA-RNA-Bindungen und RNA-Protein-Bindungen bewirken.

Solche "Helfersonden" wurden bei dieser Arbeit für die Sonde C. jejuni 1695 entworfen. Die Sonden C. alle Helfer I und C. jej Helfer II sollten sich jeweils an einem Ende der Zielregion anlegen. Aber beide Helfersonden zeigten nicht den gewünschten Effekt, so dass die Sonde C. jejuni 1695 nicht weiter getestet wurde. Im Laufe dieser Arbeit wurde bei einigen Sonden auch klar, dass die verwendete Sequenz nicht geeignet war, um eine Sonde zu konzipieren. Dies war jedoch zu Beginn der Arbeit aufgrund des kleinen Datensatzes noch nicht abzusehen. Vor allem die 16S rRNA erlaubt keine Differenzierung zwischen *Campylobacter* und *Arcobacter* und auch keine Unterscheidung auf Speziesebene [29].

Nach diesen ersten Vorversuchen konnte ein Sondensatz ausgewählt werden, welcher das Potential besaß sowohl *Campylobacter*, *Arcobacter* und *Helicobacter* auf Genusebene zu differenzieren als auch die enteritischen *Campylobacter* zu identifizieren und bis auf Speziesebene zu differenzieren.

Differenzierung von *Campylobacter*, *Arcobacter* und *Helicobacter*

Die drei Gattungen *Campylobacter*, *Arcobacter* und *Helicobacter* sind sich genetisch sehr ähnlich, so dass es oftmals schwierig ist, diese voneinander zu unterscheiden. Insbesondere die beiden eng verwandten Gattungen *Campylobacter* und *Arcobacter* lassen sich durch die bislang verwendeten konventionellen Kultur-Methoden häufig nicht differenzieren [36;55].

Mit Hilfe von drei neu entworfenen Sonden und einer bereits veröffentlichten Sonde war es in dieser Arbeit möglich, alle 90 untersuchten Stämme einer der drei Gattungen zuzuordnen. Die bereits bekannte Sonde zur Identifizierung von *Campylobacter*-Spezies war zuvor schon durch zwei voneinander unabhängige Arbeitsgruppen evaluiert worden, und wurde deshalb hier nicht weiter getestet [12;55;56;79].

Im Vergleich zu den bislang verwendeten Methoden, welche vor allem *Arcobacter*-Spezies häufig fälschlicherweise als *Campylobacter spp.* identifizieren, scheint die FISH gegenüber den biochemischen Nachweisverfahren wesentlich besser zu sein. Da es nicht vorrangiges Ziel dieser Arbeit war, *Arcobacter* und *Helicobacter* nachzuweisen, wurden bei dieser Arbeit lediglich drei *Arcobacter*-Referenzstämme und zwei *Helicobacter*-Referenzstämme sowie elf klinische *Helicobacter*-Isolate untersucht, welche alle richtig identifiziert wurden.

Mit den übergreifenden Sonden kann man nach dem Ausschlussprinzip zwischen *Campylobacter spp.*, *Arcobacter spp.* und *Helicobacter spp.* unterscheiden. Dieses Verfahren hat allerdings den kleinen Nachteil, dass das Ergebnis nicht automatisch durch weitere übergreifende Sonden abgesichert wird, wie zum Beispiel bei den Speziessonden. Damit lässt sich noch keine abschließende Aussage über die Zuverlässigkeit der *Helicobacter*- und *Arcobacter*-Spezies-Differenzierung treffen. Allerdings wäre es möglich, nachdem mit diesem SONDENSATZ ein *Helicobacter* oder *Arcobacter* identifiziert wurde, dieses Isolat mit bereits bekannten *Helicobacter*- bzw. *Arcobacter*-Sonden weiter zu untersuchen [15;80;83].

Identifizierung der thermophilen *Campylobacter*

Alle vier *Campylobacter*spezies der thermophilen Gruppe (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* und *C. upsaliensis*) sind für den Menschen potenzielle Enteritiserreger. Daher ist es von besonderem Interesse, ob ein *Campylobacter* zu einer dieser vier Spezies gehört.

Bei dieser Arbeit wurden alle klinischen Isolate, die zur Gruppe der thermophilen *Campylobacter* gehören, auch als solche identifiziert.

Eine schnelle und sichere Zuordnung ist vor allem für den klinisch tätigen Arzt wichtig, aber auch in anderen Bereichen, wie zum Beispiel in der fleischverarbeitenden Industrie besteht ein großes Interesse, *Campylobacter* zuverlässig, rasch und kostengünstig nachzuweisen. Dies ermöglicht eine schnelle Kontrolle des Fleisches und gleichzeitig einen großen Schutz des Konsumenten vor eventuell belasteten Produkten. Hierfür wurde bereits eine Sonde entwickelt [79]. Diese Sonde wurde sowohl an Analabstrichen von Hühnern, als auch an Hühnerleberproben untersucht und zeigte beides Mal gute Ergebnisse. Sie ist sowohl sehr spezifisch, als auch sensitiv gegenüber thermophilen *Campylobacter*en.

Da diese Sonde an einen ähnlichen Bereich bindet, wie die hier verwendete Sonde, werden dadurch die Ergebnisse dieser Arbeit in Bezug auf Sensitivität und Spezifität bestätigt.

Mit Hilfe der FISH-Technik lassen sich auf diese Weise sowohl Kosten als auch Zeit einsparen. Denn im Vergleich zum konventionellen kulturellen Nachweis, erhält man mit Hilfe der FISH zwei Informationen auf einmal: 1. Es handelt sich um einen *Campylobacter spp.*, 2. er gehört zur Gruppe der thermophilen *Campylobacter*.

Identifizierung der einzelnen Spezies

Aus epidemiologischer Sicht, ist nicht nur eine Identifizierung der *Campylobacter spp.* von Interesse, sondern auch eine Differenzierung der einzelnen Spezies.

Von allen gemeldeten *Campylobacter*-Enteritiden, werden die meisten durch die Spezies *C. jejuni* verursacht [74].

Dabei gilt es allerdings zu bedenken, dass die häufig verwendeten Methoden zur Kultivierung von *Campylobacter*-Spezies auch speziell auf *C. jejuni* zugeschnitten sind. Das heißt, es ist durchaus möglich, dass die anderen Spezies häufiger vorkommen als bislang beschrieben, und sie nur deshalb nicht nachgewiesen werden können, weil die Wachstumsbedingungen nicht optimal für sie sind [22;47;78].

Die Häufigkeit einer Infektion durch *A. butzleri* wurde vermutlich dadurch bislang unterschätzt, dass diese Spezies fälschlicherweise als *C. coli* oder *C. fetus* identifiziert wurde [70].

Ein Speziesnachweis erlaubt auch Rückschlüsse auf die mögliche Infektionsquelle, da *C. jejuni* als Kommensale häufiger bei Geflügel, *C. coli* dagegen öfter bei Schweinen gefunden wird. Außerdem sind *C. coli*-Stämme häufiger resistent gegenüber Erythromycin, was dann bei der Auswahl des entsprechenden Antibiotikums eine Rolle spielt [8]. Die Spezies *C. upsaliensis* wurde von einer Forschergruppe vor allem bei Haustieren, wie Hunde und Katzen isoliert, einem Reservoir, das bislang vermutlich eher unterschätzt wurde [2]. Diese verschiedenen Infektionsquellen zeigen, dass es nicht nur im Interesse der Humanmedizin liegt, eine schnelle Nachweismethode für *Campylobacter spp.* zu finden, sondern dass auch die Veterinärmedizin durchaus davon profitieren kann.

Viele Forschergruppen haben bereits die Schwierigkeiten der Differenzierung der einzelnen *Campylobacter*-Spezies beschrieben [7;58;81]. Methoden, die allein auf einer Phänotypisierung beruhen, haben sich nicht als zuverlässig erwiesen. Dies liegt vor allem daran, dass die einzelnen *Campylobacter*-Spezies biochemisch nicht besonders aktiv sind, weshalb sich Methoden wie z. B. ein API als ungeeignet erwiesen haben [34].

Vielmehr scheint entweder eine Genotypisierung oder eine Kombination aus beiden Methoden sinnvoll zu sein [87].

Besonders die Differenzierung zwischen den Spezies *C. jejuni* und *C. coli* erweist sich immer wieder als besonders schwierig [30;81]. In den meisten Laboratorien wird nach dem kulturellen Nachweis eines *Campylobacter* ein Hippurattest durchgeführt. Fällt dieser positiv aus, dann wird das Isolat als *C. jejuni* identifiziert, bei negativem Ergebnis wird häufig nicht weiter differenziert und der Stamm nur als *Campylobacter spp.* identifiziert, da die anderen Spezies keine biochemischen Merkmale aufweisen mit denen sie leicht nachzuweisen wären.

Es gibt allerdings immer wieder auch *C. jejuni*-Stämme, welche das Hippurat-Gen nicht exprimieren und somit biochemisch auch nicht als *C. jejuni* identifiziert werden können. Bislang wurden *Campylobacter*-Isolate, die einen negativen Hippurat-Test aufwiesen, meist fälschlicherweise als *C. coli* identifiziert [30;81]. Hier zeigt sich ein großer Vorteil der FISH, da diese auch *C. jejuni*-Stämme ohne Hippurat-Gen erfasst.

Von insgesamt 26 *C. jejuni*-Isolaten wurden 25 (entspricht einer Sensitivität von 96%) mit den Spezies-Sonden als *C. jejuni* identifiziert.

Bei den insgesamt 31 *C. coli*-Isolaten hat die entsprechende Sonde mit dem Kompetitor nur in 10 Fällen gebunden, (Sensitivität 32%). Da die bislang verwendeten Methoden jedoch sehr unzuverlässig bezüglich der Speziesdifferenzierung sind, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den biochemisch als *C. coli* differenzierten Stämmen doch um andere *Campylobacter*-Spezies handelt.

Ein weiteres Problem bei der Identifizierung von *C. coli* war die Tatsache, dass es nicht möglich war eine Sonde zu entwerfen, welche zu allen bislang veröffentlichten *C. coli* 23S RNA-Sequenzen komplementär ist [3;79]. Alle

potenziellen Sonden, die für *C. coli*-Stämme in Frage kamen, zeigten bereits bei den Entwürfen Kreuzbindungen zu anderen thermophilen Campylobacter-Spezies. Eine Sonde, die komplementär zur 16S RNA ist, stößt ebenfalls bei der Unterscheidung der Spezies *C. coli* und *C. jejuni* an ihre Grenzen, da diese beiden Spezies zusammen mit atypischen *C. lari*-Spezies eine fast identische 16 S RNA besitzen [30;50]. Daher erscheint es unmöglich, eine Sonde zu entwickeln, welche sowohl alle *C. coli*-Stämme identifiziert, als auch gleichzeitig keine Kreuzbindung an *C. jejuni*-Stämmen aufweist [52].

Bei allen in dieser Arbeit untersuchten Isolaten gab es mit der *C. coli*-Sonde (zusammen mit dem Kompetitor) keinerlei Kreuzreaktionen zu anderen thermophilen Campylobactern. Das heißt, dass die Sonde zwar keine hohe Sensitivität, aber dafür eine hohe Spezifität aufweist. Wurde ein Isolat als *C. coli* identifiziert, so kann man sicher sein, dass dieses Isolat auch zu dieser Spezies gehört.

Aufgrund sehr großer genetischer Heterogenität der Spezies *C. lari*, war es nicht möglich, eine einzelne Sonde zu entwickeln, welche alle Subspezies gleichermaßen erfasst. Daher wurden für diese Spezies zwei Sonden entworfen. Von insgesamt 11 *C. lari*-Isolaten wurden 10 entweder mit einer oder mit beiden Sonden gleichzeitig als *C. lari* identifiziert (Sensitivität 91%). Kreuzbindungen gab es mit dem Sondenpaar nicht, so dass die Spezifität bei 100% lag.

Für die *C. upsaliensis*-Stämme wurden ebenfalls zwei Sonden entwickelt. Beide Sonden zeigten an den 10 *C. upsaliensis*-Stämmen eine Sensitivität und Spezifität von jeweils 100%.

Von den 8 Stämmen aus Freiburg hatte die Biochemie 3 als *C. coli* identifiziert und 5 als *C. upsaliensis*.

Bei keinem der *C. upsaliensis*-Isolate aus Freiburg gelang es uns mit der FISH, das klinische Isolat dieser Spezies zuzuordnen. Vielmehr identifizierte die FISH alle als *C. jejuni*. Deshalb wurden diese Stämme anschließend sequenziert. Die Sequenzierung bestätigte das FISH-Ergebnis und identifizierte ebenfalls alle fünf als *C. jejuni*.

Von den 3 *C. coli*-Stämmen konnte keiner einer Spezies zugeordnet werden. Daraufhin wurden zwei der Isolate ebenfalls sequenziert. Das Ergebnis erbrachte in beiden Fällen erneut *C. jejuni*. Da aber die *C. jejuni*-Sonde auch nicht gebunden

hatte, wurden die Stämme in Berlin mittels PCR ein drittes Mal untersucht. Die PCR identifizierte die Isolate dann wiederum als *C. coli*.

Dieses Beispiel zeigt erneut, dass es aufgrund der engen genetischen Verwandtschaft zwischen *C. jejuni* und *C. coli* nicht möglich ist, eine entsprechende *C. coli*-Sonde zu entwerfen.

Zusammenfassung der Speziesidentifizierung

Alle Spezies-Sonden zeigten eine sehr gute Spezifität, da bei 90 untersuchten Isolaten lediglich einmal ein falsch positives Ergebnis vorkam (s. Tabelle 19). Bezüglich der Sensitivität unterscheiden sich die einzelnen Sonden stark.

Es ist aber trotz der schlechten Sensitivität der *C. coli*-Sonde möglich, eine Aussage bezüglich der Spezies zu treffen. Denn wenn man bereits nachgewiesen hat, dass es sich bei einem Stamm um einen thermophilen *Campylobacter* handelt und dann anschließend bei der Spezies-Differenzierung keine der Sonden bindet, dann kann man- aufgrund der hohen Spezifität der anderen Sonden- davon ausgehen, dass es sich hierbei um einen *C. coli* handelt.

Resistenz

Nachdem nun der Nachweis eines thermophilen *Campylobacter* als Erreger der Enteritis erfolgt ist, stellt sich als nächstes die Frage, ob der nachgewiesene *Campylobacter* sensibel gegenüber Erythromycin ist. Zur Therapie eines schweren Verlaufes einer *Campylobacter*-Infektion ist dies das Antibiotikum der Wahl. Es kann sowohl in der Pädiatrie als auch bei Erwachsenen eingesetzt werden. Eine Alternative wäre z. B. Ciprofloxacin aus der Gruppe der Fluorchinolone (RKI-Homepage), [20;57], wobei auch gegenüber Ciprofloxacin immer häufiger Resistenzen gefunden werden [21;82].

Sowohl in Entwicklungsländern, als auch in Industrienationen nimmt die Zahl der Erythromycin-resistenten-Stämme zu, wobei die Industrienationen stärker betroffen zu sein scheinen [28].

Vor allem bei Stämmen der Spezies *C. coli* sind in den letzten Jahren vermehrt Resistenzen aufgetreten und nachgewiesen worden [8]. Aber auch bei anderen Stämmen der *Campylobacter spp.* treten immer häufiger Resistenzen auf. Bei

einer Studie in Belgien wurde bei *C. upsaliensis* eine Erythromycinresistenz von 12,9% und bei *A. butzleri* von 21,3 % festgestellt [85].

In Deutschland liegt die Resistenzrate von *C. coli*-Stämmen bei 29,4% und in Spanien sogar bei 34,5% [28]. Ein Grund hierfür ist der vermehrte Einsatz von Antibiotika in der Veterinärmedizin, Schweinemast oder der Geflügelaufzucht [10;28;64]. Aber auch in Betrieben, die keine Antibiotika einsetzen, wird immer häufiger eine Resistenz gegenüber Erythromycin und Fluorchinolonen gefunden [27].

Man unterscheidet eine sogenannte High-level-Resistenz von einer Low-level-Resistenz. Die High-level-Resistenz wird durch Mutationen auf der ribosomalen RNA ausgelöst, ähnlich wie bei *H. pylori* beschrieben. Für diese Mutation wurde in Bezug auf *H. pylori* bereits eine FISH-Sonde entwickelt [76].

Im Gegensatz dazu wird die Low-level-Resistenz, welche wesentlich seltener auftritt und daher in der klinischen Praxis auch eine unbedeutende Rolle spielt, durch sogenannte Efflux-Pumpen vermittelt [14;49;62].

Eines der Ziele dieser Arbeit war es, einen SONDENSATZ zu evaluieren, der es möglich macht, mit Hilfe der FISH zwischen Erythromycin-sensiblen und Erythromycin-resistenten Stämmen zu unterscheiden.

Es gelang bei allen Stämmen, eine Sensibilität bzw. Resistenz gegenüber Erythromycin korrekt mittels FISH nachzuweisen.

Beim sogenannten Efflux-Mechanismus, einem weiteren Resistenzmechanismus, schleust das Bakterium das Antibiotikum aktiv wieder aus, bevor dieses seine Wirkung entfalten kann. Diesem kann man entgegenwirken indem man Erythromycin in höherer Dosierung verabreicht [28]. Dies zeigt, dass diese Form der Resistenz klinisch von untergeordneter Relevanz ist.

Bei dieser Arbeit wurde nur ein Sondenpaar mit der Wild-Typ-Sonde und der häufigsten Resistenz-Sonde eingesetzt. Bislang sind noch drei weitere ribosomale Mutationen beschrieben worden, welche allerdings sehr viel seltener auftreten [28].

Bedeutung der Ergebnisse für die Routine-Diagnostik, auch im Hinblick auf FISH mit anderen Enteritis-Erregern (z. B. Salmonellen)

Bei einer Enteritis infectiosa liegt vor allem ein schneller Nachweis des Erregers im Interesse des Klinikers, weniger die Identifizierung der einzelnen Spezies.

Bislang gilt für den Direktnachweis eines *Campylobacter* aus einer Stuhlprobe die Kultur mittels Selektivagar als Standardmethode. Obwohl es relativ lange dauert bis man zu einem Ergebnis kommt, hat eine Vergleichsstudie von PCR, Kultur und Filtration durch eine Membran gezeigt, dass die Kultur bislang nach wie vor die beste Nachweismethode ist [44].

Für die Routine-Diagnostik wäre es ein großer Gewinn, wenn es gelänge, die FISH direkt auf einer Patienten-Stuhlprobe anzuwenden. Damit wäre es möglich in etwa 4-5 Stunden sowohl *Campylobacter spp.* zu identifizieren, als auch ggf. eine Erythromycin-Resistenz nachzuweisen.

Würde man dann noch gleichzeitig andere Sonden von häufigen Enteritis-Erregern einsetzen, z. B. Salmonellen, dann könnte eine Stuhlprobe mit nur einem einzigen Arbeitsschritt in sehr kurzer Zeit auf die häufigsten Enteritis-Erreger untersucht werden [66].

Der Einsatz der FISH-Methode bei Blutkulturen wird bereits bei vielen Erregern praktiziert [68;69;71;89]. Da *Campylobacter* nicht nur eine Enteritis infectiosa verursachen können, sondern immer wieder auch für extraintestinale Infektionen verantwortlich sind [46;73], ist es gut vorstellbar in Zukunft auch Blutkulturen auf *Campylobacter* mittels FISH zu untersuchen.

Bei Stuhlproben findet die FISH bislang ihren Einsatz um die Zusammensetzung der Stuhlflora zu bestimmen [23]. Im Vergleich zu anderen Patientenproben, wie zum Beispiel Liquor [67] oder Blutkulturen, welche bereits auf viele Erreger mittels FISH untersucht werden können, ist die Aufbereitung einer Stuhlprobe zur Durchführung einer FISH aufwendiger.

Da bei einer Stuhlprobe aufgrund der Heterogenität des Materials mehr Autofluoreszenz [57] als z. B. bei Liquorproben zur erwarten ist, wird es eine der Herausforderungen sein, die Probe entsprechend aufzubereiten. Vor allem da *Campylobacter* sehr kleine Bakterien sind, welche leicht durch anderes Material überlagert werden.

Ein weiteres Problem ist die Tatsache, dass *Campylobacter spp.* äußerst empfindlich auf Umwelteinflüsse reagieren. Das bedeutet, dass die Stuhlprobe schnell verarbeitet werden muss, um zu verhindern, dass der Campylobacter eine inaktive Lebensform einnimmt.

Nichtsdestotrotz ist es gut vorstellbar, dass die FISH bei entsprechend aufbereitetem Stuhl zuverlässige und schnelle Ergebnisse liefert.

Zusammenfassung

Thermophile *Campylobacter* (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis* und *C. lari*) stellen weltweit die häufigste Erregergruppe der bakteriellen Enteritis dar. Trotzdem ist es bislang nicht gelungen ein Nachweisverfahren zu etablieren, welches in der Routinediagnostik schnell durchführbar und außerdem auch kostengünstig ist.

Die Fluoreszenz-in-situ-hybridisierung (FISH) ist ein mikroskopisches Verfahren, welches auf einer spezifischen Anfärbung von Bakterien mittels Fluoreszenzmarkierter-DNA-Sonden, die spezifisch an komplementäre Sequenzen der ribosomalen RNA binden, basiert. Die FISH ist sowohl in kurzer Zeit als auch mit geringem technischem und personellem Aufwand durchführbar.

Diese Arbeit hatte drei Ziele. Zunächst sollte die Frage, ob eine *Campylobacter*-Infektion vorliegt beantwortet werden. Das zweite Ziel war eine Differenzierung der thermophilen *Campylobacter*-Spezies und die dritte Aufgabe bestand darin ein FISH-Verfahren für den Nachweis einer Makrolidresistenz zu evaluieren.

Zunächst wurde eine Auswahl an Sonden entworfen, welche im ersten Schritt an 12 Referenzstämmen und anschließend an 90 klinischen Isolaten evaluiert wurden.

Durch die Kombination von zwei Sonden, welche die Gattungen *Helicobacter* und *Campylobacter* identifizieren, konnten die klinischen Isolate mit einer Spezifität und einer Sensitivität von jeweils 100% als *Campylobacter spp.* bzw. *Helicobacter spp.* identifiziert werden und damit von der eng verwandten Gattung *Arcobacter* abgegrenzt werden. Außerdem wurden alle untersuchten Isolate der Gruppe der thermophilen *Campylobacter* als solche erkannt, womit die Sonde für thermophile *Campylobacter* ebenfalls eine Sensitivität und Spezifität von 100% aufwies.

Die spezies-spezifischen Sonden zeigten alle eine hervorragende Spezifität zwischen 98,5 und 100%. Bezüglich der Sensitivität waren starke Unterschiede festzustellen. Die Sonden für *C. jejuni*, *C. lari* und *C. upsaliensis* lagen zwischen 91 und 100%.

Die Sonde für *C. coli* zeigte lediglich eine Sensitivität von 32,3%.

Eine Speziesdifferenzierung nach dem Ausschlussprinzip ist trotz der niedrigen Sensitivität der *C. coli*-Sonde möglich. Aufgrund der hohen Spezifität der übrigen Sonden kann man bei einem Isolat, an welches keine der Spezies-Sonden gebunden hat, davon ausgehen, dass es sich hierbei um einen *C. coli* handelt.

In Bezug auf die Resistenzbestimmung wurden alle Erythromycin-resistenten Stämme durch die FISH bestätigt und die sensiblen Isolate auch als solche identifiziert. Somit betrug die Sensitivität und Spezifität der Resistenz-Sonden 100%.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die FISH die Anforderung bezüglich einer schnellen Diagnose einer Campylobacter-Infektion erfüllt und gleichzeitig in der Lage ist, auch Informationen bezüglich der Resistenzlage des Erregers zu liefern.

Des Weiteren ist es auch vorstellbar, die FISH-Technik direkt auf Patientenproben anzuwenden und somit noch mehr Zeit und Kosten einzusparen.

Wir konnten mit dieser Arbeit zeigen, dass die FISH das Potenzial hat, die Routine-Diagnostik, und somit die Patientenversorgung bei einer Enteritis infectiosa zu verbessern.

Literaturverzeichnis

- [1] Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food--10 sites, United States, 2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2005; 54:352-356.
- [2] Acke E, McGill K, Golden O, Jones BR, Fanning S, Whyte P. - Prevalence of thermophilic *Campylobacter* species in household cats and dogs in Ireland. *Vet Rec* 2009;164:44-7.
- [3] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; 25:3389-3402.
- [4] Alzand BS, Ilhan M, Heesen WF, Meeder JG. - *Campylobacter jejuni*: Enterocolitis and myopericarditis. *Int J Cardiol* 2009; [Epub ahead of print].
- [5] Amann R, Fuchs BM, Behrens S. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Curr Opin Biotechnol* 2001; 12:231-236.
- [6] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 1995;59:143-69.
- [7] Atabay HI, Corry JE, On SL. - Isolation and characterization of a novel catalase-negative, urease-positive *Campylobacter* from cattle faeces. *Lett Appl Microbiol* 1997; 24:59-64.
- [8] Bae W, Kaya KN, Hancock DD, Call DR, Park YH, Besser TE. - Prevalence and antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter* spp. from cattle farms in Washington State. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71:169-74.
- [9] Bastyns K, Chapelle S, Vandamme P, Goossens H, De Wachter R. Specific detection of *Campylobacter concisus* by PCR amplification of 23S rDNA areas. *Mol Cell Probes* 1995; 9:247-250.
- [10] Belanger AE, Shryock TR. Macrolide-resistant *Campylobacter*: the meat of the matter. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60:715-23.

-
- [11] Bohnert J, Hubner B, Botzenhart K. Rapid identification of Enterobacteriaceae using a novel 23S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *Int J Hyg Environ Health* 2000; 203:77-82.
- [12] Buswell CM, Herlihy YM, Lawrence LM, McGuiggan JT, Marsh PD, Keevil CW et al. Extended survival and persistence of *Campylobacter* spp. in water and aquatic biofilms and their detection by immunofluorescent-antibody and -rRNA staining. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64:733-741.
- [13] Butzler JP. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10:868-876.
- [14] Cagliero C, Mouline C, Payot S, Cloeckert A. - Involvement of the CmeABC efflux pump in the macrolide resistance of *Campylobacter coli*. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56:948-50.
- [15] Chan V, Crocetti G, Grehan M, Zhang L, Danon S, Lee A et al. Visualization of *Helicobacter* species within the murine cecal mucosa using specific fluorescence in situ hybridization. *Helicobacter* 2005; 10:114-124.
- [16] Coker AO, Isokpehi RD, Thomas BN, Amisu KO, Obi CL. Human campylobacteriosis in developing countries. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:237-244.
- [17] Desmonts MH, Dufour-Gesbert F, Avrain L, Kempf I. Antimicrobial resistance in *Campylobacter* strains isolated from French broilers before and after antimicrobial growth promoter bans. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54:1025-30.
- [18] Diergaardt SM, Venter SN, Spreeth A, Theron J, Brozel VS. The occurrence of campylobacters in water sources in South Africa. *Water Res* 2004; 38:2589-2595.
- [19] Duim B, Vandamme PA, Rigter A, Laevens S, Dijkstra JR, Wagenaar JA. Differentiation of *Campylobacter* species by AFLP fingerprinting. *Microbiology* 2001; 147:2729-2737.

-
- [20] Engberg J, Aarestrup FM, Taylor DE, Gerner-Smidt P, Nachamkin I. Quinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: resistance mechanisms and trends in human isolates. *Emerg Infect Dis* 2001; 7:24-34.
- [21] Feodoroff FB, Lauhio AR, Sarna SJ, Hanninen ML, Rautelin HI. Severe diarrhoea caused by highly ciprofloxacin-susceptible *Campylobacter* isolates. *Clin Microbiol Infect* 2009. [Epub ahead of print].
- [22] Fermer C, Engvall EO. Specific PCR identification and differentiation of the thermophilic campylobacters, *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3370-3373.
- [23] Franks AH, Harmsen HJ, Raangs GC, Jansen GJ, Schut F, Welling GW. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64:3336-3345.
- [24] Fuchs BM, Glockner FO, Wulf J, Amann R. Unlabeled helper oligonucleotides increase the in situ accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66:3603-7.
- [25] Fuchs BM, Syutsubo K, Ludwig W, Amann R. In situ accessibility of *Escherichia coli* 23S rRNA to fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67:961-8.
- [26] Fuchs BM, Wallner G, Beisker W, Schwippl I, Ludwig W, Amann R. - Flow cytometric analysis of the in situ accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64:4973-82.
- [27] Gebreyes WA, Thakur S, Morrow WE. *Campylobacter coli*: prevalence and antimicrobial resistance in antimicrobial-free (ABF) swine production systems. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56:765-8.
- [28] Gibreel A, Taylor DE. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58:243-55.

-
- [29] Gonzalez A, Moreno Y, Gonzalez R, Hernandez J, Ferrus MA. Development of a simple and rapid method based on polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism analysis to differentiate *Helicobacter*, *Campylobacter*, and *Arcobacter* species. *Curr Microbiol* 2006; 53:416-21.
- [30] Gorkiewicz G, Feierl G, Schober C, Dieber F, Kofer J, Zechner R et al. Species-Specific Identification of *Campylobacters* by Partial 16S rRNA Gene Sequencing. *J Clin Microbiol* 2003; 41:2537-2546.
- [31] Heuvelink AE, van Heerwaarden C, Zwartkruis-Nahuis A, Tilburg JJ, Bos MH, Heilmann FG et al. Two outbreaks of campylobacteriosis associated with the consumption of raw cows' milk. *Int J Food Microbiol* 2008. [Epub ahead of print].
- [32] Hogardt M, Trebesius K, Geiger AM, Hornef M, Rosenecker J, Heesemann J. Specific and rapid detection by fluorescent in situ hybridization of bacteria in clinical samples obtained from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2000; 38:818-825.
- [33] Huang JL, Xu HY, Bao GY, Zhou XH, Ji DJ, Zhang G et al. Epidemiological surveillance of *Campylobacter jejuni* in chicken, dairy cattle and diarrhoea patients. *Epidemiol Infect.* 2009; 4:1-10. [Epub ahead of print].
- [34] Huysmans MB, Turnidge JD, Williams JH. Evaluation of API Campy in comparison with conventional methods for identification of thermophilic campylobacters. *J Clin Microbiol* 1995; 33:3345-3346.
- [35] Inglis GD, Kalischuk LD. Use of PCR for direct detection of campylobacter species in bovine feces. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69:3435-3447.
- [36] Jacob J, Feuerpfeil I, Schulze E. PCR-mediated DNA fingerprinting of atypical campylobacter strains isolated from surface and drinking water. *Zentralbl Bakteriol* 1996; 285:106-112.
- [37] Jensen LB, Aarestrup FM. Macrolide resistance in *Campylobacter coli* of animal origin in Denmark. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:371-372.

-
- [38] John HA, Birnstiel ML, Jones KW. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 1969; 223:582-587.
- [39] Kapperud G, Espeland G, Wahl E, Walde A, Herikstad H, Gustavsen S et al. Factors associated with increased and decreased risk of *Campylobacter* infection: a prospective case-control study in Norway. *Am J Epidemiol* 2003; 158:234-242.
- [40] Kempf VA, Trebesius K, Autenrieth IB. Fluorescent In situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. *J Clin Microbiol* 2000; 38:830-838.
- [41] Keramas G, Bang DD, Lund M, Madsen M, Bunkenborg H, Telleman P et al. Use of Culture, PCR Analysis, and DNA Microarrays for Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Chicken Feces. *J Clin Microbiol* 2004; 42:3985-3991.
- [42] Kist M. *Medizinische Mikrobiologie*. Köhler EFMPP, editor. urban & fischer[8th], 368-372, 2001.
- [43] Kolinska R, Drevinek M, Jakubu V, Zemlickova H. Species identification of *Campylobacter jejuni* ssp. *jejuni* and *C. coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and PCR. *Folia Microbiol (Praha)*. 2008; 53:403-9.
- [44] Kulkarni SP, Lever S, Logan JM, Lawson AJ, Stanley J, Shafi MS. Detection of *campylobacter* species: a comparison of culture and polymerase chain reaction based methods. *J Clin Pathol* 2002; 55:749-753.
- [45] Landegent JE, Jansen in dW, van Ommen GJ, Baas F, de Vijlder JJ, van Duijn P et al. Chromosomal localization of a unique gene by non-autoradiographic in situ hybridization. *Nature* 1985; 317:175-177.
- [46] Lang CL, Chiang CK, Hung KY, Wu KD. *Campylobacter jejuni* peritonitis and bacteremia in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clin Nephrol* 2009;71:96-8.
- [47] Lastovica AJ. Emerging *Campylobacter* spp.: the Tip of the Iceberg. 1-4-2006. *Clinical Microbiology Newsletter* Vol. 28, No. 7.

-
- [48] Lubber P, Wagner J, Hahn H, Bartelt E. Antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated in 1991 and 2001-2002 from poultry and humans in Berlin, Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:3825-3830.
- [49] Mamelli L, Prouzet-Mauleon V, Pages JM, Megraud F, Bolla JM. Molecular basis of macrolide resistance in *Campylobacter*: role of efflux pumps and target mutations. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56:491-7.
- [50] Marshall SM, Melito PL, Woodward DL, Johnson WM, Rodgers FG, Mulvey MR. Rapid identification of *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter* isolates by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 1999; 37:4158-4160.
- [51] Maruyama A, Sunamura M. Simultaneous direct counting of total and specific microbial cells in seawater, using a deep-sea microbe as target. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66:2211-2215.
- [52] Meinersmann RJ, Phillips RW, Ladely SR. Inter- and intra-genomic heterogeneity of the intervening sequence in the 23S ribosomal RNA gene of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Syst Appl Microbiol* 2009; 32:91-100.
- [53] Mooney A, Clyne M, Curran T, Doherty D, Kilmartin B, Bourke B. *Campylobacter upsaliensis* exerts a cytolethal distending toxin effect on HeLa cells and T lymphocytes. *Microbiology* 2001; 147:735-743.
- [54] Moore JE, Corcoran D, Dooley JS, Fanning S, Lucey B, Matsuda M et al. *Campylobacter*. *Vet Res* 2005; 36:351-382.
- [55] Moreno Y, Botella S, Alonso JL, Ferrus MA, Hernandez M, Hernandez J. Specific detection of *Arcobacter* and *Campylobacter* strains in water and sewage by PCR and fluorescent in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69:1181-1186.
- [56] Moreno Y, Hernandez M, Ferrus MA, Alonso JL, Botella S, Montes R et al. Direct detection of thermotolerant campylobacters in chicken products by PCR and in situ hybridization. *Res Microbiol* 2001; 152:577-582.

-
- [57] Moter A, Gobel UB. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J Microbiol Methods* 2000; 41:85-112.
- [58] Musmanno RA, Russi M, Figura N, Guglielmetti P, Zanchi A, Signori R et al. Unusual species of campylobacters isolated in the Siena Tuscany area, Italy. *New Microbiol* 1998;21:1-22.
- [59] Nachamkin I. *Campylobacter and Arcobacter*. Murray PR, editor. *Manual of Clinical Microbiology*. 1, 902-914. 2003.
- [60] On SL. Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* 2001;:1-15.
- [61] Pardue ML, Gall JG. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969; 64:600-604.
- [62] Payot S, Avrain L, Magras C, Praud K, Cloeckert A, Chaslus-Dancla E. Relative contribution of target gene mutation and efflux to fluoroquinolone and erythromycin resistance, in French poultry and pig isolates of *Campylobacter coli*. *Int J Antimicrob Agents* 2004 23:468-72.
- [63] Peterson MC. *Campylobacter jejuni* enteritis associated with consumption of raw milk. *J Environ Health* 2003; 65:20-1, 24, 26.
- [64] Phillips I, Casewell M, Cox T, De Groot B, Friis C, Jones R et al. Antibiotic use in animals. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:885.
- [65] Poly F, Guerry P. Pathogenesis of *Campylobacter*. *Curr Opin Gastroenterol* 2008; 24:27-31.
- [66] Poppert S, Hänle A. (Publikation in Vorbereitung).
- [67] Poppert S, Essig A, Stoehr B, Steingruber A, Wirths B, Juretschko S et al. Rapid diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR and fluorescence in situ hybridization. *J Clin Microbiol* 2005; 43:3390-3397.

-
- [68] Poppert S, Steingruber A, Stöhr B, Essig A, Tumani H. Differentiation of pathogens in cerebrospinal fluid by fluorescence in situ hybridization (FISH). Cerebrospinal fluid analysis in tropical neurology, COLLOQUIUM ITM, Antwerpen, Belgien. 2003.
- [69] Poppert S, Steingruber A, Stöhr B, Tumani H, Essig A. Evaluation of FISH (fluorescence in situ hybridization) for the detection and differentiation of pathogens directly in cerebrospinal fluid. DGHM Jahrestagung Dresden 2003 . 2003.
- [70] Prouzet-Mauleon V, Labadi L, Bouges N, Menard A, Megraud F. - *Arcobacter butzleri*: underestimated enteropathogen. *Emerg Infect Dis* 2006; 12:307-9.
- [71] Rigby S, Procop GW, Haase G, Wilson D, Hall G, Kurtzman C et al. Fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes for rapid identification of *Candida albicans* directly from blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2182-2186.
- [72] Ripabelli G, Tamburro M, Minelli F, Leone A, Sammarco ML. Prevalence of virulence-associated genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter* spp. isolated in Italy . *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2009. [Epub ahead of print].
- [73] Roan JN, Ko WC, Luo CY. Abdominal septic aortic pseudoaneurysm caused by *Campylobacter jejuni* infection: Report of a case. *Surg Today* 2009;39:137-40.
- [74] Robert Koch Institut. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2006.
- [75] Robert Koch Institut. Meldepflichtige Infektionskrankheiten Stand 19.12.2007. 19-12-2007.
- [76] Russmann H, Adler K, Haas R, Gebert B, Koletzko S, Heesemann J. Rapid and accurate determination of genotypic clarithromycin resistance in cultured *Helicobacter pylori* by fluorescent in situ hybridization. *J Clin Microbiol* 2001; 39:4142-4144.

-
- [77] Russmann H, Kempf VA, Koletzko S, Heesemann J, Autenrieth IB. Comparison of fluorescent in situ hybridization and conventional culturing for detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol* 2001; 39:304-308.
- [78] Samie A, Obi CL, Barrett LJ, Powell SM, Guerrant RL. - Prevalence of *Campylobacter* species, *Helicobacter pylori* and *Arcobacter* species in stool samples from the Venda region, Limpopo, South Africa: studies using molecular diagnostic methods. *J Infect* 2007;54:558-66.
- [79] Schmid MW, Lehner A, Stephan R, Schleifer KH, Meier H. Development and application of oligonucleotide probes for in situ detection of thermotolerant *Campylobacter* in chicken faecal and liver samples. *Int J Food Microbiol* 2005; 25;105:245-55.
- [80] Snaidr J, Amann R, Huber I, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63:2884-2896.
- [81] Steinhäuserová I, Cesková J, Fojtiková K, Obrovská I. Identification of thermophilic *Campylobacter* spp. by phenotypic and molecular methods. *J Appl Microbiol* 2001; 90:470-475.
- [82] Tambur Z, Miljkovic-Selimovic B, Bokonjic D. Determination of sensitivity to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from human feces. *Vojnosanit Pregl* 2009; 66:49-52.
- [83] Trebesius K, Panthel K, Strobel S, Vogt K, Faller G, Kirchner T et al. Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent in situ hybridisation. *Gut* 2000; 46:608-614.
- [84] Van Doorn PA, Ruts L, Jacobs BC. Clinical features, pathogenesis, and treatment of Guillain-Barre syndrome. *Lancet Neurol* 2008; 7:939-50.
- [85] Vandenberg O, Houf K, Douat N, Vlaes L, Retore P, Butzler JP et al. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of non-*jejuni/coli* campylobacters and arcobacters from Belgium. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57:908-13.

- [86] Vogt RL, Sours HE, Barrett T, Feldman RA, Dickinson RJ, Witherell L. Campylobacter enteritis associated with contaminated water. *Ann Intern Med* 1982; 96:292-296.
- [87] Waino M, Bang DD, Lund M, Nordentoft S, Andersen JS, Pedersen K et al. Identification of campylobacteria isolated from Danish broilers by phenotypic tests and species-specific PCR assays. *J Appl Microbiol* 2003; 95:649-655.
- [88] Wecke J, Kersten T, Madela K, Moter A, Gobel UB, Friedmann A et al. A novel technique for monitoring the development of bacterial biofilms in human periodontal pockets. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 191:95-101.
- [89] Wellinghausen N, Bartel M, Essig A, Poppert S. Rapid identification of clinically relevant *Enterococcus* species by fluorescence in situ hybridization. *J Clin Microbiol* 2007;45:3424-6
- [90] Wellinghausen N, Wirths B, Poppert S. Fluorescence in situ hybridization for rapid identification of *Achromobacter xylosoxidans* and *Alcaligenes faecalis* recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2006;44:3415-7.
- [91] Westrell T, Ciampa N, Boelaert F, Helwigh B, Korsgaard H, Chriel M et al. Zoonotic infections in Europe in 2007: a summary of the EFSA-ECDC annual report. *Euro Surveill* 2009;14.

Danksagung

An dieser Stelle gilt mein herzlicher Dank:

Prof. Dr. med. Stenger und Prof. Dr. med. Essig für das Korrigieren der Arbeit und ihre hilfreichen Anregungen.

Dr. med. Sven Poppert für die hervorragende Betreuung während dieser Arbeit, für die tatkräftige Unterstützung und die stets aufmunternden Worte.

Dem gesamten Team der Abteilung für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Ulm, allen MTAs, die mich stets mit wertvollen Tipps und Campylobacterstämmen versorgt haben, allen voran Adelinde Steingruber, Ulla Fricke und Tatjana Yildiz.

Allen "Campylobacter- Stämme- Spendern", Frau Dr. med. Edda Bartelt und Petra Luber (Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin), Prof. Dr. med. Kist (Universität Freiburg), Jaap Wagenaar und Jeroen Dijkstra (Animal Sciences Group, Wageningen; Lelystad, Niederlande) und Francis Megraud (Laboratory of Bacteriology, Hospital Pellegrin, Bordeaux, Frankreich).

Mein aufrichtiger Dank gilt meinen Eltern, die mir durch ihre großzügige Unterstützung mein Studium und diese Arbeit ermöglicht haben.

Zu guter Letzt danke ich ganz besonders Florian, für das Ertragen meiner nicht immer ganz so ausgeglichenen Launen und die liebevolle Unterstützung während dieser Arbeit.

Lebenslauf

Michaela Sabine Haas

Geboren am 13.11.1979 in Schwäbisch Gmünd

Ledig, keine Kinder

Schulbildung

1986-1990

Grundschule in Waldstetten

1990-1999

Scheffold- Gymnasium in Schwäbisch Gmünd,
Abitur mit Note 1,6

Studium

1999-2006

Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm

04.09.01

Ärztliche Vorprüfung

19.09.02

1. Staatsexamen

29.03.05

2. Staatsexamen

11.10.06

3. Staatsexamen

Famulaturen

03/02- 04/02

Prof. Dr. med. Roscher, Abteilung für Viszeral-
und Gefäßchirurgie, Klinikum Schwäbisch Gmünd

03/03

Prof. Dr. med. Marre, Abteilung für
Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität
Ulm

03/04. 04/04

Prof. Dr. med. Scharffetter- Kochanek, Klinik für
Dermatologie und Allergologie, Universität Ulm

08/04- 09/04

Dr. med. Schädel, Abteilung für Kinder- und
Jugendmedizin, Klinikum Schwäbisch Gmünd

PJ

10/05- 01/06

Prof. Dr. med. Abatanga, Abteilung für Chirurgie,
Komfo Anokye Teaching Hospital, Kumasi,
Ghana/ Westafrika; gefördert durch ein Stipendium
der Landesstiftung Baden- Württemberg

02/06- 05/06

Prof. Dr. med. Wiedemann, Abteilung für Innere
Medizin, Gastroenterologie, Onkologie,
Oberschwabenklinik, St. Elisabeth, Ravensburg

05/06- 08/06

PD Dr. med. Artlich, Abteilung für Kinder- und
Jugendmedizin, Oberschwabenklinik, Kinderklinik St.
Nikolaus, Ravensburg

Ärztliche Tätigkeit

Seit 01/2007 Assistenzärztin der Abteilung für Kinder- und Jugendmedizin, Oberschwabenklinik, Kinderklinik St. Nikolaus, Ravensburg, CA PD Dr. med. Artlich

Promotion

Seit 03/2003 Experimentelle Dissertation mit dem Thema "Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Identifizierung und Differenzierung von Campylobacterspezies sowie zum Nachweis einer Erythromycinresistenz"

09/03 Teilnahme am internationalen CHRO-Workshop (Campylobacter, helicobacter and related organisms) in Århus/Dänemark

07/04 Teilnahme am Jenaer Campylobacter-Symposium

Publikationen

06/2008 Identification of thermotolerant campylobacter species by fluorescence in situ hybridization.
Journal of Clinical Microbiology

11/2008 Detection of resistance to macrolides in thermotolerant campylobacter species by fluorescence in situ hybridization.
Journal of Clinical Microbiology