

3.4 Fachbereich 4

Bakterielle Tierseuchen und Bekämpfung von Zoonosen

- Forschung zur Entwicklung von Verfahren der Bekämpfung von Zoonosen (Infektionskrankheiten, die vom Tier auf den Menschen und umgekehrt übertragbar sind) und weiterer bakteriell bedingter Infektionskrankheiten bei Nutztieren als Voraussetzung für die Schaffung gesunder Tierbestände zur Produktion hochwertiger Lebensmittel.
- Molekularbiologische und genotypische Charakterisierung und Differenzierung von Krankheitserregern.
- Nationale Veterinärmedizinische Referenzlabore für folgende Zoonosen und anzeigepflichtige Tierseuchen: Milzbrand, Lungenseuche, Psittakose, Rauschbrand, Rotz, Tuberkulose des Rindes und Mykobakterieninfektionen der Tiere, Vibrionenabort der Rinder.

3.4.1 Detaillierte Aufgabenbeschreibung

3.4.2 Arbeitsergebnisse und experimentelle Tätigkeit des Fachbereichs in den Jahren 2000/2001

3.4.2.1 Sonderforschungs-Zwischenbericht *Campylobacter jejuni*

3.4.2.2 Sonderforschungsbericht Mykobakterien-Infektionen

3.4.2.3 Sonderforschungsbericht Rotaviren

3.4.2.4 Sonderforschungs-Zwischenbericht Ochratoxin A

3.4.3 Mitarbeit in nationalen und internationalen Gremien

3.4.1 Detaillierte Aufgabenbeschreibung

Der in Jena angesiedelte Fachbereich gliedert sich in die beiden Fachgruppen "Bakteriell bedingte Infektionskrankheiten bei Tieren" und "Bekämpfung von Zoonosen" mit jeweils sechs Fachgebieten. Die Aufgaben des Fachbereichs ergeben sich einmal durch Referenz- und Konsiliaraufgaben sowie Forschungsleistungen. Im Jahre 1996 wurde der Jenaer Fachbereich zum Nationalen veterinärmedizinischen Referenzlabor für Tuberkulose durch das BMG ernannt. Durch Auftrag des BMVEL kamen im Jahre 1998 und 2001 Referenzaufgaben im Rahmen der anzeigepflichtigen bakteriell bedingten Tierseuchen – Psittakose, Lungenseuche des Rindes, Vibrionenabort des Rindes, Rauschbrand sowie Milzbrand und Rotz – hinzu. Zu diesen anzeigepflichtigen bakteriell bedingten Infektionskrankheiten hat der Fachbereich den Auftrag erhalten, labordiagnostische Arbeitsmethoden zu formulieren und für alle Untersuchungsämter in Deutschland zur Verfügung zu stellen. 1999 wurden diese labordiagnostischen Methoden zusätzlich zu den AVID-(Arbeitskreis veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik)-Empfehlungen in einer Arbeitsanleitung zur Labordiagnostik von anzeigepflichtigen Tierseuchen des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten veröffentlicht.

Infektionserreger, die vom Tier oder über vom Tier stammende Lebensmittel auf den Menschen übertragen werden können (Zoonoseerreger), stellen eine wichtige Ursache menschlicher Erkrankungen dar. Der Schutz des Menschen vor Infektionen und Intoxikationen durch bakterielle Krankheitserreger ist ein zentrales Anliegen des gesundheitlichen Verbraucherschutzes. Die Zoonoseerreger sind meistens in doppelter Hinsicht bedeutungsvoll, und zwar zum einen als direkte Gefahr für den Menschen und zum anderen als Krankheitsursache bei den Tieren.

Generell gilt, dass Maßnahmen zum Schutz des Menschen vor solchen Erregern bereits bei den infizierten Tierbeständen einsetzen müssen. Es geht immer wieder darum, dem Grundsatz zu folgen "Nur mit gesunden Tieren ist eine optimale Produktion vom Tier stammender Lebensmittel möglich". Für den Tierbestand sind Infektionen oder Besiedlungen mit Zoonoseerregern oftmals nicht mit klinischen Symptomen verbunden. Für den Landwirt ergibt sich deshalb kein offensichtlich wirtschaftlicher Schaden, der ihn zu Bekämpfungsverfahren veranlassen könnte. Erst eine Deklaration wie "Lebensmittel aus Beständen, die frei sind von Salmonellen und anderen Zoonoseerregern" könnte in Zukunft einen Marktvorteil für den Landwirt bringen und ihn zu Maßnahmen gegen Zoonoseerreger veranlassen.

Bei der Verwirklichung dieser Vorhaben kommt der Prophylaxe eine dominante Bedeutung zu. Daraus ergibt sich für die Aufgaben des Fachbereichs eine Konzentration auf Bekämpfungsmaßnahmen in den Tierbeständen. Zur Zeit spielt in diesem Zusammenhang die Bekämpfung von Salmonellainfektionen in den Nutztier-, insbesondere den Geflügel- und Schweinebeständen eine hervorragende Rolle.

Effektive Bekämpfungsverfahren setzen genaue Kenntnisse der Krankheitsursachen, der Infektionsquellen und Übertragungswege voraus. Die Anwendung verbesserter Methoden des Erregernachweises sowie der Differenzierung im Labor angezüchteter Erreger ist eine ständige Aufgabe. Zur Erarbeitung epidemiologischer Übersichten und Zusammenhänge ist auch die weitere Übernahme von Referenzarbeiten für Erreger von Zoonosen und anzeigepflichtiger Tierseuchen durch den Fachbereich notwendig.

Bei allen Bemühungen der Mitarbeiter des Fachbereichs kommt eine hervorragende Bedeutung der Zielstellung zu, auf den bearbeiteten Gebieten den Bedarf an Beratung bzw. an Entscheidungshilfe der Bundesministerien, von Länderbehörden, Amtstierärzten, praktizierenden Tierärzten und in Einzelfällen von Institutionen der tierhaltenden Landwirtschaft sowie der Bevölkerung jederzeit schnell und sachkundig befriedigen zu können. Nachstehend werden die wichtigsten im Jahre 2000 bearbeiteten Aufgabenstellungen bzw. die erzielten Resultate zusammengefasst dargestellt.

3.4.2 Arbeitsergebnisse des Fachbereichs 4 in den Jahren 2000/2001

3.4.2.1 Sonderforschungs-Zwischenbericht *Campylobacter jejuni*: Nachweis und Charakterisierung von Virulenzfaktoren sowie Untersuchungen zur Beeinflussung des Infektionsverlaufes

Das Sonderforschungsprojekt ist in 8 Komplexe gegliedert. Diese weisen folgenden Bearbeitungsstand auf.

1. Komplex: Untersuchungen zu Virulenzfaktoren bei *Campylobacter (C.) jejuni* in Zellkulturmodellen

Invasion und Toxinbildung sind mögliche Virulenzfaktoren, die an der Pathogenese der *Campylobacter*-Infektion beteiligt sind. Das „cytolethal distending toxin“ (CDT) ist bereits genetisch definiert und gut charakterisiert. Seine biologische Bedeutung in der Pathogenese der *Campylobacter*-Infektion ist jedoch ungeklärt. Völlig offen ist auch die Frage, ob das Toxin intrazellulär gebildet wird.

Schwerpunkt unserer Untersuchungen 2001 war die Charakterisierung zellulärer Veränderungen nach Invasion von CDT-bildenden sowie nicht CDT-bildenden *C.-jejuni*-Stämmen in IEC-6-Zellen (Dünndarmzelllinie der Ratte). Es konnte nachgewiesen werden, dass einige *Campylobacter*-Stämme nach erfolgter Invasion in der Lage waren, für mindestens 48 Stunden in den Zellen zu überleben. Charakteristisch für alle untersuchten Stämme war eine starke Abnahme (etwa 90 %) der invadierten Keime innerhalb der ersten Untersuchungsstunden. Auch scheint eine Beziehung zwischen der Anzahl initial internalisierter Keime und der Dauer des intrazellulären Nachweises überlebender *Campylobacter* zu bestehen.

Die Internalisation von CDT-bildenden *Campylobacter*-Stämmen in IEC-6-Zellen führte zu einer nach 24 Stunden nachweisbaren Zellvergrößerung, welche ein morphologischer Hinweis für die Bildung des CDT ist. Im Gegensatz dazu riefen nicht CDT-bildende Stämme trotz gleichen intrazellulären Verhaltens keine zellulären Größenveränderungen hervor. Diese Ergebnisse sind ein erster Hinweis darauf, dass *C.-jejuni*-Stämme auch intrazellulär in der Lage sind, ein biologisch aktives CDT zu bilden.

Die Internalisation von *C.-jejuni*-Stämmen in IEC-6-Zellen führt zum Zelltod, der zumindest teilweise auf apoptotische Prozesse zurückzuführen ist. Der Vergleich der Apoptose, die durch CDT-bildende und nicht CDT-bildende *Campylobacter* hervorgerufen wird, zeigt, dass die Apoptose in größerem Umfang bei den CDT-bildenden Stämmen nachweisbar ist. Die Menge der im ELISA bestimmten Nukleosome, die durch Apoptose induziert werden, korreliert mit dem Zellvolumen, was für eine mögliche Beteiligung eines mit dem CDT assoziierten Faktors an der Apoptose spricht.

2. Komplex: Beziehungen zwischen der Kolonisationsfähigkeit von *C. jejuni* im Kükendarm und mutmaßlichen Virulenzfaktoren dieses Erregers

Die Arbeiten umfassen die beiden Teilkomplexe "Kolonisationsfähigkeit von *C. jejuni* im Kükendarm" sowie "Beziehungen zwischen der Kolonisationsfähigkeit und mutmaßlichen Virulenzfaktoren". Die Arbeiten zur Kolonisationsfähigkeit von *C. jejuni* im Kükendarm sind abgeschlossen und wurden im Berichtszeitraum zur Publikation eingereicht. Eine ausführliche Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich im Zwischenbericht für das Sonderforschungsprojekt im Jahr 2000.

Die Arbeiten zu den Beziehungen zwischen der Kolonisationsfähigkeit von *C. jejuni* und den mutmaßlichen Virulenzfaktoren wurden fortgeführt. Das Angehen einer Infektion und die Besiedlung des Darmkanals umfassen eine komplexe Wechselwirkung zwischen dem Wirt und

dem Mikroorganismus. Obgleich die Rolle von *C. jejuni* als wichtigem bakteriellern Diarrhoe-erreger des Menschen vielfach belegt ist, sind die spezifischen Virulenzmechanismen noch nicht aufgeklärt. Die möglichen Virulenzfaktoren von *C. jejuni* umfassen Chemotaxis und Motilität, Adhäsion, Invasion, Epitheltranslokation, intrazelluläres Überleben, Fe-Erwerb, Toxinbildung und die Kolonisationsfähigkeit. In unseren Kolonisationsversuchen mit elf *C. jejuni* bei Küken ergab sich eine, in dieser Klarheit nicht erwartete Einteilung der Isolate in drei Gruppen: Keine Kolonisation (vier Isolate), schwache oder verzögerte Kolonisation (zwei Isolate) und starke Kolonisation (fünf Isolate). Da die Mechanismen, mit deren Hilfe *C. jejuni* die Abwehrmechanismen des Wirtes überwindet weitgehend unbekannt sind, versuchten wir die elf in den Kükenversuchen geprüften *C. jejuni* hinsichtlich möglicher Virulenzfaktoren zu charakterisieren. In Zellkulturen prüften wir das Adhäsions- und Invasionsvermögen dieser Isolate. Dabei fanden wir eine deutliche Korrelation zwischen der Kolonisationsfähigkeit im Kükendarm und der Invasion von Caco-2-Zellen. Nach unserer Erkenntnis ist über einen derartigen Zusammenhang im Schrifttum nichts bekannt. Bisherige Versuche, invasions-spezifische Sequenzen bei *C. jejuni* nachzuweisen (siehe Punkt 8), um die molekularen Mechanismen für diesen Zusammenhang aufzuklären, brachten noch keine klaren Ergebnisse.

3. Komplex: Beziehungen zwischen der Kolonisationsfähigkeit von *C. jejuni* im Kükendarm und histologischen Veränderungen

Die 144 Küken der Versuchsdurchgänge 5 und 6 des Kükensolonisationsversuches, in denen insgesamt 6 verschiedene *C.-jejuni*-Isolate geprüft wurden, bildeten die Grundlage für diese Untersuchungen. Die histologische Auswertung wurde fortgeführt, ist aber noch nicht abgeschlossen, d. h. die Tiere des Versuchsdurchgangs 6 sind noch nicht abschließend befundet. Um die histologischen Veränderungen in den einzelnen Gruppen graphisch darstellen zu können, wurden für die Reaktionsstärke der Veränderungen (Epithelschädigung, Histiozytenproliferation, Granulozyteninfiltration, Propriahyperämie) Rangzahlen vergeben. Die bisherigen Befunde gestatten folgende Schlussfolgerungen:

- Die *C. jejuni* fanden sich nur selten im Epithel liegend und in Verbindung mit anderen Darminhaltsresten. Das spricht eher für eine zufällige Anlagerung als für eine vermittelte Adhäsion.
- Es gab keine auffällige Reaktion zu einem bestimmten Zeitpunkt.
- Prinzipiell nahmen die Veränderungen mit der Zeit bis 42 d nach Inokulation (p. i.) zu, danach allerdings deutlich ab.
- Insgesamt lagen im Zäkum die mit Abstand stärksten Veränderungen vor. Rektum und distales Jejunum folgten mit etwa gleicher Intensität, das proximale Jejunum ist nur sehr schwach betroffen. Die Veränderungen lagen im Zäkum und Rektum bereits 7 d p. i., im distalen Jejunum ab 21 d p. i. und im proximalen Jejunum 28 und 42 d p. i. vor. Zwischen den 4 Tieren einer Untersuchungsgruppe sowie zwischen den Darmabschnitten des gleichen Tieres gab es mitunter erhebliche Unterschiede.

Inwieweit sich eine Beziehung zwischen den pathologischen Veränderungen im Kükendarm und dem in vitro gemessenen Invasionsvermögen der *C. jejuni* ergibt, kann erst nach Vorliegen aller Befunde beurteilt werden.

4. Komplex: In-vitro-Untersuchungen zum Einfluss einer Rotavirus-Infektion auf Adhäsion, Invasion und intrazelluläre Vermehrung von *C. jejuni*

Mischinfektionen mit Beteiligung von Bakterien und Viren sind unter natürlichen Bedingungen eher die Regel als die Ausnahme und führen oft zu schwereren Erkrankungen als Infektionen mit einem der beteiligten Erreger allein. Die Frage, inwieweit spezifische oder unspezifische Mechanismen hierbei eine Rolle spielen, ist völlig ungeklärt. Unsere experimentellen Ergebnisse zum Einfluss einer Rotavirusinfektion auf eine nachfolgende Campylobacterinfektion an Caco-2-Zellen, die für beide Erreger gut empfänglich sind, wurden aufgearbeitet und zur Publikation eingereicht. Zusammenfassend konnte für keinen der drei untersuchten

Campylobacter-Stämme ein Effekt auf die Adhäsion oder Invasion nach vorausgegangener Virusinfektion der Zellen nachgewiesen werden. Die gleichzeitige Darstellung von virusinfizierten Zellen und zellassozierten Bakterien nach Doppelmarkierung ergab, dass die Bakterien sowohl im Verband mit virusinfizierten Zellen als auch mit nicht virusinfizierten Zellen vorlagen. Unsere Ergebnisse unterstützen die These, dass die bei bakteriell-viralen Mischinfektionen mit Beteiligung von *C. jejuni* beobachteten und nachgewiesenen Effekte das Resultat spezifischer Interaktionen zwischen den beteiligten Erregern und den Zellen sind.

5. Komplex: Versuche zur Isolierung eines Cytolethal Rounding Toxins (CRT)

Ausgegangen wird von einem Ultraschallextrakt des Toxin bildenden Stammes 51/89. Es wurden mehrere Methoden getestet, um das Toxin abzutrennen und damit eine partielle Reinigung zu erreichen.

- A. Dialyse an Ultrafiltrationsmembranen mit definierten Trenngrenzen bezüglich des Molekulargewichts (Filtron Makroseps 10 K und 30 K).
- B. Flüssigchromatografie (LC) über Säulen, Fraktionssammler mit verschiedenen Trägermaterialien (Sephadex G-100, Sepharose 4B, Sepharose 6B – alle Pharmacia)
- C. Ionenaustauschchromatografie (IAC) an DEAE-Sepharose CL-6B nach zwei Prinzipien
 - Elution des Proteins durch Erhöhung der Ionenstärke, d. h. Salzkonzentration bei pH = const. Gradient in Tris/HCl mit 0,15 nach 1 M NaCl
 - Elution der Proteine mit pH-Gradient von Tris/HCl pH 8,2 nach pH 4,0 mit Acetatpuffer

Methode A erzeugt einen Pool mit Hilfe von Filtration/Dialyse. Der Durchlauf ist in der Zellkultur (ZK) inaktiv. Die SDS-PAGE des Retardvolumens zeigt Hauptbanden bei 67 und 47 kDa. Der Pool ist in der ZK gegen CHO-K1-Zellen aktiv mit Toxintitern von 1 : 640, der Ultraschallextrakt roh liegt bei 1 : 2560, weil hier vermutlich noch andere zelltoxische Bestandteile wie z. B. Lipopolysaccharide enthalten sind. Das bestätigt auch die Elektrophorese als Methode der Wahl für die Prüfung der Aufreinigung.

Methode B liefert prinzipiell zwei Peaks, d. h. zwei Fraktionen. Die zweite, niedermolekulare Fraktion ist ZK-aktiv, während die vorlaufende hochmolekulare Fraktion sehr niedrige oder keinen Titer aufweist. Die Elektrophoresen mit Färbung auf Protein zeigen Banden bei 67 und 43-47 kDa sowie wenige, sehr schwache Banden im niedermolekularen Bereich.

Methode C bringt im Vergleich zu B eine bessere Auftrennung des Ultraschallextraktes. Bei pH 8,2 laufen ZK-inaktive Substanzen bei Elution voraus. Sie sind als Verunreinigungen u.a. aus der Kultur zu charakterisieren. Die ZK-aktiven Verbindungen bleiben auf dem Trägermaterial bei pH 8,2 adsorbiert. Bei der Elution nach Salzgradient oder pH-Gradient sind sie mit jeweils zwei getrennten Fraktionen eluierbar. Die erste Fraktion der Gradientenelution ist in der ZK aktiv, die zweite nur noch schwach oder negativ. Damit ist eine Aufreinigungsmöglichkeit für das Toxin von *C. jejuni* erarbeitet worden. Die Elektrophorese der ersten Fraktion bei Gradientenelution zeigt ebenfalls wie in A oder B starke Banden bei 67 und 43-47 kDa.

Außer Reinigungsversuchen wurden durchgeführt:

- Lagerung zelltoxischer Fraktionen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ über 15,5 Monate, danach Prüfung in der Zellkultur (ZK)
- Wie oben, aber bei Lagerung mit PMSF als Proteaseinhibitor
- Einarbeitung einer isoelektrischen Fokussierung zur Prüfung der Einheitlichkeit der gereinigten aktiven Fraktion (SDS-PAGE zeigt evtl. nur Bruchstücke eines großen Proteinmoleküls). Damit kann die Frage geklärt werden, ob es sich um ein einziges Protein handelt oder der zytotoxische Effekt durch zwei Proteine hervorgerufen wird.

Aussagen:

- Im Vergleich zu anderen in der Literatur beschriebenen Toxinen produziert *C. jejuni* ein über 15,5 Monate bei -20 °C mit unverminderter Aktivität haltbares Protein.
- Nach Aufreinigung ist es in der SDS-PAGE durch zwei intensive Banden in der Coomassie-Färbung bei 67 sowie 43-47 kDa charakterisiert.
- Eine gute Aufreinigung des Ultraschallextraktes erreicht man mit Hilfe der Ionenaustauschchromatografie an DEAE-Sephrose CL-6B mit Salz- oder pH-Gradientenelution.

6. Komplex: In-vitro-Untersuchungen zur Bedeutung von Zytokinen nach Infektion intestinaler Zellen mit *C. jejuni*

Die durch *C. jejuni* verursachten Erkrankungen sind durch Entzündungsreaktionen und Gewebeerstörungen charakterisiert. Die Entwicklung entzündlicher Prozesse wird von Zytokinen gesteuert, die u.a. durch intestinale Epithelzellen gebildet werden. Die Bildung dieser Zytokine wird durch das Adhärenz bzw. Invadieren pathogener Bakterien an Darmepithelzellen induziert und stellt die ersten Signale einer Infektion dar. Erhöhte Interleukin-Spiegel liefern somit Hinweise auf eine bakterielle Infektion. Beschrieben ist die Bildung von Interleukin 6, Interleukin 2 und Interleukin 8 durch *Salmonella* spp., *E.coli*, *Listeria monocytogenes* und *Yersinia enterocolitica*.

Wir prüften deshalb in Vorversuchen die Bildung von Interleukin 2, Interleukin 6 und Interleukin 8. Der Nachweis der Interleukine im Zellkulturüberstand erfolgte nach dreistündiger Inkubation von humanen Caco-2- und Ratten-Darmepithelzellen (IEC-6) mit verschiedenen *Campylobacter*-Stämmen und nachfolgender Inkubation der Zellkultur (ZK) über 24 bzw. 48 h. Zur quantitativen Bestimmung der Interleukine wurden kommerzielle ELISA verwendet, wobei die Nachweisgrenzen für IL-2 15 pg/ml, für IL-6 10 pg/ml und für IL-8 12 pg/ml betragen. Sowohl im humanen als auch im Ratten-System wurde weder IL-2 noch IL-6 nachgewiesen. Aus diesem Grund beschränkten wir uns in den nachfolgenden Versuchen auf Interleukin 8.

Intakte Monolayer von INT-407-Zellen wurden mit *Campylobacter*-Stämmen, die durch unterschiedliches Invasionsverhalten charakterisiert sind, inkubiert. Nach 4h, 24h bzw. 48h wurden die Interleukin-8-Gehalte in den sterilfiltrierten Zellkulturüberständen mittels ELISA (Bio-source) bestimmt. Insgesamt wurden elf Stämme untersucht.

Die ersten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die Interleukin-8-Bildung ist im Bereich von 10^8 bis 10^5 CFU/ml keimzahlabhängig und nimmt mit abnehmender Keimzahl ebenfalls ab.
- Nach 48 h Einwirkungszeit der *Campylobacter* auf die Zellen waren diese größtenteils lysiert, so dass in den nachfolgenden Versuchen auf diese Zeit verzichtet wurde.
- Nach 4 h wurde nur beim Stamm T 313 gegenüber der Zellkontrolle ein erhöhter Interleukin-8- Spiegel gefunden (Zellkontrolle: 34 pg/ml; T313: 75 pg/ml).
- Nach 24 h induzieren alle *Campylobacter*-Stämme die Interleukin-8-Bildung. Dabei kann eine vorläufige Einteilung der untersuchten Stämme in drei Gruppen vorgenommen werden:
 Gruppe 1: bis 200 pg/ml, dazu gehören: 984djLn, 73/96, 51/89 und 157/96.
 Gruppe 2: 300 bis 500 pg/ml: 340 W, T 313, P1, Z/2
 Gruppe 3: > 500 pg: 81116, C130, 158/96.
- Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Interleukin-Bildung neben dem Adhäsions- und Invasionsverhalten der Stämme noch durch andere Faktoren, möglicherweise durch die CDT-Bildung, beeinflusst wird.

7. Komplex: Nachweis speziesspezifischer Sequenzen bei *Campylobacter* mittels PCR in Probenmaterial

Insbesondere bei dem Nachweis thermophiler *Campylobacter* in Organproben ergaben sich methodische Grenzen, die derzeit kaum zu überwinden sind. Dadurch erscheint eine weitere Bearbeitung dieser Teilaufgabe im Moment wenig sinnvoll. Die hier freigesetzten Kapazitäten flossen in den Aufbau des nationalen Referenzlabors für Milzbrand und in die Etablierung der Nachweismethoden für diesen Erreger ein.

8. Komplex: Nachweis invasionsspezifischer Sequenzen bei *C. jejuni* mittels PCR

Zum Nachweis invasionsspezifischer Sequenzen wurden in ersten Untersuchungen aus der bekannten Sequenz der Invasionsdeterminante von *E. coli* H 10407 Primer ausgewählt und mittels PCR eine DIG-markierte Sonde hergestellt. Die Hybridisierung dieser Sonde mit den durch Restriktion mit Hha I, Cla I, Bgl III, Pst I und Bgl III+Pst gewonnenen DNA-Fragmenten von fünf verschiedenen invasiven *C.-jejuni*-Stämmen ergab das Nichtvorhandensein dieser Invasionsdeterminante in den fünf *C.-jejuni*-Genomen.

In die weiteren Untersuchungen zum Nachweis von Invasionsgenen in *C. jejuni* wurden elf Stämme mit unterschiedlichem Invasionsverhalten in den Caco-2- und IEC-6-Zelllinien, von nicht invasiv bis stark invasiv, einbezogen. Auf der Basis bekannter Sequenzen von Invasionsgenen in *Salmonella (S.) enterica* wurde nach homologen Sequenzen in *C. jejuni* gesucht. Aus den Sequenzen der Invasionsgene InvA, InvE, InvH und InvN wurden Primerpaare ausgewählt und mittels PCR nach homologen Bereichen an der chromosomalen DNA getestet. Da ein Stamm mit allen Primerpaaren Ausnahmefragmente lieferte und schließlich genotypisch nicht *C. jejuni* zugeordnet werden konnte, wurde er bei den folgenden Ergebnissen nicht weiter berücksichtigt.

Mit den Primern Sal InvA1/A2 konnten für sieben Stämme Fragmente bei 450 bp bzw. 350 bp gefunden werden, wobei die mitgeführten invasiven *S.-enterica*-Stämme ein Amplifikat von 1000 bp lieferten.

Ein ähnliches Ergebnis wurde für das Primerpaar Sal InvE1/E2 erhalten. Hierbei wurde bei sieben Stämmen ein 750 bp-Fragment amplifiziert, während ein Stamm negativ war und ein weiterer nur ein 300 bp-Fragment lieferte. Bei zwei Stämmen konnte zusätzlich ein 900 bp-Fragment erhalten werden. Das entsprechende *S.-enterica*-Invasionsgen wurde bei 600 bp detektiert.

Das bei *S. enterica* intensiv untersuchte Invasionsgen H ergab für alle *C.-jejuni*-Stämme keine homologen Sequenzen. Mit den Primerpaaren Inv H1/H3 und Inv H2/H3 konnte kein Amplifikat nachgewiesen werden. Ebenso wurde mit den Primern Sal InvN1/N2 kein PCR-Fragment detektiert.

Mit drei Primerpaaren aus der für *S. typhimurium* beschriebenen Invasionsgenkaskade prg H-J-K wurden ebenfalls die *C.-jejuni*-Stämme untersucht. Mit dem Primerpaar prg H1/H2 konnte für acht Stämme ein 400 bp-Fragment gefunden werden, während ein Stamm ein 300 bp-Fragment lieferte und ein Stamm gänzlich negativ war. Das entsprechende *S.-enterica*-Fragment war bei 1300 bp zu finden.

Mit dem Primerpaar prg J1/K1 wurde nur in drei Stämmen ein 300 bp-Fragment amplifiziert, wobei das *S.-enterica*-Fragment bei 1500 bp zu finden war.

Schließlich konnte mit dem Primerpaar prg J2/J3 für alle *C.-jejuni*-Stämme ein deutliches 900 bp-Amplifikat detektiert werden, wobei das *S.-enterica*-Fragment bei 1500 bp zu finden war.

In keinem Fall der detektierten PCR-Amplifikate konnte eine Korrelation zu dem phänotypischen Invasionsverhalten der untersuchten C.-jejuni-Stämme festgestellt werden. Aus diesem Grund wurden die detektierten Amplifikate nicht weiter untersucht.

Auf das inzwischen in der Literatur für C.-jejuni beschriebene Invasionsgen *ciaB* wurden die zehn Stämme ebenfalls getestet. Dabei wurde mit dem Primerpaar *CiaB1/B2* in allen Stämmen ein 2000 bp-Amplifikat erhalten. Damit konnte das Invasionsgen *ciaB* im Chromosom aller getesteten C.-jejuni-Stämme nachgewiesen werden. Auch die von Ramos-Cervantes et al. erst kürzlich beschriebene genetische Variabilität im *iam*-Locus hat sich für unsere untersuchten Stämme nicht bestätigt. Mit dem Primerpaar *Ciam3/5* wurde in allen Stämmen ein 500 bp-Fragment amplifiziert, während mit dem Primerpaar *Ciam 4/6* alle C.-jejuni-Stämme negativ waren.

Aus dem Ergebnis der letzten drei Primerpaare kann geschlussfolgert werden, dass das unterschiedliche Invasionsverhalten der hier untersuchten C.-jejuni-Stämme nicht auf den hier untersuchten chromosomalen Abschnitten determiniert ist. Es könnte durch unterschiedliche Transkription bzw. Expression der Invasionsgene verursacht werden. Des Weiteren gibt es die Möglichkeit der plasmidkodierten Invasion. Zu diesem Fragenkomplex sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Frank Schulze

3.4.2.2. Sonderforschungsbericht Mykobakterieninfektion

Zielstellung des Projekt war es, *M.-bovis*-Stämme mit zwei molekularbiologischen Methoden - dem Spoligotyping und dem RFLP-Verfahren auf der Basis des Insertionssegments IS 6110 - individuell so zu charakterisieren, dass ein Vergleich der Stämme aus unterschiedlichen Ausbrüchen möglich wird und epidemiologische Zusammenhänge aufgeklärt werden können.

Insgesamt wurden 116 *M.-bovis*-Stämme aus 28 Rindertuberkuloseausbrüchen, sieben Geschehen bei Zoo- und Wildtieren und vier Tuberkulosen beim Menschen bearbeitet, die mit dem Spoligotyping in 16 verschiedene Typen eingeordnet werden konnten. 67 Stämme waren acht unterschiedlichen *M.-bovis*-Typen im engeren Sinne, 46 Stämme sechs *M.-bovis spp. caprae*-Typen und drei Stämme zwei bisher nicht beschriebenen Typen zuzuordnen. Befunde aus der Literatur deuten darauf hin, dass die *M.-bovis spp caprae*-Isolate besonders in Zentral- und Osteuropa einschließlich Deutschland verbreitet sind und, was besonders hervorzuheben ist, aus humanmedizinischem Material isoliert werden. Diesem eventuellen epidemiologischen Zusammenhang muss zukünftig weiter nachgegangen werden.

96 der 116 Stämme wurden auch mit der RFLP-IS 6110-Methode untersucht. 49 der *M.-bovis*-Isolate konnten in sieben, 47 der *M.-bovis spp caprae*-Isolate in 23 RFLP – Typen unterschieden werden, wobei zu bemerken ist, daß sich ein Spoligotyp von *M. bovis spp caprae* in 14 RFLP-Typen aufspaltete.

Anhand der Ergebnisse konnte gefolgert werden, dass zwei Ausbrüche in Landwirtschaftsbetrieben, die 300 km von einander entfernt waren, in einem engen epidemiologischen Zusammenhang stehen. Durch Verkauf von infizierten Jungrindern wurde die Krankheit verschleppt. In ähnlicher Weise gelang der Beweis über den Zusammenhang von zwei Gruppenausbrüchen in zwei unterschiedlichen Gemeindeverbänden. In einem Fall waren die Stämme von fünf isolierten Ausbrüchen einer

bestimmten Kombination von *M. bovis* im engeren Sinne, in dem zweiten Fall von vier isolierten Ausbrüchen einer bestimmten Kombination von *M. bovis spp caprae* zuzuordnen.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die beiden molekularbiologischen Verfahren auf unterschiedlicher genetischer Grundlage sehr gut zur Typisierung von *M.-bovis*-Isolaten für epidemiologische Untersuchungen genutzt werden können.

Ein weiterer Schwerpunkt des Sonderforschungsprojektes beschäftigte sich mit der *M.-avium*-Infektion beim Schwein. In den letzten Jahren haben *M.-avium*-Infektion bei Menschen deutlich an Bedeutung gewonnen, insbesondere bei HIV-Patienten; die Infektionsquellen können meistens nicht aufgeklärt werden.

Andererseits treten relativ häufig *M.-avium*-Infektionen in Schweinebeständen auf, die am Schlachthof als tuberkulöse Lymphknotenveränderungen fleischhygienisch schwierig zu beurteilen sind. In Versuchen mit *M. avium* an Ferkeln konnte gezeigt werden, dass nach oraler Verabreichung dieses Keimes bei allen Tieren aus unterschiedlichen Organen *M. avium* angezüchtet werden konnte, so dass infizierte Schweine als potentielle Infektionsquelle für den Menschen in Betracht gezogen werden müssen.

Um dieser Frage in Zukunft intensiver nachgehen zu können wurden zwei molekularbiologische Verfahren (Pulsfeldgelelektrophorese und RFLP-IS 1245) zur Typisierung von *M.-avium*-Isolaten erfolgreich eingearbeitet.

Wilfried Erler

3.2.4.3 Sonderforschungsbericht Rotaviren: Untersuchungen zur molekularen Epidemiologie der animalen Gruppe-A-Rotaviren sowie der atypischen Rotaviren (Gruppe B bis G)

Etablierung einer RT-PCR zum Nachweis von Gruppe-A-Rotaviren

Methodik

Rotavirusstämme verschiedener Spezies [humanes Rotavirus (RV) Wa, bovines RV BRV-UK, porcines RV OSU canines RV CU-1, felines RV Cat97, equines RV FI23, ovines RV KR] sowie Rotavirus-positive Kotproben verschiedener Spezies wurden in die Untersuchungen einbezogen. Die Auswahl der Primer erfolgte auf der Grundlage der Sequenzdaten des Gensegmentes 6 des porcinen RV Gottfried (Genbank-Nr. D00326) sowie des bovinen RV BRV-UK (Genbank-Nr. X53667). Das Produkt der RT-PCR ist 309 Basepaare (bp) lang und nach der nested PCR entsteht ein 121 bp-langes Amplifikat. Zur Bestimmung der Sensitivität der nested RT-PCR wurde eine Verdünnungsreihe des porcinen RV OSU ($10^{6,25}$ TCID₅₀/ml) in PBS getestet. Vergleichend dazu erfolgte die Untersuchung einer Verdünnungsreihe, wobei das porcine RV OSU einer Rotavirus-negativen Kotprobe zugegeben wurde. Ausgehend von den jeweiligen Infektiositätstitern wurde die Anzahl der infektiösen Virionen je PCR-Ansatz bzw. je g Kot berechnet. Die Überprüfung der Spezifität der RT-PCR erfolgte durch Restriktionsenzym-Analyse sowie durch Sequenzbestimmung der Amplifikationsprodukte des bovinen Rotavirusstammes BRV-UK (Genbank-Nr. X53667).

Ergebnisse

Nach der Durchführung der RT-PCR und der nested PCR konnten bei allen Virusstämmen und untersuchten Kotsuspensionen 309 bp- bzw. 121 bp-Fragmente im Agarosegel nachgewiesen werden. Die Untersuchung der Verdünnungsreihe des Virusstammes OSU ergab nach der ersten Amplifikation bis zur Verdünnung mit 3×10^{-2} TCID₅₀ detektierbare 309bp-Amplifikate. In der anschließend durchgeführten nested PCR konnte bis zur Verdünnung mit 3×10^{-3} TCID₅₀ ein 121bp-Amplifikat nachgewiesen werden. Um den Einfluss des Probenmaterials auf die Empfindlichkeit der Methode zu überprüfen, erfolgte die Zugabe von virushaltiger Zellkultursuspension des porcinen RV OSU in eine Rotavirus-negative Kotprobe. Dabei konnte nach der ersten Amplifikation bis zu einer Verdünnung mit 0,6 TCID₅₀ ein 309bp-Produkt nachgewiesen werden. Dies entspricht nach Hochrechnung auf das Ausgangsmaterial ca. 160 TCID₅₀ je g Kot. In der nachfolgend durchgeführten nested PCR konnten bis zur Verdünnung mit 0,06 TCID₅₀ 121bp-Amplifikate nachgewiesen werden, was einer Nachweisgrenze von 16 TCID₅₀ je g Kot entspricht.

Schlussfolgerungen

Die beschriebene PCR zum Nachweis von Gruppe-A-Rotaviren weist eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität auf. Es können Rotaviren verschiedener Spezies einschließlich Mensch nachgewiesen werden.

Etablierung einer Nested RT-PCR zur Serotypisierung von Gruppe-A-Rotaviren

Methodik

112 Kotproben von durchfallkranken Kälbern aus einer Milchviehherde mit ca. 1000 Milchkühen aus den Jahren 1990, 1991, 1993, 1994, 1997 und 2000 wurden untersucht. Nach Isolierung der Rotavirus-RNA wurden eine seminested RT-PCR durchgeführt mit von Isegawa et al.(1993) beschriebenen Serotyp-spezifischen Primern für die Rotavirustypen G6, G10 sowie die Typen P1, P5 und P11.

Ergebnisse

Der dominierende Typ war G10P[5] in 41,1% der Proben, G6P[5] in 30,4% der Proben und Mischinfektionen mit G6/10P[5] in 15,2% der Fälle. Während des Jahres 1990 dominierte der Serotyp G10, aber 1991 konnten nur G6-Typen nachgewiesen werden. Während 1993-1994 dominierte wieder der Serotyp G10, aber eine große Anzahl von Mischinfektionen trat auf. 1997 und 2000 waren ausschließlich Stämme vom Serotyp G6 nachweisbar.

Der P-Genotyp scheint dagegen mehr stabil zu sein. Während der Jahre 1990-2000 war P[5] stets der dominierende Genotyp. Nur während 1991-1993 traten einige wenige P[11]-Typen und einige Mischinfektionen mit P[5] und P[11] auf.

Schlussfolgerungen

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Rotavirus-Serotypen innerhalb eines Bestandes nicht über längere Zeiträume persistieren. Der dominierende Serotyp kann innerhalb eines Jahres wechseln. Der Zukauf von trächtigen Färsen aus anderen Herden im Jahr 1990 könnte in diesem Fall die Erklärung für das Auftreten neuer Kombinationen von G- und P-Typen und das häufigere Auftreten von Mischinfektionen während 1991-1994 sein. Während der letzten Jahre der Studie wurden ausschließlich G6P[5]-Stämme gefunden. Ob dies der dominierende Typ für einen längeren Zeitraum sein wird, soll in weiterführenden Untersuchungen ermittelt werden.

Mandy Elschner

3.4.2.4 Sonderforschungs-Zwischenbericht: Ochratoxin A: In-vitro-Untersuchungen zur immunmodulatorischen Wirkung von Ochratoxin A und weiteren sekundären Metaboliten OTA-bildender Pilze als Beitrag zur Risikoabschätzung für den Menschen

Eine Studie zur "Belastung des Verbrauchers und der Lebensmittel mit Ochratoxin A" ergab für Deutschland Hinweise auf eine chronische Exposition des Verbrauchers mit geringen Dosen des Mykotoxins Ochratoxin A (OTA). Welche Gefährdung für die Gesundheit des Menschen von diesen Konzentrationen ausgeht, ist bisher völlig ungeklärt.

Im Rahmen des Sonderforschungsprojektes wurden immuntoxikologische In-vitro-Untersuchungen durchgeführt, von denen Informationen über subtile Veränderungen in immunologischen Funktionen unter Einwirkung geringster Konzentrationen des Toxins erwartet wurden. In die Untersuchungen wurden OTA und weitere Stoffwechselprodukte OTA-produzierender Pilze einbezogen, die in natürlich kontaminierten Nahrungs- und Futtermitteln möglicherweise gleichzeitig vorkommen können. Es wurden dosis- und zeitabhängige Effekte auf immunregulatorische Mechanismen (Produktion der Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 und TNF α durch Lymphozyten und Monozyten) und auf Immuneffektorfunktionen (Phagozytose, Bildung freier Sauerstoffradikale, Stoffwechselaktivität und Differenzierung von Monozyten, Aktivität natürlicher Killerzellen) zum Teil an ex-vivo gewonnenen Immunzellen vom Schwein und z.T. an humanen Zell-Linien untersucht.

Unsere bisherigen Ergebnisse zeigen, dass Ochratoxin A und weitere Metaboliten OTA-produzierender Pilze schon beim kurzzeitige Einwirken in niedrigen Konzentrationen Dysregulationen von wichtigen Immunvorgängen hervorrufen. Hierzu gehören die TNF- α -Produktion, die Bildung freier Sauerstoffradikale, die metabolische Aktivität und die Differenzierungsfähigkeit von Monozyten zu Makrophagen, die bei der Abwehr bakterieller Infektionserreger oder von entarteten Zellen (Tumorzellen) von wesentlicher Bedeutung sein können.

Unsere Untersuchungen ergaben weiterhin, dass Ochratoxin C, dessen Vorkommen bisher in verschiedenen Weiß- und Rotweinen nachgewiesen, für andere Lebensmittel aber kaum untersucht worden ist, in vielen immunologischen Reaktionen die Wirkungen von OTA und allen anderen geprüften Metaboliten z. T. erheblich übertraf. Welche Gefährdung hiervon für die menschliche Gesundheit ausgeht, ist nach dem derzeitigen Kenntnisstand nicht zu beurteilen.

Heike Köhler

3.4.3 Mitarbeit in internationalen Gremien

- EU-Projekt (FAIR6-CT98-4006) "Novel Mechanisms of Live, Bacterial Vaccines in Protection against Salmonella and other Food-Borne Zoonoses" (Großbritannien, Deutschland, Tschechien, Ungarn, Belgien, Frankreich, Niederlande)
- EU-Projekt (FAIR6-CT98-4373) "Concerted action for the setting up of a European veterinary network on diagnosis, epidemiology and research of Mycobacterial diseases"
- COST-Aktion 826 "Mykoplasmosen der Wiederkäuer", unter Beteiligung von Forschungseinrichtungen aus etwa 15 europäischen Ländern, Laufzeit: 01/96 bis 12/2000, Geldgeber: BMBF (nur Reisemittel)