

**Zuordnung von  
*Brachyspira hyodysenteriae*-Feldisolaten  
aus deutschen und ausländischen  
Schweinebeständen zu Serotypen  
und Serogruppen**

---

**Simone Schneider**

**INAUGURAL-DISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. em. Dr. Dr. habil. G. Baljer

**Zuordnung von**  
***Brachyspira hyodysenteriae*-Feldisolaten**  
**aus deutschen und ausländischen**  
**Schweinebeständen zu Serotypen**  
**und Serogruppen**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Simone Schneider**

Tierärztin aus Siegen

Gießen 2013

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. em. Dr. Dr. habil. Georg Baljer  
Prof. Dr. Dr. Gerald Reiner

Tag der Disputation: 06.05.2014

*In Memoriam*  
Meinem Bruder

R.I.P. my brother.  
My thoughts are always with you until we meet again.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Poster:

Herbst, W., S. Schneider, G. Baljer, S. Barth (2012): Serotyping of German and European *Brachyspira hyodysenteriae* isolates. Tagung der Fachgruppe Bakteriologie und Mykologie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, 27.-29. Juni, Leipzig, Deutschland.

Herbst, W., S. Schneider, G. Baljer, S. Barth (2013): Serological diversity of *B. hyodysenteriae*. 16th International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, June 5-8, 2013 in Berlin, Germany.

Herbst, W., S. Schneider, G. Baljer, S. Barth (2013): Differentiation of Mainly European *Brachyspira hyodysenteriae* Isolates by Immunoblot Analysis of their LOS with Serotype-Specific Antisera. 6<sup>th</sup> International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, Guildford, UK, 5<sup>th</sup>-6<sup>th</sup> September

Diese Arbeit wurde finanziell gefördert durch ein Stipendium der H. Wilhelm Schaumann Stiftung und eine Sachbeihilfe der Firma Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH.

# Inhaltsverzeichnis

	Inhaltsverzeichnis .....	V
	Verzeichnis der Abkürzungen.....	VIII
<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Schrifttum .....</b>	<b>3</b>
2.1	Die Dysenterie des Schweines .....	3
2.1.1	Ätiologie .....	4
2.1.2	Diversität von <i>B. hyodysenteriae</i> .....	5
2.1.2.1	Serotypisierung .....	5
2.1.2.2	Biodiversität.....	11
2.1.2.3	Genetische Diversität.....	12
2.1.3	Immunantwort nach natürlicher und experimenteller Infektion.....	15
2.1.3.1	Humorale Immunantwort.....	16
2.1.3.2	Zelluläre Immunantwort.....	17
2.1.3.3	Antigene .....	18
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>21</b>
3.1	Materialien.....	21
3.1.1	Referenzstämme.....	21
3.1.2	Feldisolate.....	21
3.1.3	Lagerung der Brachyspiren.....	22
3.2	Bakteriologische Methoden.....	22
3.2.1	Anzucht .....	22
3.2.2	Keimzahlbestimmung.....	23
3.2.3	Reinheitskontrolle.....	23
3.3	Präparation von LOS-Fraktionen .....	23
3.4	Analyse der LOS-Fraktionen.....	25
3.4.1	Proteinase K-Verdau der LOS-Fraktion .....	25
3.4.2	SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese).....	25
3.4.3	Zinkfärbung von SDS-PA-Gelen .....	25
3.4.4	Silberfärbung von SDS-PA-Gelen.....	25
3.5	Antikörperbestimmung .....	26
3.5.1	Konjugat .....	26
3.5.2	Immunoblot .....	26
3.5.3	Immundiffusionstest .....	27

3.6	Tierexperimentelle Methoden.....	27
3.6.1	Herstellung polyklonaler Antiseren gegen Referenzstämme und Feldisolate in Kaninchen .....	27
3.6.1.1	Tiere.....	27
3.6.1.2	Tierhaltung .....	27
3.6.1.3	Impfantigene .....	27
3.6.1.4	Impfung und Serumgewinnung .....	28
3.7	Datenhaltung und Auswertung.....	29
3.7.1	Bilddokumentation.....	29
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>31</b>
4.1	Reaktivität der Antiseren mit den zur Impfung verwendeten Referenzstämmen und Isolaten .....	31
4.1.1	Nebenwirkungen der verwendeten Antigene .....	31
4.1.2	Nachweis LOS-präzipitierender Antikörper nach Immunisierung mit Ganzzelllysaten.....	31
4.1.2.1	Reaktionen Serotyp-spezifischer Antiseren mit homologen und heterologen LOS-Präparationen im IDT.....	33
4.1.2.2	Reaktivität der Serotyp-spezifischen Antiseren mit LOS-Präparationen vor und nach Proteinase K-Verdau .....	34
4.1.3	Optimierung der LOS-Präparationen für die Verwendung im Immunoblot.....	36
4.1.3.1	Standardisierung der LOS-Präparationen für die Untersuchungen im Immunoblot .....	36
4.1.4	Wahl der geeigneten Antiserumverdünnungen für die Typisierung im Immunoblot .....	38
4.1.5	Bestimmung Serotyp-spezifischer LOS-Profile für die serologische Zuordnung.....	39
4.1.5.1	Charakteristika der Antiseren gegen die Serotypen 1 bis 7 und Serogruppen H und I.....	41
4.1.6	Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Immunoblots der LOS-Präparationen der Referenzstämme mit den homologen und heterologen Antiseren gegen die Referenzstämme .....	42
4.1.7	Vergleichende Charakteristika der gegen deutsche <i>B. hyodysenteriae</i> -Isolate generierten Antiseren.....	42
4.1.7.1	Kreuzreaktionen der Referenzstämme und der zur Immunisierung verwendeten deutschen Isolate im Immunoblot.....	44
4.2	Serologische Charakterisierung von deutschen Feldisolaten .....	45
4.3	Serologische Charakterisierung von ausländischen Isolaten.....	46
4.3.1	Feldisolate aus Dänemark .....	46
4.3.2	Feldisolate aus Spanien.....	47
4.3.3	Feldisolate aus Japan .....	48
4.3.4	Aktuelle amerikanische Feldisolate.....	49



4.4	Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse der serologischen Charakterisierung mit den deutschen und ausländischen Feldisolaten .....	49
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>57</b>
	<b>Summary .....</b>	<b>59</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>60</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>67</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>72</b>
9.1	Abbildungsverzeichnis .....	72
9.2	Tabellenverzeichnis .....	72
	<b>Danksagung .....</b>	<b>74</b>

## Verzeichnis der Abkürzungen

°C	°Celsius	n	Stichprobenumfang
<b>A.</b>	<i>Aqua</i>	<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection	<b>n. b.</b>	nicht bestimmt
<b>B.</b>	<i>Brachyspira</i>	<b>nm</b>	Nanometer
<b>BHI</b>	brain-heart-infusion (Nährbouillon)	<b>nox</b>	Gen der NADH-Oxidase für Aerotoleranz
<b>BHIF</b>	brain-heart-infusion mit fetalem bovinen Serum	<b>o. a.</b>	oben angegeben
<b>bhlp29,7</b>	Gen zu Bhlp29,7	<b>OMP</b>	Outer Membrane Proteins
<b>bzw.</b>	beziehungsweise	<b>Osp</b>	Outer surface proteins
<b>cm</b>	Zentimeter	<b>PAGE</b>	Polyacrylamidgelelektrophorese
<b>d</b>	Tage	<b>PBS</b>	Phosphat-Buffered-Saline
<b>DK</b>	Isolat aus Dänemark	<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction (=Polymerase-Kettenreaktion)
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid (=Desoxyribonukleinsäure)	<b>PEG</b>	Polyethylenglycol
<b>E.</b>	<i>Escherichia</i>	<b>PFGE</b>	Pulsfeldgelelektrophorese
<b>E</b>	Isolat aus Spanien (Espana)	<b>p. i.</b>	<i>post infectionem</i>
<b>ET</b>	Elektrophoretische Typen	<b>RAPD</b>	Random Amplified Polymorphic DNA-Methode
<b>FBS</b>	fetales bovines Serum	<b>REA</b>	Restriktionsendonuklease-Analyse
<b>g</b>	Erdschwerebeschleunigung	<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>G</b>	Isolat aus Deutschland (Germany)	<b>RFLP</b>	Restriktionsfragmentlängen-polymorphismus-Analyse
<b>h</b>	Stunde	<b>s.</b>	siehe
<b>HCl</b>	Chlorwasserstoff	<b>s. c.</b>	subkutan
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Wasserstoffperoxid	<b>SD</b>	Schweinedysenterie
<b>IDT</b>	Immundiffusionstest	<b>SDS</b>	Sodium (=Natrium)-Dodecylsulfat
<b>Ig</b>	Immunglobulin	<b>sec</b>	Sekunde
<b>IL</b>	Interleukin	<b>s. o.</b>	siehe oben
<b>i. m.</b>	intramuskulär	<b>ST</b>	Sequenztypen
<b>ISU</b>	Iowa State University	<b>T.</b>	<i>Treponema</i>
<b>i. v.</b>	intravenös	<b>TiHo</b>	Tierärztliche Hochschule Hannover
<b>J</b>	Isolat aus Japan	<b>TSA</b>	Trypticase-Soja-Agar
<b>k. A.</b>	keine Angabe	<b>TV</b>	Tierversuch
<b>kDa</b>	Kilodalton	<b>u. a.</b>	unter anderem
<b>KGW</b>	Körpergewicht	<b>U/min</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>LOS</b>	Lipooligosaccharid	<b>USA</b>	United States of America
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid	<b>UV</b>	Ultraviolettes Licht
<b>M</b>	Molar	<b>v</b>	Volumen
<b>mA</b>	Milliampere	<b>v. a.</b>	vor allem
<b>mg</b>	Milligramm	<b>vsp</b>	variable surface protein
<b>min</b>	Minute	<b>vsp</b>	Gen zu vsp
<b>ml</b>	Milliliter	<b>w</b>	Masse
<b>MLEE</b>	Multilocus enzyme electrophoresis-Test	<b>WbE<sub>50</sub>/ml</b>	Wachstum-bildenden Einheiten 50 je ml
<b>MLST</b>	Multilocus Sequenz Typisierung	<b>z. B.</b>	zum Beispiel
<b>mm</b>	Millimeter	<b>z. T.</b>	zum Teil
<b>MU</b>	Murdoch University		
<b>µl</b>	Mikroliter		

# 1 Einleitung

Die Schweinedysenterie (SD) ist eine weltweit verbreitete und wirtschaftlich sehr bedeutende Krankheit heranwachsender Schweine. Klinisch steht eine mukohämorrhagische Diarrhö im Vordergrund der Symptomatik. Der erst viel später nach Erstbeschreibung der SD (Whiting *et al.* 1921) nachgewiesene Erreger, *Brachyspira (B.) hyodysenteriae* (Taylor und Alexander, 1971), bildet mit weiteren *Brachyspira* spp. das einzige Genus in der Familie Brachyspiraceae. Zusammen mit den Genera *Leptospira*, *Borrelia* und *Treponema* gehört das Genus *Brachyspira* zu den medizinisch und/oder veterinärmedizinisch bedeutsamen Spirochaeten.

*B. hyodysenteriae* ist serologisch nicht einheitlich. Hampson und Stanton postulierten 1979 die Existenz von 11 Serogruppen mit jeweils einem oder mehreren Repräsentanten (Hampson und Stanton, 1997). Bis zu diesem Zeitpunkt waren 9 Serotypen bekannt, die jedoch unerklärlicherweise nicht mit den gleichlautenden (neuen) Serogruppen übereinstimmten (Baum und Joens, 1979; Hampson und Stanton, 1997; Li *et al.*, 1991; Mapother und Joens, 1985). Die Ursache für diese unbefriedigende Situation dürfte aller Wahrscheinlichkeit nach daran liegen, dass innerhalb der Spezies *B. hyodysenteriae* einzelne Stämme nicht nur über Serotyp-spezifische sondern auch über kreuzreagierende Antigene verfügen.

Die serologische Typisierung der Brachyspiren erfolgt anhand ihres Lipooligosaccharids (LOS). Je nach angewandter Methodik der Untersucher besitzen die bisher beschriebenen Techniken zur serologischen Charakterisierung je nach Qualität bzw. Reinheit des Antigens einen unterschiedlich hohen Diskriminierungsgrad. Auch bei Verwendung eines reinen LOS dürfte allein schon wegen seines komplexen Aufbaus, für den zahlreiche Gene kodieren, eine eindeutige Trennung von Feldstämmen sehr schwer möglich sein. Die Einteilung in Serogruppen, bei der Serotyp-übergreifende (kreuzreagierende) Antigene eine höhere Berücksichtigung fanden, muss damit als pragmatischer, jedoch leider wenig reproduzierbarer, Kompromiss interpretiert werden, den methodischen Unzulänglichkeiten bei der Aufklärung der serologischen Diversität des Erregers Rechnung zu tragen.

Die Diversität der Serotypen entsteht durch Mutation und Selektion. Selektionskriterium ist die bestehende Immunitätssituation in einer Schweinepopulation. An Schweinedysenterie erkrankte Tiere entwickeln nach der Genesung einen belastbaren Schutz gegen eine Reinfektion mit dem gleichen Serotyp. Sie können jedoch bei Infektion mit einem anderen Serotyp erneut erkranken. Die Serotypisierung dient demnach nicht ausschließlich der Klassifizierung von Erregern, sondern beantwortet wichtige Fragen im Zusammenhang mit der Epidemiologie und dem Schutz vor der Dysenterie. So entscheidet die Serodiversität

eines Erregers u. a. mit darüber, wie eine Trennung von Produktionsabschnitten im Detail zu gestalten ist.

Dieser hohe Stellenwert einer serologischen Charakterisierung von *B. hyodysenteriae*-Feldisolaten im Rahmen der Epidemiologie, gab, vor dem Hintergrund der fehlenden Kenntnisse über die Serodiversität des Erregers in Europa, Anlass zu der vorliegenden Untersuchung.

Ziel dieser Arbeit war eine Zuordnung von Feldisolaten unterschiedlicher Herkunft zu existenten Serotypen und nicht zu Serogruppen. Die Serotyp-Zugehörigkeit entscheidet schließlich, ob Tiere nach Reinfektion wieder erkranken können oder nicht. Gleichfalls sollte die Serotypisierung aus methodischer Sicht derart optimiert werden, dass Unwägbarkeiten, die im besonderen methodischen Geschick der jeweiligen Untersucher liegen (z. B. bei der Adsorption von Seren mit heterologen Antiseren) von vornherein ausgeschlossen werden. Demzufolge war zu prüfen, ob nicht Immunoblotverfahren wegen ihrer Eignung zur Demarkierung kreuzreagierender Antigene für die Beantwortung der Fragestellung besonders geeignet erscheinen.

## 2                    **Schrifttum**

### 2.1                    **Die Dysenterie des Schweines**

Die Schweinedysenterie ist eine weltweit verbreitete Erkrankung von großer wirtschaftlicher Bedeutung. Ihre erste Beschreibung geht auf das Jahr 1921 zurück (Harris, 1974; Harris und Kinyon, 1974, Whiting *et al.*, 1921). Der Erreger, *Brachyspira (B.) hyodysenteriae*, wurde jedoch erst 50 Jahre später entdeckt und nach tierexperimentellen Untersuchungen als eigentlicher Verursacher der Dysenterie anerkannt (Taylor und Alexander, 1971). Auch in Deutschland hat *B. hyodysenteriae* eine hohe Prävalenz bei durchfallkranken Schweinen (Herbst *et al.*, 2004)

Wichtigstes klinisches Kennzeichen dieser auf fäkal-oralem Weg übertragenen Infektionskrankheit ist eine mukohämorrhagische Diarrhö (Alexander und Taylor, 1969). Diese betrifft insbesondere heranwachsende Tiere in der Mast und führt wegen der hohen Morbidität (bis 90 %) und Mortalität (bis 30 %) zu massiven ökonomischen Verlusten (Harris, 1974; ter Huurne und Gaastra, 1995).

Die Übertragung von *B. hyodysenteriae* erfolgt vornehmlich durch latent infizierte Schweine, jedoch auch durch belebte und unbelebte Vektoren. Unter den belebten Vektoren haben Ratten und Mäuse, die in Schweinebeständen nicht selten vorkommen, Bedeutung. Beide sind empfänglich für *B. hyodysenteriae* ohne jedoch selber zu erkranken (Songer und Harris, 1978). Nach oraler Aufnahme gelangt der Erreger in den Dickdarm. Nach der Ausscheidung schützen Kot und Schleim die Spirochaeten sowohl vor rascher Inaktivierung als auch vor dem Einfluss des sauren Milieus im Magen nach erneuter Infektion (Hampson und Stanton, 1997). Der schleimige Kot wird gern von anderen Schweinen aufgenommen. Da er besonders erregerrhaltig ist, führt dieses Verhalten zu einer sicheren Verbreitung des Erregers innerhalb des Bestandes. Ab dem zweiten Tag *post infectionem (p. i.)* kann *B. hyodysenteriae* bereits im Darm nachgewiesen werden (Pohlenz *et al.*, 1983). Bis zur Entstehung erster Krankheitsanzeichen können 5 bis 24 Tage vergehen (Olson, 1974). Die Erreger befinden sich im frühen Stadium der Erkrankung entlang des intestinalen Epithels des Colons, dringen dann in die tiefen Krypten ein und können dort in den Becherzellen nachgewiesen werden (Glock *et al.*, 1974, Pohlenz *et al.*, 1983). Der entscheidende Virulenzfaktor hierzu ist die positive Chemotaxis von *B. hyodysenteriae* zu Muzin. Die Endoflagellen des Erregers ermöglichen es ihm, sich besonders gut im zähflüssigen Schleim des Colons fortzubewegen (Milner und Sellwood, 1994). *In vitro* konnte eine Adhärenz von *B. hyodysenteriae* an Darmepithelzellen nachgewiesen werden (Richter, 2009), bisher konnte aber *in vivo* diese Adhärenz nicht sicher beobachtet werden. Daher wird das

Adhärenzvermögen des Erregers als Virulenzfaktor kontrovers diskutiert (ter Huurne und Gaastra, 1995). Innerhalb der Becherzellen vermehren sich die Erreger und können auch innerhalb der Epithelzellen nachgewiesen werden (Glock *et al.*, 1974; Pohlenz *et al.*, 1983). Es kommt dann zu einer diphteroiden bis nekrotisierenden Colitis (Pohlenz *et al.*, 1983). Endoskopisch konnte im Colon von experimentell infizierten Schweinen eine hyperämische, zerstörte Mukosa und massive Schleimmengen nachgewiesen werden (Jacobson *et al.*, 2007). Histologisch fallen eine Hyperplasie der Krypten auf, sowie eine gesteigerte Proliferation von Becherzellen. Ebenso können Schleimhauterosionen nachgewiesen werden (Hughes *et al.*, 1974; Pohlenz *et al.*, 1983). Durch diese morphologischen Veränderungen des Colonepithels erklären sich die typischen Symptome der Schweinedysenterie. Diese bestehen in einer mukohämorrhagische Diarrhö und durch die Entleerung des Darms bedingte, eingefallene Flanken (Olson, 1974). Weitere Anzeichen können eine erhöhte Temperatur (bis 40 °C) Anorexie und ein gestörtes Allgemeinbefinden sein (Alexander und Taylor, 1969). Die klinische Ausprägung variiert stark. Milde Verlaufsformen als auch klinisch inapparente Infektionen sind beschrieben (Jacobson *et al.*, 2007; Pluske *et al.*, 1996).

### 2.1.1 Ätiologie

*B. hyodysenteriae* gehört taxonomisch zur Familie der Brachyspiraceae, die mit den veterinärmedizinisch bedeutsamen Leptospiraceae und Spirochaetaceae die Ordnung der *Spirochaetales* bilden. Seit der Isolierung des Erregers im Jahr 1971 erfolgten verschiedene Umbenennungen. Zunächst wurde der Erreger aufgrund struktureller und metabolischer Charakteristika dem Genus *Treponema* (*T.*) zugeordnet (Harris *et al.*, 1972). Die zu dieser Zeit bekannten Spezies *T. hyodysenteriae* und *T. innocens* besaßen untereinander eine hohe DNA-Homologie, die sie jedoch nicht mit den anderen bekannten Spezies im Genus *Treponema* teilten (Stanton *et al.*, 1991). Aufgrund dessen wurde ein neues Genus *Serpula* definiert (Stanton *et al.*, 1991). Leider wurde dieser Name in der Mykologie bereits verwendet. Dies führte zur Umbenennung von *Serpula* in *Serpulina* (Stanton, 1992). Neuere, molekularbiologische Analysen der Spirochäten offenbarten eine nahe Verwandtschaft zwischen dem Genus *Serpulina* und dem Genus *Brachyspira*. Beide wurden daher in dem Genus *Brachyspira* vereint (Ochiai *et al.*, 1997).

*B. hyodysenteriae* ist zwar ein strikter Anaerobier, gilt jedoch als aerotolerant. Diese Eigenschaft verdankt er den bei allen Brachyspiren vorkommendem Enzym NADH-Oxidase, welches den Erreger vor der Einwirkung von Sauerstoff schützt (Stanton und Jensen, 1993; Stanton *et al.*, 1999). Die Gestalt des Bakteriums ist bei einer Länge von etwa 6-9 µm und einem Durchmesser von ca. 0,3-0,4 µm schraubenförmig gewunden (Harris *et al.*, 1972). Brachyspiren sind beweglich. Ihre Beweglichkeit wird durch Endoflagellen vermittelt, die im periplasmatischen Raum gelegen sind. Sie sind an beiden Polen des Bakteriums in der

Zellwand verankert, umgeben den Zelleib in mehreren Windungen und überlappen in der Mitte des Bakteriums. *B. hyodysenteriae* besitzt sieben bis neun dieser Endoflagellen (Harris *et al.*, 1972). Sie ermöglichen dem Bakterium eine aktive Fortbewegung besonders in der zähflüssigen Muzinschicht des Dickdarms (Kennedy *et al.*, 1988).

Der Aufbau der Zellwand der Brachyspiren entspricht dem der gram-negativen Bakterien. Entsprechend sind in die äußere Membran Lipopolysaccharide (LPS) eingelagert, die als bedeutendes Antigen fungieren (Baum und Joens, 1979).

### **2.1.2 Diversität von *B. hyodysenteriae***

Wie bei zahlreichen anderen Bakterienspezies können auch innerhalb der Spezies *B. hyodysenteriae* unterschiedliche Stämme unterschieden werden. Grundlage bilden differierende phänotypische und/oder genetische Eigenschaften. Beispielsweise sind Stämme mit unterschiedlicher Serotypzugehörigkeit (Serodiversität), unterschiedlicher Virulenz (Biodiversität) und mit unterschiedlichen genetischen Eigenschaften (Genodiversität) beschrieben. Insgesamt fehlt jedoch eine allgemein gültige Charakteristik zur Stammdifferenzierung bei *B. hyodysenteriae*, da bei der Typisierung mit zahlreichen diskriminierenden Methoden gearbeitet wurde. Die Typisierungsmethoden können in phänotypische und genotypische Methoden unterschieden werden. Phänotypische Unterscheidungskriterien beruhen u. a. auf biochemischen Leistungen der Erreger, der Bildung von Toxinen, der Antibiotikaempfindlichkeit und dem Antigenaufbau der Erreger. Das Spektrum der Nachweismethoden ist sehr umfangreich. Genotypische Differenzierungstechniken zielen auf den Nachweis von Unterschieden in der Nukleotidsequenz. Bei Brachyspiren dienen zum Nachweis die Restriktionsendonuklease-Analyse (REA), die Multilocus Sequenz Typisierung (MLST), das Ribotyping, die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE), die Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (RFLP), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-Methode und die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR).

#### **2.1.2.1 Serotypisierung**

Bereits 1979 wurde bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen festgestellt, dass die Zellwand von *B. hyodysenteriae* der von gram-negativen Bakterien ähnelt. Daraufhin nahmen die Autoren an, dass *B. hyodysenteriae* ein „LPS-ähnliches“ Material in der äußeren Membran enthalten muss. Im entsprechenden Fall könnten LPS-Extrakte, die mit der sogenannten „heißen Phenol-Wasser-Methode nach Westphal“ gewonnen wurden, ähnlich wie z. B. von *Escherichia (E.) coli*, zur Serotypisierung der Bakterien dienen (Baum und Joens, 1979). Auch andere Autoren beschreiben ein „LPS-ähnliches“ Material, das als wichtiges Antigen zur Stimulierung der Immunabwehr angesehen wurde und der Interaktion mit dem zellulären und humoralen Immunsystem diene (Nuessen *et al.*, 1982; Nuessen und Joens, 1982). Bei weiterer Analyse von LOS-Extrakten verschiedener *B. hyodysenteriae*-

Referenzstämme in der SDS-PAGE wurden jeweils zwei Serotyp-spezifische Banden im Bereich zwischen 18 und 24 kDa nachgewiesen. Im Vergleich zu glatten Formen von LPS wiesen diese jedoch keine „leiterartige“ Struktur auf (Halter und Joens, 1988). Entsprechende Berichte liegen auch von anderen Untersuchern vor. Nach Chatfield *et al.* (1988) weist das Serotyp-spezifische LPS von *B. hyodysenteriae* ein Molekulargewicht von 14 bis 24 kDa auf. Im Immunoblot und in silbergefärbten SDS-PAGE-Gelen stellte sich das LOS bei weiteren Nachforschungen in einem Bereich von 14 bis 19 kDa dar (Wannemuehler *et al.*, 1988). Nach Hampson *et al.* (1989) existieren dagegen drei bis vier Hauptantigene des LOS im Bereich von zehn bis 42 kDa. Zusätzlich wird von dieser Arbeitsgruppe vermutet, dass Banden im Bereich von zehn bis 16 kDa das Lipid A und die Kernregion des LOS repräsentieren. Größere Banden sollen den Spekulationen dieser Autoren zufolge von zusätzlichen kurzen O-Antigen-Seitenketten herrühren. Nach Versuchen im Immunoblot mit verschiedenen Hyperimmunseren waren diese jedoch nicht bei allen *B. hyodysenteriae*-Stämmen nachweisbar (Hampson *et al.*, 1989; Lau und Hampson, 1992; Lee und Hampson, 1999).

Die LPS-/LOS-Präparationen von *B. hyodysenteriae* liegen somit nach weitgehend übereinstimmenden Untersuchungen im niedrigen Molekulargewichtsbereich (ca. 14-24 kDa). Gleichzeitig fehlt ihnen die bei LPS-Präparationen anderer Bakterien vorhandene charakteristische Leiterstruktur. Weiterhin wird das LPS von *B. hyodysenteriae* zum Teil als eine raue, zum Teil auch als semi-raue Form bezeichnet. Diesen Befunden zufolge wurde das LPS von *B. hyodysenteriae* als Lipooligosaccharid (LOS) bezeichnet. In der Literatur werden beide Begriffe jedoch synonym verwandt (Hampson *et al.*, 1989; Lau und Hampson, 1992; Lee und Hampson, 1999; Westerman *et al.*, 1995). Die Existenz eines LPS weitgehend ähnlichen Materials (LOS) bei *B. hyodysenteriae* erscheint somit gesichert. Im weiteren Verlauf wird daher ausschließlich der Begriff „LOS“ verwendet.

## **Methoden**

Die Serotypisierung bei *B. hyodysenteriae* beruht auf der Reaktion von extrahierten LOS der zu untersuchenden Stämme mit spezifischen Hyperimmunseren, welche gegen bekannte Referenzstämme hergestellt wurden. Methodisch kamen verschiedene Techniken zur Anwendung. Erste Serotypen von *B. hyodysenteriae* wurden unter Auswertung von Antigen-Antikörperreaktionen im Immundiffusionstest (IDT) nach Ouchterlony definiert (Baum und Joens, 1979). Andere Autoren übernahmen diese Untersuchungstechnik und entdeckten mit Hilfe des IDT neue Serotypen bzw. -gruppen (Hampson *et al.*, 1989; Li *et al.*, 1991; Mapother und Joens, 1985). Eine weitere Methode, die in der Literatur zur Serotypisierung von *B. hyodysenteriae* beschrieben wurde, ist die Objektträger-Agglutination. Diese Technik ist weniger zeitaufwändig, allerdings müssen die verwendeten Hyperimmunseren zuvor mit den



heterologen Seren der anderen Serotypen adsorbiert werden, da es sonst zu Kreuzreaktionen kommen kann (Hampson, 1991; Kim *et al.*, 2005). Der Immunoblot, ein sehr sensitives serologisches Verfahren, diente als Technik im Rahmen der Serotypisierung lediglich zur Klärung der Ursachen von Kreuzreaktionen (Hampson *et al.*, 1989; Hampson *et al.*, 1990; Li *et al.*, 1992). Entgegen Empfehlungen wurde der Immunoblot zur Zuordnung von Feldisolaten zu bekannten Serotypen dagegen leider nie genutzt (Li *et al.*, 1992). Auch ein Mikroagglutinationstest mit ultraschalllysierten bzw. gekochten Ganzzellsuspensionen kam, trotz erfolgversprechender Ergebnisse, für die Serotypisierung nicht zur Anwendung (Diarra *et al.*, 1994).

### **Einteilung nach Serotypen/-gruppen**

Derzeit werden neun Serotypen, bzw. elf Serogruppen mit jeweils einer unterschiedlichen Anzahl von Serovarietäten unterschieden. Nach ersten Berichten wurden unter 13 amerikanischen Isolaten mit Hilfe spezifischer Antiseren gegen LOS-Präparationen dieser Stämme vier Serotypen (Serotypen 1-4) im Immundiffusionstest differenziert (Baum und Joens, 1979). In weiteren, methodisch vergleichbaren Studien wurden bei Untersuchung von vier bereits serologisch zugeordneten und vier nicht zugeordneten Isolaten drei neue Serotypen (Serotypen 5, 6 und 7) beschrieben (Mapother und Joens, 1985). Erstmals ging aus dieser Untersuchung jedoch die Existenz anscheinend kreuzreagierender LOS-Determinanten bei *B. hyodysenteriae*-Stämmen unterschiedlichen Serotyps hervor: Die neuen Serotypen 5, 6 und 7 besitzen demnach sowohl Serotyp-spezifisches LOS, als auch Antigene, die sie mit einem oder mehreren der vorherigen Serotypen teilen. Eine eindeutig homologe Reaktion war erst nach Adsorption der Antiseren mit Zellsuspensionen der jeweils kreuzreagierenden Stämme vorhanden (Mapother und Joens, 1985). Bei Untersuchung von 30 kanadischen Feldisolaten reagierten jedoch lediglich 17 % der Stämme mit Antiseren gegen die bisher bekannten sieben Serotypen. Der verbliebene Anteil der Isolate verteilte sich dagegen auf zwei neu definierte Serotypen, die Typen 8 und 9 (Li *et al.*, 1991).

Die Auswertung weiterer Charakterisierungsversuche, die vor allem von australischen Arbeitsgruppen vorangetragen wurden, war durch das Auftreten zunehmender Kreuzreaktionen erheblich erschwert. Mit größer werdender Zahl der zu differenzierenden Stämme reagierten im Immundiffusionstest anscheinend typspezifische Antiseren auch gleichzeitig mit anderen Serotypen. Dies wurde als Folge der Existenz einer größeren Vielfalt an Verwandtschaftsbeziehungen auf Basis des LOS interpretiert. So wurde die Basis zur Etablierung von Serogruppen und Serovaren in Anlehnung an die bei Leptospiren bekannte serologische Differenzierung gelegt (Hampson *et al.*, 1989). *Per definitionem* wurden *B. hyodysenteriae*-Isolate jener Serogruppe zugeordnet, die das nicht adsorbierte Hyperimmunserum gegen einen definierten Referenzstamm erkannte. Innerhalb dieser Gruppe

können die Stämme unter Verwendung von nun präadsorbierten Antiseren in Serovare differenziert werden. Als Serovar ist demnach ein Stamm definiert, der serologisch ausschließlich mit Antikörpern gegen diese Serovar reagiert. Ursache für diese komplexe Situation könnte nach Meinung der Untersucher die Existenz von sowohl gruppenspezifischen als auch Serovar-spezifischen LOS bei *B. hyodysenteriae* sein (Hampson *et al.*, 1989). Die Anzahl der nach diesen Studien postulierten Serogruppen betrug 11 (Hampson und Stanton, 1997).

Aktuell existieren 9 Serotypen und 11 Serogruppen. Wie aus der **Tabelle 1**, die vor allem Bestrebungen australischer Untersucher zur Vereinheitlichung der Serotypisierung zusammenfasst, hervorgeht, lassen sich zuvor definierte Serotypen nicht unbedingt immer auch unterschiedlichen Serogruppen zuordnen. Diese Situation ist gemessen am Bedürfnis nach einer eindeutigen und klaren Definition sehr unbefriedigend (Hampson und Stanton, 1997).



### Erläuterungen zur Tabelle 1:

**1:** B78 = ATCC 27164; **2:** B204 = ATCC 31212; **3:** B234 = ATCC 31287; **4:** WA-1 = ATCC 49526; **5:** WA-6 = ATCC 49527; **6:** FMV89-3323 = ATCC 49886; **7:** FM88-90 = ATCC 49887;

**Unterstrichene Isolate** wurden mehrere Serotypen zugeordnet.

**ATCC** = American Type Culture Collection; **k.A.:** keine Angabe; **n.b.:** nicht bestimmt.

Angaben nach: (Achacha und Mittal, 1995; Baum und Joens, 1979; Combs *et al.*, 1992; Diarra *et al.*, 1994; Dugourd *et al.*, 1996; Hampson und Stanton, 1997; Harel *et al.*, 1994; Lau und Hampson, 1992; Lee *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1991; Mapother und Joens, 1985; Ochiai *et al.*, 2000; Sotiropoulos *et al.*, 1994; ter Huurne *et al.*, 1992a; Westerman *et al.*, 1995).

### Typisierung mittels MLEE

Der Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE)-Test ist eine sensitive und spezifische Methode zur Identifikation und zur Bestimmung phylogenetischer Verwandtschaftsbeziehungen von taxonomisch benachbarten Bakterien als auch zur Untersuchung nah verwandter Isolate innerhalb einer Spezies (Stanton, 2006; ter Huurne und Gaastra, 1995). Hierbei erfolgt die gelelektrophoretische Auftrennung von Enzymen der zu untersuchenden Bakterien und anschließend die Einteilung von Bakterienstämmen in elektrophoretische Typen (ET).

Aufgrund von MLEE-Untersuchungen konnte die Gattung *Brachyspira* in acht ETs unterteilt werden, die den damals sieben bekannten Spezies innerhalb dieser Gattung zugeordnet werden konnten. Die achte ET gehört der damals noch nicht näher charakterisierten Spezies *B. canis* an (Stanton, 2006).

1993 haben Lee *et al.* Untersuchungen zur genetischen Verwandtschaft von *B. hyodysenteriae* durchgeführt und dabei Methoden zur Differenzierung innerhalb einer Spezies miteinander verglichen. Dabei wurde die MLEE mit der Restriktionsendonukleaseanalyse (REA) und der Serotypisierung verglichen. Anhand der Ergebnisse im MLEE konnten die Autoren die 98 untersuchten Stämme in 29 ETs unterteilen, die sie wiederum zu 4 Hauptgruppen zusammenfassten. Berücksichtigt wurden hierbei 15 Enzyme. Im Vergleich zu der REA scheint die MLEE ähnlich sensitiv und spezifisch zu sein. Allerdings hat die MLEE den Vorteil, dass mit ihrer Hilfe eine quantitative Aussage über die Verwandtschaft der Isolate getroffen werden kann. Nach den MLEE-Untersuchungen waren Isolate mit sehr unterschiedlichem REA-Muster zum Teil sehr eng verwandt, so auch australische und nicht australische Isolate. Insgesamt sehen die Autoren aber eine Tendenz, dass genetische Unterschiede zwischen *B. hyodysenteriae*-Isolaten mit entsprechenden serologischen Unterschieden einhergehen. Dennoch existieren Stämme, die zwar in derselben Serogruppe sind, aber keine genetischen oder biologischen Unterschiede aufweisen. Außerdem gibt es Isolate, die zwar nach MLEE-

Untersuchungen nah miteinander verwandt sind, aber bei der Serotypisierung nicht derselben Serogruppe zugeordnet werden konnten (Lee *et al.*, 1993). Bei der Untersuchung von koreanischen *Brachyspira*-Isolaten wurden 24 Isolate unterschiedlicher *Brachyspira*-Spezies untersucht, davon zehn koreanische Feldisolate, die alle der Spezies *B. hyodysenteriae* angehörten, sowie 14 Referenzstämme, und zwar zehn davon *B. hyodysenteriae*-Stämme und jeweils ein Stamm von *B. intermedia*, *B. pilosicoli*, *B. murdochii* und *B. innocens*. Die zehn koreanischen Isolate konnten mittels MLEE in neun ETs eingeteilt werden, die sich aber von den ETs der Referenzstämme unterschieden. Auch diese Untersuchung weist nach Ansicht der Autoren auf die hohe Diversität von *B. hyodysenteriae*-Stämmen hin (Kim *et al.*, 2005). In einer größer angelegten MLEE-Studie mit 231 Isolaten wurde bezweifelt, dass die Diversität der Brachyspiren klonalen Ursprungs ist, wie bisher angenommen wurde (Trott *et al.*, 1997).

#### **2.1.2.2 Biodiversität**

Es gibt verschiedene phänotypische Eigenschaften, die in der Diagnostik genutzt werden, um *B. hyodysenteriae* von den anderen Spezies des Genus *Brachyspira* zu unterscheiden. *B. hyodysenteriae* induziert eine starke vollständige Hämolyse bei Wachstum auf Blutagarplatten (Kinyon *et al.*, 1977). Bisher nahm man an, dass *B. hyodysenteriae* die einzige Spezies des Genus *Brachyspira* ist, die eine starke Hämolyse auf Blutagar ausbildet, im Gegensatz zu alle anderen Spezies, die lediglich eine schwache Hämolyse zeigen (Kim *et al.*, 2005). Kürzlich wurden jedoch zwei weitere Spezies beschrieben, die auch durch die Ausbildung einer starken Hämolyse auf Blutagarplatten charakterisiert waren. Zum einen *B. suanatina* (Phillips *et al.*, 2010; Rasback *et al.*, 2007), zum anderen *B. hamptonii*, die in Nordamerika und Skandinavien in Schweineherden nachgewiesen werden konnten (Chander *et al.*, 2012). Zur Unterscheidung von Spezies innerhalb des Genus *Brachyspira* wurde auch das enzymatische Profil im API-ZYM-System herangezogen (Hunter und Wood, 1979). Hierbei fällt *B. hyodysenteriae* durch eine positive Indolreaktion auf. *B. hyodysenteriae* ist  $\alpha$ -Glukosidase-positiv, aber  $\alpha$ -Galaktosidase-negativ ist (Kim *et al.*, 2005). Was die Fähigkeit zum Tryptophanabbau anbetrifft scheint es jedoch unter den Brachyspiren Variationen zu geben (Kim *et al.*, 2005). So wurden z. B. indolnegative Stämme in Deutschland, Belgien und vereinzelt in Kanada beschrieben, sowie kürzlich in Spanien (Fellstrom *et al.*, 1999, Hidalgo *et al.*, 2010). Diese auffälligen Isolate wurden eindeutig dem Genus *B. hyodysenteriae* zugeordnet. Mittels PFGE und auch anderer diskriminierender Techniken waren diese Stämme nicht voneinander zu unterscheiden. Es wurde vermutet, dass sie von einem einzelnen Klon abstammen. Genetische Untersuchungen konnten eine Verwandtschaft dieser indolnegativen Isolate mit den indolnegativen Isolaten aus Deutschland und Belgien nachweisen (Fellstrom *et al.*, 1999, Hidalgo *et al.*, 2010). Auch hinsichtlich der Glukosidase scheinen Varianten zu existieren (Fellstrom *et al.*, 1997).

### 2.1.2.3 Genetische Diversität

Untersuchungen zur vergleichenden Analyse von *B. hyodysenteriae*-Isolaten mit molekularbiologischen Techniken sind umfangreich und entsprechen dem jeweiligen Stand der methodischen Entwicklungen. Die zur Differenzierung von Brachyspiren, z. T. von mehreren Arbeitsgruppen gleichzeitig angewandten Techniken umfassen die DNA-Restriktionsendonukleaseanalyse (REA), die Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-Methode, die DNA-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)-Analyse, die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) sowie die Multilocus Sequenz Typisierung (MLST), die aus der Multilocus Enzyme electrophoresis (MLEE)-Technik abgeleitet wurde (La *et al.*, 2009). Insgesamt spiegeln alle Klassifikationsschemata eine hohe Diversität der intestinalen Spirochäten wider (Fisher *et al.*, 1997). Die 16S rDNA Sequenzierung für das Genus *Brachyspira* ist dagegen für phylogenetische Untersuchungen nur bedingt geeignet. Stämme unterschiedlicher Spezieszugehörigkeit erwiesen sich als zu nah verwandt um mit Hilfe der 16S rDNA unterschieden werden zu können. So fielen z. B. einige Isolate von *B. hyodysenteriae* und von *B. intermedia* in das gleiche Cluster, ebenso wie *B. innocens* und *B. murdochii* (Pettersson *et al.*, 1996, Stanton *et al.*, 1996).

## Methoden

### Restriktionsenzymanalyse

Bei der Restriktionsenzymanalyse (REA) werden bestimmte Restriktionsenzyme genutzt, um die DNA des zu untersuchenden Bakteriums oder Organismus an bestimmten DNA-Stellen zu spalten, so dass anschließend anhand der spezifischen DNA-Frequenzen eine Genotypisierung vorgenommen werden kann. Die REA wurden bei Untersuchungen von Brachyspiren zum einen dazu genutzt, nicht-charakterisierte intestinale Spirochäten-Isolate zu einer *Brachyspira*-Spezies zuzuordnen, zum anderen dazu, bereits als *B. hyodysenteriae*-Isolate differenzierte Isolate zu vergleichen (Stanton, 2006). Die REA wurde bei *B. hyodysenteriae* an genomischer DNA durchgeführt (Combs *et al.*, 1989; Combs *et al.*, 1992; ter Huurne *et al.*, 1992). Bei epidemiologischen Untersuchungen von *B. hyodysenteriae*-Feldisolaten wiesen diese, im Vergleich zu mitgeführten Referenzstämmen unterschiedliche REA-Muster auf. So wurden in einer Studie in den Niederlanden 43 niederländische *B. hyodysenteriae*-Isolate mittels REA und DNA-Hybridisierung untersucht und diese sechs REA-Mustern (I-VI) zugeordnet. Allein 18 bzw. 20 Isolate fielen in die REA-Muster I und II. Die mitgeführten Stämme der Serotypen 1 bis 7 wiesen dagegen alle voneinander unterschiedliche REA-Muster auf, die sich auch gleichzeitig von denen der Feldisolate unterschieden (ter Huurne *et al.*, 1992). Mit Hilfe der REA-Analyse wurden somit bei *B. hyodysenteriae* erste Grundlagen für die genetische Charakterisierung von Stämmen erarbeitet. Die Anzahl der differenzierbaren Stämme war weitaus größer, als dies nach den

zu der Zeit vorliegenden Ergebnissen über phänotypische Unterschiede (z. B. Serotypen) bei *B. hyodysenteriae*-Isolaten zu erwarten gewesen wäre (Olsen *et al.*, 2000). Nachfolgende Untersuchungen bestätigten diese Aussage. So wurden 91 australische Isolate und sieben Referenzstämme der Serogruppen A bis E aus den USA, Kanada und Großbritannien vergleichend mittels Serotypisierung und mittels REA untersucht. Die sieben Referenzstämme wiesen unterschiedliche REA-Muster auf, obwohl diese nur zu fünf verschiedenen Serogruppen gehörten (REA-Muster A bis G). Die 91 australischen Feldisolate von *B. hyodysenteriae* konnten insgesamt 31 REA-Mustern zugeordnet werden. Diese wurden wiederum zu acht Hauptmustern (REA-Muster H bis O) zusammengefasst, die aufgrund von geringen Unterschieden in den Bandenmustern in bis zu elf Muster unterteilt wurden. Die Autoren gingen davon aus, dass die Stämme mit solchen Mustern, die aber das gleiche Hauptmuster besitzen, aus einem gemeinsamen Klon entstanden waren. Somit verteilten sich die 31 australischen Stämme auf insgesamt 8 Klone. Beim Vergleich der Untersuchungsergebnisse mit jenen der serologischen Klassifizierung waren Isolate mit gleichem oder ähnlichem REA-Muster jeweils derselben Serogruppe zuzuordnen. Dies gelang jedoch nicht in allen Fällen. Es existierten Stämme mit übereinstimmendem REA-Muster aber unterschiedlicher Serotypzugehörigkeit. Damit waren die Hoffnungen auf die Entwicklung einer molekularbiologisch basierten Genotypisierung nicht erfüllt worden. Andere Arbeitsgruppen verdauten mittels unterschiedlicher Restriktionsenzyme chromosomale DNA, und prüften die entstandenen Banden im Southern-Blot mit Spezies-spezifischen und Stamm-spezifischen DNA-Proben, die von verschiedenen Referenzstämmen gewonnen wurden. Dabei konnten einzelne Banden nachgewiesen werden, die zum einen spezifisch für *B. hyodysenteriae* waren, d. h. die Banden traten nicht bei *B. innocens* auf, zum anderen konnten Banden nachgewiesen werden, die für die Referenzstämme spezifisch waren (Sotiropoulos *et al.*, 1994).

### **Pulsfeldgelelektrophorese**

Die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) ist eine weitere molekularbiologische Methode zur genetischen Typisierung von Bakterien. Hierbei werden die nach enzymatischen Verdau der gesamten genomischen DNA entstandenen Fragmente in einem Agarose-Gel aufgetrennt. Durch Änderung der Orientierung der elektrischen Spannung, die auf ein Gel einwirkt, können auch DNA-Fragmente mit hohem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dies ist ein entscheidender Unterschied zu der einfachen Gelelektrophorese, bei der Fragmente ab einer bestimmten Größe nicht mehr separiert werden können. Mittels der PFGE wurden bei Untersuchung von insgesamt 40 meist australischen Stämmen 23 verschiedene PFGE-Typen voneinander differenziert. Diese Ergebnisse bestätigen das Vorliegen einer hohen genetischen Diversität bei *B. hyodysenteriae* (Atyeo *et al.*, 1999). Neben der generellen

Frage nach dem Vorliegen von Genvarianten wird die PFGE-Analyse bevorzugt für ein sehr gutes Instrument für die epidemiologischen Untersuchungen (molekulare Epidemiologie) im Zuge der Ausbreitung/Verbreitung der Schweinedysenterie angesehen (Fellstrom *et al.*, 1999).

### **Multi-Locus-Sequenztypisierung**

Das Multi-Locus-Sequenztypisierung (MLST) ist eine Typisierungstechnik, die auf Sequenzanalysen verschiedener Genfragmente des Erregers beruht. Mithilfe von Computerprogrammen können durch die Kenntnis von Mutationen in diesen Genfragmenten phylogenetische Entwicklungen nachvollzogen werden, bzw. Dendrogramme aufgestellt und somit eine Einteilung der untersuchten Bakterien in Sequenztypen (ST) ermöglicht werden. In den Dendrogrammen steht die jeweilige Aufzweigung für eine Mutation in den untersuchten Genfragmenten. Erste Studien mit dem MLST zielten auf einen Vergleich mit anderen Stamm-differenzierenden Techniken ab. Unter Verwendung von 60 unterschiedlichen *Brachyspira* spp.-Isolaten erfolgte ein Vergleich zu Untersuchungsergebnissen, die durch kulturelle und biochemische Methoden, mittels 16S rRNA-Sequenzanalysen und mittels RAPD-Analyse erzeugt wurden. Die mittels kultureller Untersuchung und anschließender biochemischer Differenzierung charakterisierten Spezies bildeten jeweils ein Cluster im MLST-Dendrogramm. Somit ist die MLST nach diesen ersten Untersuchungen zumindest für die Speziesdifferenzierung geeignet (Rasback *et al.*, 2007). Darüber hinaus hat sie sich, wie z. B. auch bei dem vergleichenden Studium von *Escherichia coli*-Isolaten, als ein sehr probates Mittel zum Studium von Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Brachyspiren-Stämmen erwiesen. Mittels Sequenzanalyse von 7 Genen konnten 111 *B. hyodysenteriae*-Isolate in 67 Sequenztypen und 46 Aminosäuretypen unterteilt werden. Nach Bearbeitung der 67 Sequenztypen mit einem Programm, das anhand der aus den Sequenzen abgeleiteten Schlüssel in der Lage ist, nah verwandte Isolate in Gruppen einzuteilen, konnten elf „Klonale Komplexe“ identifiziert werden, die zwischen zwei und zehn Sequenztypen enthielten und sich auf 2 bis 26 Stämme verteilten. Bei Sequenzierung und vergleichender Analyse von 7 verschiedenen Genfragmenten wird die MLST für *B. hyodysenteriae* als hochdiskriminierend eingestuft. So konnte in einer aktuellen Studie an spanischen und anderen europäischen Feldisolaten gezeigt werden, dass sich bestimmte Genlinien in verschiedenen Schweineherden in Europa nachweisen lassen, was für die Erforschung der Ausbreitung von *B. hyodysenteriae* von Bedeutung ist (Osorio *et al.*, 2012). Hinweise auf den vorliegenden Serotyp lassen sich durch diese Technik jedoch ebenso wenig ableiten wie aus den zuvor beschriebenen molekularbiologischen Methoden. Ein klarer Vorteil der MLST liegt in der Standardisierbarkeit. Für die vergleichende Einordnung von Isolaten ist diese Methode hervorragend geeignet (La *et al.*, 2009).



## **Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse**

Die Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (RFLP) ist eine Technik zum vergleichenden Nachweis unterschiedlich langer DNA-Bruchstücke nach Verdau von Genfragmenten verschiedener Bakterien mit Restriktionsenzymen. Voraussetzung hierfür ist die Kenntnis der DNA-Sequenzen, um geeignete Restriktionsenzyme auswählen zu können. Dadurch ist es möglich, bestimmte DNA-Abschnitte gezielt zu duplizieren und damit zu vergleichen. Die Analyse verschiedener Gene von *Brachyspira* unter Verwendung der RFLP-Analyse erfolgte zu Zwecken der Gattungs- bzw. Speziescharakterisierung, als auch zur Beschreibung von Stämmen (Fisher *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1992; Rohde *et al.*, 2002). So wurden, z. B. anhand des periplasmatischen Flagellen-Gens *flaA1*, sechs RFLP-Fingerprint-Muster voneinander differenziert (Fisher *et al.*, 1997). In einer weiteren Studie wurde das *nox*-Gen für eine RFLP-Analyse herangezogen und als einfache Methode zur Spezies-Charakterisierung beschrieben (Rohde *et al.*, 2002).

## **Random Amplified Polymorphic DNA-Methode**

Die Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-Methode wird ebenfalls zur Untersuchung der phylogenetischen Verwandtschaft von Bakterien und anderen Organismen eingesetzt. Durch Auswahl von geeigneten Primern werden nur bestimmte DNA-Abschnitte vervielfältigt. Durch Auftrennung mittels Elektrophorese und Vergleich der entstehenden Bandenmuster kann auf die Verwandtschaft der untersuchten Spezies geschlossen werden. Im Zusammenhang mit der Schweinedysenterie wurde die RAPD-Methode dazu genutzt DNA-Sequenz-Unterschiede von Feld- und Referenzstämmen von *B. hyodysenteriae* und *B. innocens* zu untersuchen. Durch Einsatz verschiedener Primer kann die RAPD-Methode dazu genutzt werden, zum einen Isolate den verschiedenen *Brachyspira* spp.-Spezies zuzuordnen, zum anderen dazu, die phylogenetische Verwandtschaft innerhalb der Spezies *B. hyodysenteriae* zu untersuchen. Dabei konnte innerhalb der Referenzstämmen von *B. hyodysenteriae* mittels RAPD nur eine geringe genotypische Diversität festgestellt werden. Isolate von *B. hyodysenteriae* konnten dagegen deutlich gegenüber den Stämmen von *B. innocens* und anderen schwach hämolysierenden Stämmen abgegrenzt werden (Dugourd *et al.*, 1996).

### **2.1.3 Immunantwort nach natürlicher und experimenteller Infektion**

Erste gesicherte Hinweise für die Schutzwirkung einer natürlichen *B. hyodysenteriae*-Infektion vor einem erneutem Auftreten der Dysenterie ließen sich aus Belastungsversuchen an Schweinen, die von der Dysenterie genesen waren, herleiten (Joens *et al.*, 1979; Olson, 1974). Eine überstandene Erstinfektion schützt vor den klinischen Folgen einer Belastungsinfektion mit *B. hyodysenteriae* (Joens *et al.*, 1979; La *et al.*, 2004; Olson, 1974). Allerdings wurde bereits 1982 eine direkte Beziehung zwischen der Schwere der klinischen Symptome

und der Ausbildung einer Immunität hergestellt. Bildeten Schweine nur milde Symptome aus, kam es zu keiner belastbaren Immunitätsreaktion (Schlink und Olson, 1983). Feldinfektionen oder experimentelle Infektionen gingen mit der Bildung hoher humoraler Antikörpertiter gegen *B. hyodysenteriae* einher (Glock *et al.*, 1978; La *et al.*, 2004). Gleichzeitig kommt es in infizierten Tieren zu einer Reaktion des mukosalen Immunsystems (Chatfield *et al.*, 1988; Joens und Marquez, 1986). Sehr wahrscheinlich korreliert die Entstehung humoraler Antikörper mit der Ausbildung einer protektiven Immunität (Diego *et al.*, 1995; Glock *et al.*, 1978). Die Schutzwirkung richtete sich jedoch vornehmlich gegen den homologen Erreger. Heterologe Stämme lösten nach Belastungsinfektion nach wie vor eine Dysenterie aus (Joens *et al.*, 1983). Die Genesung nach einer Schweinedysenterie scheint nicht im Zusammenhang mit der Bildung der Antikörper zu stehen, vielmehr können die Antikörper als Anzeichen für eine längere, bzw. andauernde Auseinandersetzung mit dem Erreger dienen, da es in einigen Fällen, nach einer Genesung, nicht zu einer belastbaren Immunität gekommen war (Jonasson *et al.*, 2006).

#### **2.1.3.1 Humorale Immunantwort**

Schweine bilden die fünf Immunglobulinklassen IgG, IgA, IgM, IgE und IgD (Butler *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2002). Das IgG beim Schwein kommt in sechs verschiedenen Subklassen vor (IgG1-IgG6), die durch insgesamt elf Subklassen-Gene codiert werden (Butler *et al.*, 2009). Wie bei anderen Tieren und beim Menschen ist IgA auch das vorherrschende Immunglobulin, das auf Schleimhäuten sezerniert wird und zwar beim Schwein sowohl als Monomer als auch als Polymer, bestehend aus zwei oder mehr Monomeren (Butler *et al.*, 2009; Marcotte und Lavoie, 1998; Vaerman *et al.*, 1997).

Beim Studium der humoralen Immunantwort wurde nicht in allen Untersuchungen eine spezifische Differenzierung in Immunglobulin-Klassen oder Subklassen vorgenommen. Deshalb ist in dem nachfolgenden Text der Begriff „Antikörper“ gewählt worden. In allen anderen Fällen werden die Immunglobuline exakt bezeichnet.

Eine Serokonversion bei den an Dysenterie erkrankten Schweinen kann, je nach Testmethode, innerhalb von zwei bis vier Wochen nach einer Infektion mit *B. hyodysenteriae* nachgewiesen werden (Joens *et al.*, 1978; Joens *et al.*, 1982). Der Antikörpertiter gegen *B. hyodysenteriae* persistiert bis zu 19 Wochen *post infectionem* (*p. i.*). Allerdings wird auch über einen Rückgang der Antikörpertiter bereits ca. vier Wochen *p. i.* berichtet, sofern es zu keiner erneuten Auseinandersetzung des Immunsystems der Schweine mit dem Erreger kommt (Joens *et al.*, 1978; La *et al.*, 2009).

Bei den im Serum enthaltenen Antikörpern gegen *B. hyodysenteriae* handelt es sich v. a. um spezifische IgG-, IgA- und IgM-Antikörper. Die Anwesenheit von Antikörpern scheint nicht ausreichend für einen Schutz gegen die Schweinedysenterie. Allerdings kann durch deren

Vorhandensein Rückschlüsse auf den Infektionsstatus gezogen werden. So weisen IgG-Antikörper im Serum auf eine anhaltende Auseinandersetzung der Schweine mit einem Antigen hin, IgA dagegen auf eine kürzlich stattgefundene Infektion mit dem Erreger (Rees *et al.*, 1989). In der Darmmukosa werden hauptsächlich IgA-Antikörper gefunden. Sekretorisches IgA, das bei Darmerkrankungen vorherrscht, wird durch Plasmazellen der *Lamina propria* produziert und durch Epithelzellen ins Lumen des Darms abgegeben. Dort wird die Anheftung der Erreger an die mukosale Oberfläche verhindert (Rees *et al.*, 1989).

Die nach einer Infektion mit *B. hyodysenteriae* gebildete Antikörpermenge ist abhängig von verschiedenen Faktoren. So ist der Antikörpertiter umso höher, je länger die klinischen Symptome andauerten und je schwerer sie waren. Ebenso steigt der Antikörpertiter nach mehrmaliger Infektion mit dem Erreger. Dagegen führt eine erfolgreiche Behandlung der Schweine mit Antibiotika zu einem weniger ausgeprägten Titer. Hierbei kommt es aber auf die Wirksamkeit der Antibiotika an. Wurden Schweine mit wenig effektiven Medikamenten, wie z. B. Tiamulin behandelt, entwickelten sie in den meisten Fällen Durchfälle und bildeten höhere Antikörpertiter aus. Eine erfolgreichere Behandlung mit z. B. Lincomycin, die eine Entstehung der Diarrhö verhinderte, induzierte dagegen einen niedrigeren Antikörpertiter (Lee *et al.*, 1976; Schlink und Olson, 1983; Songer und Harris, 1978).

Bei unterschiedlichen Belastungsversuchen kam es immer wieder zu einem Anstieg von agglutinierenden Serum-Antikörpern auch bei Kontrolltieren, die darauf zurückgeführt wurden, dass es im Darm gesunder Tiere zu einer Auseinandersetzung mit anderen Spirochäten kommen kann (Fisher und Olander, 1981; Hudson *et al.*, 1976).

### **2.1.3.2 Zelluläre Immunantwort**

Über die zellulären Immunmechanismen nach einer Infektion von Schweinen mit *B. hyodysenteriae* liegt nur eine sehr überschaubare Anzahl von Publikationen vor. Sicher belegt ist, dass im akuten Stadium der Dysenterie, die durch eine ausgeprägte klinische Symptomatik definiert wurde, CD8 $\alpha^+$ -Lymphozyten, IL-1 $\beta$  und das Serum-Amyloid-A (Akute-Phase-Protein) signifikant ansteigen (Jacobson *et al.*, 2004; Jonasson *et al.*, 2006; Kruse *et al.*, 2008). IL-1 $\beta$  ist ein Zytokin, das durch die Anwesenheit von LPS gramnegativer Bakterien induziert wird. Es wird u. a. von Makrophagen und Darmepithelzellen gebildet und spielt eine wichtige Rolle bei der Synthese von Akute Phase Proteinen (Kruse *et al.*, 2008; Sacco *et al.*, 1996). Weitere Kennzeichen einer zellulären Immunreaktion sind neutrophile Granulozyten und Makrophagen, die während der Phase der klinisch Symptome und auch noch während des Beginns der Genesungsphase der Schweinedysenterie in den für diese Erkrankung typischen Läsionen im Darm gefunden werden können (Jonasson *et al.*, 2006; Kruse *et al.*, 2008). Ein weiteres bei Dysenterie möglicherweise bedeutsames Zytokin ist das IL-10. IL-10

wirkt anti-inflammatorisch und wurde mit Beginn der Genesung im Blut von Schweinen, die an einer Dysenterie erkrankt waren, nachgewiesen (Kruse *et al.*, 2008).

### 2.1.3.3 Antigene

Bei den Studien über die Immunantwort von Schweinen gegen *B. hyodysenteriae* war eine wichtige Fragestellung, welche Bestandteile des Erregers bevorzugt eine Antikörperbildung im Wirt induzieren. Durch die Erforschung anderer Bakterien wusste man, dass bei gram-negativen Bakterien die Virulenzfaktoren und die protektive Immunantwort oftmals mit der äußeren Membran der Bakterien assoziiert sind (Wannemuehler *et al.*, 1988). Verschiedene Autoren gingen davon aus, dass bei *B. hyodysenteriae* ebenfalls die Antikörper gegen Bestandteile der äußeren Membran einen Schutz vermitteln könnten. Erschwert wurden die Untersuchungen zur Antikörperbildung im Schwein durch zahlreiche Kreuzreaktionen mit Antigenen anderer *Brachyspira*-Spezies (Chatfield *et al.*, 1988). So wurden bereits in den 1970er und 1980er Jahren verschiedene Antigene präpariert und auf ihre Speziespezifität hin untersucht (Baum und Joens, 1979).

Als ein bedeutendes Spezies-spezifisches Antigen wurde das LOS identifiziert (Chatfield *et al.*, 1988). LOS gilt als Virulenzfaktor von *B. hyodysenteriae* (Nuessen *et al.*, 1983). Die Variabilität von LOS erklärt auch, warum die Immunantwort gegen die Schweinedysenterie zumindest zum Teil Serotyp-spezifisch ist (Hampson *et al.*, 2000). So wurden in einer Studie Versuche durchgeführt, bei denen im Immunoblot Seren von rekonvaleszenten Schweinen getestet wurden. Zuvor wurden diese Seren mit homologem und heterologem LOS adsorbiert. Bei mit heterologem LOS adsorbierten Seren kam es zu einer Reaktion im Bereich des LOS (14-19 kDa), bei mit homologem LOS adsorbierten Seren kam es aber zu keiner Reaktion im Immunoblot (Wannemuehler *et al.*, 1988). Dieses Ergebnis erklärt auch die wenig Erfolg versprechenden Ergebnisse vieler Vakzinationsversuche mit Ganz-Zell-Vakzinen oder attenuierten *B. hyodysenteriae*-Stämmen, bei denen das dominierende Antigen LOS war. Diese Vakzinen konnten zwar einen zumindest teilweisen Schutz bei Reinfektion mit homologen Stämmen induzieren, bei Infektionen mit heterologen Stämmen war aber kein Schutz vorhanden (Ferne *et al.*, 1983; Hudson *et al.*, 1974).

Im Verlauf natürlicher und experimenteller Infektionen wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblot-Techniken zahlreiche Proteine entdeckt, die von Seren rekonvaleszenter Schweine erkannt wurden. Nicht alle Proteine wurden näher untersucht, da ein großer Teil auch bei anderen *Brachyspira*-spp. nachweisbar war (Chatfield *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 1990). Besonderes wissenschaftliches Interesse erweckten Proteine der äußeren Membran der Bakterien, von denen wiederum bisher nur einige ausgewählte im Rahmen von serologischen Untersuchungen als Antigen Beachtung fanden. Einen Überblick über entsprechend untersuchte Proteine gibt **Tabelle 2**. Nach einer Studie ist davon auszugehen,

dass diese äußeren Membranproteine (Outer Membrane Proteins, OMP) an der Adhäsion der Bakterien an die Darmschleimhaut beteiligt sind (Richter, 2009).

Besonders hervorzuheben ist ein Lipoprotein mit einem Molekulargewicht von 16 kDa bis 17 kDa (Ochiai *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 1992). Seren von rekonvaleszenten Schweinen enthalten Antikörper gegen dieses Protein. Diese Seren konnten in *in vitro*-Tests das homologe *B. hyodysenteriae*-Isolat im Wachstum hemmen (Sellwood *et al.*, 1989). Das 16 kDa-Protein wurde zunächst als SmpA (*Serpulina* membrane protein A) bezeichnet, später als BmpA (*Brachyspira* membrane protein A) und schließlich als Bhlp16 (*Brachyspira hyodysenteriae* lipoprotein mit 16 kDa) (Hampson *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2000; Thomas und Sellwood, 1993). Wie später nachgewiesen wurde, besitzen nicht alle *B. hyodysenteriae*-Stämme das Gen für dieses Protein (Holden *et al.*, 2006). Des Weiteren scheint es umweltabhängig exprimiert zu werden, da es während der Phase der klinischen Symptome der Schweinedysenterie nicht im Serum der infizierten Schweine nachgewiesen werden konnte (Sellwood *et al.*, 1995). Nach Entdeckung des Bhlp16 wurde ein vergleichbar großes Protein nachgewiesen, das als SmpB (Bhlp17.6) bezeichnet wurde (Holden *et al.*, 2006). Nach molekularbiologischen Analysen wurde anschließend postuliert, dass alle *B. hyodysenteriae*-Stämme entweder über das Gen für Bhlp16 oder aber Bhlp17.6 verfügen aber niemals über beide Gene (Holden *et al.*, 2008). Nach neueren Untersuchungen scheint diese Hypothese jedoch keine Allgemeingültigkeit zu besitzen (Barth *et al.*, 2012) Die Funktion dieser beiden Lipoproteine ist ungeklärt. Die Anwesenheit von Antikörpern gegen SmpA in Seren rekonvaleszenter Schweine weist jedoch darauf hin, dass das Protein von den Spirochäten *in vivo* exprimiert werden muss. Eine Expression *in vivo* wurde aber bisher nicht nachgewiesen (Holden *et al.*, 2008).

Ein weiteres gut untersuchtes Lipoprotein der äußeren Membran von *B. hyodysenteriae* ist das BmpB, später als BlpA und dann als Bhlp29.7 bezeichnet (Cullen *et al.*, 2003; Hampson *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2000). Es besitzt ein Molekulargewicht von etwa 30 kDa (Lee und Hampson, 1996; Lee *et al.*, 2000). Gegen rekombinant hergestelltes Bhlp29.7 mit exakt einem Molekulargewicht von 29,7 kDa (La *et al.*, 2004) konnten in Seren von rekonvaleszenten Schweinen Antikörper nachgewiesen werden (Lee *et al.*, 2000). Dieses Protein und das zugehörige Gen wurden zunächst in zwei voneinander unabhängigen Studien entdeckt und untersucht (Cullen *et al.*, 2003; Lee und Hampson, 1996). Erst später wurde erkannt, dass es sich um dasselbe Protein handelte (La *et al.*, 2004). Das Gen *bhlp29.7* kommt anscheinend bei allen *B. hyodysenteriae*-Stämmen vor und lediglich noch bei dem *B. innocens*-Stamm B256<sup>T</sup> (La *et al.*, 2005; Lee und Hampson, 1996). Im Rahmen der Analyse des kodierenden Gens wurden 4 paraloge Gene entdeckt und als *blpGFEA*, bzw. als *bhlp29.7a*, *bhlp29.7b*, *bhlp29.7c* und *bhlp29.7d* bezeichnet. Allerdings wird *in vivo* nur ein Protein exprimiert,

nämlich Bhlp29,7a, das dem bereits vorher beschriebenen BmpB, bzw. BlpA entspricht (Cullen *et al.*, 2003; La *et al.*, 2005).

Neben den genannten Proteinen wurden noch so genannte „variable surface proteins“ (vsp) beschrieben, welche die Hauptproteine der äußeren Membran von *B. hyodysenteriae* bilden (Witchell *et al.*, 2011). Diese Proteine besitzen nach Untersuchungen in der SDS-PAGE-Elektrophorese eine Masse von ca. 39 kDa (Gabe *et al.*, 1995). Bei der Suche nach dem für dieses Protein codierende Gen wurden mehrere Gene entdeckt, die jeweils für ein 39 kDa-Protein kodieren (Gabe *et al.*, 1998). Derzeit werden zehn vsp-Gene unterschieden, die auf zwei Genorte verteilt sind, nämlich *vspABCD* und *vspEFGH* (McCaman *et al.*, 2003). Die erst kürzlich entdeckten Gene *vspI* und *vspJ* scheinen auf eigenen Genorten zu liegen (Witchell *et al.*, 2011). Die Stämme von *B. hyodysenteriae* unterscheiden sich in der Anzahl der vsp-Gene. Ihre Lokalisation auf dem Chromosom ist aber identisch. Einige Autoren vermuten, dass die Bereitstellung mehrerer, geringfügig unterschiedlicher Gene eine Strategie zur Umgehung der Immunantwort des Wirtes darstellt. Etwas ähnliches, einen von dem Milieu induzierten „switch“ zwischen OspA und OspB, ist bei *Borrelia burgdorferi* beschrieben (Cullen *et al.*, 2003). Gleichfalls könnte dieser Set von Genen aber auch zur Adaptation an geänderte Umweltbedingungen dienen (McCaman *et al.*, 2003). Bei Untersuchungen zur Antigenität dieser Proteine reagierten Seren von Schweinen, die an Schweinedysenterie erkrankt und wieder genesen waren, nicht mit den denaturierten vsp-Proteinen im „Westernblot“. Dagegen wurde nachgewiesen, dass diese Proteine Komplexe mit unterschiedlicher Zusammensetzung in der äußeren Membran von *B. hyodysenteriae* bilden und diese Komplexe von den Seren der rekonvaleszenten Schweine im Westernblot erkannt werden (Witchell *et al.*, 2011). Gleichzeitig widersprechen die Autoren um Witchell der Vermutung, dass diese Proteine dem Bakterium dazu dienen, der Wirtsabwehr zu entgehen. Die eigentliche Funktion dieser Proteinkomplexe bleibt somit unklar (Witchell *et al.*, 2011).

**Tabelle 2      Überblick über die bekannten Antigene von *B. hyodysenteriae***

<b>Lokalisation</b>	<b>Bezeichnungen</b>	<b>Molekulargewicht (kDa)</b>
Lipopolysaccharid	Lipooligosaccharid (LOS)	10 - 24
Membranproteine	VspA-J (variable surface proteins) oder Bhmp39a-j	39
Lipoproteine	SmpA, BmpA oder Bhlp16	16
	SmpB oder Bhlp17.6	17,6
	BmpB, BlpA, Bhlp29.7a-d oder BlpGFEA	29,7

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Referenzstämme

Die im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen verwendeten Referenzstämme von *B. hyodysenteriae* und deren Serotyp- und Serogruppenzugehörigkeit sind der **Tabelle 3** zu entnehmen. Als weiterer Referenzstamm diente *B. innocens* (im hiesigen Institut unter der Tagebuchnummer P7949 archiviert), der freundlicherweise von Dr. J. Rohde, Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt wurde. Die Referenzstämme wurden in der Stammsammlung verwahrt.

**Tabelle 3** *Brachyspira* spp.-Referenzstämme

Spezies	Stamm	Serotyp	Serogruppe	Herkunft
<i>B. hyodysenteriae</i>	B78	1	A	ISU
<i>B. hyodysenteriae</i>	B204	2	B	IM
<i>B. hyodysenteriae</i>	B169	3	C	ISU
<i>B. hyodysenteriae</i>	A1	4	D	ISU
<i>B. hyodysenteriae</i>	B8044	5/2	B	ISU
<i>B. hyodysenteriae</i>	B6933	6/1	A	ISU
<i>B. hyodysenteriae</i>	ACK300/8	7/2	B	ISU
<i>B. hyodysenteriae</i>	Vic2	k. A.	H	MU
<i>B. hyodysenteriae</i>	NSW1	k. A.	I	MU
<i>B. innocens</i>	P7949	–	–	TiHo

**Erläuterungen:** **k. A.** = keine Angaben in der Literatur; **ISU** = Prof. M.J. Wannemuehler, Veterinary Medical Research Institute Iowa State University, Ames, USA, **MU** = Prof. D.J. Hampson, School of Veterinary Studies, Murdoch University, Perth, Western Australien, **IM** = ursprünglich Dr. Harris, Veterinary Medical Research Institute Iowa State University, Ames, USA freundlicherweise überlassen von Prof. G. Amtsberg, Institut für Mikrobiologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover; **TiHo** = Dr. J. Rohde, Institut für Mikrobiologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover.

##### 3.1.2 Feldisolate

Für die vorliegende Arbeit standen im Institut 75 *B. hyodysenteriae*-Feldisolate aus Deutschland zur Verfügung. Diese Isolate waren seit 2003 aus Kotproben durchfallkranker und gesunder Schweine (diagnostische Einsendungen an das Institut) isoliert, in Reinkultur vermehrt und archiviert worden. Die Zuordnung zur Spezies *B. hyodysenteriae* erfolgte

anhand des Phänotyps der Stämme (starke Hämolyse auf TSA<sup>CVSSR</sup>-Agar unter flächig ausgebreiteten, an den Randbereichen unregelmäßigen „Kolonien“) und molekularbiologischer Analysen (PCR-RFLP-Analyse des *nox*-Gens und/oder *B. hyodysenteriae*-spezifische PCR) (Herbst et al., 2004; Schlez, 2011). Hinsichtlich der Kultivierung der Brachyspiren aus Untersuchungsmaterialien und der Charakterisierung der Isolate bis zur Speziesebene wird auf die Dissertationsschrift von Schlez (2011) verwiesen. Neben den deutschen Feldisolaten wurden 42 ausländische Feldisolate in die Stammsammlung aufgenommen. Insgesamt 17 spanische Feldisolate wurden freundlicherweise von Prof. Dr. P. Rubio (Universidad de León, León, Spanien), 12 dänische Isolate von Ph. D. B. Kokotovic (National Veterinary Institute, Frederiksberg, Dänemark), fünf japanische Isolate von Prof. Y. Adachi (National Ibaraki University, Ibaraki, Japan), sowie acht nordamerikanische Isolate von Dianna Jordan, (Boehringer Ingelheim vetmedica, Ames, Iowa, USA) zur Verfügung gestellt. Alle Isolate erhielten eine Stammnummer unter der in einer Microsoft Excel-Datenbank alle Informationen zur den Isolaten (z.B. Herkunft der Stämme, Passagezahl) eingetragen wurden.

### **3.1.3 Lagerung der Brachyspiren**

Für die dauerhafte Lagerung wurden die Referenzstämme und die Feldisolate auf TSA<sup>CVSSR</sup>-Agar angezüchtet, in fetalem bovines Serum (FBS) (Fa. Sigma, Australien) suspendiert und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Zur vorübergehenden Aufbewahrung wurden die Referenzstämme und auch alle Feldisolate in BHIF<sup>CVSSR</sup>-Medium suspendiert, in Cryotubes (Cryo's, Greiner bio-one, Frickenhausen) abgefüllt und bei -70 °C eingefroren.

## **3.2 Bakteriologische Methoden**

### **3.2.1 Anzucht**

**Anzucht auf TSA<sup>CVSSR</sup>-Agar.** Zur Anzucht von Isolaten aus flüssigem Stickstoff und aus Kotproben wurden die Brachyspiren auf TSA<sup>CVSSR</sup>-Agar ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte in einer Anaerobiertopf (Anaerocult, Fa. Merck, Darmstadt) unter anaeroben Bedingungen, die mittels eines AnaeroGen®-Beutels (Fa. Oxoid, Hampshire, England) hergestellt und mit einem Mikrobiologie Anaerotest® (Fa. Merck, Darmstadt) überprüft wurden (37 °C, 5-10 d).

**Anzucht von Brachyspiren in BHIF<sup>CVSSR</sup>-Medium.** Für die Anzucht der bei -70 °C eingefrorenen Brachyspiren wurde das entsprechende Cryotube mittels Handwärme aufgetaut und der Inhalt anschließend im Verhältnis 1:49 (v/v) in das Anzuchtmedium überführt. Alternativ dienten auch frisch auf TSA<sup>CVSSR</sup>-Agar-Platten vermehrte Brachyspiren. Hierzu wurden die Brachyspiren mit BHIF<sup>CVSSR</sup>-Medium abgeschwemmt und ca. 1 ml dieser Suspension in 49 ml BHIF<sup>CVSSR</sup>-Medium überführt.

Die Inkubation fand unter anaeroben Bedingungen (37 °C, 3-7 d) in einer Anaerobierbox (AnaeroPack, Rectangular Jar, Fa. Mitsubishi Gas Chemical Company, INC, Japan) unter



ständiger Bewegung auf dem Kreisschüttler (96 U/min) statt. Zur Kontrolle der anaeroben Bedingungen wurde stets ein Sauerstoffindikator mitgeführt.

### 3.2.2 Keimzahlbestimmung

**WbE<sub>50</sub>-Bestimmung.** Zur Bestimmung der Lebendkeimzahl wurde nach jeder Anzucht eine log<sub>10</sub>-Verdünnungsreihe über sechs Stufen in BHIF<sup>CVSSR</sup>-Medium hergestellt. Je Verdünnungsstufe wurden vier 10 µl-Tropfen auf eine TSA<sup>CVSSR</sup>-Agar aufgebracht. Nach Inkubation (anaerob, 37 °C, 5 – 7 d) erfolgte die Auswertung makroskopisch anhand der Hämolyseplaques. Die je Verdünnungsstufe entstandenen Hämolyseplaques wurden protokolliert und hieraus der Titer der Wachstum-bildenden Einheiten 50 je ml (WbE<sub>50</sub>/ml) geschätzt (Kärber, 1931; Spearman, 1908).

**Optische Dichte.** Die Bestimmung der optischen Dichte von Bakteriensuspensionen erfolgte in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 550 nm bzw. 600 nm (Spektralphotometer DU640, Fa. Beckman, Fullerton).

### 3.2.3 Reinheitskontrolle

**Brachyspiresuspensionen.** Die Suspensionen der Referenzstämmen, die bei -70 °C gelagert wurden, sowie jede von den Feldstämmen hergestellten Suspensionen wurden vor der weiteren Verwendung auf Kontaminationsfreiheit geprüft. Hierzu wurden jeweils 100 µl der Suspensionen auf einen Schädler-ohne-Agar (ohne Antibiotika), einen Blut-Agar, einen Gassner-Agar und einen Zeissler-Agar pipettiert und ausgestrichen, sowie eine Serumbouillon beimpft. Nach aerober und anaerober Bebrütung über drei Tage und dem Ausbleiben von makroskopisch erkennbarem Bakterienwachstum wurden die Suspensionen für kontaminationsfrei erklärt und zur weiteren Verwendung freigegeben.

**Impfantigen.** Zur Prüfung der Impfantigene auf Freisein von aerob und anaerob vermehrbaren Bakterien dienten verschiedene Nährmedien wie Schädler-Agar, Blut-Agar, Gassner-Agar, Zeissler-Agar und Serumbouillon. Nach Beimpfung und dreitägiger anaerober und aerober Bebrütung wurden die Kulturen makroskopisch auf Bakterienwachstum geprüft. Zum Ausschluss vermehrungsfähiger Brachyspiren wurden zusätzlich 100 µl des Impfantigens auf TSA<sup>CVSSR</sup>-Agar verimpft und für 5 Tage anaerob kultiviert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Antigene bei -70 °C gelagert.

## 3.3 Präparation von LOS-Fractionen

**Extraktion der LOS-Fraktion mittels modifizierter Phenol-Wasser-Methode** (Baum und Joens, 1979; Westphal *et al.*, 1952). Nach Vermehrung der zu präparierenden Stämme in 50 ml BHIF<sup>CVSSR</sup>-Medium, wurden diese in ein Cellstar®Tube (Fa. Greiner bio-one, Frickenhausen) überführt und die Bakterien nach Zentrifugation (2700 x g, RT, 20 min) zwei Mal mit 0,15 M NaCl gewaschen. Das Pellet wurde in 1 ml *A. deionisata* resuspendiert, in ein

1,5 ml-Reaktionsgefäß (Fa. Eppendorf) überführt und nach erneutem Zentrifugieren (2900 x g, RT, 8 min) in 0,5 ml heißem *A. deionisata* (68 °C) resuspendiert und in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt. Dort wurden weitere 9,5 ml *A. deionisata* (68 °C) zugegeben und die Suspension anschließend sorgfältig gemischt. Nach Zugabe von 10 ml heißem Phenol (88 % (v/v), 68 °C) wurde die Suspension erneut gemischt, inkubiert (12 min), in einem Eisbad auf 10 °C abgekühlt und zentrifugiert (2200 x g, 4 °C, 20 min). Anschließend wurde die wässrige Phase abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Das Pellet wurde einem zweiten Phenolextraktionsschritt unterzogen und beide gewonnenen wässrigen Phasen gepoolt, in einen Dialyseschlauch (Visking®, Dialysis tubing, Fa. Serva, Heidelberg) überführt und gegen 5 l *A. deionisata* dialysiert (4 °C, 24 h). Nach der Reduktion des Volumens durch Einlegen des Dialyseschlauches in PEG 6000 (Fa. Merck, Darmstadt) auf ca. ein Fünftel des Ausgangsvolumens wurden das 6-fache Volumen einer Ethanol-Na-Acetat-Lösung (90 % [v/v]) zugegeben und die LOS-Fraktion gefällt (-20 °C, 14-16 h). Nach Zentrifugation (16000 x g, 4 °C, 20 min) wurde das Präzipitat in 1 ml *A. deionisata* aufgenommen und mit 5 ml eiskaltem Aceton versetzt. Nach Zentrifugation (16000 x g, RT, 20 min) wurde der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit Aceton gewaschen. Abschließend wurde das Pellet in 1 ml *A. deionisata* aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

**Extraktion der LOS-Fraktion unter Verwendung des iNtRON-LPS-Kits.** Für die Präparation des LOS aus den Feldisolaten wurde der kommerziell erhältliche LPS Extraction Kit (iNtRON, Südkorea, bezogen über HISS Diagnostics GmbH, Freiburg) genutzt. Nach Anzucht der Brachyspiren-Stämme in BHIF<sup>CVSSR</sup>-Medium wurde die optische Dichte OD<sub>600nm</sub> der Suspension gemessen (Spektralphotometer DU640, Fa. Beckman, Fullerton) und entsprechend dem Ergebnis nur ein Anteil dieser Suspension zentrifugiert (4500 x g, 10 °C, 10 min), der nach seinem Bakteriengehalt einer 10 ml Kultur von *E. coli* mit einer OD<sub>600nm</sub> von 1 entsprach. Nach Zugabe von 1 ml Lysispuffer des iNtRON-LPS-Kits und 200 µl Chloroform wurde die Suspension gut geschüttelt, inkubiert (RT, 10 min) und zentrifugiert (13000 x g, RT, 10 min). Anschließend wurde der Überstand mit dem zweifachen Volumen Purificationpuffer des iNtRON-LPS-Kits versetzt. Nach Inkubation (-20 °C, 10 min) und Zentrifugation (13000 x g, RT, 15 min) wurde das Pellet gewonnen und mit 800 µl 70 %igem Ethanol (v/v) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (13000 x g, RT, 15 min) wurde das Pellet bei RT für mindestens 1 h getrocknet, in 70 µl Tris-HCl Puffer aufgenommen, 1 min im Wasserbad erhitzt (100 °C) und dann bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### **3.4 Analyse der LOS-Fractionen**

#### **3.4.1 Proteinase K-Verdau der LOS-Fraktion**

Die mittels des iNtRON-LPS-Kits gewonnenen LOS-Fractionen wurden vor Auftrennung in der SDS-PAGE mit Proteinase K (Fa. Sigma-Aldrich Chemical GmbH) verdaut. Hierfür wurden die LOS-Präparationen mit der gleichen Menge Lämmli-Puffer und der 1,7fachen Menge Proteinase K-Lösung (10 mg/ml [w/v]) versetzt und über Nacht im Wasserbad inkubiert (37 °C, 16-18 h). Die Auftrennung in der SDS-PAGE erfolgte unmittelbar im Anschluss an den Verdau.

#### **3.4.2 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)**

Die analytische Auftrennung von Proteinase K-verdauten LOS-Präparationen erfolgte mittels vertikaler SDS-PAGE nach Lämmli (Lämmli, 1970). Vor dem Auftragen auf das SDS-PA-Gel wurden die Proben gekocht (100 °C, 10 min) und anschließend zentrifugiert (13000 x g, RT, 1 min). Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 1 mm dicken, 4,5 %-igen Polyacrylamidsammelgel und einem 16 %-igen Polyacrylamidtrenngel über eine effektive Trennstrecke von 5,5 cm bei 120 Volt / Gel über 2 h. Zur Schätzung der molaren Masse der LOS-Banden wurde der Marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas GmbH, St. Leon Rot) mitgeführt.

Zur Visualisierung der LOS-Banden wurden die SDS-PA-Gele entweder einer Zink- oder einer Silberfärbung unterzogen. Zur Haltbarmachung wurden die gefärbten SDS-PA-Gele auf Filterpapier gelegt und unter Vakuum getrocknet (80 °C, 2 h) (Gel Dryer, Model 543, Fa. Biorad, München).

#### **3.4.3 Zinkfärbung von SDS-PA-Gelen**

Einzelne SDS-PA-Gele wurden mittels des *zinc stain and destain* Kits (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) gefärbt und anschließend wieder entfärbt. Hierzu wurde das entsprechende SDS-PA-Gel zunächst für 10 min in der mit *A. deionisata* verdünnten Lösung A (Verdünnung 1:10 [v/v]) und anschließend für 1 min in der verdünnten Lösung B (Verdünnung 1:10 [v/v]) des Kits geschwenkt. Die Färbung wurde mit *A. deionisata* gestoppt. Nachdem die SDS-PA-Gele fotografiert waren, wurden sie mit der verdünnten *destain*-Lösung (Verdünnung 1:10 mit *A. deionisata* [v/v]) entfärbt.

#### **3.4.4 Silberfärbung von SDS-PA-Gelen**

SDS-PA-Gele wurden mithilfe des PageSilver™ Silver Staining Kit (Fermentas GmbH, St. Leon Rot) gefärbt. Hierzu wurden die SDS-PA-Gele nach Ende der SDS-PAGE zunächst in *gel fixing solution 1* für mindestens eine Stunde geschwenkt. Anschließend wurden die SDS-PA-Gele dreimal für je 20 min in *gel fixing solution 2* fixiert und zweimal mit *A. deionisata* gewaschen. Nachdem die *sensitizing solution* für 1 min eingewirkt hatte, wurde, nach einem

erneuten Waschschrift, die *staining solution* zugegeben und die SDS-PA-Gele für 20 min auf der Wippe geschwenkt. Es schloss sich ein weiterer Waschschrift an, danach wurde die *developing solution* zugegeben und diese je nach Stärke der sich zeigenden Banden für 5 bis 10 min auf das SDS-PA-Gel einwirken lassen. Sobald die gewünschte Bandenstärke zu erkennen war, wurde die *stop solution* für 10 min zugegeben. Das fertige SDS-PA-Gel wurde fotografiert und bis zur Trocknung in *A. deionisata* gelagert.

### **3.5 Antikörperbestimmung**

#### **3.5.1 Konjugat**

In dieser Arbeit wurde „ECLTM Donkey Anti Rabbit IgG HRP POD“ (GE Healthcare, München) in der Gebrauchsverdünnung 1:1000 (v/v) in PBS Tween-Puffer als Konjugat eingesetzt.

#### **3.5.2 Immunoblot**

**Transfer.** Die in der SDS-PAGE aufgetrennten LOS-Bestandteile wurden anschließend durch das Semi-Dry-Verfahren aus dem SDS-PA-Gel auf eine auf Gelgröße zugeschnittene PROTRAN®-Nitrocellulosemembran (Whatman, Dassel) übertragen. Dazu wurden Filterpapiere (MAGV, Rabenau-Londorf) in der Elektroblotkammer (Novablot Electrophoretic Transfer Kit, Modell 2117-250, Pharmacia/LKB Bromma, Schweden) folgendermaßen gestapelt: sechs in Anodenpuffer I getränkte Filterpapiere, drei in Anodenpuffer II getränkte Filterpapiere, die Nitrocellulosemembran (30 min in 1 x PBS eingelegt), das SDS-PA-Gel (in Anodenpuffer II äquilibriert) und neun in Kathodenpuffer eingelegte Filterpapiere. Der Transfer erfolgte bei konstanten 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Nitrocellulosemembran (RT, 100 min). Anschließend wurde das SDS-PA-Gel bis zur Trocknung in *A. deionisata* bei 4 °C gelagert und die Nitrocellulosemembran über Nacht in 1 x PBS eingelegt und ebenfalls bei 4 °C gelagert.

**Detektion.** Die Nitrocellulosemembran wurde in Peptonblockpuffer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) (1:10 [v/v] in *A. deionisata* verdünnt) inkubiert (RT, 1 h) und daraufhin dreimal mit 1x PBS-Tween (20 ml, RT, 5 min) gewaschen. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran in eine Slot-Blot-Kammer (Von-Keutz-Labortechnik, Reiskirchen) gespannt. Die Slots der Kammer wurden jeweils mit dem entsprechenden Antiserum gefüllt (Verdünnung 1:100 mit 1 x PBS-Tween, Inkubation RT, 1 h). Nach Dekantierung der Antiseren folgten drei Waschschriffe mit 1 x PBS-Tween (RT, 5 min). Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran mit dem Konjugat (Detektionsantikörper) (ECL<sup>TM</sup> Donkey Anti Rabbit IgG HRP POD, GE Healthcare, München) inkubiert (Verdünnung 1:1000 in 1 x PBS-Tween, RT, 1 h). Nach 2 Waschschriffen mit 1 x PBS-Tween (RT, 5 min) und Äquilibrierung mit 1 x PBS (2 x, RT, 1 min) erfolgte die Visualisierung der serologischen Reaktion durch

Zugabe von Substratlösung (4 ml Chloronaphtol-Methanol, 6 ml PBS, 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Bei ausreichender Signalstärke wurde die enzymatische Reaktion durch zweimaliges Waschen mit *A. deionisata* (jeweils 20 sec) gestoppt. Die so behandelten Nitrocellulosemembranen wurden bei RT getrocknet und danach fotografiert.

### **3.5.3 Immundiffusionstest**

Der Immundiffusionstest wurde zur Überprüfung der Serokonversion der immunisierten Kaninchen eingesetzt. Als Medium für den Immundiffusionstest diente Borat-Agar, der in Petrischalen gegossen wurde (15 ml je Petrischale mit 8,5 cm Durchmesser). Nach dem Erkalten des Agars wurden mithilfe eines Stempels (institutseigene Werkstatt) sieben Löcher (Durchmesser 5 mm) in den Agar gestanzt, die nach dem folgenden Muster angeordnet waren: um ein zentrales Loch waren, mit jeweils 4 mm Abstand (Rand zu Rand), zirkulär sechs Löcher angeordnet, wobei der Gesamtdurchmesser 2 cm betrug. Nach Zugabe der LOS-Präparationen und Hyperimmunseren der Kaninchen (Probenvolumen je Vertiefung 18  $\mu$ l) wurde der Test in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert und nach 24 h und 48 h makroskopisch auf das Vorhandensein von Präzipitatlinien untersucht. Das Ergebnis wurde fotografisch dokumentiert.

## **3.6 Tierexperimentelle Methoden**

### **3.6.1 Herstellung polyklonaler Antiseren gegen Referenzstämme und Feldisolate in Kaninchen**

#### **3.6.1.1 Tiere**

Insgesamt wurden 27 weibliche Kaninchen der Rasse Weiße Neuseeländer in vier verschiedenen Versuchsdurchgängen (TVs) eingesetzt [Fa. Harlan Winkelmann, Borcheln (TV141, 143), bzw. Fa. Bauer, Neuenstein (TV144, TV145)].

#### **3.6.1.2 Tierhaltung**

Alle vier Tierversuche wurden nach § 8a Abs. 1 und 2 des Tierschutzgesetzes dem Regierungspräsidium Gießen mit Datum vom 31.10.07 angezeigt.

Die Kaninchen wurden während der Versuche in Einzelboxen (60 cm breit, 63 cm hoch, 85 cm tief) gehalten. Die Fütterung erfolgte mit Heu und pelletiertem Alleinfuttermittel (Hasfit plus, Raiffeisen) *ad libitum*. Wasser stand stets durch Flaschentränken zur Verfügung. Bis zu dem Beginn der Versuche hatten die Tiere mindestens 14 Tage Zeit sich einzugewöhnen.

#### **3.6.1.3 Impfantigene**

Als Impfantigene wurden verschiedene Ganzzelllysate von *B. hyodysenteriae*-Stämmen eingesetzt. Nach Vermehrung der Bakterien in BHIF<sup>CVSSR</sup>-Medium und Bestimmung der optischen Dichte (OD<sub>540nm</sub>) sowie der WBE<sub>50</sub>/ml wurden die Kulturen zentrifugiert (4500 x g, 15 min) und die Pellets zweimal mit 0,15 M NaCl gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift

wurden die Erreger in 0,15 M NaCl suspendiert und die Suspension auf eine optische Dichte von  $OD_{540nm} = 1$  eingestellt. Zum Aufschluss der Bakterienzellen schloss sich eine dreimalige direkte Behandlung mit Ultraschall (Sonifier®, Branson) für einen Zeitraum von 2 x 20 s je Anwendung an. Abschließend wurde die Suspension mit UV-Licht inaktiviert. Dazu wurden jeweils 10 ml der Suspensionen in eine Petrischale gegeben und für 5 min in einer UV-Kammer (Stratalinker, Stratagene) UV-Licht mit einer Leistung von 500 J ausgesetzt. Nach dieser Behandlung wurden Proben entnommen und kulturell bakteriologisch untersucht (Reinheitskontrolle, s. **Kapitel 3.2.3**). Bis zur weiteren Verwendung wurden die Antigene bei -70 °C gelagert. Für die subkutan (s. c.)- und intramuskulär (i. m.)-Immunisierung wurden die Lysate kurz vor der Applikation mit dem gleichen Volumen  $Al_2(OH_3)$  versetzt, bei intravenöser (i. v.)-Verabreichung erfolgte die Applikation ohne Adjuvanz.

#### **3.6.1.3.1 Auswahlkriterien von deutschen Feldisolaten zur Herstellung von polyklonalen Antiseren im Kaninchen**

Zur Herstellung von Antiseren gegen deutsche *B. hyodysenteriae*-Feldisolate in Kaninchen, wurden solche Isolate ausgewählt, die zuvor nicht im Immunoblot mit einem der gegen verschiedene *B. hyodysenteriae*-Referenzstämme im Institut vorhandenen Antiseren reagiert hatten. Weitere Auswahlkriterien waren die geografische Herkunft, das Alter der Schweine, von denen das Isolat gewonnen wurde, das Jahr der Herkunft, sowie Unterschiede in den biochemischen und genetischen Eigenschaften. Hierbei wurde versucht, eine möglichst große Variation zu erreichen. Einen Überblick über die genannten Eigenschaften der Impfstämme gibt **Tabelle 4**.

#### **3.6.1.4 Impfung und Serumgewinnung**

Vor jeder Applikation der Antigene wurde den Kaninchen aus der *Vena auricularis caudalis* zwischen 2 und 5 ml Blut entnommen. Anschließend erfolgte die Immunisierung subkutan (s. c.), intramuskulär (i. m.) sowie intravenös (i. v.). Bei den Teilversuchen TV144 und TV145 wurde auf eine intravenöse Verabreichung des Antigens verzichtet. Die **Tabelle 5** gibt die Impfschemata und die Applikationsart der Antigene der jeweiligen Teilversuche wieder.

Die terminale Blutentnahme erfolgte durch Eröffnung der *Arteria carotis*. Zuvor wurden die Tiere mit Ketamin (30 mg/kg KGW, i. m., Fa. Medistar®, Holzwickede) und Xylazin (5 mg/kg KGW, i. m., Fa. Medistar, Holzwickede) narkotisiert. Nach Ausbleiben des Lidreflexes wurden die Tiere getötet. Das aufgefangene Blut wurde mindestens 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend abzentrifugiert (1300 x g, RT, 10 min). Das gewonnene Serum wurde in neue Gefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 4

Eigenschaften der zur Herstellung von Antiseren ausgewählten deutschen *B. hyodysenteriae*-Feldisolate

Feld- isolat	Herkunft (PLZ)	Alter der Schweine	Isola- tions- jahr	Biochemische Eigenschaften <sup>1)</sup> deutscher Feldisolate			genetische Eigenschaften (Vsp-Multiplex-PCRs) deutscher Feldisolate							
				I	Hi	Ga	A	B	C	D	E	F	G	H
				G3	27793	k. A.	2004	0	0	0	+	0	+	+
G21	23758	Sau	2004	0	0	0	+	0	0	0	+	0	0	0
G38	36151	Mastschwein 35 kg	2005	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0
G44	25764	Mastschwein 60 kg	2004	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0
G47	27404	Saugferkel	2004	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	0
G64	49439	k. A.	2004	0	0	0	+	+	+	0	+	0	+	0
G88	54675	Mastschwein	2003	0	+	+	0	0	0	0	+	0	0	0
G91	k. A.	k. A.	2006	n. t.	n. t.	n. t.	0	0	0	0	+	0	0	0
G98	49596	Mastschwein	2006	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Erläuterungen**

**k. A.:** keine Angabe, **n. t.:** nicht getestet.

**1)** alle Isolate  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glukosidase positiv (nicht aufgeführt),

**I:** Indolbildung, **Hi:** Hippurathydrolyse, **Ga:**  $\alpha$ -Galaktosidase;

**0:** negativ, **+**: positiv.

### 3.7 Datenhaltung und Auswertung

#### 3.7.1 Bilddokumentation

Die SDS-PA-Gele und die Immunoblots wurden mittels der Digitalkamera MEDION© LIFE© P42005 (MEDION, Mühlheim, Ruhr) fotografisch dokumentiert. Bildausschnitte wurden im Microsoft PowerPoint-Programm (Microsoft Office XP Professional) erstellt.

Tabelle 5

**Impfung mit verschiedenen *B. hyodysenteriae*-Stämmen/Isolaten  
(TV 141, 143, 144, 145)**

Impfantigen-charge	WBE <sub>50</sub> pro ml	Applika- tions- stelle	Injektionsvolumen [ml] je Versuchstag und Applikationsstelle									
			1	15	22/ 23	29/ 30	36	42/ 43	51/ 56	63	79	86
B78/02/08	10 <sup>8,00</sup>	s.c.	2,0	1,5	1,5	-	-	-	-	-	-	-
		i.m.	-	0,5	0,5	-	-	-	-	-	-	-
		i.v.	-	-	-	1,0	-	1,0	-	-	-	-
B204/02/08	10 <sup>8,00</sup>	s.c.	2,0	1,5	1,5	-	-	-	-	-	-	-
		i.m.	-	0,5	0,5	-	-	-	-	-	-	-
		i.v.	-	-	-	1,0	-	1,0	-	-	-	-
B169/02/08	10 <sup>8,00</sup>	s.c.	2,0	1,5	1,5	-	-	-	-	-	-	-
		i.m.	-	0,5	0,5	-	-	-	-	-	-	-
		i.v.	-	-	-	1,0	-	1,0	-	-	-	-
A1/05/08	10 <sup>8,00</sup>	s.c.	2	1,5	1,5	-	-	1,5	-	-	-	-
		i.m.	-	0,5	0,5	-	-	0,5	-	-	-	-
		i.v.	-	-	-	1,0	-	-	-	-	-	-
A1/10/08	n. b.	s.c.	2	1,5	1,5	1,5	-	1,5	-	1,5	1,5	1,5
		i.m.	-	0,5	0,5	0,5	-	0,5	-	0,5	0,5	0,5
B8044/05/08 (2 Tiere)	10 <sup>7,25</sup>	s.c.	2	1,5	1,5	-	-	1,5	-	-	-	-
		i.m.	-	0,5	0,5	-	-	0,5	-	-	-	-
		i.v.	-	-	-	1,0	-	-	-	-	-	-
B8044/10/08	n. b.	s.c.	2	1,5	1,5	1,5	-	1,5	-	-	-	-
		i.m.	-	0,5	0,5	0,5	-	0,5	-	-	-	-
B6933/05/08 (2 Tiere)	10 <sup>7,25</sup>	s.c.	2	1,5	1,5	-	-	1,5	-	-	-	-
		i.m.	-	0,5	0,5	-	-	0,5	-	-	-	-
		i.v.	-	-	-	1,0	-	-	-	-	-	-
ACK300/8/06/08 (2 Tiere)	10 <sup>4,00</sup>	s.c.	2	1,5	1,5	1,5	-	1,5	-	-	-	-
		i.m.	-	0,5	0,5	0,5	-	0,5	-	-	-	-
Vic2/06/08	10 <sup>6,50</sup>	s.c.	2	1,5	1,5	-	-	-	-	-	-	-
		i.m.	-	0,5	0,5	-	-	-	-	-	-	-
Vic2/10/08	n. b.	s.c.	2	1,5	1,5	1,5	-	1,5	-	1,5	1,5	1,5
		i.m.	-	0,5	0,5	0,5	-	0,5	-	0,5	0,5	0,5
NSW1/06/08	10 <sup>7,00</sup>	s.c.	2	1,5	1,5	1,5	-	1,5	-	-	-	-
		i.m.	-	0,5	0,5	0,5	-	0,5	-	-	-	-
NSW1/10/08	n. b.	s.c.	2	1,5	1,5	1,5	-	1,5	-	1,5	1,5	1,5
		i.m.	-	0,5	0,5	0,5	-	0,5	-	0,5	0,5	0,5
G3/02/10	10 <sup>7,75</sup>	s.c.	2	-	1,5	1,5	1,5	-	1,5	-	-	-
		i.m.	-	-	0,5	0,5	0,5	-	0,5	-	-	-
G21/11/08	n. b.	s.c.	2	1,5	1,5	1,5	-	1,5	-	-	-	-
		i.m.	-	0,5	0,5	0,5	-	0,5	-	-	-	-
G38/02/10	10 <sup>6,25</sup>	s.c.	2	-	1,5	1,5	1,5	-	1,5	-	-	-
		i.m.	-	-	0,5	0,5	0,5	-	0,5	-	-	-
G44/02/10	10 <sup>7,75</sup>	s.c.	2	-	1,5	1,5	1,5	-	1,5	-	-	-
		i.m.	-	-	0,5	0,5	0,5	-	0,5	-	-	-
G47/02/10	10 <sup>8,00</sup>	s.c.	2	-	1,5	1,5	1,5	-	1,5	-	-	-
		i.m.	-	-	0,5	0,5	0,5	-	0,5	-	-	-
G64/02/10	10 <sup>7,75</sup>	s.c.	2	-	1,5	1,5	1,5	-	1,5	-	-	-
		i.m.	-	-	0,5	0,5	0,5	-	0,5	-	-	-
G88/02/10	10 <sup>6,50</sup>	s.c.	2	-	1,5	1,5	1,5	-	1,5	-	-	-
		i.m.	-	-	0,5	0,5	0,5	-	0,5	-	-	-
G91/02/10	10 <sup>7,50</sup>	s.c.	2	-	1,5	1,5	1,5	-	1,5	-	-	-
		i.m.	-	-	0,5	0,5	0,5	-	0,5	-	-	-
G98/02/10	10 <sup>7,75</sup>	s.c.	2	-	1,5	1,5	1,5	-	1,5	-	-	-
		i.m.	-	-	0,5	0,5	0,5	-	0,5	-	-	-
P7949/02/08	10 <sup>8,00</sup>	s.c.	2,0	1,5	1,5	-	-	-	-	-	-	-
		i.m.	-	0,5	0,5	-	-	-	-	-	-	-
		i.v.	-	-	-	1,0	-	1,0	-	-	-	-



## 4 Ergebnisse

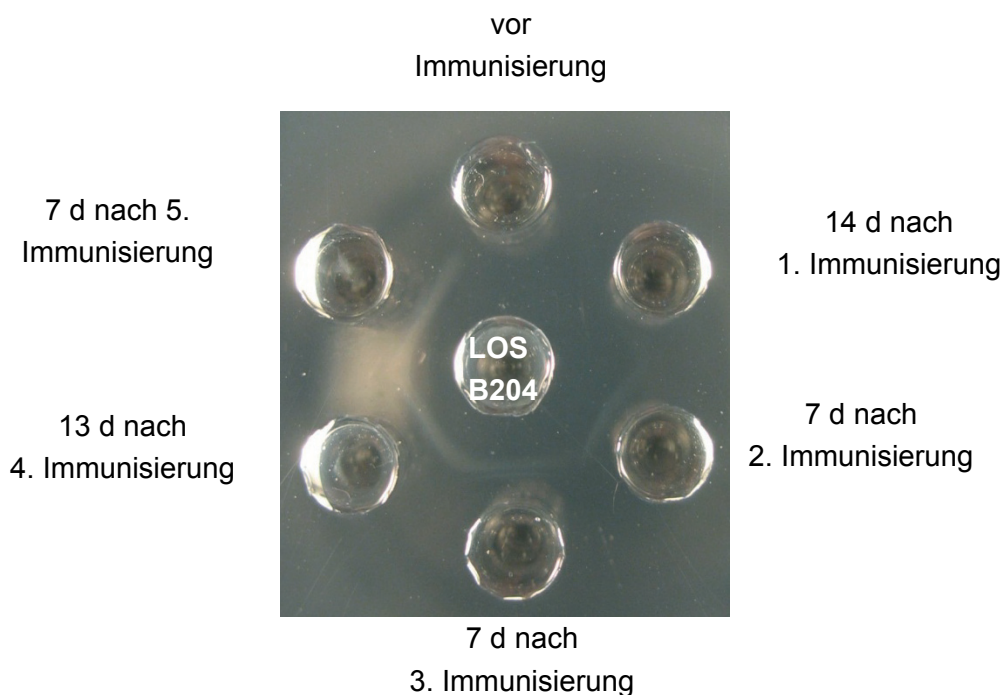
### 4.1 Reaktivität der Antisera mit den zur Impfung verwendeten Referenzstämmen und Isolaten

#### 4.1.1 Nebenwirkungen der verwendeten Antigene

Bei subkutaner und intramuskulärer Applikation der Ganzzelllysate von *B. hyodysenteriae* traten nach wenigen Tagen an den Injektionsstellen Verhärtungen, mit einem Durchmesser von etwa 0,5 cm im Unterhautgewebe auf.

#### 4.1.2 Nachweis LOS-präzipitierender Antikörper nach Immunisierung mit Ganzzelllysaten

Die im Verlauf der Immunisierung mit den Ganzzelllysaten diverser *B. hyodysenteriae*-Isolate gegen das LOS der Spirochäten gebildeten präzipitierenden Antikörper wurden im Immundiffusionstest (IDT) nachgewiesen. In **Abbildung 1** ist repräsentativ die Serokonversion des Kaninchens TV141-U dargestellt. Wie aus der Abbildung hervorgeht, kommt es im Verlauf der Immunisierung der Kaninchen zur Bildung von Antikörpern, die im Immundiffusionstest mit dem aus den Impfstämmen präparierten LOS in Präzipitationsbanden dargestellt werden können. Die Präzipitationsbanden der einzelnen Kaninchen sind von unterschiedlicher Stärke. Bei einem der Kaninchen konnten keine LOS-spezifischen Antikörper im Immundiffusionstest nachgewiesen werden.



**Abbildung 1** Ergebnis des IDT mit einem Kaninchenserum nach Immunisierung mit dem Ultraschalllysate von *B. hyodysenteriae*-Stamm B204

Die Ergebnisse des IDT zum Nachweis LOS-präzipitierender Antikörper gegen das jeweilige homologe Antigen 14 Tage nach letzter Vakzination sind in **Tabelle 6** aufgelistet. Von den insgesamt 23 Kaninchen wiesen 17 im IDT eine deutliche Präzipitationsreaktion mit dem Antigen auf. Bei 6 Kaninchen war dagegen jeweils nur eine schwache Reaktion vorhanden, die in ihrer Stärke in etwa der Präzipitationslinie 7 Tage nach der 2. bzw. 3. Immunisierung in der **Abbildung 1** entsprach.

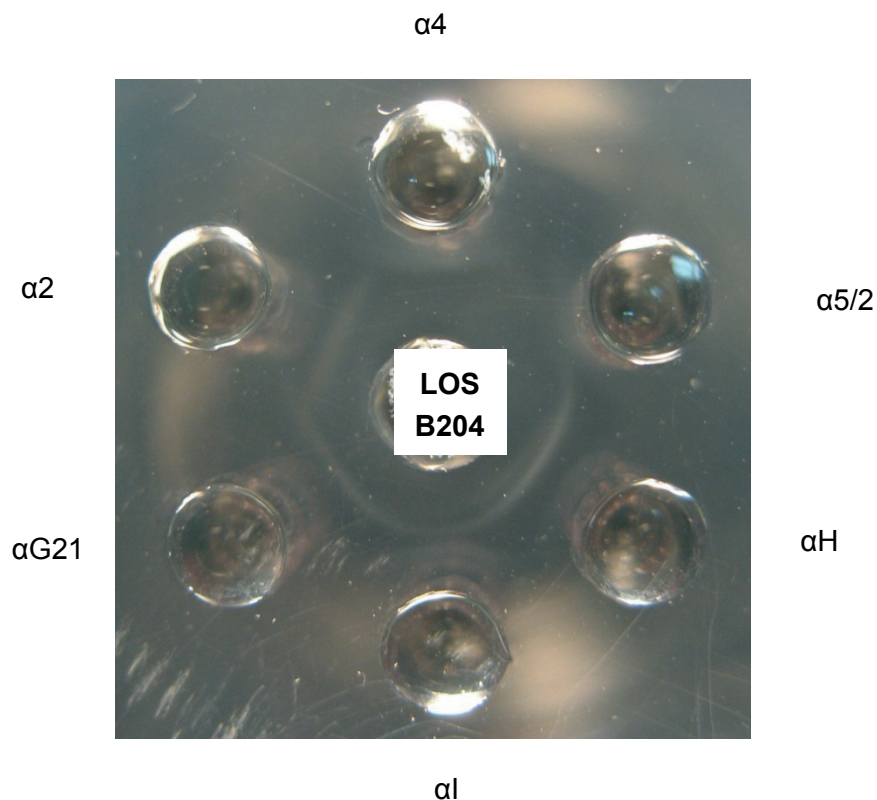
**Tabelle 6**                      **Ergebnisse der Prüfung der Kaninchenantiseren auf LOS-präzipitierende Antikörper nach abgeschlossener Immunisierung im Immundiffusionstest**

<b>Tier-Nr.</b>	<b>Impfantigen (Charge)</b>	<b>Präzipitationsreaktion mit dem jeweils zum Impfantigen homologen LOS als Antigen</b>
TV141-B	P7949 (1) <sup>1)</sup>	+
TV141-H	B78 (1) <sup>2)</sup>	(+)
TV141-U	B204 (1) <sup>2)</sup>	+
TV141-E	B169 (1) <sup>2)</sup>	+
TV143-M1	A1 (1) <sup>2)</sup>	(+)
TV144-A	A1 (2) <sup>2)</sup>	+
TV143-I	B8044 (1) <sup>2)</sup>	+
TV143-M2	B8044 (1) <sup>2)</sup>	+
TV144-B	B8044 (2) <sup>2)</sup>	+
TV143-T	B6933 (1) <sup>2)</sup>	(+)
TV143-E	Ack300/8 (1) <sup>2)</sup>	(+)
TV143-S2	Ack300/8 (1) <sup>2)</sup>	+
TV144-V	Vic2 (1) <sup>2)</sup>	+
TV144-N1	NSW1 (1) <sup>2)</sup>	+
TV145-A	G3 (1) <sup>3)</sup>	+
TV144-S	G21 (1) <sup>3)</sup>	+
TV145-B	G38 (1) <sup>3)</sup>	+
TV145-C	G44 (1) <sup>3)</sup>	+
TV145-D	G47 (1) <sup>3)</sup>	(+)
TV145-F	G64 (1) <sup>3)</sup>	+
TV145-G	G88 (1) <sup>3)</sup>	+
TV145-H	G91 (1) <sup>3)</sup>	+
TV145-I	G98 (1) <sup>3)</sup>	(+)

**Erläuterungen**            **1)** Referenzstamm *B. innocens* ; **2)** Referenzstämme *B. hyodysenteriae*; **3)** deutsche *B. hyodysenteriae*-Feldisolate.  
+ = deutliche, starke, (+) = schwache Präzipitationsbande.

#### 4.1.2.1 Reaktionen Serotyp-spezifischer Antiseren mit homologen und heterologen LOS-Präparationen im IDT

Die gewonnenen Antiseren der verschiedenen Kaninchen wurden im IDT auf Serokonversion überprüft. Im Laufe dieser Untersuchungen wurden die nach mehrmaliger Immunisierung gewonnenen Seren sowohl gegen die homologen Referenzstämme als auch gegen die heterologen Referenzstämme überprüft. In **Abbildung 2** ist beispielhaft ein IDT mit LOS von Referenzstamm B204 (Serotyp 2) mit dem homologen Antiserum und einer Auswahl heterologer Antiseren dargestellt. Einen Überblick über die Ergebnisse aller durchgeführten IDTs gibt **Tabelle 7**. Es kam zu Einweg- und zu Zweiwegkreuzreaktionen. Einwegkreuzreaktion bedeutet, wie am Beispiel von den Referenzstämmen B78 und B204 ersichtlich, dass zwar das  $\alpha$ B204-Antiserum mit LOS-Präparationen von B204 und B78 reagierte, das  $\alpha$ B78-Antiserum aber nur mit der LOS-Präparation von B78, nicht aber mit der von B204. Bei Zweiwegkreuzreaktionen reagieren die jeweiligen Antiseren und LOS-Präparationen gleichermaßen untereinander (Referenzstämme B204 und A1).



**Abbildung 2** Reaktion verschiedener LOS-spezifischer Antiseren mit LOS von *B. hyodysenteriae*-Stamm B204 im Immundiffusionstest (nach 46 h).  
**Bezeichnung der Antiseren:**  $\alpha$ 4:  $\alpha$ -A1 (Serotyp 4),  $\alpha$ 5/2:  $\alpha$ -Ack300/8 (Serotyp 5,2),  $\alpha$ H:  $\alpha$ -Vic2 (Serogruppe H),  $\alpha$ 1:  $\alpha$ -NSW1 (Serogruppe I),  $\alpha$ G21:  $\alpha$ -G21 (Serotyp bzw. gruppe nicht bekannt),  $\alpha$ 2:  $\alpha$ -B204 (Serotyp 2).

**Tabelle 7**                      **Reaktionen der Antiseren gegen Referenzstämmen mit den aus ihnen hergestellten LOS-Präparationen im IDT**

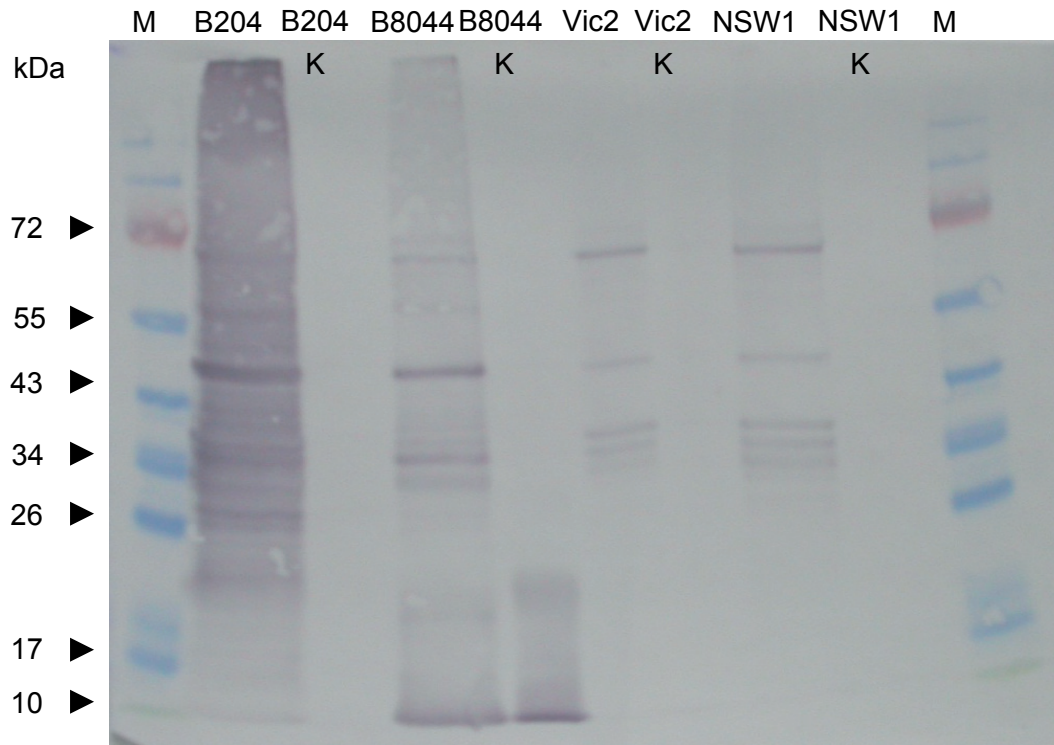
Antiseren gegen verschiedene <i>B. hyodysenteriae</i> -Referenzstämmen	Reaktion im IDT mit LOS-Präparationen verschiedener <i>B. hyodysenteriae</i> -Stämme								
	B78	B204	B169	A1	B8044	B6933	ACK 300/8	Vic2	NSW1
αB78	+	-	-	(+)	-	-	-	-	-
αB204	+/-	+	-	(+)	+/-	-	-	-	-
αB169	(+/-)	-	+	(+)	-	-	-	-	-
αA1	-	(+)	-	+	-	-	(+)	-	-
αB8044	(+)	-	-	+	++	-	-	-	-
αB6933	-	-	-	-	-	+/-	(+/-)	-	-
αACK300/8	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
αVic2	-	+/-	-	(+)	-	-	-	(+)	-
αNSW1	-	-	-	(+)	-	-	-	(+)	+
αP7949 ( <i>Innocens</i> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Erläuterungen: + = deutliche Reaktion des Antiserums mit der entsprechenden LOS-Präparation, (+) = schwache Reaktion des Antiserums mit der entsprechenden LOS-Präparation, abweichende Ergebnisse der wiederholten IDTs sind jeweils angegeben

#### 4.1.2.2                      **Reaktivität der Serotyp-spezifischen Antiseren mit LOS-Präparationen vor und nach Proteinase K-Verdau**

In den Vorversuchen zur Etablierung des Immunoblots als Methode zur Serotypisierung konnten zahlreiche Kreuzreaktionen innerhalb der Referenzstämmen und der Antiseren gegen die Referenzstämmen festgestellt werden (**Abbildung 3**). Seit Jahren wird LOS in klassischer Weise mit Phenol extrahiert. Allerdings hat sich bei der Untersuchung von LOS-Präparationen der Brachyspiren, die zum einen mittels Phenol-Wasser-Methode, zum anderen durch das LPS Extraction Kit gewonnen wurden, in der SDS-PAGE und im Immunoblot gezeigt, dass diese Präparationen nicht gänzlich frei von Proteinkontaminationen sind. Daher wurde eine weitergehende enzymatische Behandlung der Präparationen zum Abbau jeglicher Proteinresiduen durchgeführt (**Abbildung 3**). Es erfolgte ein versuchsweiser Verdau einer LOS-Präparation mit unterschiedlichen Verdünnungsstufen der Proteinase K (**Abbildung 4**), so dass die optimale Konzentration festgelegt werden konnte, um kreuzreagierende Proteine soweit zu verdauen, dass sie als Antigen nicht mehr erkannt wurden. Wie aus **Abbildung 4** ersichtlich ist, wird mit steigender Proteinase K-Konzentration die Zahl der im SDS-Gel nach Silberfärbung vorhandenen Banden geringer. In den geringeren Konzentrationen färbt sich

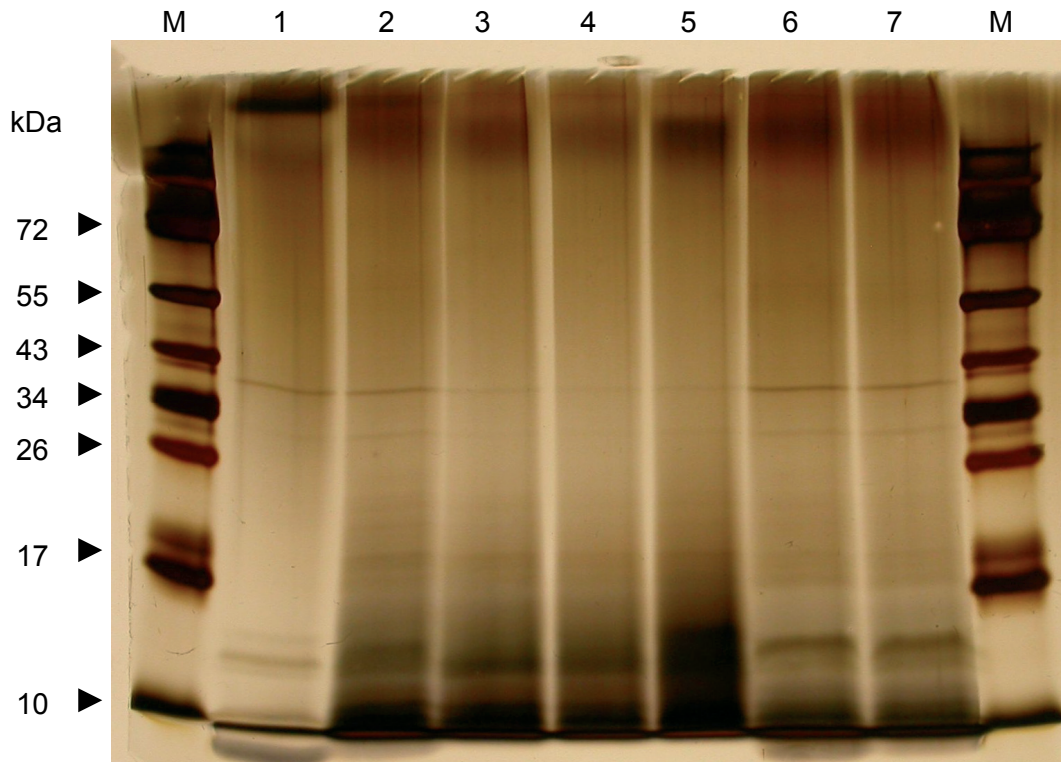
nahezu der gesamte Hintergrund im Molekularbereich von 10 bis 14 kDa an. Dagegen sind in der Spur der höchsten Proteinase K-Konzentration einzelne Banden deutlich zu erkennen. In Folge wurden alle weiteren LOS-Präparationen einem Proteinase K-Verdau unterzogen.



**Abbildung 3**

**Reaktion des  $\alpha$ B8044-Serums mit verschiedenen LOS-Präparationen (präpariert mit Phenol-Wasser-Methode) vor bzw. nach Proteinase K-Verdau.**

**K:** jeweilige LOS-Präparation wurde zuvor mit Proteinase K behandelt,  
**M:** Molekularmassenstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder).



**Abbildung 4** SDS-PAGE einer Proteinase K-verdauten LOS-Präparation von *B. hyodysenteriae* (Stamm B204, Serotyp 2) nach Silberfärbung. Proteinase K-Konzentration: 1: 10 mg/ml, 2: 0,5 mg/ml, 3: 0,1 mg/ml, 4: 0,05 mg/ml, 5: 0,025 mg/ml, 6: 0,05 mg, 7: 0,025 mg. M: Molekularmassenstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder)

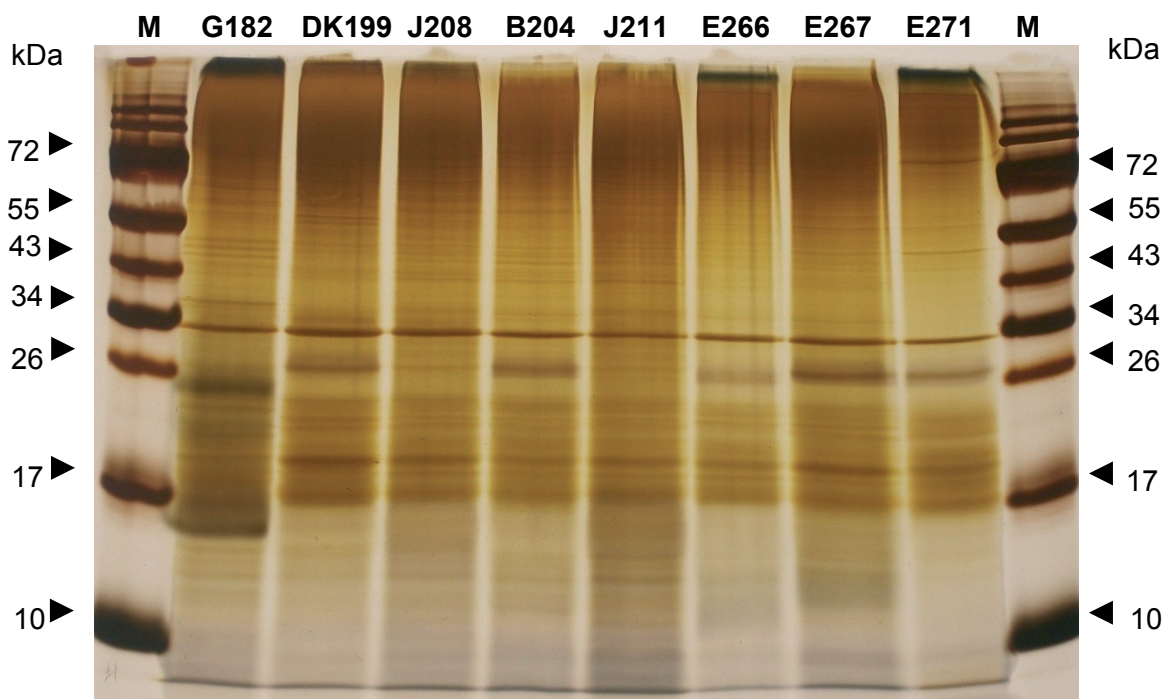
#### 4.1.3 Optimierung der LOS-Präparationen für die Verwendung im Immunoblot

##### 4.1.3.1 Standardisierung der LOS-Präparationen für die Untersuchungen im Immunoblot

Die Gewährleistung gleicher LOS-Gehalte in den verschiedenen Antigenpräparationen erfolgte durch die Verwendung von der in der Dichte übereinstimmenden Bakteriensuspensionen für die streng nach Angaben des Herstellers durchgeführte LOS-Präparation. Auch die Festlegung der Probenauftragsmenge erfolgte anhand der optischen Dichte der Ausgangskultur vor der LOS-Präparation. Laut Herstellerangaben war für die Präparation eine Bakterienmenge nötig, die in einer Bakterienkultur von 5 ml mit der  $OD_{600nm}$  von 1 enthalten ist. Nach verschiedenen Versuchen mit unterschiedlich großen Bakterienmengen für die Extraktion (**Abbildung 5**) erwiesen sich LOS-Präparationen aus der zweifachen Anzahl von Bakterien bei gleichen Puffermengen vorteilhafter. Das Protokoll des Herstellers wurde dahingehend geändert.



Darüber hinaus wurden, zur Dokumentation einer ausreichenden Menge an LOS, die als Antigen für den Immunoblot vorgesehenen Präparationen in der SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit dem *silver staining* Kit gefärbt. Diese Kontrollen wurden insbesondere bei jenen Feldstämmen durchgeführt, die mit den Serotyp-spezifischen Antiseren im Immunoblot keinerlei Reaktion aufwiesen. Wie aus der **Abbildung 6** hervorgeht wiesen die fraglichen LOS-Präparationen gemessen an der Bandenintensität eine zu der mitgeführten positiven Kontrolle (Referenzstamm B204 [Serotyp 2]) jeweils vergleichbare Antigenmenge auf.

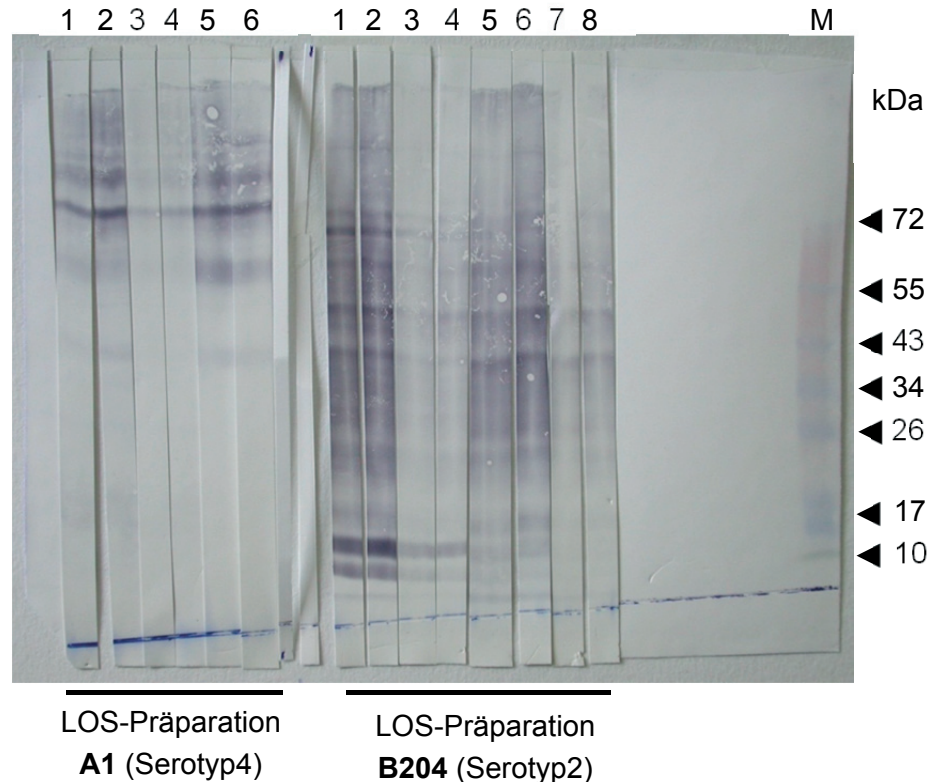


**Abbildung 6** LOS-Präparationen verschiedener nicht typisierbarer *B. hyodysenteriae*-Feldisolate nach SDS-PAGE und Silberfärbung  
**M:** Molekularmassenstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder)

#### 4.1.4 Wahl der geeigneten Antiserumverdünnungen für die Typisierung im Immunoblot

Die optimale Konzentration der eingesetzten Antiseren für die Verwendung im Immunoblot wurde anhand der Reaktionen der Antiseren, die gegen die Referenzstämme gerichtet waren, im Immunoblot gegen die LOS-Präparation des jeweils homologen Referenzstammes ermittelt. Wie aus der **Abbildung 7** hervorgeht sind bei gleicher Konjugatkonzentration keine Unterschiede in der Detektion von Banden zwischen den gewählten Verdünnungen der Typisierungsseren von 1:50 und 1:100 (v/v) nachweisbar. Aus diesem Grund wurde die Verdünnung der Antiseren mit 1:100 (v/v) festgesetzt.





**Abbildung 7**

**Detektion der LOS-Präparationen der *B. hyodysenteriae*-Stämme A1 und B204 nach SDS-Elektrophorese und Immunoblot bei variierender Konzentration von Antiserum und Konjugat.**

- 1:  $\alpha$ A1 1:50 (v/v) verdünnt, Konjugat 1:1000 (v/v) verdünnt
- 2:  $\alpha$ A1 1:100 (v/v) verdünnt, Konjugat 1:1000 (v/v) verdünnt
- 3:  $\alpha$ A1 1:50 (v/v) verdünnt, Konjugat 1:4000 (v/v) verdünnt
- 4:  $\alpha$ A1 1:100 (v/v) verdünnt, Konjugat 1:4000 (v/v) verdünnt
- 5:  $\alpha$ B204 1:50 (v/v) verdünnt, Konjugat 1:1000 (v/v) verdünnt
- 6:  $\alpha$ B204 1:100 (v/v) verdünnt, Konjugat 1:1000 (v/v) verdünnt
- 7:  $\alpha$ B204 1:50 (v/v) verdünnt, Konjugat 1:4000 (v/v) verdünnt
- 8:  $\alpha$ B204 1:100 (v/v) verdünnt, Konjugat 1:4000 (v/v) verdünnt
- M: Molekularmassenstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder)

#### **4.1.5 Bestimmung Serotyp-spezifischer LOS-Profile für die serologische Zuordnung**

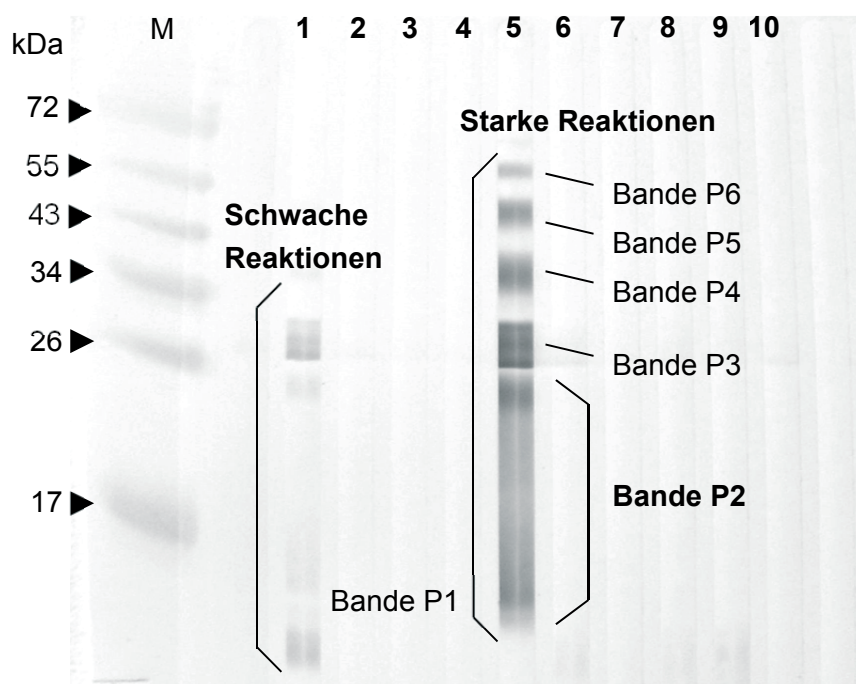
Zur Etablierung des Immunoblots zur Serotypisierung der Feldisolate von *B. hyodysenteriae* dienten zunächst die 9 Referenzstämme und ihre homologen Antiseren.

Zur Festlegung von Auswertungskriterien wurden die neun im Institut vorhandenen Referenzstämme wiederholt im Immunoblot gegen alle erzeugten Hyperimmunseren getestet. Die Ergebnisse wichen nur minimal voneinander ab. Im Verlauf der Untersuchungen wurden weitere Antiseren gegen deutsche Feldisolate von *B. hyodysenteriae* hergestellt und zusammen

mit den bereits vorhandenen Seren zur Typisierung aller vorliegenden Isolate im Immunoblot verwendet.

Die Reaktionen mit dem LOS resultierten in einem Muster an Bandenprofilen unterschiedlicher Molekulargewichte und Intensität (**Abbildung 8**). Die **Tabelle 8** enthält eine Übersicht aller den Bandenprofilen zugeordneten Banden. Das zur Diskriminierung von Serotypen geeignete Bandenprofil wurde anhand der Reaktionsmuster der 9 Referenzstämme und ihren zugehörigen Antiseren festgelegt. Banden, die lediglich eine schwache Signalstärke aufwiesen, wurden nicht berücksichtigt. Insgesamt konnten 7 Bandenprofile voneinander unterschieden werden. Das Bandenprofil P2 war im Gegensatz zu allen anderen Bandenprofilen in den homologen Reaktionen stets nachweisbar. Es diente daher als Antigen zur Diskriminierung von Serotypen. Alle weiteren Banden wurden zwar dokumentiert, aber nicht zur Typisierung der Bakterien herangezogen.

Für die serologische Zuordnung der Feldisolate diente ebenfalls ausschließlich die Reaktion der Hyperimmunseren mit dem Bandenprofil P2 der LOS-Präparation des jeweilig zu typisierenden Isolats.



**Abbildung 8** Im Immunoblot detektierte Banden am Beispiel der LOS-Präparation von *B. hyodysenteriae*-Stamm B8044 (Serotyp 5,3) (Bande P7 ist hier nicht dargestellt)  
**1** =  $\alpha$  B78, **2** =  $\alpha$  B204, **3** =  $\alpha$  B169, **4** =  $\alpha$ A1, **5** =  $\alpha$ B8044, **6** =  $\alpha$ B6933, **7** =  $\alpha$ ACK300/8, **8** =  $\alpha$ Vic2, **9** =  $\alpha$ NSW1, **10** =  $\alpha$ G21,  
**M** = Molekularmassenstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fa. Fermentas, St. Leon-Rot)

Tabelle 8

**Einteilung und Definition der bei der serologischen Typisierung von *B. hyodysenteriae*-Stämmen im Immunoblot nachgewiesenen Reaktionsmuster**

Zu einem Komplex zusammengefasste Banden [kDa]	Qualitative Beschreibung	Größe [kDa]	Bezeichnung
9 10	solitäre Banden	9 - 10	<b>P1</b>
11-22 12-22 12-21 14-21 12-26 10-20 10-25 13-19 14-30 12-28 10-13	breite, verlaufende Banden, z. T. auch solitäre Banden	10 - 30	<b>P2</b>
24 26 27 >25 >26	1-2 Banden	24 - 27	<b>P3</b>
31-38 29-40	breite, verlaufende Banden, z. T. mehrere solitäre Banden	29 - 40	<b>P4</b>
48 50	solitäre Bande	48 - 50	<b>P5</b>
54 >55	solitäre Bande	54 - >55	<b>P6</b>
72	solitäre Bande	72	<b>P7</b>

#### 4.1.5.1 Charakteristika der Antiseren gegen die Serotypen 1 bis 7 und Serogruppen H und I

Zur Herstellung spezifischer Antikörper gegen die neun ausgewählten Referenztypstämme von *B. hyodysenteriae* wurden insgesamt 14 Kaninchen immunisiert. Gegenüber vier Referenzstämmen standen somit zwei bzw. drei Seren anstatt einem Antiserum zu Verfügung. Zur Beantwortung der Frage nach der Spezifität dieser Antiseren als auch im Hinblick auf die Auswahl des geeigneten Serums in den entsprechenden Fällen wurden alle Seren auf ihre Reaktivität gegenüber Proteinase-K-behandelten LOS-Präparationen, die anschließend in der SDS-PAGE aufgetrennt wurden, untersucht. In diese Untersuchungen wurde als Kontrolle *B. innocens* mit einbezogen. Insgesamt dominierten bei diesen Untersuchungen Reaktionen mit den Bandenprofilen P1 bis P3 (siehe oben). Hierbei handelte sich um eine deutlich abgegrenzte Bande von ca. 25 kDa, als P3 bezeichnet, mehrere mittlere unscharfe, nicht identifizierbare Einzelbanden von ca. 13 bis 20 kDa, Bande P2, und eine kleinere deutlich

abgegrenzte Bande von ca. 10 kDa, P3. Einen Überblick über alle erhaltenen Reaktionsmuster gibt die **Tabelle 9**. Die als „Fettdruck“ markierten Hyperimmunseren wurden aufgrund der Stärke der Reaktionen mit den Banden P1, P2 und P3 für die Typisierung der Feldisolate verwendet.

#### **4.1.6 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Immunoblots der LOS-Präparationen der Referenzstämme mit den homologen und heterologen Antiseren gegen die Referenzstämme**

Um die Reproduzierbarkeit der im Immunoblot gewonnenen Ergebnisse der Immunoblots der LOS-Präparationen der Referenzstämme mit den homologen und heterologen Antiseren gegen die Referenzstämme (**Tabelle 9**) zu überprüfen, wurden die LOS-Präparationen aller Referenzstämme erneut auf ihre Reaktivität mit den gegen diese Stämme hergestellten Antiseren, die zuvor ausgewählt wurden (**Kapitel 4.1.5.1**) im Immunoblot untersucht. Die Ergebnisse dieser Überprüfung sind ebenfalls in **Tabelle 9** wiedergegeben. Abweichende Ergebnisse sind jeweils angegeben. Weitgehend waren die Reaktionsmuster in Übereinstimmung mit denen der ersten Untersuchung. Lediglich in drei Fällen kam es in Bezug auf die Bande P2 zu leicht abweichenden Ergebnissen in der Stärke der Reaktion. Verschiedene leichte Abweichungen gab es ebenfalls bei den unterschiedlichen Kreuzreaktionen der Antiseren mit den heterologen LOS-Präparationen.

#### **4.1.7 Vergleichende Charakteristika der gegen deutsche *B. hyodysenteriae*-Isolate generierten Antiseren**

Die mit deutschen *B. hyodysenteriae*-Isolaten vakzinieren Kaninchen entwickelten in vergleichbaren Zeiträumen wie die mit den Referenzstämmen geimpften Tiere im Immundiffusionstest nachweisbare präzipitierende Antikörper gegen das jeweilige homologe Antigen (LOS-Präparation nach Westphal). Die im Immunoblot erzielten Ergebnisse aller möglichen Reaktionen der Proteinase K-verdauten LOS-Präparationen der zur Immunisierung verwendeten Stämme mit den im Kaninchen induzierten Antiseren sind in **Tabelle 10** wiedergegeben. Nahezu alle Antiseren zeigen eine starke Reaktion der Bande P2 mit der homologen LOS-Präparation. Das gegen den Feldisolat G98 hergestellte Antiserum jedoch zeigte nur eine schwache Bande P2 mit seiner homologen LOS-Präparation. Dieses wurde dennoch für die serologische Untersuchung der Feldisolate eingesetzt. Das Antiserum gegen Feldisolat G47 reagierte im Immunoblot nicht mit seiner homologen LOS-Präparation und wurde darum nicht in der weiteren Arbeit verwendet. Es kommt zu mehreren Kreuzreaktionen, die weiter unten näher beschrieben werden.

Tabelle 9

**Reaktionsmuster der Serotyp-spezifischen Antiseren mit LOS-Präparationen verschiedener Referenzstämme im Immunoblot**

		Reaktionsmuster der Antiseren gegen verschiedene <i>B. hyodysenteriae</i> -Serotypen														
LOS-Präparation von Stamm	Bande	$\alpha$ P7949	$\alpha$ B78	$\alpha$ B204	$\alpha$ B169	$\alpha$ A1	$\alpha$ A1	$\alpha$ B8044	$\alpha$ B8044	$\alpha$ B8044	$\alpha$ B6933	$\alpha$ B6933	$\alpha$ ACK300/8	$\alpha$ ACK300/8	$\alpha$ Vic2	$\alpha$ NSW1
<b>B78</b> [Serotyp 1]	P1	-	-/+	-	-	-	-	-	-	(+)/+	-	-/(+)	-	-	-	-/(+)
	P2	-	+	(+)/-	(+)/-	-	-	(+)	+	+	(+)	+/-	-	-	(+)	(+)
	P3	-	+	-	-	-	-	+	+	+/-	-	+/(+)	(+)/-	(+)	+/(+)	+
<b>B204</b> [Serotyp 2]	P1	-	(+)	+	-	-	-	(+)	(+)	(+)/-	(+)	(+)/-	(+)/-	(+)	(+)/-	(+)/-
	P2	-	-	(+)/+	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-
	P3	-	-	-/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>B169</b> [Serotyp 3]	P1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	P2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	P3	-	-	-	-/(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>A1</b> [Serotyp 4]	P1	-	-	-	-/+	-	(+)/+	-	-	-	-	-	-/(+)	-	-	-
	P2	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-/(+)	-	-	-
	P3	-	-	-	-	-	-/(+)	-	-	-	-	-	-/(+)	-	-	-
<b>B8044</b> [Serotyp 5,2]	P1	-	(+)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	P2	-	+/(+)	-	-	-	-	+	+	+	(+)	(+)	-	(+)	(+)	-
	P3	-	+/(+)	-	-	-	-	+	+	+/-	-	+	-	-	+	+
<b>B6933</b> [Serotyp 6,1]	P1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/+	-	-	-/(+)	-/(+)
	P2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	+	-	-	+/(+)	(+)
	P3	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)/+	-	-	-/(+)	-/(+)
<b>ACK300/8</b> [Serotyp 7,2]	P1	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	+	+	(+)	+
	P2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	(+)	-	-
	P3	-	-	-/(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-/+	-	-	-
<b>Vic2</b> [Serogruppe H]	P1	-	(+)/-	+/-	(+)	-	-	-	(+)	(+)	+	(+)	-	-	+	+
	P2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)/+	+
	P3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)/-	+
<b>NSW1</b> [Serogruppe I]	P1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/+	+
	P2	-	-	(+)/-	-	-	-	-	(+)	(+)/-	-	(+)/-	-	(+)	-/+	+
	P3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<b>B. innocens P7949</b>	P1															
	P2	Leiterförmig														
	P3															

Erläuterungen:

+ = deutliche Reaktion des Antiserums mit der entsprechenden LOS-Präparation, (+) = schwache Reaktion des Antiserums mit der entsprechenden LOS-Präparation, grau hinterlegt = homologe Partner, Fett: Antiseren, die zur serologischen Typisierung herangezogen wurden, abweichende Ergebnisse der wiederholten Immunoblots sind jeweils angegeben

Tabelle 10

**Reaktionsmuster der Antiseren mit LOS-Präparationen verschiedener *B. hyodysenteriae*-Referenzstämmen und Feldisolaten**

<i>B. hyodysenteriae</i> Stamm-spezifische Antiseren																		
Reaktionen mit Bande P2																		
LOS-Präparation von Stamm	$\alpha$ B78	$\alpha$ B204	$\alpha$ B169	$\alpha$ A1	$\alpha$ B8044	$\alpha$ B6933	$\alpha$ ACK300/8	$\alpha$ Vic2	$\alpha$ NSW1	$\alpha$ G3	$\alpha$ G21	$\alpha$ G38	$\alpha$ G44	$\alpha$ G47	$\alpha$ G64	$\alpha$ G88	$\alpha$ G91	$\alpha$ G98
B78	+	(+)	(+)	-	+	+	-	(+)	(+)	-	(+)	-	-	-	-	(+)	-	-
B204	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B169	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
B8044	+	-	-	-	+	(+)	(+)	(+)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
B6933	-	-	-	-	-	+	-	+	(+)	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-
Ack300/8	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vic2	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-
NSW1	-	(+)	-	-	(+)	(+)	-	+	+	-	-	-	(+)	-	-	-	-	(+)
G3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	(+)	-
G21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	(+)	-
G38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	+	-	-	-	-	+	-
G44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	+	-	-	-	-	-
G47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	(+)	-
G88	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	+	-	-
G91	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	(+)	-	+	-
G98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)

**Erläuterungen:** + = deutliche Reaktion des Antiserums mit der entsprechenden LOS-Präparation, (+) = schwache Reaktion des Antiserums mit der entsprechenden LOS-Präparation, **grau hinterlegt** = erwartete Reaktion des Antiserums mit der homologen LOS-Präparation

#### 4.1.7.1 Kreuzreaktionen der Referenzstämmen und der zur Immunisierung verwendeten deutschen Isolate im Immunoblot

Nach Abschluss der Untersuchungen der Referenzstämmen und der zur Immunisierung verwendeten deutschen Feldisolate im Immunoblot mit den homologen und den heterologen Antiseren wurde die Bande P2 als diskriminierender Bandenkomplex bestimmt und diente somit der serologischen Zuordnung der untersuchten Feldisolate. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 10** zusammengefasst. Bezogen auf P2 lagen typspezifische Reaktionen nur für drei Stämme (Stämme B204, B169 und ACK300/8) vor. Die Stämme B6933, G21, G38, G64 und G91 wiesen dagegen zu jeweils einem weiteren Stamm eine Einwegkreuzreaktion auf. Der

Stamm A1 zeigte zwei Einwegkreuzreaktionen. Eine Besonderheit bildeten die Referenzstämme B78 und B8044, sowie die beiden australischen Isolate Vic2 und NSW1. Hier lag jeweils eine Zweiwegkreuzreaktion im Bereich von P2 vor. Darüber hinaus lagen bei verschiedenen Stämmen Kreuzreaktionen auch für die Banden P1, P3 sowie weitere kleinere Banden vor. Nach den für die Diskriminierung von Serogruppen im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Kriterien mussten somit Vic2 und NSW1 trotz Vorliegens geringer Unterschiede serologisch einer Gruppe zugeordnet werden. Alle weiteren Stämme waren trotz z. T. bestehender Kreuzreaktionen serologisch voneinander unterscheidbar.

#### **4.2 Serologische Charakterisierung von deutschen Feldisolaten**

Die **Tabelle 11** fasst die Ergebnisse der Immunoblots zusammen, die zur serologischen Charakterisierung deutscher *B. hyodysenteriae*-Feldisolate durchgeführt wurden. Von den 75 getesteten Feldisolaten konnten 35 Stämme (46,7 %) serologisch typisiert werden. Auf Grundlage der Reaktion der Typisierungsantiseren mit Bande P2 des LOS der Feldisolate waren 23 (30,7 %) deutsche Isolate eindeutig zuzuordnen. Hierbei handelte es sich in sieben Fällen um Antiseren gegen die Referenzstämme (B8044, NSW1 und B169) und in 16 Fällen um Antiseren gegen deutsche Feldisolate (G3, G21, G44, G64, G88, G91 und G98). Am häufigsten (6 Isolate / 8 %) reagierten Isolate mit dem Antiserum gegen G21, gefolgt von vier Isolaten (5,3 %), die mit dem B8044-Antiserum eine Reaktion zeigten. Weitere 12 Feldisolate (16 %) reagierten ebenfalls mit den eingesetzten Antiseren, zeigten aber Kreuzreaktionen mit zwei (9 Isolate), drei (2 Isolate) oder sogar vier (1 Isolat) Antiseren. Auffallend häufig waren hierbei Kreuzreaktionen unter Einschluss des Antiserums gegen Stamm G91 (6 Isolate). Je 3 Isolate wiesen Reaktionen mit Antiseren gegen B78, B8044, G3, G21, G64 und G88, zwei mit dem NSW1-Antiserum und je ein Isolat mit dem Antiserum gegen A1 bzw. G38 auf.

Tabelle 11

Ergebnis der serologischen Charakterisierung der deutschen *B. hyodysenteriae*-Feldisolat (n=75)

		<i>B. hyodysenteriae</i> Stamm-spezifische Antiseren															
		Reaktionen mit Bande P2															
Anzahl Stämme																	
	$\alpha$ B78	$\alpha$ B204	$\alpha$ B169	$\alpha$ A1	$\alpha$ B8044	$\alpha$ B6933	$\alpha$ ACK300/8	$\alpha$ Vic2	$\alpha$ NSW1	$\alpha$ G3	$\alpha$ G21	$\alpha$ G38	$\alpha$ G44	$\alpha$ G64	$\alpha$ G88	$\alpha$ G91	$\alpha$ G98
1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
1	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Erläuterungen:** + = deutliche Reaktion des Antiserums mit der entsprechenden LOS-Präparation mit P2, - = keine oder schwache Reaktion des Antiserums mit der entsprechenden LOS-Präparation.

### 4.3 Serologische Charakterisierung von ausländischen Isolaten

#### 4.3.1 Feldisolat aus Dänemark

Insgesamt reagierten vier dänische Isolate (33,3 %) mit nur einem der Antiseren. Davon reagierten zwei mit dem NSW1-Antiserum und je ein Stamm mit dem B8044-Antiserum bzw. dem G21 -Antiserum. Auch traten bei verschiedenen Isolaten Reaktionen mit zwei (2 Isolate), drei (2 Isolate) oder sogar fünf (1 Isolat) Antiseren auf. Die Ergebnisse der Immunoblots die-



ser Feldstämme sind in **Tabelle 12** zusammengefasst. Drei der Isolate konnten nicht zugeordnet werden.

**Tabelle 12** Ergebnis der serologischen Charakterisierung der dänischen *B. hyodysenteriae*-Feldisolate (n=12).

Anzahl Stämme	<i>B. hyodysenteriae</i> Stamm-spezifische Antiseren															
	Reaktionen mit Bande P2															
	$\alpha$ B78	$\alpha$ B204	$\alpha$ B169	$\alpha$ A1	$\alpha$ B8044	$\alpha$ B6933	$\alpha$ ACK300/8	$\alpha$ Vic2	$\alpha$ NSW1	$\alpha$ G3	$\alpha$ G21	$\alpha$ G38	$\alpha$ G44	$\alpha$ G64	$\alpha$ G88	$\alpha$ G91
1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
1	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
1	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Erläuterungen:** + = deutliche Reaktion des Antiserums mit der entsprechenden LOS-Präparation mit P2, - = keine oder schwache Reaktion des Antiserums mit der entsprechenden LOS-Präparation

#### 4.3.2 Feldisolate aus Spanien

Die Ergebnisse der Untersuchung der spanischen Isolate sind in **Tabelle 13** dargestellt. Sechs Isolate (35,3 %) aus Spanien ließen sich eindeutig einem Antiserum zuordnen. Diese Fälle betrafen ausschließlich Antiseren, die gegen die deutschen Feldisolate (G21, G64 und G88) hergestellt wurden. Weitere fünf Isolate (29,4 %) reagieren mit zwei Antiseren und ein Stamm mit drei Antiseren. Fünf der 17 Isolate (29,4 %) konnten keinem der vorhandenen Antiseren zugeordnet werden. Insgesamt reagierten die spanischen Feldisolate nur mit Antiseren gegen die deutschen Feldisolate. Dabei erfolgten Reaktionen mit 5 der 8 Antiseren. Drei der Antiseren reagierten nicht mit LOS-Präparationen der spanischen Feldisolate.

Tabelle 13

**Ergebnis der serologischen Charakterisierung der spanischen  
*B. hyodysenteriae*-Feldisolate (n=17)**

		<b><i>B. hyodysenteriae</i> Stamm-spezifische Antiseren</b>															
		<b>Reaktionen mit Bande P2</b>															
Anzahl Stämme																	
	$\alpha$ B78	$\alpha$ B204	$\alpha$ B169	$\alpha$ A1	$\alpha$ B8044	$\alpha$ B6933	$\alpha$ ACK300/8	$\alpha$ Vic2	$\alpha$ NSW1	$\alpha$ G3	$\alpha$ G21	$\alpha$ G38	$\alpha$ G44	$\alpha$ G64	$\alpha$ G88	$\alpha$ G91	$\alpha$ G98
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Erläuterungen:** + = deutliche Reaktion des Antiserums mit der entsprechenden LOS-Präparation mit P2, - = keine oder schwache Reaktion des Antiserums mit der entsprechenden LOS-Präparation

#### 4.3.3 Feldisolate aus Japan

Zwei der fünf Isolate zeigten keine Reaktion mit den 17 Antiseren (siehe **Tabelle 14**). Jeweils ein Isolat reagierte mit dem B78-Antiserum bzw. dem NSW1-Antiserum, ein weiteres Isolat reagierte mit beiden Antiseren.

Tabelle 14

**Ergebnis der serologischen Charakterisierung der japanischen  
*B. hyodysenteriae*-Feldisolate (n=5)**

		<b><i>B. hyodysenteriae</i> Stamm-spezifische Antiseren</b>															
		<b>Reaktionen mit Bande P2</b>															
Anzahl Stämme																	
	$\alpha$ B78	$\alpha$ B204	$\alpha$ B169	$\alpha$ A1	$\alpha$ B8044	$\alpha$ B6933	$\alpha$ ACK300/8	$\alpha$ Vic2	$\alpha$ NSW1	$\alpha$ G3	$\alpha$ G21	$\alpha$ G38	$\alpha$ G44	$\alpha$ G64	$\alpha$ G88	$\alpha$ G91	$\alpha$ G98
1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Erläuterungen:** + = deutliche Reaktion des Antiserums mit der entsprechenden LOS-Präparation mit P2, - = keine oder schwache Reaktion des Antiserums mit der entsprechenden LOS-Präparation

#### 4.3.4 Aktuelle amerikanische Feldisolate

Die Ergebnisse der Immunoblots der amerikanischen Feldisolate sind in **Tabelle 15** zusammengefasst. Nur ein Isolat (12,5 %) zeigte eine starke Reaktion mit einem Antiserum. Dieses Antiserum ist gegen den Stamm B8044 (Serotyp 5,2) gerichtet. Die anderen Isolate zeigten keine oder nur eine schwache Reaktion im Immunoblot, die nicht berücksichtigt wurde.

**Tabelle 15** Ergebnis der serologischen Charakterisierung der amerikanischen *B. hyodysenteriae*-Feldisolate (n=8)

		<i>B. hyodysenteriae</i> -Stamm-spezifische Antiseren															
		Reaktionen mit Bande P2															
Anzahl Stämme																	
	$\alpha$ B78	$\alpha$ B204	$\alpha$ B169	$\alpha$ A1	$\alpha$ B8044	$\alpha$ B6933	$\alpha$ ACK300/8	$\alpha$ Vic2	$\alpha$ NSW1	$\alpha$ G3	$\alpha$ G21	$\alpha$ G38	$\alpha$ G44	$\alpha$ G64	$\alpha$ G88	$\alpha$ G91	$\alpha$ G98
1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Erläuterungen:** + = deutliche Reaktion des Antiserums mit der entsprechenden LOS-Präparation mit P2, - = keine oder schwache Reaktion des Antiserums mit der entsprechenden LOS-Präparation

#### 4.4 Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse der serologischen Charakterisierung mit den deutschen und ausländischen Feldisolaten

Insgesamt wurden 104 europäische Feldisolate von *B. hyodysenteriae* einer serologischen Charakterisierung unterzogen. Hiervon zeigten fast die Hälfte (46,2 %) keine Reaktion mit den im Institut vorhandenen Antiseren und konnte somit keinem Serotyp zugeordnet werden. In etwa ein Viertel der europäischen Isolate reagierte eindeutig mit einem Antiserum das gegen ein deutsches Feldisolat hergestellt wurde. Ein weiteres knappes Viertel reagierte mit mehr als einem Antiserum und konnte somit nicht eindeutig zugeordnet werden. Nur sechs der europäischen Isolate reagierte mit Antiseren gegen amerikanische Referenzstämme und weitere vier Isolate reagierten mit Antiseren gegen die australischen Isolate. Diese Referenzstämme stammen im Gegensatz zu den aktuellen deutschen Isolaten, die zur Antiserumherstellung herangezogen wurden, aus dem vorigen Jahrhundert. Die aktuellen Isolate aus den Vereinigten Staaten reagierten nur mit einem Antiserum gegen die etwa vor 20 Jahren isolierten Referenzstämme aus Nordamerika. Die japanischen Isolate zeigten sowohl eine Reaktion mit einem Antiserum gegen einen australischen als auch einen amerikanischen Referenzstamm. Eine Zusammenfassung der serologischen Charakterisierung gibt **Tabelle 16**.

Tabelle 16

Überblick über die serologische Charakterisierung deutscher und ausländischer *B. hyodysenteriae*-Feldisolate

Herkunft	Alter	Anzahl	nicht typisierbar	<i>B. hyodysenteriae</i> -Stamm-spezifische Antiseren verschiedener Herkunft und Alter			
				Reaktion mit einem Antiserum mit Bande P2			Reaktion mit zwei oder mehr Antiseren mit Bande P2
				USA (n=7) 20. Jh.	Australien (n=2) 20. Jh.	Deutschland (n=8) 21. Jh.	
<b>Europa</b> (DK, ES, G)	21. Jh.	104	48 (46,2 %)	6	4	23	23
<b>USA</b>	21. Jh.	8	7 (87,5 %)	1	-	-	-
<b>Japan</b>	21. Jh.	5	2 (40 %)	1	1	-	1

**Erläuterungen:** DK: Dänemark, ES: Spanien, G: Deutschland.

## 5 Diskussion

Eine serologische Typisierung von Bakterien hat nicht nur einen rein deskriptiven Charakter, sondern erlaubt in gewissem Umfang die Vorhersage bestimmter Eigenschaften des Erregers. Gleichzeitig nimmt die Kenntnis der möglichen serologischen Variation Einfluss auf Diagnostik und Prophylaxe. Da es über die serologische Variabilität von *B. hyodysenteriae* im europäischen Raum keine Kenntnisse gibt, wurden Antiseren sowohl gegen bereits charakterisierte Serotypen von *B. hyodysenteriae* als auch gegen deutsche Feldisolate hergestellt und zur Typisierung vorwiegend deutscher *B. hyodysenteriae*-Isolate verwendet. Völlig unerwartet war, dass lediglich etwas mehr als die Hälfte der Isolate serologisch zuzuordnen war. *B. hyodysenteriae* verfügt demnach über eine ausgesprochen hohe serologische Variabilität.

Basis zur Diskriminierung von Serotypen ist das in der Zellwand der Brachyspiren lokalisierte Lipooligosaccharid (LOS). Methodisch wurden in der Vergangenheit wenig sensitive Techniken wie der Immundiffusionstest und der Agglutinationstest zur Differenzierung verwendet (Baum und Joens, 1979; Hampson, 1991; Hampson *et al.*, 1989). Bisher wurden innerhalb der Spezies *B. hyodysenteriae* 9 Serotypen (Li *et al.*, 1991) oder auch 11 Serogruppen mit einer unterschiedlichen Anzahl von Serovaren (Hampson und Stanton, 1997; Lau und Hampson, 1992) differenziert. Zum Zwecke der Fortführung dieser Antigen-basierten Typisierung wurden in der vorliegenden Arbeit europäische Isolate mit selbst hergestellten Antiseren gegen Serotyp-spezifische Referenzstämme untersucht. Die bei der Prüfung der Antiseren auf Spezifität aufgetretenen Reaktionen mit heterologen Antigenen (Kreuzreaktionen) entsprachen jedoch nicht den Ergebnissen, die aus den Kenntnissen der Literatur zu erwarten waren. Zwar wurde über Kreuzreaktionen in der Literatur ausführlich berichtet (Hampson *et al.*, 1989; Hampson *et al.*, 1990; Lau und Hampson, 1992; Mapother und Joens, 1985), sie entsprachen jedoch im Umfang nicht den eigenen Beobachtungen. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, dass einige Untersucher ihre Antiseren vor der Verwendung mit heterologen Antigenen zur Beseitigung von Kreuzreaktionen mit mehr oder weniger hohem Aufwand adsorbierten. Dieses Prozedere ist trotz des Aufwands nicht immer erfolgreich und geht oft auch mit einem Verlust an Sensitivität einher. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht über mögliche Ursachen der Kreuzreaktivität geforscht werden sollte, wurde methodisch ein anderer Weg beschritten. Als Antigen wurde, in Anlehnung an die Vorgaben aus dem Schrifttum, eine Präparation des Lipooligosaccharids (LOS) der Brachyspiren verwendet. Standard der Herstellung ist die sogenannte „hot phenol-water method“ nach Westphal (Westphal *et al.*, 1952). Bei Untersuchungen zum LPS von Bakterien wird häufig diese Technik angewandt. Dies gilt auch für die Herstellung von Antigenen zur

Serotypisierung der Brachyspiren, weswegen auch in der vorliegenden Untersuchung diese Präparationstechnik angewandt wurde. Die Methode nach Westphal lieferte allerdings mit hoher Wahrscheinlichkeit kein reines LOS. Ansonsten wären die im Immunoblot analysierten LOS-Präparationen vor und nach Proteinase-K-Verdau identisch gewesen. Nach Proteinase K-Verdau der LOS-Präparationen nach Westphal war die Zahl der durch die Serotyp-spezifischen Antiseren detektierbaren Banden erheblich reduziert. In gleichem Ausmaß reduzierte sich damit auch der Anteil der kreuzreagierenden Stämme. Die im Immundiffusionstest aufgetretenen Kreuzreaktionen dürften daher zu einem überwiegenden Anteil auf Proteinresiduen in den LOS-Präparationen nach Westphal zurückzuführen sein. Leider sind die von anderen Untersuchern verwendeten Antigene (Baum und Joens, 1979; Lau und Hampson, 1992; Lee und Hampson, 1999; Li *et al.*, 1991) in dieser Beziehung kaum charakterisiert worden. Dies erschwert nicht nur die Vergleichbarkeit der bisher durchgeführten Serotypisierungsversuche an Brachyspiren, sondern lässt auch nicht ganz unberechtigte Zweifel an den publizierten Ergebnissen aufkommen.

Für das weitere methodische Vorgehen waren diese Überlegungen und die durch Voruntersuchungen gewonnenen Erkenntnisse richtungsweisend. Als der methodisch sicherste und eleganteste Weg, eine wirklich auf dem LOS beruhende Diskriminierung der Brachyspiren vornehmen zu können, erschien uns die Untersuchung Proteinase-K-verdauter LOS-Präparationen im Immunoblot. Diese Näherungsweise war zwar von einem erheblich größeren Aufwand begleitet, bot dagegen aber Vorzüge im Hinblick auf Spezifität und Sensitivität. Letzteres war mitentscheidend dafür, die Untersuchungen im Immunoblotverfahren durchzuführen. Zunächst musste aber noch geklärt werden, welche der LOS-Banden der Brachyspiren zur Diskriminierung der Serotypen geeignet sind. Bei der Auswahl vertrauten wir auf die Serotyp-Spezifität der gegen die 9 Referenzstämme von *B. hyodysenteriae* hergestellten Antiseren. Eine Bande, bezeichnet als P2 (10-30 kDa), dominierte bei den homologen Paaren aus Antiserum und Antigen und wurde folglich als Indikator zur Differenzierung der Serotypen verwendet. Dennoch traten weiterhin Kreuzreaktionen auf. Überwiegend handelte es sich hierbei um Einwegkreuzreaktionen. Derartige Kreuzreaktionen sind auch in der Literatur beschrieben. Allerdings gibt es von den Autoren keinerlei schlüssige Erklärungsansätze hierfür (Hampson *et al.*, 1990; Lau und Hampson, 1992). Aus den eigenen Untersuchungen könnte man schließen, dass die detektierten Banden neben mehreren antigenen Epitopen zusätzlich Haptene enthielten. Diese lassen sich serologisch nachweisen, induzieren aber keine Antikörperbildung. Bei Übereinstimmung von Hapten und antigenem Epitop liefert diese Hypothese eine naheliegende Erklärung für die Natur von Einwegkreuzreaktionen. Dieser Gesichtspunkt könnte bei der Beschreibung und Analyse von serologischen Kreuzreaktionen unter Umständen hilfreich sein.

Daneben wurden sogenannte Zweiwegkreuzreaktionen, auch als vollständige oder echte Kreuzreaktion bezeichnet, beobachtet. Ursache hierfür sind sehr wahrscheinlich identische antigene Epitope in der Bande P2 unterschiedlicher Serotypen. Dies war beispielsweise zwischen den Serotypen 5 und 1 der Fall. Im Schrifttum wurde dagegen auf eine entsprechende Reaktion zwischen den Serotypen 5 und 2 verwiesen (Mapother und Joens, 1985). Erklären lässt sich diese Diskrepanz durch Unterschiede in der Methodik als auch der Qualität der Antigene und der Konzentration und Spezifität der Antikörper in den Antiseren.

In den vorliegenden Versuchen unterschieden sich z. B. die durch Immunisierung von Kaninchen mit Ganzzelllysaten gewonnenen Antiseren im Antikörpergehalt stark voneinander, wie die unterschiedlich starken Präzipitationslinien bzw. Signalstärken der Banden sowohl im Immundiffusionstest als auch im Immunoblot zeigen. Bei der Auswahl der für die serologische Charakterisierung geeigneten Antiseren wurden neben der Bande P2 auch die Banden P1 und P3 mitberücksichtigt. Es wurden somit ausschließlich jene Antiseren für die serologische Differenzierung ausgewählt, die die geringsten Kreuzreaktionen mit heterologen LOS-Präparationen der Referenzstämmen zeigten, gleichzeitig aber die Bande P2 der homologen Stämme eindeutig detektierten.

Ein großer Einfluss auf die Qualität der erzeugten Antiseren geht auch von den einzelnen Versuchstieren aus. Diese Tatsache hat beim Vergleich von Ergebnissen unterschiedlicher Arbeitsgruppen eine nicht zu unterschätzende Bedeutung. Ein weiterer naheliegender Grund für die von dem Schrifttum abweichenden Ergebnisse dürfte jedoch in den unterschiedlichen methodischen Ansätzen zur Differenzierung von Serotypen liegen. Es ist nach unseren Erfahrungen sehr wahrscheinlich, dass die von Mapother und Joens (1985) im Immundiffusionstest beschriebene Kreuzreaktion auf Proteinresiduen in dem verwendeten Antigen zurückzuführen ist. Beispielsweise war bei den eigenen Untersuchungen das Antiserum gegen Stamm G47 im Immunoblot negativ, reagierte jedoch im IDT mit der nicht Proteinase-K-behandelten LOS-Präparation dieses Stammes. Weiterhin ist anzunehmen, dass auf Grund der geringeren Sensitivität des IDT, die bestehende Kreuzreaktion zwischen Serotypen 5 und 1 von den zitierten Autoren unentdeckt blieb. Insgesamt sollten deshalb den mit dem Immunoblot erzeugten Ergebnissen zur serologischen Differenzierung von *B. hyodysenteriae*-Isolaten größeres Vertrauen beigemessen werden als den auf den Immundiffusionstesten basierenden Resultaten. Bei allen von uns beschriebenen serologisch detektierten Banden kann mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass diese auf Serotypübergreifende Reaktionen mit Proteinen des jeweiligen Erregers beruhen. Die Bearbeitung der eigentlichen Fragestellung der vorliegenden Arbeit fußt demnach zweifelsfrei allein auf jenen Kriterien die *per definitionem* zur Differenzierung von Serotypen bei Brachyspiren postuliert wurden. Diesen Anspruch besitzen die zitierten Untersuchungen nicht. Unser methodischer Ansatz geht sogar noch einen Schritt weiter. Nicht das gesamte LOS der

Brachyspiren ging in die Bewertung ein, sondern lediglich nur eine, sehr wahrscheinlich den Serotyp definierende, Fraktion. Dies ist ein erstmaliger Versuch zur serologischen Charakterisierung von Brachyspiren. Aber auch bei ausschließlicher Konzentrierung auf diese Bande blieben nach Auswertung der heterologen Reaktionsansätze Kreuzreaktionen bestehen, wie z. B. jene zwischen den Serotypen 5 und 1 (siehe oben). Somit besitzt der von uns zur Diskriminierung von Serovarianten bestimmte Anteil des LOS, die Bande P2, aller Wahrscheinlichkeit auch einige kreuzreagierende antigene Epitope.

Dieses Ergebnis bedeutet, dass das LOS unterschiedlicher Stämme bzw. Serogruppen, ebenfalls unterschiedlich stark kreuzreagiert. Serogruppen/Serotypen sind somit lediglich als ein Versuch zu verstehen, der natürlichen biologischen Vielfalt eine Ordnung zu geben. Diese Einteilung wird immer dann besonders schwierig, wenn, wie im vorliegenden Fall, die Merkmale zur Differenzierung und Sortierung durch mehrere Gene determiniert werden. Die Existenz zahlreicher, das LOS kodierender Gene, macht somit die vorhandene Kreuzreaktivität erklärlich. Eine die Speziesbarriere überschreitende Reaktion scheint es aber wahrscheinlich nicht zu geben. Keines der Antiseren reagierte mit *B. innocens*.

Der anschließend im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen vorgenommene Versuch zur Typisierung von Isolaten ist im eigentlichen Sinn keine Serotypisierung, auch wenn hier und auch im Schrifttum dieser Begriff gelegentlich verwandt wurde (Hampson *et al.*, 1989; Kim *et al.*, 2005). Treffender ist die Bezeichnung „serologische Zuordnung zu Serotypen bzw. -gruppen“. Diese Formulierung berücksichtigt die Vorgehensweise korrekter.

Von den deutschen Isolaten ließ sich unter Anwendung der o. a. Kriterien nur eine bescheidene Anzahl den 9 Referenzstämmen zuordnen. Als Ursache hierfür können verschiedene Erklärungen herangezogen werden. Es ist nicht auszuschließen, dass die gegen die Referenzstämmen aus den 1980-iger und 1990-iger Jahren hergestellten Antiseren, aktuelle Isolate aus Gründen einer möglichen ständigen Antigenvariation des Erregers nicht erkennen. Ferner könnten geographische Unterschiede in der Herkunft der Isolate (Deutschland) und Referenzstämmen (Nordamerika, Australien) als Ursache in Frage kommen. Nicht zuletzt muss auch eine extrem hohe serologische Vielfalt des Erregers in Betracht gezogen werden. Diese Erklärung hat durchaus Berechtigung da bei vergleichbaren Untersuchungen zahlreiche Serovaren innerhalb weniger Serogruppen beschrieben wurden (Lau und Hampson, 1992). Zur Beantwortung dieser komplexen Fragestellungen wurden daher auch Antikörper gegen aktuelle deutsche *B. hyodysenteriae*-Isolate hergestellt und weitere aktuelle Feldisolate aus europäischen Ländern (Spanien, Dänemark) und auch Nordamerika sowie Japan in die Untersuchungen miteinbezogen. Für die Herstellung neuer Antiseren wurden nicht-reagierende Feldisolate ausgewählt, die sich nach Herkunft, Jahr der Isolierung und dem Besitz von Virulenz- und Fitness-Genen unterschieden. Diese Auswahlkriterien er-



wiesen sich als sehr fruchtbar. Von 9 ausgewählten Stämmen wurden 8 nach den in dieser Arbeit vorgestellten Kriterien als eigenständige Serotypen identifiziert. Zur serologischen Differenzierung von Feldisolaten standen somit insgesamt 9 Antiseren gegen die Referenzstämme und weitere 8 Seren gegen aktuelle deutsche Feldisolate zur Verfügung. Insgesamt konnten etwas weniger als die Hälfte der deutschen Isolate serologisch zugeordnet werden. Auffällig war jedoch, dass unter diesen Stämmen der Anteil jener, die durch Antiseren gegen die aktuellen deutschen Isolate charakterisiert werden konnten, weitaus größer war, als der Anteil, der mit den Antiseren gegen die Referenzstämme reagierte. Diese Ergebnisse belegen eindrucksvoll ein hohes Ausmaß an antigener Variabilität des LOS in der Spezies *B. hyodysenteriae*. Hierbei dürfte sich eine, je nach geographischer Herkunft der Brachyspiren, unterschiedliche Entwicklung vollzogen haben. Bestätigung für diese Hypothese lässt sich aus den Untersuchungsergebnissen der aktuellen nordamerikanischen Isolate ableiten. Von den nordamerikanischen Isolaten reagierte keines mit den Antiseren gegen deutsche Isolate. Interessanterweise reagierte auch nur eines dieser Isolate mit den Antiseren gegen die älteren Stämme aus Nordamerika. Unter Berücksichtigung der Zeitpunkte der Isolierung der Stämme müssen diese antigenen Variationen innerhalb der letzten 15-20 Jahre entstanden sein. Sehr wahrscheinlich führen sehr schnelle Mutationen und Selektionen zu dieser Diversität bei *B. hyodysenteriae*.

Was die weiteren Isolate aus Europa anbetrifft, treffen die für die deutschen Isolate erhobenen Beobachtungen nicht unbedingt zu. Die spanischen Isolate reagierten nahezu ausschließlich mit Seren gegen die deutschen *B. hyodysenteriae*-Stämme. Dieser Befund sollte zwar nicht zu voreiligen Schlussfolgerungen, wie z. B. der Existenz gemeinsamer Infektionsquellen und Übertragungswege, verleiten, obwohl der Befund im auffälligen Gegensatz zu den Ergebnissen der Untersuchung der dänischen Isolate steht. Die dänischen Isolate wiesen bis auf die unterschiedlich hohe Anzahl von Isolaten, die mit den Antiseren gegen die Referenzstämme reagierten, ein den deutschen Isolaten vergleichbares Zuordnungsmuster auf. Dies bedeutet, dass sehr wahrscheinlich auch innerhalb Europas, trotz des regen Handels, eine geographisch unterschiedliche Entwicklung der Brachyspiren stattfindet. Eine ähnliche Situation ist auch in Nordamerika, zwischen Kanada und den USA, zu beobachten (Baum und Joens, 1979; Li *et al.*, 1991; Mapother und Joens, 1985).

Die wichtigste Schlussfolgerung aus den vorgelegten Ergebnissen betrifft die überraschenderweise große antigene Variabilität der Brachyspiren. Die Versuche mit den *B. hyodysenteriae*-Isolaten aus dem europäischen Ausland bestätigen die bereits auf Basis der Untersuchung der deutschen Stämme aufgestellte These (siehe oben) einer unerwartet hohen serologischen Diversität des LOS von *B. hyodysenteriae*. Trotz bestehender Gemeinsamkeiten ist somit das Ausmaß der Serodiversität von *B. hyodysenteriae* deutschlandweit, europaweit und anscheinend weltweit wesentlich größer, als bisher angenommen. Zudem

erscheint die Dynamik dieses Prozesses nicht unbeträchtlich. Diese Situation ist bei allen Anstrengungen im Rahmen der Diagnostik, Therapie und Bekämpfung der Dysenterie zu berücksichtigen.

## 6 Zusammenfassung

Die Schweinedysenterie ist eine durch *B. hyodysenteriae* verursachte, während der Mast auftretende mukohämorrhagische Diarrhöe, die weltweit große wirtschaftliche Bedeutung besitzt. Im Verlauf der Infektion entwickeln die Tiere eine Serotyp-spezifische Immunität. Bei Infektion mit anderen Serotypen von *B. hyodysenteriae* kann somit erneut eine Dysenterie auftreten. Derzeit werden bei *B. hyodysenteriae* mittels Immundiffusions- oder Agglutinationstest 9 Serotypen unterschieden. Für den europäischen Raum liegen jedoch hierzu keinerlei Informationen vor.

In Bezug auf diese ungeklärte Situation wurden in Kaninchen Antiseren gegen die neun bekannten Serotypen und weitere acht, nach ersten Untersuchungen hiervon abweichende deutsche *B. hyodysenteriae* Isolate, hergestellt und für die Charakterisierung deutscher (n=75), spanischer (n=17), dänischer (n=12), japanischer (n=5) und nordamerikanischer (n=8) Isolate verwendet. Basis zur Diskriminierung von Serotypen ist das in der Zellwand der Bakterien lokalisierte Lipooligosaccharid (LOS). Im Fokus standen LOS-spezifische Banden im Bereich von 10-30 kDa, die nach Untersuchung im Immunoblot mit den Serotyp-spezifischen Antiseren zur Diskriminierung von Serotypen geeignet erschienen. Trotz des für den Immunoblot erforderlichen Aufwands, erschien dies der sicherste und eleganteste Weg, eine tatsächlich auf dem LOS beruhende Diskriminierung der Brachyspiren vorzunehmen. Zusätzlich wurden alle untersuchten LOS-Präparationen einem Proteinase K-Verdau unterzogen, da Proteinresiduen im LOS zu erheblichen Kreuzreaktionen führten.

Insgesamt konnten von allen untersuchten Stämmen (n=117) nur etwas mehr als die Hälfte (n=60, 51 %) serologisch zugeordnet werden. Die Anzahl der deutschen Isolate, die von den Antiseren gegen deutsche Stämme erkannt wurden, war etwa zweimal so hoch (n=16) als jene, die mit den Antiseren gegen die bereits bekannten Serotypen reagierten (n=7). Entsprechende Befunde lagen auch für die Isolate aus Spanien vor. Die Mehrzahl (61 %) reagierte mit den Antiseren gegen deutsche Stämme, während die anderen Stämme (29 %) nicht zugeordnet werden konnten. Im Gegensatz dazu konnten 58 % der dänischen und 60 % der japanischen Isolate den Serotypen 1-7, bzw. Serogruppen H und I zugeordnet werden. Von den aktuellen nordamerikanischen Stämmen reagierte lediglich ein Stamm, und zwar mit dem Antiserum gegen Serotyp 5.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Brachyspiren ein hohes Ausmaß an antigener Variabilität besitzen. Bei Berücksichtigung von geographischer Herkunft und Zeit der Isolierung der Brachyspiren scheint eine kontinuierliche aber geographisch unterschiedliche phylogenetische Entwicklung der Brachyspiren zu erfolgen. Diese Situation ist bei allen

Arbeiten im Rahmen der Diagnostik, Therapie und Bekämpfung der Dysenterie zu berücksichtigen.

## Summary

*Brachyspira (B.) hyodysenteriae* is the causative agent of swine dysentery, a worldwide distributed muco-hemorrhagic diarrhea of tremendously economic importance occurring mostly in fattening pigs. Infected pigs develop a serotype specific immune response. Accordingly, infections with other serotypes can cause a reemergence of disease. By immunodiffusion and agglutination different serogroups (A-K) and serotypes (1-9) of *B. hyodysenteriae* could be identified. Corresponding European data on predominant serotypes are not available.

To get more insight into the serological diversity of *B. hyodysenteriae*, antisera to (a) nine published (reference) strains belonging to different serotypes and serogroups of *B. hyodysenteriae* and (b) eight currently isolated non-typeable German field isolates, were produced in rabbits to characterize field isolates coming from Germany (n=75), Denmark (n=12), Spain (n=17), Japan (n=5) and the USA (n=8). Classification of serotypes is based on differences of the lipooligosaccharide (LOS) of the bacteria. We focused on LOS bands in a molecular-weight range of 10-30 kDa that seemed to be well suited to distinguish between serotypes according to our immunoblot studies with serotype specific antisera. Although the method required time consuming immunoblot analyses, this approach is believed to be the most appropriate to actually discriminate the spirochetes by their LOS. In addition, each LOS preparation was digested by proteinase K before use in immunoblot, since protein residues resulted in strong cross reactions, as has been proven in this study.

Only 60 (51 %) of all strains analyzed by this procedure could be serotyped by at least one of the antisera. The number of German strains typed by the German antisera was twice as high (n=16) as those typed by the reference serotype antisera (n=7). Similarly, Spanish isolates were mainly recognized by the German sera (61 %). In contrast, 58 % of the Danish and 60% of the Japanese isolates were assigned to serotypes 1 through 7 and serogroups H and I. Of the American isolates only one strain was recognized and identified as belonging to serotype 5.

In conclusion, *B. hyodysenteriae* displays a high degree of antigenic diversity. Considering origin and year of isolation of the isolates it seems that there is a continuous but geographically distinct antigenic drift in *B. hyodysenteriae*. This is of great importance for diagnosis and therapy of SD.

## 7 Literaturverzeichnis

- Achacha, M., Mittal, K.R., 1995, Production and characterization of monoclonal antibodies against *Serpulina hyodysenteriae* and *S. innocens* and their use in serotyping. J. Clin. Microbiol. 33, 2519-2521.
- Alexander, T.J., Taylor, D.J., 1969, The clinical signs, diagnosis and control of swine dysentery. Vet. Rec. 85, 59-63.
- Atyeo, R.F., Oxberry, S.L., Hampson, D.J., 1999, Analysis of *Serpulina hyodysenteriae* strain variation and its molecular epidemiology using pulsed-field gel electrophoresis. Epidemiol. Infect. 123, 133-138.
- Barth, S., Gömmel, M., Baljer, G., Herbst, W., 2012, Demonstration of genes encoding virulence and virulence life-style factors in *Brachyspira* spp. isolates from pigs. Vet. Microbiol. 155, 438-443.
- Baum, D.H., Joens, L.A., 1979, Partial purification of a specific antigen of *Treponema hyodysenteriae*. Infect. Immun. 26, 1211-1213.
- Baum, D.H., Joens, L.A., 1979, Serotypes of beta-hemolytic *Treponema hyodysenteriae*. Infect. Immun. 25, 792-796.
- Butler, J.E., Zhao, Y., Sinkora, M., Wertz, N., Kacsokovics, I., 2009, Immunoglobulins, antibody repertoire and B cell development. Dev. Comp. Immunol. 33, 321-333.
- Chander, Y., Primus, A., Oliveira, S., Gebhart, C.J., 2012, Phenotypic and molecular characterization of a novel strongly hemolytic *Brachyspira* species, provisionally designated "*Brachyspira hampsonii*". J. Vet. Diagn. Invest. 24, 903-910.
- Chatfield, S.N., Fernie, D.S., Penn, C., Dougan, G., 1988, Identification of the major antigens of *Treponema hyodysenteriae* and comparison with those of *Treponema innocens*. Infect. Immun. 56, 1070-1075.
- Combs, B., Hampson, D.J., Mhoma, J.R., Buddle, J.R., 1989, Typing of *Treponema hyodysenteriae* by restriction endonuclease analysis. Vet. Microbiol. 19, 351-359.
- Combs, B.G., Hampson, D.J., Harders, S.J., 1992, Typing of Australian isolates of *Treponema hyodysenteriae* by serology and by DNA restriction endonuclease analysis. Vet. Microbiol. 31, 273-285.
- Cullen, P.A., Coutts, S.A., Cordwell, S.J., Bulach, D.M., Adler, B., 2003, Characterization of a locus encoding four paralogous outer membrane lipoproteins of *Brachyspira hyodysenteriae*. Microbes. Infect. 5, 275-283.
- Diarra, A.T., Mittal, K.R., Achacha, M., 1994, Evaluation of microagglutination test for differentiation between *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae* and *S. innocens* and serotyping of *S. hyodysenteriae*. J. Clin. Microbiol. 32, 1976-1979.
- Diego, R., Lanza, I., Carvajal, A., Rubio, P., Carmenes, P., 1995, *Serpulina hyodysenteriae* challenge of fattening pigs vaccinated with adjuvanted bivalent bacterin against swine dysentery. Vaccine. 13, 663-667.
- Dugourd, D., Jacques, M., Bigras-Poulin, M., Harel, J., 1996, Characterization of *Serpulina hyodysenteriae* isolates of serotypes 8 and 9 by random amplification of polymorphic DNA analysis. Vet. Microbiol. 48, 305-314.
- Fellstrom, C., Karlsson, M., Pettersson, B., Zimmerman, U., Gunnarsson, A., Aspan, A., 1999, Emended descriptions of indole negative and indole positive isolates of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*. Vet. Microbiol. 70, 225-238.
- Fellstrom, C., Pettersson, B., Thomson, J., Gunnarsson, A., Persson, M., Johansson, K.E., 1997, Identification of *Serpulina* species associated with porcine colitis by biochemical analysis and PCR. J. Clin. Microbiol. 35, 462-467.

- Fernie, D.S., Ripley, P.H., Walker, P.D., 1983, Swine dysentery: protection against experimental challenge following single dose parenteral immunisation with inactivated *Treponema hyodysenteriae*. Res. Vet. Sci. 35, 217-221.
- Fisher, L.F., Olander, H.J., 1981, Shedding of *Treponema hyodysenteriae*, transmission of disease, and agglutinin response to pigs convalescent from swine dysentery. Am. J. Vet. Res. 42, 450-455.
- Fisher, L.N., Mathiesen, M.R., Duhamel, G.E., 1997, Restriction fragment length polymorphism of the periplasmic flagellar *flaA1* gene of *Serpulina* species. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4, 681-686.
- Gabe, J.D., Chang, R.J., Slomiany, R., Andrews, W.H., McCaman, M.T., 1995, Isolation of extracytoplasmic proteins from *Serpulina hyodysenteriae* B204 and molecular cloning of the *flaB1* gene encoding a 38-kilodalton flagellar protein. Infect. Immun. 63, 142-148.
- Gabe, J.D., Dragon, E., Chang, R.J., McCaman, M.T., 1998, Identification of a linked set of genes in *Serpulina hyodysenteriae* (B204) predicted to encode closely related 39-kilodalton extracytoplasmic proteins. J. Bacteriol. 180, 444-448.
- Glock, R.D., Harris, D.L., Kluge, J.P., 1974, Localization of spirochetes with the structural characteristics of *Treponema hyodysenteriae* in the lesions of swine dysentery. Infect. Immun. 9, 167-178.
- Glock, R.D., Schwartz, K.J., Harris, D.L., 1978, Parenteral immunization of pigs against infection with *Treponema hyodysenteriae*. Am. J. Vet. Res. 39, 639-642.
- Halter, M.R., Joens, L.A., 1988, Lipooligosaccharides from *Treponema hyodysenteriae* and *Treponema innocens*. Infect. Immun. 56, 3152-3156.
- Hampson, D.J., 1991, Slide-agglutination for rapid serological typing of *Treponema hyodysenteriae*. Epidemiol. Infect. 106, 541-547.
- Hampson, D.J., La, T., Adler, B., Trott, D.J., 2006, Proposed revisions to the nomenclature for *Brachyspira* membrane proteins and lipoproteins. Microbiology 152, 1-2.
- Hampson, D.J., Mhoma, J.R., Combs, B., 1989, Analysis of lipopolysaccharide antigens of *Treponema hyodysenteriae*. Epidemiol. Infect. 103, 275-284.
- Hampson, D.J., Mhoma, J.R., Combs, B., Buddle, J.R., 1989, Proposed revisions to the serological typing system for *Treponema hyodysenteriae*. Epidemiol. Infect. 102, 75-84.
- Hampson, D.J., Mhoma, J.R., Combs, B.G., Lee, J.I., 1990, Serological grouping of *Treponema hyodysenteriae*. Epidemiol. Infect. 105, 79-85.
- Hampson, D.J., Robertson, I.D., La, T., Oxberry, S.L., Pethick, D.W., 2000, Influences of diet and vaccination on colonisation of pigs by the intestinal spirochaete *Brachyspira (Serpulina) pilosicoli*. Vet. Microbiol. 73, 75-84.
- Hampson, D.J., Stanton, T.B., 1997, Intestinal Spirochaetes in domestic animals and humans. CABI Publishing
- Harel, J., Belanger, M., Forget, C., Jacques, M., 1994, Characterization of *Serpulina hyodysenteriae* isolates of serotypes 8 and 9 from Quebec by restriction endonuclease fingerprinting and ribotyping. Can. J. Vet. Res. 58, 302-305.
- Harris, D.L., 1974, Current status of research on swine dysentery. J. Am. Vet. Med. Assoc. 164, 809-812.
- Harris, D.L., Glock, R.D., Christensen, C.R., Kinyon, J.M., 1972, Inoculation of pigs with *Treponema hyodysenteriae* (new species) and reproduction of the disease. Vet. Med. Small Anim. Clin. 67, 61-64.
- Harris, D.L., Kinyon, J.M., 1974, Significance of anaerobic spirochetes in the intestines of animals. Am. J. Clin. Nutr. 27, 1297-1304.

- Herbst, W., Willems, H., Baljer, G., 2004, [Distribution of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Lawsonia intracellularis* in healthy and diarrhoeic pigs]. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 117, 493-498.
- Hidalgo, A., Carvajal, A., Pringle, M., Rubio, P., Fellström, C., 2010, Characterization and epidemiological relationships of Spanish *Brachyspira hyodysenteriae* field isolates. Epidemiol. Infect. 138: 76-85.
- Holden, J., Coloe, P.J., Smooker, P.M., 2008, An evaluation of the immunogenicity and protective responses to *Brachyspira hyodysenteriae* recombinant SmpB vaccination. Vet. Microbiol. 128, 354-363.
- Holden, J., Moutafis, G., Istivan, T., Coloe, P.J., Smooker, P.M., 2006, SmpB: a novel outer membrane protein present in some *Brachyspira hyodysenteriae* strains. Vet. Microbiol. 113, 109-116.
- Hudson, M.J., Alexander, T.J., Lysons, R.J., Prescott, J.F., 1976, Swine dysentery: protection of pigs by oral and parenteral immunisation with attenuated *Treponema hyodysenteriae*. Res. Vet. Sci. 21, 366-367.
- Hudson, M.J., Alexander, T.J., Lysons, R.J., Wellstead, P.D., 1974, Swine dysentery: failure of an attenuated strain of spirochaete, given orally, to protect pigs against subsequent challenge. Br. Vet. J. 130, xxxvii-xl.
- Hughes, R., Olander, H.J., Williams, C.B., 1975, Swine dysentery: Pathogenicity of *Treponema hyodysenteriae*. Am. J. Vet. Res. 36, 971-977.
- Hunter, D., Wood, T., 1979, An evaluation of the API ZYM system as a means of classifying spirochaetes associated with swine dysentery. Vet. Rec. 104, 383-384.
- Jacobson, M., Fellstrom, C., Lindberg, R., Wallgren, P., Jensen-Waern, M., 2004, Experimental swine dysentery: comparison between infection models. J. Med. Microbiol. 53, 273-280.
- Jacobson, M., Lindberg, R., Jonasson, R., Fellstrom, C., Waern, M.J., 2007, Consecutive pathological and immunological alterations during experimentally induced swine dysentery - a study performed by repeated endoscopy and biopsy samplings through an intestinal cannula. Res. Vet. Sci. 82, 287-298.
- Joens, L.A., Harris, D.L., Baum, D.H., 1979, Immunity to Swine dysentery in recovered pigs. Am. J. Vet. Res. 40, 1352-1354.
- Joens, L.A., Harris, D.L., Kinyon, J.M., Kaeberle, M.L., 1978, Microtitration agglutination for detection of *Treponema hyodysenteriae* antibody. J. Clin. Microbiol. 8, 293-298.
- Joens, L.A., Marquez, R.B., 1986, Molecular characterization of proteins from porcine spirochetes. Infect. Immun. 54, 893-896.
- Joens, L.A., Nord, N.A., Kinyon, J.M., Egan, I.T., 1982, Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to *Treponema hyodysenteriae* antigens. J. Clin. Microbiol. 15, 249-252.
- Joens, L.A., Whipp, S.C., Glock, R.D., Nuessen, M.E., 1983, Serotype-specific protection against *Treponema hyodysenteriae* infection in ligated colonic loops of pigs recovered from swine dysentery. Infect. Immun. 39, 460-462.
- Jonasson, R., Andersson, M., Rasback, T., Johannisson, A., Jensen-Waern, M., 2006, Immunological alterations during the clinical and recovery phases of experimental swine dysentery. J. Med. Microbiol. 55, 845-855.
- Kärber, G., 1931, Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie 162, 480-483.
- Kennedy, M.J., Rosnick, D.K., Ulrich, R.G., Yancey, R.J., Jr., 1988, Association of *Treponema hyodysenteriae* with porcine intestinal mucosa. J. Gen. Microbiol. 134, 1565-1576.



- Kim, T.J., Jung, S.C., Lee, J.I., 2005, Characterization of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from Korea. *J. Vet. Sci.* 6, 335-339.
- Kinyon, J.M., Harris, D.L., Glock, R.D., 1977, Enteropathogenicity of various isolates of *Treponema hyodysenteriae*. *Infect. Immun.* 15, 638-646.
- Kruse, R., Essen-Gustavsson, B., Fossum, C., Jensen-Waern, M., 2008, Blood concentrations of the cytokines IL-1beta, IL-6, IL-10, TNF-alpha and IFN-gamma during experimentally induced swine dysentery. *Acta. Vet. Scand.* 50, 32.
- La, T., Phillips, N.D., Hampson, D.J., 2009, Evaluation of recombinant Bhlp29.7 as an ELISA antigen for detecting pig herds with swine dysentery. *Vet. Microbiol.* 133, 98-104.
- La, T., Phillips, N.D., Harland, B.L., Wanchanthuek, P., Bellgard, M.I., Hampson, D.J., 2009, Multilocus sequence typing as a tool for studying the molecular epidemiology and population structure of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Vet. Microbiol.* 138, 330-338.
- La, T., Phillips, N.D., Reichel, M.P., Hampson, D.J., 2004, Protection of pigs from swine dysentery by vaccination with recombinant BmpB, a 29.7 kDa outer-membrane lipoprotein of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Vet. Microbiol.* 102, 97-109.
- La, T., Tan, P., Phillips, N.D., Hampson, D.J., 2005, The distribution of *bmpB*, a gene encoding a 29.7 kDa lipoprotein with homology to MetQ, in *Brachyspira hyodysenteriae* and related species. *Vet. Microbiol.* 107, 249-256.
- Lämmler, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lau, T.T., Hampson, D.J., 1992, The serological grouping system for *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*. *Epidemiol. Infect.* 109, 255-263.
- Lee, B.J., Hampson, D.J., 1996, Production and characterisation of a monoclonal antibody to *Serpulina hyodysenteriae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 136, 193-197.
- Lee, B.J., Hampson, D.J., 1999, Lipo-oligosaccharide profiles of *Serpulina pilosicoli* strains and their serological cross-reactivities. *J. Med. Microbiol.* 48, 411-415.
- Lee, B.J., La, T., Mikosza, A.S., Hampson, D.J., 2000, Identification of the gene encoding BmpB, a 30 kDa outer envelope lipoprotein of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*, and immunogenicity of recombinant BmpB in mice and pigs. *Vet. Microbiol.* 76, 245-257.
- Lee, C.H., Olson, L.D., Rodabaugh, D.E., 1976, Influence of medication on development of serum antibody to swine dysentery as detected with indirect fluorescent antibody method. *Am. J. Vet. Res.* 37, 1159-1163.
- Lee, J.I., Hampson, D.J., Combs, B.G., Lybery, A.J., 1993, Genetic relationships between isolates of *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*, and comparison of methods for their subspecific differentiation. *Vet. Microbiol.* 34, 35-46.
- Li, Z., Jensen, N.S., Belanger, M., L'Esperance, M.C., Jacques, M., 1992, Molecular characterization of *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae* isolates representing serotypes 8 and 9. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2941-2947.
- Li, Z.S., Belanger, M., Jacques, M., 1991, Serotyping of Canadian isolates of *Treponema hyodysenteriae* and description of two new serotypes. *J. Clin. Microbiol.* 29, 2794-2797.
- Mapother, M.E., Joens, L.A., 1985, New serotypes of *Treponema hyodysenteriae*. *J. Clin. Microbiol.* 22, 161-164.
- Marcotte, H., Lavoie, M.C., 1998, Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 71-109.
- McCaman, M.T., Auer, K., Foley, W., Gabe, J.D., 2003, *Brachyspira hyodysenteriae* contains eight linked gene copies related to an expressed 39-kDa surface protein. *Microbes. Infect.* 5, 1-6.

- Milner, J.A., Sellwood, R., 1994, Chemotactic response to mucin by *Serpulina hyodysenteriae* and other porcine spirochetes: potential role in intestinal colonization. *Infect. Immun.* 62: 4095-4099
- Nuessen, M.E., Birmingham, J.R., Joens, L.A., 1982, Biological activity of a lipopolysaccharide extracted from *Treponema hyodysenteriae*. *Infect. Immun.* 37, 138-142.
- Nuessen, M.E., Joens, L.A., 1982, Serotype-specific opsonization of *Treponema hyodysenteriae*. *Infect. Immun.* 38, 1029-1032.
- Nuessen, M.E., Joens, L.A., Glock, R.D., 1983, Involvement of lipopolysaccharide in the pathogenicity of *Treponema hyodysenteriae*. *J. Immunol.* 131, 997-999.
- Ochiai, S., Adachi, Y., Asano, T., Prapasarakul, N., Ogawa, Y., Ochi, K., 2000, Presence of 22-kDa protein reacting with sera in piglets experimentally infected with *Brachyspira hyodysenteriae*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 28, 43-47.
- Ochiai, S., Adachi, Y., Mori, K., 1997, Unification of the genera *Serpulina* and *Brachyspira*, and proposals of *Brachyspira hyodysenteriae* comb. nov., *Brachyspira innocens* comb. nov. and *Brachyspira pilosicoli* comb. nov. *Microbiol. Immunol.* 41, 445-452.
- Olsen, I., Paster, B.J., Dewhirst, F.E., 2000, Taxonomy of spirochetes. *Anaerobe* 6, 39-57.
- Olson, L.D., 1974, Clinical and pathological observations on the experimental passage of swine dysentery. *Can. J. Comp. Med.* 38, 7-13.
- Osorio, J., Carvajal, A., Naharro, G., La, T., Phillips, N., Rubio, P., Hampson, D. J., 2012, Dissemination of clonal groups of *Brachyspira hyodysenteriae* amongst pig farms in Spain, and their relationships to isolates from other countries., published online: 10.1371/journal.pone.0039082.
- Pettersson, B., Fellstrom, C., Andersson, A., Uhlen, M., Gunnarsson, A., Johansson, K.E., 1996, The phylogeny of intestinal porcine spirochetes (*Serpulina* species) based on sequence analysis of the 16S rRNA gene. *J. Bacteriol.* 178, 4189-4199.
- Phillips, N.D., La, T., Amin, M.M., Hampson, D.J., 2010, *Brachyspira intermedia* strain diversity and relationships to the other indole-positive *Brachyspira* species. *Vet. Microbiol.* 143, 246-254.
- Pluske, J.R., Siba, P.M., Pethick, D.W., Durmic, Z., Mullan, B.P., Hampson, D.J., 1996, The incidence of swine dysentery in pigs can be reduced by feeding diets that limit the amount of fermentable substrate entering the large intestine. *J. Nutr.* 126, 2920-2933.
- Pohlenz, J.F., Whipp, S.C., Robinson, I.M., 1983, [Pathogenesis of swine dysentery caused by *Treponema hyodysenteriae*]. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 90, 363-367.
- Rasback, T., Jansson, D.S., Johansson, K.E., Fellstrom, C., 2007, A novel enteropathogenic, strongly hemolytic spirochaete isolated from pig and mallard, provisionally designated '*Brachyspira suanatina*' sp. nov. *Environ. Microbiol.* 9, 983-991.
- Rasback, T., Johansson, K.E., Jansson, D.S., Fellstrom, C., Alikhani, M.Y., La, T., Dunn, D.S., Hampson, D.J., 2007, Development of a multilocus sequence typing scheme for intestinal spirochaetes within the genus *Brachyspira*. *Microbiology* 153, 4074-4087.
- Rees, A.S., Lysons, R.J., Stokes, C.R., Bourne, F.J., 1989, Antibody production by the pig colon during infection with *Treponema hyodysenteriae*. *Res. Vet. Sci.* 47, 263-269.
- Rees, A.S., Lysons, R.J., Stokes, C.R., Bourne, F.J., 1989, The effect of parenteral immunisation on antibody production in the pig colon. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 23, 171-178.
- Richter, M., 2009 Untersuchungen zur Immunogenität verschiedener äußerer Membranproteine von *Brachyspira hyodysenteriae* im Zellkultur-Adhärenz-Modell. *Vet. Med. Diss., Justus-Liebig-Universität, Gießen.*

- Rohde, J., Rothkamp, A., Gerlach, G.F., 2002, Differentiation of porcine *Brachyspira* species by a novel nox PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 40, 2598-2600.
- Sacco, R.E., Nibbelink, S.K., Baarsch, M.J., Murtaugh, M.P., Wannemuehler, M.J., 1996, Induction of interleukin (IL)-1beta and IL-8 mRNA expression in porcine macrophages by lipopolysaccharide from *Serpulina hyodysenteriae*. *Infect. Immun.* 64, 4369-4372.
- Schlez, K., 2011. Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit bei *Brachyspira* spp.-Stämmen von deutschen Mastschweinen aus den Jahren 2003 - 2005. *Vet. Med. Diss.*, Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Schlink, G.T., Olson, L.D., 1983, Detecting anti-*Treponema hyodysenteriae* antibodies in swine serum using immunofluorometry. *Can. J. Comp. Med.* 47, 320-327.
- Sellwood, R., Kent, K.A., Burrows, M.R., Lysons, R.J., Bland, A.P., 1989, Antibodies to a common outer envelope antigen of *Treponema hyodysenteriae* with antibacterial activity. *J. Gen. Microbiol.* 135, 2249-2257.
- Sellwood, R., Walton, F., Thomas, W., Burrows, M.R., Chesham, J., 1995, Expression of the SmpA outer membrane lipoprotein of *Serpulina hyodysenteriae* strain P18A *in vivo*. *Vet. Microbiol.* 44, 25-35.
- Smith, S.C., Roddick, F., Ling, S., Gerraty, N.L., Coloe, P.J., 1990, Biochemical and immunochemical characterisation of strains of *Treponema hyodysenteriae*. *Vet. Microbiol.* 24, 29-41.
- Songer, J.G., Harris, D.L., 1978, Transmission of swine dysentery by carrier pigs. *Am. J. Vet. Res.* 39, 913-916.
- Sotiropoulos, C., Coloe, P.J., Smith, S.C., 1994, Identification and characterization of *Serpulina hyodysenteriae* by restriction enzyme analysis and Southern blot analysis. *J. Clin. Microbiol.* 32, 1397-1401.
- Spearman, C., 1908, The method of "right and wrong cases" ("constant stimuli") without Gauss's formulae. *Brit. J. Psychol.* 2, 227-242.
- Stanton, T.B., 1992, Proposal to change the genus designation *Serpula* to *Serpulina* gen. nov. containing the species *Serpulina hyodysenteriae* comb. nov. and *Serpulina innocens* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 189-190.
- Stanton, T.B., Trott, D.J., Lee, J.I., McLaren, A.J., Hampson, D.J., Paster, B.J., Jensen, N.S., 1996, Differentiation of intestinal spirochaetes by multilocus enzyme electrophoresis and 16S rRNA sequence comparisons. *FEMS Microbiol. Lett.* 136, 181-186.
- Stanton, T.B., 2006, The Genus *Brachyspira*. *The Prokaryotes* 7, 330-356.
- Stanton, T.B., Jensen, N.S., 1993, Purification and characterization of NADH oxidase from *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*. *J. Bacteriol.* 175, 2980-2987.
- Stanton, T.B., Jensen, N.S., Casey, T.A., Tordoff, L.A., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., 1991, Reclassification of *Treponema hyodysenteriae* and *Treponema innocens* in a new genus, *Serpula* gen. nov., as *Serpula hyodysenteriae* comb. nov. and *Serpula innocens* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 50-58.
- Stanton, T.B., Rosey, E.L., Kennedy, M.J., Jensen, N.S., Bosworth, B.T., 1999, Isolation, oxygen sensitivity, and virulence of NADH oxidase mutants of the anaerobic spirochete *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*, etiologic agent of swine dysentery. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5028-5034.
- Taylor, D.J., Alexander, T.J., 1971, The production of dysentery in swine by feeding cultures containing a spirochaete. *Br. Vet. J.* 127, 58-61.
- ter Huurne, A.A., Gaastra, W., 1995, Swine dysentery: more unknown than known. *Vet. Microbiol.* 46, 347-360.

- ter Huurne, A.A., van Houten, M., Koopman, M.B., van der Zeijst, B.A., Gaastra, W., 1992, Characterization of Dutch porcine *Serpulina (Treponema)* isolates by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *J. Gen. Microbiol.* 138, 1929-1934.
- Thomas, W., Sellwood, R., 1993, Molecular cloning, expression, and DNA sequence analysis of the gene that encodes the 16-kilodalton outer membrane lipoprotein of *Serpulina hyodysenteriae*. *Infect. Immun.* 61, 1136-1140.
- Thomas, W., Sellwood, R., Lysons, R.J., 1992, A 16-kilodalton lipoprotein of the outer membrane of *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*. *Infect. Immun.* 60, 3111-3116.
- Trott, D.J., Oxberry, S.L., Hampson, D.J., 1997. Evidence for *Serpulina hyodysenteriae* being recombinant, with an epidemic population structure. *Microbiology* 143, 3357-3365.
- Vaerman, J.P., Langendries, A., Pabst, R., Rothkotter, H.J., 1997, Contribution of serum IgA to intestinal lymph IgA, and vice versa, in minipigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 58, 301-308.
- Wannemuehler, M.J., Hubbard, R.D., Greer, J.M., 1988, Characterization of the major outer membrane antigens of *Treponema hyodysenteriae*. *Infect. Immun.* 56, 3032-3039.
- Westerman, R.B., Phillips, R.M., Joens, L.A., 1995, Production and characterization of monoclonal antibodies specific for lipooligosaccharide of *Serpulina hyodysenteriae*. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2145-2149.
- Westphal, O., Lüderitz, O., Bister, R., 1952, Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. *Naturforsch.* 76, 148-155.
- Whiting, R.A., Doyle, L.P., Spray, R.S., 1921, Swine dysentery. *Purdue. Univ. Agric. Exp. Stn. Bull* 257, 3-15.
- Witchell, T.D., Hoke, D.E., Bulach, D.M., Coutts, S.A., Driesen, S.J., Cordwell, S.J., Adler, B., 2011, The major surface Vsp proteins of *Brachyspira hyodysenteriae* form antigenic protein complexes. *Vet. Microbiol.* 149, 157-162.
- Zhao, Y., Kacskovics, I., Pan, Q., Liberles, D.A., Geli, J., Davis, S.K., Rabbani, H., Hammarstrom, L., 2002, Artiodactyl IgD: the missing link. *J. Immunol.* 169, 4408-4416.

## 8 Anhang

Tabelle 17 Verwendete Puffer und Medien

Puffer	Zusammensetzung	Menge
<b>Anodenpuffer I</b>	Tris-Puffer (1 M)	300 ml
	Methanol	200 ml
	<i>A. deionisata</i>	500 ml
<b>Anodenpuffer II</b>	Tris-Puffer (1 M)	25 ml
	Methanol	200 ml
	<i>A. deionisata</i>	770 ml
<b>Borat-Agar</b>	Borat-Puffer	120 ml
	Agarose	1,2 g
	PEG 6000	1,2 g
<b>Borat-Puffer</b>	NaOH	2 g
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	9 g
	<i>A. deionisata</i>	ad 1000 ml
<b>BHI-Medium</b>	Fa. Oxoid, Hampshire, England, Kat. Nr.: CM1135	37 g
	<i>A. deionisata</i>	ad 1000 ml
<b>BHIF<sup>CVSSR</sup>-Medium</b>	Fa. Oxoid, Hampshire, England, Kat. Nr.: CM1135	37 g
	Colistin	6,23 mg
	Vancomycin	6 mg
	Spectinomycin	200 mg
	Spiramycin	15,25 mg
	Rifampicin	12,5 mg
	<i>A. deionisata</i>	ad 1000 ml
	direkt vor Gebrauch zusetzen: FBS (Fötales bovines Serum) (γ- bestrahlt) Fa. Sigma, Australien	20 %
<b>Blut-Agar</b>	Fa. Merck, Darmstadt, Kat. Nr.: 1.10886.0500	40 g
	defibriniertes Schafblut	50 ml
	<i>A. deionisata</i>	ad 1000 ml
<b>Chloronaphthol-Methanol</b>	4-Chloro-1-Naphthol	3 mg
	Methanol	1 ml
<b>Developing solution</b>	<i>Sensitizer concentrate</i>	10 µl
	<i>Developing reagent</i>	10 ml
	<i>A. deionisata</i>	ad 100 ml
	direkt vor Gebrauch zusetzen: Formaldehyd	27 µl

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Menge</b>
<b>Gassner-Agar</b>	Fa. OXOID GmbH, Wesel, Kat. Nr.: GFG01B <i>A. deionisata</i>	77 g ad 1000 ml
<b>Gel fixing solution 1</b>	Ethanol Eisessig <i>A. deionisata</i>	50 ml 10 ml 40 ml
<b>Gel fixing solution 2</b>	Ethanol <i>A. deionisata</i>	60 ml 120 ml
<b>Kathodenpuffer</b>	6-Aminocaprinsäure Tris-Puffer (1 M) Methanol <i>A. deionisata</i>	5,25 g 25 ml 200 ml 770 ml
<b>LÄMMLI-Puffer (1970), pH 6,8</b>	Tris-Cl (0,5 M, pH 6,8) Glycerol (87 %) SDS (10 %) $\beta$ -Mercaptoethanol Bromphenolblau <i>A. deionisata</i> pH-Wert einstellen mit 37 % HCl	1 ml 0,8 ml 1,6 ml 0,4 ml 0,02 g 4 ml
<b>1x PBS (pH 7,4)</b>	NaCl KCl $\text{KH}_2\text{PO}_4$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ <i>A. deionisata</i>	10 g 0,25 g 0,25 g 1,8 g ad 1000 ml
<b>1x PBS-Tween (pH 7,2)</b>	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ NaCl Tween 20 (0,05 %) <i>A. deionisata</i>	0,5 g 0,47 g 8,18 g 0,5 ml ad 1000 ml
<b>Schädler-ohne-Agar (ohne Antibiotika)</b>	Fa. Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA, Kat. Nr.: 212189 defibriniertes Schafblut <i>A. deionisata</i>	41,9 g 50 ml ad 1.000 ml
<b>SDS-Elektrophorese-Laufpuffer</b>	Glycin SDS (Dodecylsulfat Natriumsalz) Tris <i>A. deionisata</i>	14,4 g 1 g 3,03 g ad 1000 ml

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Menge</b>
<b>analytisches SDS-Sammelgel (Mini, 4,5 %)</b>	Tris-HCl (1 M, pH 6,8)	250 µl
	Acrylamid-Bisacrylamid 37,5:1	381 µl
	SDS (20 %)	12,5 µl
	Harnstoff (8 M)	1,5 ml
	APS (10 %)	75 µl
	TEMED	2,5 µl
	<i>A. deionisata</i>	319 µl
<b>analytisches SDS-Trenngel (Mini, 16 %)</b>	Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8)	2,5 ml
	Acrylamid-Bisacrylamid 37,5:1	6 ml
	SDS (20 %)	62,5 µl
	Harnstoff (8 M)	3,75 ml
	APS (10 %)	60 µl
	TEMED	10 µl
<b><i>Sensitizing solution</i></b>	<i>Sensitizer concentrate</i> <i>A. deionisata</i>	0,4 ml ad 100 ml
<b>Serumbouillon</b>	Standard-I-Nährbouillon	25 g
	Rinderserum	100 ml
	<i>A. deionisata</i>	ad 1000 ml
<b><i>Staining solution</i></b>	<i>Staining reagent</i>	4 ml
	<i>A. deionisata</i>	ad 100 ml
	direkt vor Gebrauch zugeben: Formaldehyd	54 µl
<b><i>Stop solution</i></b>	<i>Stop reagent</i>	8 ml
	<i>A. deionisata</i>	92 ml
<b>Tris-Puffer (1 M, ungepuffert)</b>	Tris	121,14 g
	<i>A. deionisata</i>	ad 1000 ml
<b>TSA<sup>CVSSR</sup>-Agar (mit Schafblut)</b>	Caso-Agar: Fa. Merck, Darmstadt, Kat. Nr.: 1.05458.0500	40 g
	defibriniertes Schafblut	50 ml
	Colistin	6,23 mg
	Vancomycin	6 mg
	Spectinomycin	200 mg
	Spiramycin	15,25 mg
	Rifampicin	12,5 mg
	<i>A. deionisata</i>	ad 1000 ml
<b>Zeissler-Agar</b>	Columbia-Agar: Fa. Merck, Darmstadt, Kat. Nr.: 1.10455.0500	52 g
	Glucose	10 g
	<i>A. deionisata</i>	ad 1000 ml

**Tabelle 18** Übersicht über alle in den Tierversuchen TV141, TV143, TV144 und TV145 gewonnenen Kaninchenserien

Tierversuch / Kaninchen	Impfantigencharge	Null- Serum <sup>1</sup>	CH-Nummer								zusätzliche Seren		
			nach Impfung <sup>2</sup>								nach 1. Impfung	nach 4. Impfung	nach 5. Impfung
			1	2	3	4	5	6	7	8			
<b>TV141</b>													
141-B	P7949/02/08	27	31	35	39	43	<b>82</b>	-	-	-	-	-	-
141-U	B204/02/08	28	32	36	40	44	<b>83</b>	-	-	-	-	-	-
141-H	B78/02/08	29	33	37	41	45	<b>84</b>	-	-	-	-	-	-
141-E	B169/02/08	30	34	38	42	46	<b>85</b>	-	-	-	-	-	-
<b>TV143</b>													
143-M1	A1 / Serotyp 4	287	296	305	314	322	<b>329</b>	-	-	-	-	-	-
143-I	B8044/ Serotyp 2,5	288	297	306	315	323	<b>330</b>	-	-	-	-	-	-
143-M2	B8044/ Serotyp 2,5	289	298	307	316	324	<b>331</b>	-	-	-	-	-	-
143-T	B6933/ Serotyp 6,1	290	299	308	317	325	<b>332</b>	-	-	-	-	-	-
143-S1	B6933/ Serotyp 6,1	291	300	309	318	-	-	-	-	-	-	-	-
143-E	Ack300/8 Serotyp 7,2	292	301	310	319	326	<b>333</b>	-	-	-	-	-	-
143-S2	Ack300/8 Serotyp 7,2	293	302	311	320	327	<b>334</b>	-	-	-	-	-	-
143-L	Vic2 / Serotyp 8	294	303	312	-	-	-	-	-	-	-	-	-
143-C	NSW1 / Serotyp 9	295	304	313	321	328	335	336	-	-	-	-	-
<b>TV144</b>													
144-A	A1 / Serotyp 4	732	738	744	750	755	760	765	770	<b>773</b>	-	-	-
144-B	B8044/ Serotyp 2,5	733	739	745	751	756	<b>766</b>	-	-	-	-	-	761
144-V	Vic2 / Serotyp 8	734	740	746	752	757	762	767	771	<b>774</b>	-	-	-
144-N1	NSW1 / Serotyp 9	735	741	747	753	758	763	768	772	<b>775</b>	-	-	-
144-N2	NSW1 / Serotyp 9	736	742	-	-	-	-	-	-	-	748	-	-
144-S	G21	737	743	749	754	759	<b>769</b>	-	-	-	-	-	764

Fortsetzung der **Tabelle 18** und Erläuterungen auf der nächsten Seite



Tierversuch / Kaninchen	Impfantigencharge	Null- Serum <sup>1</sup>	CH-Nummer								zusätzliche Seren							
			nach Impfung <sup>2</sup>								nach 1. nach 4. nach 5.							
			1	2	3	4	5	6	7	8	Impfung	Impfung	Impfung					
<b>TV145</b>																		
145-A	G3 [St.3/02/10]	963	971	979	987	1003	1019	-	-	-	-	-	-	-	995	1011		
145-B	G38 [St.38/02/10]	964	972	980	988	1004	1020	-	-	-	-	-	-	-	996	1012		
145-C	G44 [St.44/02/10]	965	973	981	989	1005	1021	-	-	-	-	-	-	-	997	1013		
145-D	G47 [St.47/02/10]	966	974	982	990	1006	1022	-	-	-	-	-	-	-	998	1014		
145-F	G64 [St.64/02/10]	967	975	983	991	1007	1023	-	-	-	-	-	-	-	999	1015		
145-G	G88 [St.88/02/10]	968	976	984	992	1008	1024	-	-	-	-	-	-	-	1000	1016		
145-H	G91 [St.91/02/10]	969	977	985	993	1009	1025	-	-	-	-	-	-	-	1001	1017		
145-I	G98 [St.98/02/10]	970	978	986	994	1010	1026	-	-	-	-	-	-	-	1002	1018		

**Erläuterung:** 1) Nullserum = Serum vor der ersten Immunisierung; 2) Seren, mit denen die Serotypisierung der *B. hyodysenteriae*-Isolate durchgeführt wurden, sind durch Fettdruck hervorgehoben.

## 9                    **Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**

### 9.1                **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1	Ergebnis des IDT mit einem Kaninchenserum nach Immunisierung mit dem Ultraschalllysat von <i>B. hyodysenteriae</i> -Stamm B204 .....	31
Abbildung 2	Reaktion verschiedener LOS-spezifischer Antiseren mit <i>B. hyodysenteriae</i> -Stamm B204 im Immundiffusionstest.....	33
Abbildung 3	Reaktion des $\alpha$ B8044-Serums mit verschiedenen LOS-Präparationen (präpariert mit Phenol-Wasser-Methode) vor bzw. nach Proteinase K-Verdau.....	35
Abbildung 4	SDS-PAGE einer Proteinase K-verdauten LOS-Präparation von <i>B. hyodysenteriae</i> (Stamm B204, Serotyp 2) nach Silberfärbung.....	36
Abbildung 5	Detektion verschiedener LOS-Präparationen von <i>B. hyodysenteriae</i> Stamm-A1 (Serotyp 4) nach SDS-PAGE-Elektrophorese und Immunoblot mit einem homologen Antiserum .....	37
Abbildung 6	LOS-Präparationen verschiedener nicht typisierbarer <i>B. hyodysenteriae</i> -Feldisolate nach SDS-PAGE und Silberfärbung .....	38
Abbildung 7	Detektion der LOS-Präparationen der <i>B. hyodysenteriae</i> -Stämme A1 und B204 nach SDS-Elektrophorese und Immunoblot bei variierender Konzentration von Antiserum und Konjugat.....	39
Abbildung 8	Im Immunoblot detektierte Banden am Beispiel der LOS-Präparation von <i>B. hyodysenteriae</i> -Stamm B8044 (Serotyp 5,3) (Bande P7 ist hier nicht dargestellt) .....	40

### 9.2                **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1	Serotypen- bzw. Serogruppenzugehörigkeit aller entsprechend untersuchten <i>B. hyodysenteriae</i> -Stämme .....	9
Tabelle 2	Überblick über die bekannten Antigene von <i>B. hyodysenteriae</i> .....	20
Tabelle 3	<i>Brachyspira</i> spp.-Referenzstämme .....	21
Tabelle 4	Eigenschaften der zur Herstellung von Antiseren ausgewählten deutschen <i>B. hyodysenteriae</i> -Feldisolate .....	29
Tabelle 5	Impfung mit verschiedenen <i>B. hyodysenteriae</i> -Stämmen/Isolaten (TV 141, 143, 144, 145) .....	30
Tabelle 6	Ergebnisse der Prüfung der Kaninchenantiseren auf LOS-präzipitierende Antikörper nach abgeschlossener Immunisierung im Immundiffusionstest.....	32
Tabelle 7	Reaktionen der Antiseren gegen Referenzstämme mit den aus ihnen hergestellten LOS-Präparationen im IDT .....	34

Tabelle 8	Einteilung und Definition der bei der serologischen Typisierung von <i>B. hyodysenteriae</i> -Stämmen im Immunoblot nachgewiesenen Reaktionsmuster.....	41
Tabelle 9	Reaktionsmuster der Serotyp-spezifischen Antiseren mit LOS-Präparationen verschiedener Referenzstämmen im Immunoblot.....	43
Tabelle 10	Reaktionsmuster der Antiseren mit LOS-Präparationen verschiedener <i>B. hyodysenteriae</i> -Referenzstämmen und Feldisolate.....	44
Tabelle 11	Ergebnis der serologischen Charakterisierung der deutschen <i>B. hyodysenteriae</i> -Feldisolate (n=75).....	46
Tabelle 12	Ergebnis der serologischen Charakterisierung der dänischen <i>B. hyodysenteriae</i> -Feldisolate (n=12).....	47
Tabelle 13	Ergebnis der serologischen Charakterisierung der spanischen <i>B. hyodysenteriae</i> -Feldisolate (n=17).....	48
Tabelle 14	Ergebnis der serologischen Charakterisierung der japanischen <i>B. hyodysenteriae</i> -Feldisolate (n=5).....	48
Tabelle 15	Ergebnis der serologischen Charakterisierung der amerikanischen <i>B. hyodysenteriae</i> -Feldisolate (n=8).....	49
Tabelle 16	Überblick über die serologische Charakterisierung deutscher und ausländischer <i>B. hyodysenteriae</i> -Feldisolate.....	50
Tabelle 17	Verwendete Puffer und Medien.....	67
Tabelle 18	Übersicht über alle in den Tierversuchen TV141, TV143, TV144 und TV145 gewonnenen Kaninchenserum.....	70

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Allen bedanken, ohne die es diese Doktorarbeit nie gegeben hätte.

Herrn Prof. em. Dr. Dr. habil. Georg Baljer danke ich besonders für die Überlassung des Themas und den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Dr. Werner Herbst für seine nie endende Geduld, seine Ermunterungen, seinem Anhalten zum selbstständigen Arbeiten und die zahlreichen Gespräche, die aufmunternd und hilfreich waren.

Frau Dr. Stefanie Barth danke ich ebenfalls ganz herzlich für ihre gute Betreuung. Besonders hilfreich waren stets ihre Computerkenntnisse, die mir so vieles erleichtert haben und ihre Ideen und Anregungen bezüglich meiner Doktorarbeit. Auch ihr möchte ich für die Gespräche danken, die mir neuen Mut gegeben haben.

Mein Dank gilt der H. Wilhelm Schaumann Stiftung für die Bereitstellung meines Stipendiums.

Danken möchte ich auch der Firma Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.

Weiterhin geht mein Dank an meine Arbeitsgruppe: Regina Weil, Adelheid Hess und Jörg Heuser für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei meiner Arbeit. Besonders danke ich Herrn Jörg Heuser für die Aufmunterungen, Gespräche, Witze und auch konstruktive Kritik, die mir so viel Freude gemacht haben und es mir ermöglicht haben, stets alles im richtigen Licht zu sehen.

Ebenso herzlich möchte ich den Doktoranden des Instituts danken, die mir durch ihre Hilfsbereitschaft und den Zusammenhalt eine schöne und unvergessene Zeit im Institut bereitet haben.

Dank geht auch an alle anderen Mitarbeiter des Instituts, die stets freundlich und hilfsbereit auf mich zugegangen sind.

Schließlich möchte ich meiner Familie (und alle, die ich als solche ansehe) und meinen Freunden danken. Ohne sie, wäre ich nicht da, wo ich heute bin. Danke für jede Art der Unterstützung, sei es finanziell, durch Kritik, durch Aufmunterungen oder stetem Nachfragen nach dem Fortschreiten der Dissertation! Besonders hervorgehoben sei meine Mutter. Sie hat mich zu der gemacht, die ich bin. Danke!

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Simone Schneider



*edition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6165-4



9 783835 196165 4