A close-up photograph of a dog's face, showing its eye, nose, and whiskers. The dog has grey and white fur. The background is a soft, out-of-focus light blue.

**Nachweis von *Brucella* sp. bei Meeressäugern
der deutschen Nordsee:**

**Phäno- und genotypische Charakterisierung
der Isolate sowie serologische Studien**

Ellen Prenger-Berninghoff

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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 2005

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.

1st Edition 2005

© 2005 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer

**Nachweis von *Brucella* sp. bei Meeressäugern
der deutschen Nordsee:
Phäno- und genotypische Charakterisierung
der Isolate sowie serologische Studien**

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

eingereicht von

Ellen Prenger-Berninghoff

Tierärztin aus Osnabrück

Gießen, 2005

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

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutacher: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer
Prof. Dr. E. Kaleta

Tag der Disputation: 03.11.2005

Meinen Eltern

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

A. König, E. Prenger-Berninghoff, R. Weiß, A. Vossen und U. Siebert (2002)
Phänotypische und molekularbiologische Untersuchungen von Brucellen-Isolaten
aus Meeressäugern der deutschen Nordsee
Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift, 115(9-10): S. 339

E. Prenger-Berninghoff, A. Thoele, U. Siebert, M. Stede und R. Weiß (2003)
Phenotypic and molecular characterization of *Brucella* strains isolated from marine
mammals of the german North Sea
International Journal of Medical Microbiology, 293(Suppl. No. 36): S. 320

E. Prenger-Berninghoff, A. König, R. Weiß, G. Baljer (2004)
Brucella sp. in Meeressäugern der deutschen Nordsee – Klassifikation und klinische
Signifikanz
Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift, 117(11-12): S. 451

Inhaltsverzeichnis

	Inhaltsverzeichnis.....	I
	Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Brucellentaxonomie	3
2.2	Nachweis von Brucellen bei Meeressäugern	5
2.3	Phänotypische Charakterisierung mariner Brucellen	7
2.4	Molekulargenetische Charakterisierung mariner Brucellen	12
2.4.1	16S rRNS-Gen	12
2.4.2	<i>omp</i> -Gene.....	13
2.4.2.1	<i>omp2</i> -Lokus.....	14
2.4.2.2	<i>omp25</i> -Gen.....	18
2.4.2.3	<i>omp31</i> -Gen.....	19
2.4.3	<i>IS711</i> -Lokus	20
2.5	Nachweis von <i>Brucella</i>-spezifischen Antikörpern in Seren von Meeressäugern	22
3	Material und Methoden.....	28
3.1	Untersuchungsmaterial.....	28
3.2	Untersuchungszeitraum und Zahl der untersuchten Tiere	28
3.3	Probenentnahme	29
3.4	Kulturell-bakteriologische Untersuchung von Organ- und Tupferproben zur Isolierung von Brucellen	29
3.5	Herkunft der verwendeten Brucellen-Kontrollstämme.....	30
3.6	Phänotypische Untersuchungen zur Identifizierung und Differenzierung von Brucellen-Isolaten	31
3.6.1	Mikroskopische Untersuchungen.....	31
3.6.2	Biochemische Untersuchungen.....	31
3.6.2.1	Untersuchung auf Katalaseaktivität	31
3.6.2.2	Untersuchung auf Cytochromoxidaseaktivität.....	31

3.6.2.3	Untersuchung auf Ureaseaktivität.....	31
3.6.2.4	Prüfung der Schwefelwasserstoffbildung.....	31
3.6.3	Testung der Farbstoffsensitivität.....	32
3.6.4	Prüfung auf Empfindlichkeit gegenüber lytischen Phagen.....	32
3.6.5	Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung.....	33
3.6.6	Überprüfung der NaCl-Empfindlichkeit	35
3.6.7	Untersuchung des Lipopolysaccharidprofils mittels spezifischer Antisera (Objektträgeragglutination)	35
3.7	Molekulargenetische Untersuchungen zur Identifizierung und Differenzierung von Brucellen-Isolaten	35
3.7.1	Präparation von bakterieller Gesamt-DNS.....	35
3.7.1.1	Lysis by boiling-Verfahren	35
3.7.1.2	DNS-Präparation mittels DNEasy Tissue Kit	36
3.7.1.3	Quantifizierung von DNS	36
3.7.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	36
3.7.2.1	<i>omp2</i> -PCR nach SIFUENTES-RINCON <i>et al.</i> (1997).....	37
3.7.2.2	<i>omp2</i> -PCR nach CLOECKAERT <i>et al.</i> (1995).....	38
3.7.2.3	<i>omp2</i> -XL-PCR	39
3.7.2.4	<i>IS711</i> -PCR nach BRICKER und HALLING (1994)	41
3.7.3	Agarosegelelektrophorese.....	42
3.7.4	Spaltung von DNS mit Restriktions-Endonukleasen.....	43
3.7.4.1	Restriktionsanalyse des <u><i>omp2</i>-Gens</u>	43
3.7.4.2	Restriktion von <u>Gesamt-DNS</u> zur Vorbereitung der DNS-DNS-Hybridisierung.....	43
3.7.5	DNS-DNS-Hybridisierungsverfahren	44
3.7.5.1	Herstellung einer Digoxigenin-markierten DNS-Sonde.....	44
3.7.5.2	Southern Blot.....	44
3.7.5.3	DNS-DNS-Hybridisierung	45
3.7.5.4	Digoxigenin-Detektionsverfahren.....	45
3.7.6	Sequenzierung des <i>omp2</i> -Gens und Auswertung der Sequenzdaten	45
3.8	Serologische Untersuchung von Blutproben (Serumlangsamagglutination)	48
3.8.1	Langsamagglutination mit <i>Brucella abortus</i> -Antigen.....	48
3.8.2	Langsamagglutination mit marinem Brucellen-Antigen.....	48

4	Ergebnisse	50
4.1	Kulturell-bakteriologischer Nachweis von brucellenverdächtigen Bakterienisolaten aus Organproben von Meeressäugern	50
4.2	Phänotypische Charakterisierung.....	55
4.2.1	Mikroskopische Morphologie	55
4.2.2	Biochemische Eigenschaften.....	55
4.2.3	Farbstoffsensitivität.....	56
4.2.4	Phagenlysis	58
4.2.5	Antibiotikaempfindlichkeit	59
4.2.6	NaCl-Empfindlichkeit	61
4.2.7	Lipopolysaccharidprofil	62
4.3	Molekulargenetische Charakterisierung.....	63
4.3.1	4.3.1 Nachweis des <i>Brucella</i> -gattungsspezifischen <i>omp2</i> -Lokus	63
4.3.2	PCR-Amplifikationsmuster des <i>omp2</i> -Lokus	65
4.3.3	PCR-RFLP-Muster des <i>omp2</i> -Lokus	69
4.3.4	Amplifikation des <i>omp2</i> -Lokus mittels XL-PCR	74
4.3.5	Sequenzanalyse des <i>omp2</i> -Lokus.....	74
4.3.6	Nachweis des gattungsspezifischen <i>IS711</i> -Lokus.....	79
4.3.7	<i>IS711</i> -Fingerprinting	79
4.4	Nachweis von <i>Brucella</i>-spezifischen Antikörpern in Seren von Meeresessäugern	85
4.4.1	Ergebnisse der Langsamagglutination mit <i>B. abortus</i> -Antigen	85
4.4.2	Ergebnisse der Langsamagglutination mit Antigen von marinen <i>Brucella</i> -Isolaten.....	86
5	Diskussion	88
6	Zusammenfassung	108
7	Summary	110
8	Literaturverzeichnis.....	112
9	Anhang	126
	Danksagung	132

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
Acc.	Accession number (Datenbankeintrag)
al.	alii (lat. andere)
AMC	Amoxicillin/Clavulansäure
AMP	Ampicillin
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
ATCC	American Type Culture Collection
AVID	Arbeitskreis für Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik
B.	Brucella
BBA	Brucellosis card test using buffered <i>Brucella</i> antigen
BCCN	<i>Brucella</i> Culture Collection, Nouzilly, Frankreich
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Basenpaare
BPAT	Buffered plate agglutination test
bzw.	beziehungsweise
C	Chloramphenicol
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
C _{DNS}	DNS-Konzentration
cELISA	kompetitiver ELISA
CL	Cefalexin
cm	Zentimeter
CN	Gentamycin
CO ₂	Kohlendioxid
CSPD	Dinatrium 3-(4-methoxyspiro[1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chlor) tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}] decan}-4-yl) phenylphosphat
d	Desoxy
DA	Clindamycin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dd	Didesoxy
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d. h.	das heißt
DIG	Digoxigenin
DNS	Desoxy-Ribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DO	Doxycyclin
D-Rha4Nfo	4,6-Dideoxy-4-Formamido-D-Mannopyranosyl
dTTP	<i>Desoxythymidintriphosphat</i>
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ENR	Enrofloxacin
F	Nitrofurantoin

F1	Phage Weybridge
F25	Phage Weybridge
F10	Fuchsin 10 µg/ml
F20	Fuchsin 20 µg/ml
F40	Fuchsin 40 µg/ml
f.c.	final concentration
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
I	inkomplette Lysis
iELISA	indirekter ELISA
IHIT	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
IS	Insertionselement
K	komplette Lysis
k.A.	keine Angaben
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharide
µ	Mikro (10 ⁻⁶)
M	Molar
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Mg(OAc) ₂	Magnesiumacetat
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MY	Lincomycin
n	Nano (10 ⁻⁹)
N	Neomycin
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NCTC	National Collection of Type Cultures
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OMP	Außenmembranprotein
P	Penicillin
P	Plaques
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	Potentiale hydrogenii (negativer Zehnerlogarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration)
PVC	Polyvinylchlorid
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RT	Raumtemperatur

RTD	Routine test dilution
S	smooth
S	Streptomycin
S10	Safranin 10 µg/ml
S20	Safranin 20 µg/ml
S40	Safranin 40 µg/ml
SDS	Natriumdodecylsulfat
spp.	Spezies
SSC	Standard saline-citrate
SXT	Sulfomethoxazol/Trimethoprim
T10	Thionin 10 µg/ml
T20	Thionin 20µg/ml
T40	Thionin 40 µg/ml
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCBS	Thiosulfate-Citrate-Bile-Sucrose
TE	Tetracyclin
TE	Tris-EDTA
Tfl	<i>Thermus flavus</i>
Tris	Tri-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Units
UV	Ultraviolett
V	Verdünnung
V	Volt
v. a.	vor allem
v/v	volume/volume
Vol	Volumen
W	Keimwachstum
w/v	weight/volume
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Brucellen sind gram-negative, kokkoide, fakultativ intrazelluläre Stäbchenbakterien, die als Krankheitserreger sowohl beim Menschen als auch bei Tieren weltweit eine bedeutende Rolle spielen (27,121).

Die Vertreter der Gattung *Brucella* (*B.*) werden aufgrund ihrer über 90%igen DNS-Homologie heute taxonomisch alle der Spezies *B. melitensis* zugeordnet (27). In der Literatur und im folgenden Manuskript findet jedoch die alte Nomenklatur weiterhin Verwendung, welche die Brucellen anhand ihrer Pathogenität und Wirtspräferenz in 6 Spezies und 15 Biovare einteilt (27). Unter den Haussäugetieren erkranken hauptsächlich Rinder (*B. abortus*), Schafe und Ziegen (*B. melitensis*, *B. ovis*), sowie Schweine (*B. suis*) und Hunde (*B. canis*). Bei den betroffenen Tierarten kommt es in erster Linie zu Aborten und Infertilität (4). Brucellen-Infektionen bei Nutztieren werden seit mehreren Jahrzehnten europaweit mit staatlichen Mitteln mehr oder weniger erfolgreich bekämpft. Die Nutztierbestände Deutschlands sind seit einigen Jahren amtlich anerkannt brucellosefrei (93/52/EWG, 1992).

Brucellen konnten auch bei einer Vielzahl von Wildtieren isoliert werden; diese stellen somit als Naturreservoir ein zusätzliches Problem für die Eradikation dieser Erreger dar (29).

Bei Meeressäugern wurde der Nachweis von Brucellen erstmalig 1994 beschrieben (107). Mittlerweile liegt eine lange Reihe positiver Befunde bei verschiedenen Meeressäugerspezies aus der nördlichen und südlichen Hemisphäre vor (6, 18, 38, 45, 46, 54, 65, 67, 88, 96, 99, 107, 108, 121, 124).

Die von Meeressäugern isolierten Brucellenstämme wurden zunächst anhand konventioneller Typisierungsmethoden charakterisiert und konnten keiner der 6 bekannten *Brucella*-Spezies zugeordnet werden. JAHANS *et al.* (1997) schlugen daher vor, die marinen Brucellen-Isolate vorläufig als neue Spezies *B. „maris“* zusammenzufassen.

Molekulargenetische Untersuchungen bestätigten, dass es sich bei den marinen Brucellen-Isolaten um eine neue Spezies handelt (10, 18, 23, 66, 129). Wie bei allen Brucellen konnte das repetitive Insertionselement *IS711* auch in der chromosomalen DNS mariner Brucellen-Isolate nachgewiesen werden, auffällig war aber eine deutlich höhere Anzahl an *IS711*-Kopien im Vergleich zu den klassischen *Brucella*-

Spezies. Außerdem wurde eine für marine Brucellen spezifische *IS711*-Kopie downstream des *bp26*-Gens identifiziert.

Eine weitere molekularbiologische Differenzierung der marinen Brucellen-Isolate konnte durch PCR-RFLP-Studien des gattungsspezifischen *omp2*-Lokus, bestehend aus den zwei Genen *omp2a* und *omp2b*, erfolgen. Die ermittelten Restriktionsmuster innerhalb des *omp2*-Lokus erwiesen sich als wichtiges Unterscheidungsmerkmal zwischen Brucellen-Isolaten terrestrischer und mariner Säugetiere. Die aufgrund unterschiedlicher Restriktionsmuster festgestellte Heterogenität innerhalb der Gruppe der marinen Brucellen-Isolate legte eine Unterteilung in zwei neue Spezies nahe, die den Wirtstierspezies entsprechend als *B. cetaceae* (Walartige) und *B. pinnipediae* (Flossenfüßler) bezeichnet wurden (24).

Bisher ist wenig darüber bekannt, welche Erkrankungen bei Meeressäugern durch marine Brucellen ausgelöst werden. Die Isolierung aus subkutanen Läsionen, Abszessen und Abortmaterial gab erste Hinweise auf eine pathogene Bedeutung dieser Bakterien bei ihren primären Wirten (35, 79, 90). Ihr inzwischen auch bei einem Labormitarbeiter und bei zwei an Neurobrucellose erkrankten Patienten erfolgter Nachweis deutet auf ein zoonotisches Potential dieser Erreger hin (8, 116).

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit Brucellen-Isolaten aus Meeressäugerspezies der deutschen Nordsee. Ziele waren die Identifizierung und Charakterisierung sowie die Bewertung der zur Verfügung stehenden Isolate hinsichtlich

1. ihrer Diversität im Vergleich zu den klassischen *Brucella*-Spezies,
2. ihres Verwandtschaftsgrades untereinander und
3. ihrer Zuordnung zu den bereits beschriebenen marinen Brucellen-Isolaten.

Weiterhin sollten serologische Untersuchungen zum Vorkommen von *Brucella*-spezifischen Antikörpern den Kenntnisstand über die Verbreitung von *Brucella*-Spezies bei Meeressäugern der deutschen Nordsee erweitern helfen.

2 Literaturübersicht

2.1 Brucellentaxonomie

Die zur Klasse der α -Proteobakterien und zur Familie der *Brucellaceae* gehörenden Vertreter der Gattung *Brucella* besitzen untereinander eine hohe DNS-Sequenzhomologie von über 90 % (27, 126). Die anhand ihrer Pathogenität und Wirtspräferenz lange Zeit als sechs eigenständige Spezies definierten Vertreter *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* und *B. neotomae* werden daher heute taxonomisch alle einer Spezies *B. melitensis* zugeordnet und als Biovare dieser Spezies weitergeführt (27). Aufgrund der phänotypischen und genotypischen Unterschiede der marinen Brucellen-Isolate im Vergleich zu den sechs klassischen Brucellen-Spezies wurden diese vorläufig unter der Bezeichnung *B. „maris“* zusammengefasst. Anhand jüngster genotypischer Untersuchungen der marinen Isolate auf der Basis von Restriktionsanalysen und anhand ihrer Wirtspräferenz ist derzeit eine weitergehende Unterteilung der marinen Brucellen-Isolate in die Spezies *B. cetaceae* (Walartige) und *B. pinnipediae* (Flossenfüßler) vorgeschlagen worden (24).

Eine Übersicht über die aktuelle von der NCBI angegebene Brucellentaxonomie sowie über die in der Literatur häufig weiterhin verwendete Nomenklatur, die auch im vorliegenden Manuskript benutzt wird, gibt **Tabelle 1**.

Alle von Meeressäugern isolierte Brucellen werden im folgenden vorläufig als *B. „maris“* bezeichnet.

Tab. 1: Brucellentaxonomie nach NCBI

Gattung	Spezies	Biovar	Kein Rang	Bezeichnung in der Literatur	Literatur- quelle	
<i>Brucella</i>	<i>B. cetaceae</i>			<i>B. sp. B1/94</i>	1, 10, 18	
				<i>B. sp. B14/94</i>		
				<i>B. „maris“</i>		
	<i>B. melitensis</i>				<i>B. melitensis</i>	
				<i>B. melitensis</i> 16M	<i>B. melitensis</i> ATCC 23456	126
				<i>B. abortus</i> 1	<i>B. abortus</i>	126
					<i>B. canis</i>	126
					<i>B. neotomae</i>	126
	<i>B. pinnipediae</i>				<i>B. ovis</i>	126
				<i>B. suis</i> 1330	<i>B. suis</i>	126
				<i>B. sp. B2/94</i>	1, 10, 18	
				<i>B. „maris“</i>		

2.2 Nachweis von Brucellen bei Meeressäugern

Brucellen konnten bei einer Vielzahl von Wildtieren, namentlich bei Mäusen, Wölfen, Füchsen, Bisons, Rentieren, Elchen, Ottern und einigen Bärenarten nachgewiesen werden (29).

Auf eine epidemiologische Bedeutung bei Meeressäugern gibt es erst seit verhältnismässig kurzer Zeit Hinweise. Die Isolierung von Brucellen aus einem Meeressäuger wurde erstmalig 1994 beschrieben (107). Mittlerweile liegen positive Befunde über Brucellen bei verschiedenen Meeressäugerspezies wie dem Schweinswal (*Phocoena phocoena*), dem gemeinen Delfin (*Delphinus delphis*), dem atlantischen Weißseitendelfin (*Lagenorhynchus acutus*), dem kalifornischen Flaschennasendelfin (*Tursiops truncatus*), dem Streifendelfin (*Stenella coeruleoalba*), dem Minkwal (*Balaenoptera acutorostrata*), dem gemeinen Seehund (*Phoca vitulina*), der Klappmütze (*Cystophora cristata*), der Kegelrobbe (*Halichoerus grypus*), dem pazifischen Seehund (*Phoca vitulina richardsi*), der Ringelrobbe (*Phoca hispida*) und der Sattelrobbe (*Phoca groenlandica*) vor (45, 46, 48, 54, 65, 122).

Diese Befunde wurden v.a. an angestrandeten Tieren erhoben, die im Rahmen der Eruiierung der Anstrandungsursachen einer bakteriologischen Untersuchung unterzogen wurden. Pathologisch-anatomische Untersuchungen zeigten, dass sich die Tiere sehr häufig in einem schlechten Allgemeinzustand befanden. Kennzeichnend waren Abmagerung, ein leerer Verdauungstrakt und ein massiver Parasitenbefall, namentlich mit Nematoden der Lunge und des Magen-Darm-Traktes (54). Bei der überwiegenden Zahl der Tiere wurden Brucellen aus Leber, Milz, Niere Lunge, Milchdrüse, Lymphknoten, Uterus, Hoden und/oder Blut isoliert, ohne dass die Tiere spezielle pathologisch-anatomische Veränderungen aufwiesen (48).

Nur in wenigen Fällen konnte die Isolierung von Brucellen signifikanten pathologischen Veränderungen zugeordnet werden. So wurden Brucellen aus subkutanen Läsionen von zwei Delfinen und einem Schweinswal (46) sowie aus einem Lungengranulom eines Delfins isoliert (45, 79). Bei drei lebend gestrandeten, juvenilen bis subadulten Streifendelfinen konnte eine chronische, nicht suppurative Meningoencephalitis diagnostiziert werden. In allen drei Fällen gelang die Isolierung von Brucellen aus Gehirnmateriale (57).

Die Isolierung von Brucellen aus Abortmaterial eines in Gefangenschaft lebenden Flaschennasendelfins (*Tursiops truncatus*) gab erste Hinweise auf einen kausalen Zusammenhang zwischen Brucellen-Infektionen bei Meeressäugern und Reproduktionsstörungen (38). Untersuchungen von MILLER *et al.* (1999) an zwei in Gefangenschaft lebenden Delfinen bestätigten diese Zusammenhänge. Hier wurden bei Aborten infolge einer Placentitis Brucellen aus Abortmaterial beider Tiere isoliert. Infektionsversuche bei sechs trächtigen Rindern mit einem marinen Brucellenisolat zeigten ebenfalls, dass die Erreger in Übereinstimmung mit den klassischen Brucellen-Spezies in der Lage sind, Reproduktionsstörungen hervorzurufen (102). Das Auftreten von Aborten als Folge einer intrauterinen Infektion lieferte dabei deutliche Hinweise auf einen Tropismus der marinen Brucellen zum Reproduktionstrakt als primärem Zielorgan. Die Induktion von Aborten bei den infizierten Rindern mit deutlicher Serokonversion belegte gleichzeitig ein pathogenes Potential dieser Erreger für terrestrische Säugetiere (102). Dies zeigten auch Infektionsversuche an Meerschweinchen, die aber eine geringere Virulenz der marinen Brucellen-Isolate im Vergleich zu den klassischen Brucellen-Spezies vermuten ließen (96). Experimentelle Untersuchungen an Schafen wiesen ebenfalls auf eine gegenüber klassischen Brucellen-Spezies geringere Virulenz mariner Brucellen-Isolate hin. Schafe wurden in der 12. Gestationswoche mit Brucellen-Isolaten eines Schweinswals, eines Seehundes und eines Delfins konjunktival infiziert. Gleichzeitig erfolgte die konjunktivale Infektion einer Kontrollgruppe mit einem *B. melitensis*-Stamm. Die Infektion mit marinen Brucellen-Isolaten führte im Gegensatz zur *B. melitensis*-Infektion nicht zu einer Auslösung von Aborten. Es wurde lediglich eine höhere neonatale Mortalität im Vergleich zu nicht infizierten Tieren festgestellt. Die serologische Reaktion war im Gegensatz zur *B. melitensis*-Kontrollgruppe wesentlich schwächer (48).

Welche Infektionswege bei der natürlichen Infektion von Meeressäugern mit marinen Brucellen von Bedeutung sind, ist Gegenstand derzeitiger Untersuchungen. Bei einem pazifischen Seehund (*Phoca vitulina richardsi*) mit massenhaftem Lungennematodenbefall (*Parafilaroides* sp.) konnten Brucellen aus Uterus und Darm der Lungenwürmer sowie aus dem umgebenden Lungengewebe des Seehundes isoliert werden. Dies ließ auf einen eventuellen Zusammenhang zwischen dem Lungenwurmbefall und einer damit einhergehenden Brucelleninfektion schließen (54). Fische stellen eine weitere mögliche Infektionsquelle für Meeressäuger dar. So

konnte durch experimentelle Infektionen von Afrikanischen Welsen (*Clarias* sp.) mit *Brucella melitensis* Biovar 3 eine Empfänglichkeit von Fischen gegenüber diesen Erregern nachgewiesen werden (109). Schließlich besteht durch das häufig unentdeckte Anstranden von verendeten Meeressäugern eine mögliche Gefahr der Übertragung mariner Brucellen auf terrestrische Wild- und Haustiere (96).

2.3 Phänotypische Charakterisierung mariner Brucellen

Eine Zuordnung der bislang von Meeressäugern stammenden Isolate zur Gattung *Brucella* erfolgte zunächst anhand ihrer kulturmorphologischen und mikroskopischen Eigenschaften. Zur weiteren Differenzierung der Isolate wurden ihre biochemischen Eigenschaften, Antigenstrukturen, ihre Farbstoffsensitivität sowie die Empfindlichkeit gegenüber ausgewählten lytischen Phagen untersucht.

CO₂-Bedarf. Eine 10-prozentige CO₂-Spannung war für die Primäranzucht aller von Robbenspezies isolierten Brucellen absolut notwendig. Die Anzucht der Cetaceen-Isolate hingegen erfolgte CO₂-unabhängig (45, 46, 48, 65, 96).

Kulturmorphologie. Die bislang von Meeressäugern isolierten Brucellen stimmten bezüglich ihrer kulturmorphologischen Eigenschaften mit dem Genus *Brucella* überein. Sie wuchsen auf bluthaltigen Nährböden nach 3 bis 7 Tagen bei 37°C in Form von kleinen, transparenten, konvexen, glänzenden, glatten S (smooth)-Kolonien. Eine Hämolyse auf Schafblutagar war nicht nachzuweisen. Die von Robben-Spezies isolierten Brucellen wiesen im Vergleich zu den Cetaceen-Isolaten kleinere Kolonien auf (46, 48, 65).

Mikroskopische Morphologie. Marine Brucellen stellten sich mikroskopisch wie alle Brucellenarten als kleine, unbewegliche kokkoide oder kurze Stäbchen dar (46, 65).

Färbung nach Gram. Alle marinen Brucellen-Isolate erwiesen sich als gramnegativ (46, 65).

Säurefestigkeit. Wie alle Brucellen zeigten sich auch die marinen Isolate resistent gegenüber der Dekolorisation durch schwache Säuren und färbten sich somit rot in der von STAMP modifizierten ZIEHL-NEELSEN-Färbung (46).

Lipopolysaccharidprofil. Die Hauptoberflächenantigene der Brucellen sind A- und M-Lipopolysaccharid-Antigene, die zur Differenzierung der verschiedenen Biovarien dienen. Alle S-Formen der Brucellen besitzen beide Antigene in unterschiedlichen Anteilen, so dass zwischen A, M und AM- Gruppen unterschieden werden kann (22). Die Lipopolysaccharide (LPS) bestehen aus einer Core-Region, aus dem Lipid A und einer O-Polysaccharidkette, welche hauptsächlich die Produktion von Antikörpern induziert. Die O-Kette ist ein unverzweigtes Polysaccharid aus 4,6-Dideoxy-4-Formamido-D-Mannopyranosyl-Resten (D-Rha4Nfo). Die LPS der rauhen Brucellenstämme unterscheiden sich von den S-LPS durch die Abwesenheit der O-Kette oder durch deren Reduktion auf wenige Reste (27, 137).

Bislang sind für Brucellen vier unterschiedliche Epitope der O-Kette beschrieben, welche jeweils durch spezifische monoklonale Antikörper charakterisiert werden: Die A- und M-Epitope, welche bei A- bzw. M-dominanten *Brucella*-Spezies vorkommen, die *common* (C)-Epitope, die spezifisch für alle glatten (S) Brucellenstämme sind und die C/Y-Epitope, welche bei glatten Brucellenstämmen und bei *Yersinia enterocolitica* O:9-Stämmen vorkommen (14, 33, 94).

Die Struktur des M-Epitopes besteht aus einer linearen Pentasaccharideinheit, welche sich aus einem α -1,3 verknüpften D-Rha4Nfo-Disaccharid mit angrenzenden α -1,2 verknüpften Resten zusammensetzt (2, 22, 27, 61, 137).

Das A-Epitop wird durch vier oder fünf Einheiten aus α -1,2 verknüpften D-Rha4Nfo-Resten gebildet. Diese Struktur kommt ebenfalls bei *Yersinia enterocolitica* O:9-Stämmen vor und ist somit Ursache für serologische Kreuzreaktionen (2, 22, 27, 61, 137).

Das C/Y-Epitop bildet eine Sequenz aus zwei bis vier Einheiten von α -1,2 verknüpften D-Rha4Nfo-Resten. Durch Bindung spezifischer monoklonaler Antikörper kann eine weitere Unterteilung in drei spezifische C/Y-Epitope erfolgen: C/Y(M>A), C/Y(M=A) und C/Y(M<A).

Die Struktur des A- und M-Anteile enthaltenden C-Epitopes ist noch nicht eindeutig geklärt, es lassen sich jedoch C-Epitope mit einem M>A- und M=A-Anteil unterscheiden.

Durch die Verwendung mehrerer monoklonaler Antikörper entstand die Vermutung, dass es sich bei allen genannten Epitopen um überlappende Strukturen handelt (2, 22, 137).

Die bisher untersuchten Brucellen-Isolate von Meeressäugern wurden bis auf eine Ausnahme (ein M-dominantes Isolat eines Kalifornischen Flaschennasendelfins) alle als A-dominant differenziert. Sie weisen jedoch eine Abweichung zu den klassischen *Brucella*-Spezies in Bezug auf die Struktur des C-Epitopes und die durchschnittliche Größe der O-Kette auf, die bei den marinen Brucellen kleiner ist als bei den klassischen *Brucella*-Spezies (5, 65).

Biochemische Charakterisierung. Im Rahmen der biochemischen Charakterisierung von Brucellen werden die Katalase-, Cytochromoxidase- und Ureaseaktivität untersucht, die H₂S-Produktion überprüft sowie ein metabolisches Profil anhand der unterschiedlichen Verstoffwechslung von Aminosäuren und Kohlenhydraten erstellt. Wie fast alle aerob und fakultativ anaerob wachsenden Mikroorganismen besitzen auch die marinen Brucellen-Isolate eine Katalase, die das bei der Metabolisierung entstehende Hydrogenperoxid detoxifiziert (54, 68, 96).

Bei allen marinen Brucellen konnte weiterhin das Enzym Cytochromoxidase nachgewiesen werden (18, 107, 108). Cytochromoxidasen sind Metalloproteine, die entweder Eisen oder Kupfer enthalten und eine entscheidende Rolle im Elektronentransportsystem der aeroben Respiration spielen. Die Cytochromoxidase benutzt Sauerstoff als Elektronenakzeptor und oxidiert reduziertes Cytochrom c zu oxidiertem Cytochrom c und H₂O (72).

Alle marinen Brucellen-Isolate produzierten Urease (18, 65). Das Enzym Urease ist ein wichtiges Enzym für den Stickstoffkreislauf. Es katalysiert die Spaltung von Harnstoff zu Ammoniak und Kohlenstoffdioxid (72).

Die Bildung von H₂S kann aus organischen oder anorganischen Schwefelverbindungen, wie z. B. Thiosulfaten oder schwefelhaltigen Aminosäuren, insbesondere Cystein, erfolgen. Der Nachweis wird mittels Metallsalzen, wie Eisenchlorid, geführt. Aus diesen entstehen bei H₂S-Anwesenheit unter Farbentwicklung die entsprechenden Sulfide. Eine H₂S-Produktion konnte bisher bei keinem der marinen Isolate nachgewiesen werden (18, 54, 65, 96).

Um die metabolische Aktivität der Brucellen zu ermitteln, wurde ursprünglich die Stimulation der Sauerstoffaufnahme durch bestimmte Substrate anhand eines

Respirometers gemessen (26). Ein speziell von JAHANS *et al.* (1997) für marine Brucellen entwickeltes Untersuchungsverfahren stellt die substratinduzierte metabolische Aktivität der zu untersuchenden Isolate dar, indem die Stimulation der Tetrazoliumreduktion gemessen wird. Als Substrate dienen Alanin, Aspartat, Arginin, Erythritol, Galaktose, Glutamat, Lysin, Ornithin, Ribose, Urocanat und Xylose. Alle marinen Brucellen-Isolate wiesen eine erhöhte Tetrazoliumreduktion mit den Substraten Glutamat, Ribose und Xylose auf. Unterschiedliche Reaktionen zwischen den Isolaten ergaben sich bei den Substraten Galaktose, Erythritol und Urocanat. Eine erhöhte Verstoffwechslung von Galaktose erfolgte bei den Delfin- und Tümmler-Isolaten, Erythritol wurde hauptsächlich von Robben- und Tümmler-Isolaten und Urocanat von Delfin-Isolaten verstoffwechselt. Es konnten damit Zusammenhänge zwischen der metabolischen Aktivität von marinen Brucellen und deren Wirtspräferenz aufgezeigt werden. Die gemessenen metabolischen Aktivitäten mariner Brucellen unterschieden sich deutlich von den metabolischen Profilen der klassischen Brucellen-Spezies (65).

Anhand der Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen konnten die bislang isolierten marinen Brucellen keiner bekannten Brucellen-Spezies zugeordnet werden (67, 96). JAHANS *et al.* (1997) schlugen daher vor, die marinen Brucellen-Isolate vorläufig und inoffiziell unter der Bezeichnung *B. „maris“* zusammenzufassen. Weiterhin wurde empfohlen, anhand anerkannter Kriterien zur Biovardefinition eine Unterteilung dieser Spezies in 3 Biovare vorzunehmen. Danach umfasste die Biovar 1 Isolate von Robben und Ottern, die nur unter CO₂-Spannung wachsen und durch eine fehlende D-Galaktose-Metabolisierung charakterisiert sind. Zur Biovar 2 wurden Isolate von Großbritannien-Delfinen und -Schweinswalen gezählt, die CO₂-unabhängig wachsen und D-Galaktose metabolisieren. Das Brucellen-Isolat eines kalifornischen Flaschennasendelfins repräsentierte die Biovar 3, da sie im Gegensatz zu den anderen Meeressäuger-Isolaten ein M-dominantes Lipopolysaccharidprofil aufweist.

Phagensensitivität. Es existiert eine Anzahl von Bakteriophagen, die in der Lage sind, speziell Bakterien des Genus *Brucella* zu lysieren. Diese Phagen sind somit von taxonomischer Bedeutung bei der Identifikation von Erregern des Genus *Brucella* und dessen Spezies. Alle *Brucella*-Phagen gehören zu einer Phagenfamilie (26). In den letzten Jahren ist die Differenzierung der Brucellen anhand der Empfindlichkeit gegenüber lytischen Phagen in den Hintergrund getreten, da bei

kürzlich isolierten Brucellenstämmen der klassischen Spezies vermehrt Diskrepanzen gegenüber früheren Ergebnissen zur Phagensensitivität auftraten (65). Da die Phagensensitivität jedoch zu den klassischen Differenzierungsmethoden der Brucellen gehört, wurden auch die bisher isolierten marinen Brucellen auf ihre Empfindlichkeit gegenüber den lytischen Phagen Berkeley, Firenze, Izatnagar, R/C, Tbilisi und Weybridge hin untersucht (18, 45, 54, 65, 96). Keines der marinen Isolate wurde durch den R/C-Phagen lysiert, der nur die rauhen Brucellen-Spezies *B. ovis* und *B. canis* lysieren kann. Wie *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* und *B. neotomae* wurden alle marinen Brucellen-Isolate durch den Berkeley-Phagen und die Mehrzahl der marinen Isolate auch durch den Izatnagar-Phagen lysiert. Nur eine geringe Anzahl der marinen Isolate war sensitiv gegenüber dem Firenze- und dem Weybridge-Phagen, der typischerweise Isolate der Spezies *B. abortus*, *B. suis*, und *B. neotomae* lysiert. Der Tbilisi-Phage wird in zwei unterschiedlichen Verdünnungsstufen eingesetzt (65). Die Routine-Testverdünnung (RTD) ist definiert als die minimale Konzentration, die eine komplette Lysis des für diesen Phagen propagierten Bakterienstammes hervorruft (26). Eine Lysis bei Einsatz der RTD findet bei den klassischen Brucellen-Spezies nur bei *B. abortus* statt. Bei Verwendung des Tbilisi-Phagen in dieser Verdünnung wurden auch zwei marine Brucellen-Isolate lysiert. Bei Einsatz des Tbilisi-Phagen in einer höheren Konzentration (10^4 -fache Konzentration der RTD) findet eine Lysis bei *B. abortus*, *B. suis* und *B. neotomae* statt; die Mehrzahl der marinen Isolate wird ebenfalls lysiert. Die Variationen bezüglich der Phagensensitivität innerhalb der Gruppe mariner Brucellen korrelieren nicht mit der Einteilung, die sich aufgrund der CO_2 -Abhängigkeit, des metabolischen Profils und der Wirtspräferenz dieser Isolate ergibt (65).

Farbstoffsensitivität. Die äussere Membran der Brucellen ist u. a. von Proteinen durchsetzt, die als Porine, d. h. als wassergefüllte Diffusionskanäle, fungieren. Variationen im Durchmesser dieser Porine bewirken eine unterschiedliche Sensitivität der Brucellen-Isolate gegenüber diagnostischen Farbstoffen und ermöglichen so eine Klassifizierung der Brucellen anhand ihrer Farbstoffsensitivität. Zudem beeinflusst auch die unterschiedliche Hydrophobizität der verwendeten basischen Farbstoffe Fuchsin, Thionin und Safranin O deren Penetrationsvermögen (32).

Bei allen bisher untersuchten marinen Brucellen-Isolaten konnte basisches Fuchsin, wie bei den meisten klassischen Brucellen, aufgrund seiner starken Hydrophobizität und eines Moleküldurchmessers von ca. 1,5 nm nicht in die Zelle penetrieren. Marine Brucellen waren daher in der Lage, auf Medien, welche basisches Fuchsin in den Konzentrationen 10 µg/ml, 20 µg/ml und 40 µg/ml enthielten, zu wachsen. Sie zeigten sich auch resistent gegenüber den gleichen Konzentrationen an Thionin, das trotz einer im Vergleich zu basischem Fuchsin hohen Hydrophilie und eines kleineren Moleküldurchmessers die Zellwand ebenfalls nicht penetrieren konnte. Dies gilt auch für das hydrophile Safranin O, so dass die marinen Brucellen-Isolate auf Safranin O-haltigen Nährböden (100 µg/ml) stets Wachstum zeigten (54, 65, 96).

2.4 Molekulargenetische Charakterisierung mariner Brucellen

Molekulargenetische Untersuchungen bestätigten, dass es sich bei den Brucellen-Isolaten von Meeressäugern um eine neue Spezies handelt. Dabei wurden unterschiedliche Verfahren verwendet, die der molekulargenetischen Differenzierung mariner Brucellen durch Aufdeckung von DNS-Polymorphismen innerhalb gattungsspezifischer Signatursequenzen dienen (10, 23, 129).

2.4.1 16S rRNS-Gen

Ein häufig untersuchter Genabschnitt für die Identifizierung und phylogenetische Einordnung von Bakterienstämmen ist das 16S rRNS-Gen, das die zur 30S-Untereinheit der Ribosomen gehörende 16S rRNS codiert (10, 28, 73, 106, 129). Das 16S rRNS-Gen besteht aus hochkonservierten Regionen und variablen sowie hypervariablen Bereichen. Innerhalb einer Gattung differieren die 16S rRNS-Gensequenzen zwischen den einzelnen Spezies nur um wenige Prozent. Eine entsprechende Übereinstimmung innerhalb dieser Gensequenz wird somit als Indiz für die Zugehörigkeit zu einer Spezies gewertet (10).

Mittels PCR konnte durch den Einsatz eines genusspezifischen Primerpaares bei Vertretern aller 6 klassischen Brucellen-Spezies ein 905 bp-Fragment innerhalb des 16S rRNS-Gens amplifiziert werden. Von anderen geprüften Bakterienpezies konnte nur bei *Ochrobactrum anthropi* Biotyp D, einem ebenfalls zur α -2-

Untereinheit der Klasse *Proteobacteria* gehörenden Vertreter, ein entsprechendes PCR-Produkt amplifiziert und damit die enge Verwandtschaft dieses Erregers zu den Brucellen belegt werden (106).

Sequenzvergleiche des 16S rRNS-Gens der klassischen *Brucella*-Spezies mit dem Isolat eines gemeinen Seehundes bestätigten die Zugehörigkeit des marinen Isolates zur Gattung *Brucella* (10). Dabei war die Gensequenz des marinen Isolates identisch mit den Sequenzen von *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* und *B. canis*. *B. ovis* wies im Vergleich zu den oben genannten Spezies nur eine einzige Nukleotiddifferenz in der 16S rRNS-Gensequenz auf. Aufgrund dieser Tatsache und unter Berücksichtigung der phylogenetischen Definition einer Bakterien-Spezies werden daher heute, wie bereits unter 2.1 beschrieben, alle Vertreter der Gattung *Brucella* offiziell als *B. melitensis* zusammengefasst.

Anhand des 16S rRNS-Gens konnten Unterschiede zwischen den marinen Isolaten und den klassischen *Brucella*-Spezies erst durch das sogenannte Ribotyping-Verfahren erfasst werden (129). Für Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-(RFLP)-Studien wurde Gesamtzell-DNS der zu untersuchenden Stämme mittels der Restriktionsendonuklease *HindIII* verdaut. Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNS-Fragmente und Transfer auf eine Nylonmembran folgte die Hybridisierung mit einer 16S und 23S rRNS-Sonde. Dabei zeigten die marinen Brucellen-Isolate abweichende rDNS- *HindIII*-Restriktionsmuster im Vergleich zu den klassischen *Brucella*-Spezies und repräsentierten damit eine separate Untergruppe (129).

2.4.2 omp-Gene

Die Gene, welche für die wichtigsten Außenmembranproteine (Outer Membrane Proteins, OMPs) der Brucellen codieren, sowie ihre Expression werden seit Ende der 80iger Jahre untersucht. Die Außenmembran der Brucellen beinhaltet nach dem derzeitigen Wissensstand zwei Proteingruppen: Gruppe 2 Porin-Proteine mit einem Molekulargewicht von 35 bis 40 kDa beinhalten die Genprodukte des *omp2*-Lokus, und Gruppe 3 Proteine mit einem Molekulargewicht von 25 bis 27 kDa, die durch das *omp25*-Gen codiert werden, sowie Proteine mit einem Molekulargewicht von 31-34 kDa, welche durch das *omp31*-Gen codiert werden. Variationen innerhalb der Molekulargewichte der OMPs sind zurückzuführen auf die Assoziation der Proteine

mit Peptidoglykanen unterschiedlicher Größe (19, 21, 25, 32, 34, 41, 42, 75, 118, 130).

Die Außenmembranproteine sind oberflächenexponiert und bei rauhen Brucellenstämmen immundominant. Bei glatten Brucellenstämmen ist ihre immunogene und protektive Aktivität nur gering, da sie für Antikörper aufgrund einer sterischen Behinderung durch die Präsenz langer O-Lipopolysaccharidseitenketten schlechter zugänglich sind (25).

Die *omp*-Gene sind für die Diagnostik von besonderer Bedeutung, da sie bei allen Brucellen-Spezies hochkonserviert sind und Polymorphismen aufweisen, die eine Differenzierung auf der Spezies- und zum Teil sogar auf der Biovarebene ermöglichen.

2.4.2.1 *omp2*-Lokus

Der *omp2*-Lokus der Brucellen besteht aus den zwei eng verwandten Genen *omp2a* und *omp2b*, welche eine mehr als 85 %ige DNS-Homologie aufweisen (41). Das *omp2a*-Gen besitzt bei den Brucellen-Isolaten von Robbenspezies eine Größe von 1104 bp und bei Cetaceen-Isolaten eine Größe von 1089 bp. Die Größe des *omp2b*-Gens beträgt bei allen Meeressäuger-Isolaten 1089 bp. Die beiden Gene sind durch 900 bp voneinander getrennt und in entgegengesetzter Richtung auf dem Chromosom orientiert. Diese Genanordnung ist bei allen Brucellen hochkonserviert. Die Konservierung des Genarrangements spricht dafür, dass beide Gene essentiell sind und ihre Expression reguliert wird (42).

Der *omp2*-Lokus codiert für OMPs mit einem Molekulargewicht von 36 bis 38 kDa. Diese Porine beeinflussen die Empfindlichkeit der Brucellen gegenüber Farbstoffen und Antibiotika (32, 41). Unter Laborbedingungen wird von *B. abortus* nur das vom *omp2b*-Gen codierte 36 kDa Protein exprimiert, wohingegen das *omp2a*-Gen nicht exprimiert wird (41). Die Expression eines 33 kDa Proteins von *omp2a*, das im Vergleich zum *omp2b*-Gen eine Deletion von 108 bp aufweist, kann erst nach Klonierung des *omp2a*-Gens in *E.coli* in Verbindung mit dem invertierten Promotor aus der intergenischen *omp2b-omp2a*-Region oder mit *E.coli lacZ* induziert werden (25, 41, 42). In Übereinstimmung mit *B. abortus* werden von *B. melitensis*- und *B. ovis*-Isolaten unter Laborbedingungen ebenfalls einheitliche *omp2*-Genprodukte exprimiert (42). Für *B. canis*, *B. neotomae* und *B. suis* hingegen wurde die Expression von zwei unterschiedlichen Proteinen mit Molekulargewichten von 36 und

38 kDa nachgewiesen (42). Bei marinen Brucellen-Isolaten wurde die Expression der *omp2*-Genprodukte bislang nicht genauer untersucht. Ob die von *B. canis*, *B. neotomae* und *B. suis* gebildeten 36 und 38 kDa-Porine sowohl *omp2a*- als auch *omp2b*-Genprodukte darstellen, oder ob die Unterschiede des Molekulargewichtes der exprimierten Proteine auf spezies-spezifischen posttranslationalen Modifikationen beruhen, ist nach wie vor offen. So konnte auch die Frage, ob der *omp2*-Lokus ein aktives *omp2b*- sowie ein stilles bzw. kryptisches *omp2a*-Gen aufweist oder ob beide Gene aktiv sind, noch nicht eindeutig geklärt werden. Kennzeichnend für ein kryptisches Gen wäre die Tatsache, dass dessen Funktion unter bestimmten Wachstumsbedingungen notwendig und unter anderen Bedingungen wiederum nachteilig für die Bakterienzelle wäre. Ähnliche Systeme, welche auf Umweltveränderungen durch unterschiedliche Genexpression auf Transkriptionslevel reagieren, wurden bei *E. coli* und anderen Prokaryoten nachgewiesen (41). Gegen die Möglichkeit, dass es sich bei dem *omp2a*-Gen der Brucellen um ein kryptisches Gen handelt, spricht, dass kryptische Gene in der Regel nicht dupliziert werden (41). Im Rahmen der Fragestellung, welche Wachstumsbedingungen eine Omp2a-Expression induzieren könnten, wurden verschiedene Untersuchungen zur Feststellung der Größe und Beschaffenheit der gebildeten Omp2-Porine und deren osmotischer Regulation durchgeführt. So zeigten *E. coli*-Transformanten, die das Porin Omp2a exprimierten, eine gesteigerte hydrophile Permeabilität im Vergleich zu Omp2b-Transformanten (75). In einem Liposomenswelltest wurde weiterhin die Zuckerpermeabilität der beiden Porine untersucht. Dabei stellte Omp2a eine effizientere Pore für die Zuckerdiffusion im Vergleich zu Omp2b dar (95). Damit könnte Omp2a für das intrazelluläre Überleben von Brucellen von Vorteil sein, indem es die Diffusion von den im Phagosom in niedriger Konzentration enthaltenen Nährstoffen erleichtert. Untersuchungen, die auf eine Expression von Omp2a während der intrazellulären Phase hinweisen, liegen bislang aber nicht vor.

Eine weitere mögliche Erklärung für das Auftreten von zwei *omp2*-Genkopien innerhalb des Brucellengenoms ist der mögliche selektive Vorteil, der im Rahmen der Evolution durch Genduplikation entstehen kann. Der stille Genlokus kann modifiziert und unter bestimmten Bedingungen reaktiviert werden, um anschließend das ehemals aktive Gen zu ersetzen (41).

Innerhalb der klassischen Brucellen-Spezies nimmt *B. ovis* eine Sonderstellung ein, da bei dieser Spezies ein *omp2*-Lokus nachgewiesen wurde, der aus zwei *omp2a*-

Genen besteht, die sich nur durch 30 Nukleotide an den 3'-Enden unterscheiden. Die *omp2a*- und *omp2b*-Gene von *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* und *B. canis* hingegen unterscheiden sich an den 3'-Enden durch 130, die von *B. neotomae* durch 112 Nukleotide (18).

Die Konservierung des *omp2*-Lokus und die innerhalb des Lokus nachgewiesenen spezies-spezifischen Polymorphismen sind von großem Wert für die Identifizierung von Brucellen-Isolaten. So lassen sich mittels PCR durch den Einsatz von zwei Primerpaaren, die komplementär zur Sequenz des *omp2*-Lokus von *B. abortus* (Accession number M26034) sind und innerhalb der *omp2a*- und *omp2b*-Gene coamplifizieren, 4 unterschiedliche Amplifikationsmuster nachweisen. Die Amplifikationsmuster I und II repräsentieren jeweils drei Banden mit einer Größe von 900, 600 und 200 (Muster I) bzw. 720, 600 und 200 bp (Muster II). Das Muster III wird repräsentiert durch zwei Banden von 600 und 900 bp. Nur eine Bande von 900 bp kennzeichnet Muster IV. Anhand der gewonnenen Amplifikationsmuster konnten *B. abortus* bv.1 (Muster II), *B. canis* (Muster III) und *B. ovis* (Muster IV) eindeutig unterschieden werden. Hingegen zeigten *B. melitensis* bv.1 und 2, *B. abortus* bv. 5, *B. suis* bv.1 und *B. neotomae* alle das Amplifikationsmuster I und waren erst nach Restriktion der 900 bp-Bande mit dem Restriktionsenzym *KpnI* voneinander zu differenzieren (114). Marine Brucellen-Isolate wurden mittels dieser PCR-Methode bislang nicht untersucht.

Weitergehende Untersuchungen des *omp2*-Lokus der Brucellen erfolgten mittels PCR-RFLP-Studien (20, 24). Dabei wurden Primerpaare verwendet, die das gesamte *omp2a*- und *omp2b*-Gen amplifizieren. Eine anschließende Restriktionsanalyse mit 13 Enzymen führte innerhalb der klassischen Brucellen-Spezies zur Identifizierung von 11 verschiedenen *omp2b*-Varianten (Restriktionsmuster A-K). Anhand der Restriktion des *omp2a*-Gens konnten 8 unterschiedliche Varianten (Restriktionsmuster A-H) identifiziert werden. Dabei waren bestimmte Restriktionsmuster spezifisch für geographische Regionen. Anhand dieser Untersuchungsmethode wurde die Anwesenheit von zwei *omp2a*-Genen bei *B. ovis* bestätigt (20). Allerdings zeigte sich bei *B. ovis* eine Intraspezies-Diversität zwischen den Referenzstämmen 63/290 (ATCC 25840) und Reo 198 (BCCN R22, Brucella culture collection, Nouzilly) und untersuchten Feldisolaten. Das ursprüngliche *omp2b*-Gen der Feldisolate scheint offensichtlich mehr *omp2b*-Motive zu besitzen als das der Referenzstämme. Sequenzanalysen zeigten, dass das ursprüngliche *omp2b*-Gen

der Feldisolate aus *omp2a*- und *omp2b*-Gensequenzen besteht und somit ein chimäres Gen darstellt.

Eine phylogenetische Analyse der *omp2*-Nukleotidsequenzen ergab einen hohen Verwandtschaftsgrad für die klassischen Brucellen-Spezies *B. melitensis* und *B. abortus*. Für *B. canis* und *B. suis* wird hingegen eine andere gemeinsame Abstammung als für die sonstigen klassischen Brucellen-Spezies vermutet. *B. neotomae* und *B. ovis* stellen die am meisten divergenten klassischen Spezies dar (20, 25).

Die Untersuchung der marinen Brucellen-Isolate ergab für das *omp2a*-Gen 3 von den bisher bekannten Restriktionsmustern abweichende Varianten (Restriktionsmuster I, J, K) und für das *omp2b*-Gen 5 neue Varianten (Restriktionsmuster L, M, N, O, P). Die *omp2a*-Gruppe I, welche die Isolate von Seehunden und einem Otter repräsentiert, zeigte ein Restriktionsmuster, das sich nur in der Restriktion mit *Styl* von dem Muster des *omp2a*-Gens der klassischen Brucellen-Spezies unterscheidet. Die *omp2a*-Gruppen J und K beinhalten die Isolate aller anderen untersuchten Meeressäuger (Delfine, Tümmler und Minkwal) und zeigten im Vergleich zu den klassischen *omp2a*-Genen völlig andere Muster, die nahezu identisch mit ihren jeweiligen *omp2b*-Mustern M und N waren. Von besonderem Interesse ist das *AluI*-Restriktionsmuster des *omp2b*-Gens, das mit einer Ausnahme bei allen untersuchten marinen Brucellen-Isolaten identisch und für marine Isolate spezifisch ist (24).

Die untersuchten marinen Brucellen-Isolate ließen sich anhand der PCR-RFLP-Studien in 2 Gruppen einteilen. Die erste Gruppe repräsentiert Isolate mit einer *omp2a*- und einer *omp2b*-Genkopie; die Isolate der zweiten Gruppe besitzen zwei *omp2b*-Genkopien. Diese Einteilung steht in Übereinstimmung mit der Wirtsspezies und deren ökologischer Nische. Die erste Gruppe beinhaltet Brucellen-Isolate von Seehunden und einem Otter, welche teilweise an Land und teilweise im Wasser leben. Die zweite Gruppe umfasst Isolate verschiedener Cetaceen-Spezies, die permanent im Wasser leben.

Sequenzvergleiche der *omp2*-Gene der marinen Brucellen-Isolate untereinander und mit den klassischen Brucellen-Spezies terrestrischer Säugetiere bestätigten die mittels PCR-RFLP-Studien ermittelten Ergebnisse (24). So unterscheiden sich die *omp2*-Gene der Cetaceen-Isolate untereinander nur in weniger als 10 bp und ähneln in ihrer Sequenz den *omp2b*-Genen der terrestrischen Brucellenstämme. Die genetische Diversität der beiden *omp2*-Gene der Cetaceen-Isolate weist somit einen

sehr niedrigen Divergenzlevel im Vergleich zu den Seehund-Isolaten und terrestrischen Brucellen-Isolaten auf. Die geringe Nukleotiddivergenz zwischen den zwei *omp2*-Genen der Cetaceen-Isolate könnte durch eine hohe Genkonversionsrate begründet sein, die zu einer Homogenisierung der beiden Sequenzen führte (24).

Sequenzanalysen der *omp2*-Gene der Seehund-Isolate konnten zeigen, dass das *omp2a*-Gen dieser Isolate, außer einem kleinen Motiv zwischen der Nukleotidposition 150 bis 240, identisch ist mit dem *omp2a*-Gen terrestrischer Brucellenstämme. Die abweichende Sequenz von 91 bp ist sowohl für das *omp2a*- als auch für das *omp2b*-Gen von fast allen Meeressäuger-Isolaten typisch (mit Ausnahme eines Delfin-Isolates) und kommt bei den klassischen Brucellen-Spezies nicht vor. Da diese typische Sequenz in beiden Genen vorliegt, kann vermutet werden, dass dieses Motiv zunächst in einem der beiden Gene aufgetreten ist und anschließend als Schablone zur Konvertierung des anderen Gens genutzt wurde. Die Sequenzunterschiede zwischen dem *omp2a*- und *omp2b*-Gen der Seehund-Isolate sind insgesamt geringer als bei allen klassischen Brucellen-Spezies. Damit nehmen die Seehund-Isolate bezüglich ihrer genetischen Diversität eine intermediäre Stellung zwischen Cetaceen-Isolaten und Isolaten von terrestrischen Säugern ein (24).

Aufgrund der nachgewiesenen DNS-Polymorphismen innerhalb des *omp2*-Lokus und unter Berücksichtigung der Einteilung der Brucellen anhand ihrer Wirtspräferenz schlagen CLOECKAERT *et al.* (2001) für marine Brucellen die Benennung von zwei neuen Spezies vor: *B. pinnipediae* (Flossenfüssler) und *B. cetaceae* (Walartige). Diese Benennungen wurden in der NCBI, die allerdings nicht als autorisierte taxonomische Datenbank für die Nomenklatur und Klassifikation von Bakterien anerkannt ist, veröffentlicht.

2.4.2.2 *omp25*-Gen

Das OMP25 gehört zu den Gruppe 3-Membranproteinen, ist beteiligt an der Virulenz von *B. melitensis*-, *B. abortus*- und *B. ovis*-Stämmen und scheint bei der Induzierung einer protektiven Immunität von Bedeutung zu sein (25, 34, 130).

Polymorphismen des *omp25*-Gens wurden mittels PCR und RFLP-Studien untersucht, wodurch zwei spezies-spezifische Marker detektiert werden konnten. So weisen *B. melitensis*-Stämme im Vergleich zu anderen Brucellen-Spezies keine EcoRV-Schnittstelle auf und *B. ovis*-Stämme unterscheiden sich von den anderen

Brucellen-Spezies durch eine Deletion von 36 bp am 3'-Ende des *omp25*-Gens. Abgesehen von dieser Deletion unterscheiden sich die 639 bp großen *omp25*-Gene der klassischen Brucellen-Spezies durch nicht mehr als 12 Nukleotidsubstitutionen, wodurch die hohe Konservierung dieses Lokus bestätigt wird (21, 25).

Untersuchungen zur Expression des OMP25 zeigten, dass die nachgewiesene Deletion im *omp25*-Gen von *B. ovis* auch Auswirkungen auf die Bindung von monoklonalen Antikörpern hat, was zu dem Schluss führte, dass OMP25 von *B. ovis* wahrscheinlich eine andere Konformation als bei den anderen Brucellen-Spezies aufweist, wodurch spezifische nicht-lineare Epitope exponiert werden (21, 25).

Das untersuchte marine Brucellenisolat eines Minkwals B202R wies keine spezies-spezifischen Marker innerhalb des *omp25*-Gens auf (18).

2.4.2.3 *omp31*-Gen

Das *omp31*-Gen codiert für ein 31-34 kDa Außenmembranprotein, welches wie OMP25 zu den Gruppe 3-Proteinen gehört (130). Die Aminosäuresequenzen von OMP25 und OMP31 weisen untereinander eine 34%ige Sequenzhomologie auf (25, 131). Die kürzlich veröffentlichte Genomsequenz von *B. melitensis* 16M zeigte die Präsenz von fünf weiteren Genen, die Homologien zum *omp25*- und *omp31*-Gen besitzen (25). Das von *omp31* codierte Protein ist wahrscheinlich als Porin an der Sekretion von Exopolysacchariden beteiligt (133).

Mittels PCR kann das *omp31*-Gen bei allen Brucellen-Spezies, außer bei *B. abortus*, amplifiziert werden. *B. abortus* ist die einzige Spezies, bei der eine Expression von OMP31 mittels monoklonaler Antikörper, die gegen ein Epitop von OMP31 gerichtet sind, nicht nachgewiesen werden konnte (132). Weiterführende Untersuchungen an *B. abortus*-Stämmen zeigten die Abwesenheit eines ca. 10 kb großen DNS-Fragmentes, welches das gesamte *omp31*-Gen einschließt (132).

Mittels PCR-RFLP-Studien des *omp31*-Gens lassen sich *B. ovis*, *B. canis* und *B. suis* Biovar 2 voneinander differenzieren. Allerdings ist es nicht möglich *B. neotomae* von *B. suis* Biovar 1, 3, 4 und 5 zu unterscheiden (132). Auch der von einem Minkwal stammende Brucellenisolat B202R wies keine DNS-Polymorphismen auf, die eine Differenzierung gegenüber den klassischen Brucellen-Spezies ermöglichen (18).

Inzwischen sind die *omp31*-Gene von allen Brucellen-Referenzstämmen sequenziert worden (25, 134). Trotz der hohen Konservierung dieses Gens konnten zwischen *B. ovis* und *B. melitensis* neun Nukleotidunterschiede festgestellt werden, die eine

Differenz von sieben Aminosäuren im OMP31 bedingen. Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern zeigten, dass diese Differenz auch unterschiedliche antigene Eigenschaften hervorruft (25). Rauhe Brucellenstämme wie *B. ovis* reagieren besser mit monoklonalen Antikörpern, die spezifisch für OMP31 und andere OMPs sind, als glatte Brucellenstämme, was zu dem Schluß führt, dass die LPS-O-Polysaccharidkette, die den rauhen Brucellenstämmen fehlt, die antigenen und immunogenen Eigenschaften der OMPs reduziert. Das OMP31 hat sich somit als interessanter Kandidat für die Diagnose von *B. ovis* bei Schafen und für die Entwicklung einer DNS-Vakzine erwiesen (134).

Auch in Bezug auf das *omp31*-Gen repräsentiert *B. ovis* innerhalb der Gattung *Brucella* die am meisten divergente Spezies (134).

2.4.3 IS711-Lokus

Das gattungsspezifische repetitive Insertionselement *IS711* bietet eine weitere Möglichkeit zur molekularen Differenzierung von *Brucella*-Spezies, basierend auf der unterschiedlichen Anzahl und Verteilung der *IS711*-Kopien innerhalb des Brucellengenoms (9, 10).

Insertionssequenzen sind mobile DNS-Elemente, die für Proteine codieren, welche die Transposition der Elemente beeinflussen. Sie haben in der Regel eine Größe von 0,7 bis 2,5 kb und werden typischerweise von *inverted repeats* begrenzt (50, 60, 64). Das Insertionselement *IS711* wurde erstmalig bei *B. ovis* näher beschrieben (59, 60). Es besitzt eine Größe von 842 bp und wird durch zwei 20 bp-große *inverted repeats* begrenzt, die sich nur in den Nukleotidpositionen 5 und 19 unterscheiden. *IS711* besitzt zwei sich überlappende *open reading frames* und eine Ribosomenbindungsstelle *upstream* des Startcodons des ersten *open reading frames* (60).

Die Anzahl und Verteilung der *IS711*-Genkopien innerhalb des Brucellengenoms kann mittels Southernblot-Analyse von *EcoRI*-verdauter Gesamt-DNS und anschließender Hybridisierung mit einer *IS711*-Sonde untersucht werden. Anhand der Anzahl der *IS711*-Kopien werden innerhalb der Gattung *Brucella* zwei Gruppen unterschieden: Zur ersten Gruppe gehören *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. abortus* und *B. canis* mit einer Anzahl von unter 10 *IS711*-Kopien. Die zweite Gruppe repräsentiert *B. ovis* und die marinen Brucellen-Isolate mit einer hohen Kopienzahl

von über 25 *IS711*-Genen (18). Abgesehen von wenigen Ausnahmen liegt mindestens eine *IS711*-Genkopie an einem spezies- oder sogar biovarspezifischen Locus (9). Identische Hybridisierungsmuster weisen *B. abortus* Biovar 3, *B. canis* und *B. suis* Biovar 4 auf. Die Biovare 1, 2 und 4 von *B. abortus* zeigen ebenfalls übereinstimmende Hybridisierungsmuster und können daher mittels *IS711*-RFLP-Studien nicht voneinander differenziert werden (18).

Obwohl sie eine hohe Übereinstimmung bezüglich der Anzahl an *IS711*-Genkopien aufweisen, unterscheiden sich die Muster der marinen Isolate deutlich von dem *B. ovis*-Profil, so dass insgesamt eine größere phylogenetische Distanz der marinen Isolate zu den klassischen Brucellen-Spezies vermutet wird (10).

Innerhalb der marinen Isolate zeigen sich geringe Unterschiede in den Hybridisierungsmustern, die sich tendenziell nach der Wirtszuordnung richten scheinen. Variationen innerhalb einer Wirtszuordnung kommen vor allem bei *Phoca vitulina*-Isolaten vor. Dabei wiesen Isolate, die aus einer geographischen Lokalisation stammten, bisher nur geringe Variationen auf (10).

Eine *IS711*-Kopie auf einem 1,7 kb-*EcoRI*-Fragment konnte nur bei marinen Isolaten nachgewiesen werden (10). Mittels lokusspezifischer Primer für dieses Fragment wurde ihre Eignung als spezies-spezifischer Marker überprüft. Dabei konnte mit einer Ausnahme bei allen marinen Isolaten ein PCR-Produkt von 375 bp amplifiziert werden. Bei den klassischen Brucellen-Spezies fand nur bei *B. ovis*-Stämmen eine schwache Amplifikation statt, was auf eine partielle aber nicht vollständige Homologie innerhalb dieses *IS711*-Genlokus schließen lässt. Dass die marinen Isolate einen gemeinsamen spezifischen *IS711*-Genlocus besitzen und offensichtlich sogar mehrere übereinstimmende Genloki aufweisen, lässt auf einen gemeinsamen Ursprungsstamm für die marinen Brucellen-Isolate schließen, der sich von den terrestrischen Brucellenstämmen unterscheidet. Die bei *B. ovis* nachgewiesene partielle Homologie des *IS711*-Lokus auf dem 1,7 kb-Fragment kann Ergebnis einer zufälligen Insertion einer *IS711*-Kopie am gleichen Locus sein. Sie kann aber auch zusammen mit der hohen Kopienanzahl als Hinweis für eine engere phylogenetische Verwandtschaft mit den marinen Brucellen bewertet werden (10).

Eine weitere für marine Brucellen spezifische *IS711*-Kopie wurde *downstream* des *bp26*-Gens nachgewiesen, welches für das immundominante OMP28-Protein codiert. Diese Kopie liegt neben einem *Bru-RS1*-Element, einer repetitiven, palindromischen DNS-Sequenz von 103 bp, die bei Brucellen hochkonserviert ist,

mehr als 35 mal im Brucellengenom vorkommt und als *hot spot* für die Insertion von *IS711* angesehen wird. Mittels Primern, die das gesamte *bp26*-Gen inklusive der flankierenden Regionen amplifizieren, konnte bei allen marinen Isolaten ein 1900 bp großes Amplifikat nachgewiesen werden. Alle klassischen Brucellen-Isolate inklusive *B. ovis* zeigten ein kleineres Amplifikat mit nur 1029 bp. Aufgrund dieser Ergebnisse kann dem *IS711*-Lokus *downstream* des *bp26*-Gens die Funktion eines weiteren spezies-spezifischen Markers für marine Brucellen zugewiesen werden (23).

Insgesamt weisen die marinen Brucellen-Isolate im Vergleich zu den klassischen Brucellen eine höhere *IS711*-Genkopienzahl und eine größere Vielfalt in der Lokalisation der *IS711*-Elemente auf, was eine höhere Aktivität dieser Elemente im Genom der marinen Brucellen im Vergleich zu den terrestrischen Isolaten vermuten läßt. Ob diese Aktivierung anhält oder mit der Wirtsadaptation zusammenhängt, ist noch nicht geklärt (10).

2.5 Nachweis von *Brucella*-spezifischen Antikörpern in Seren von Meeressäugern

Nachdem in den neunziger Jahren erstmalig die Isolierung von Brucellen bei marinen Säugetieren gelang, wurden vermehrt serologische Untersuchungen auf *Brucella*-spezifische Antikörper bei Wildpopulationen mariner Säugetiere durchgeführt. Anhand dieser Erhebungen sollte ermittelt werden, in welchem Umfang marine Säugetiere mit *Brucella* sp. in Kontakt kommen und welche Aussagen zur Seroprävalenz sowie zur geographischen Verteilung seropositiver Tiere getroffen werden können. In den Untersuchungen wurden Testverfahren verwendet, die bereits routinemäßig bei der Diagnostik der klassischen Brucellose eingesetzt werden, wie der Bengalrosatest, der BPAT (Buffered plate agglutination test) (87, 99), der BBA (Brucellosis card test using buffered *Brucella* antigen) (54), die Serumlangsamagglutination (139), die EDTA-modifizierte Serumlangsamagglutination (61), der Komplementbindungstest (67, 87, 89, 91), der indirekte ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (2, 67, 87, 108, 121, 124) und der kompetitive ELISA (67, 87, 88, 124). Der erste dokumentierte Nachweis von *Brucella*-spezifischen Antikörpern aus Seren von Meeressäugern gelang TAYLOR im Jahre

1982 bei einem Killerwal (*Orcinus orca*) unter Verwendung der Serumlängsamagglutination und des Bengalrosatests (120).

Der Serumlängsamagglutinationstest gilt als Standardmethode in der Brucellose-Diagnostik. Hier wird die Fähigkeit des Serums zur Agglutination mit zellulärem Brucellen-Antigen gemessen, indem die Präsenz von anti-OPS (O-Polysaccharid)-Antikörpern vom IgM-Isotyp detektiert wird (61). IgM-Antikörper sind bei einem neutralen oder leicht sauren pH die aktivsten Agglutinine, allerdings besteht in diesem pH-Bereich auch eine Anfälligkeit des Testsystems für falsch positive Reaktionen durch kreuzreagierende Antikörper (87). Außerdem sind IgM-Antikörper charakteristisch für das Frühstadium einer Infektion, wodurch eventuell die Detektion von Antikörpern mittels Serumlängsamagglutination in einem späteren Infektionsstadium vermindert ist (89). Um trotzdem eine möglichst hohe Sensitivität und Spezifität zu erzielen, wird die Serumlängsamagglutination daher häufig in Kombination mit dem Bengalrosa- und dem Komplementbindungstest eingesetzt (2). Beim Bengalrosatest wird das Antigen bei einem sauren pH-Wert von 3,65 eingesetzt, um eine Agglutination von IgM-Antikörpern zu verhindern und die Agglutination von IgG₁-Antikörpern zu fördern. Dadurch werden unspezifische Interaktionen reduziert (54, 87). Der Bengalrosatest ist gut standardisiert, billig, einfach durchzuführen und durch den Nachweis von IgG₁-Antikörpern auch im Spätstadium einer Infektion noch deutlich positiv. Als Antigene kommen mit Bengalrosa gefärbte inaktivierte *B. abortus* S99- oder S1119.3- bzw. *B. melitensis* Biovar 1-Ganzzellsuspensionen zum Einsatz.

Beim Komplementbindungstest werden im Testserum vorhandene IgG₁-Antikörper an Brucellen-Antigen (*B. abortus* S99- oder S1119.3-Phenol-NaCl-Ganzzellsuspension) und im Testansatz gleichzeitig enthaltenes Meerschweinchenkomplement gebunden (91). Als Indikatorsystem dienen Schaferythrozyten, die mit Kaninchenantikörpern sensibilisiert sind. Eine Lysis dieser Erythrozyten findet allerdings nur dann statt, wenn keine *Brucella*-spezifischen Antikörper im Testserum vorhanden sind und das in dem Fall frei verfügbare Komplement mit den Rezeptoren der Fc-Untereinheit der Kaninchenantikörper auf den Erythrozyten reagieren kann (87).

Eine durch hohe Sensitivität und Spezifität gekennzeichnete Methode ist der indirekte ELISA (iELISA), der häufig zur Detektion von *Brucella*-spezifischen Antikörpern bei Meeressäugern eingesetzt wird. Für den iELISA wird ein

Antiglobulinkonjugat verwendet, das spezifisch für den Immunglobulinisotyp der getesteten Spezies ist. Hier zeigen Protein A, eine Zellwandkomponente von *Staphylococcus aureus*, sowie Protein G eine gute Bindungsaktivität an IgG-Antikörper der unterschiedlichen Meeressäugerspezies. Als Antigene kommen Lipopolysaccharide (LPS) von *B. melitensis* 16M (16M-ELISA) und von *B. abortus* S99 (AS2-ELISA) zum Einsatz, die an Polystyren-Platten gebunden werden (67, 121, 124).

Bei *B. abortus*-Infektionen wurden serologische Kreuzreaktionen mit Antikörpern beobachtet, die gegen ähnliche antigenetische Determinanten von O-Polysacchariden anderer Erreger wie z.B. *Yersinia enterocolitica* O:9-Stämme gerichtet sind. Allerdings konnten bisher noch keine *Yersinia enterocolitica* O:9-Stämme von Meeressäugern isoliert werden (108). Außerdem zeigten Untersuchungen von 113 marinen Testsera, die positiv auf Brucellen-spezifische Antikörper getestet wurden, in einem iELISA mit *Yersinia enterocolitica* O:9-Außenmembranantigenen keine positiven serologischen Reaktionen, so dass angenommen werden kann, dass die positiven Titer tatsächlich aufgrund einer Brucellen-Infektion entstanden sind (121). Als Referenzseren für alle bei Meeressäugern durchgeführten ELISAs werden Seren von terrestrischen Säugetieren verwendet, da Referenzseren von Meeressäugern, die als sicher infiziert gelten, nur in geringer Anzahl vorhanden sind (48). Als Systemkontrollen dienen Seren von Baikalseerobben (*Phoca sibirica*), für die als vom marinen Ökosystem abgegrenzte Population in der jüngeren Vergangenheit keine Infektionsmöglichkeit mit marinen Brucellen bestand (108).

Der Einsatz eines kompetitiven ELISA (cELISA) hat gegenüber dem iELISA den Vorteil, dass hier keine „unspezifischen“ Konjugate für die Antikörperdetektion eingesetzt werden, sondern kompetitive monoklonale Antikörper, die spezifisch für ein Epitop der Brucellenantigene sind (87, 124). Diese monoklonalen Antikörper konkurrieren mit den im Testserum enthaltenen Antikörpern um die Bindungsstelle des auf der Polystyren-Platte gebundenen Antigens. Die Testwerte werden aus der Inhibitionsprozentzahl gegen die Pufferkontrolle (0% Inhibition) errechnet (87). Im Vergleich mit dem iELISA zeichnet sich der cELISA durch eine höhere Antikörperdetektionsrate aufgrund der Spezifität der monoklonalen Antikörper aus (124). Als Antigen wird S (smooth)-LPS von *B. melitensis* 16M und von *B. abortus* sowie OPS von *B. abortus* konjugiert mit Lysin eingesetzt (67, 87, 88, 124).

Abhängig vom verwendeten Antigen konnten beim cELISA qualitative Unterschiede in der Detektion von Antikörpern bei Cetaceen- und Robben-Spezies nachgewiesen werden. Der M84-ELISA mit monoklonalen Mausantikörpern gegen *B. abortus*-OPS und einem *B. abortus* S-LPS-Antigen reagierte bei getesteten Seren von Robben-Spezies wesentlich sensitiver als der O-Ketten-ELISA, der als konkurrierende Antikörper ebenfalls monoklonale Mausantikörper gegen OPS und als Antigen *B. abortus* OPS verwendet. Keine Detektionsunterschiede zwischen diesen beiden Methoden konnten hingegen bei Seren von Cetaceen-Spezies festgestellt werden, was auf eine Infektion der Robben- und Cetaceen-Spezies mit unterschiedlichen Brucellenbiovarien hindeuten könnte. Insgesamt scheint der cELISA der am besten geeignete Test zum Nachweis von Brucellenantikörpern bei Meeressäugern zu sein, da er einfach durchzuführen, sensitiv und spezifisch ist und auch die Untersuchung von Vollblutproben ermöglicht (88).

Untersuchungen zur Seroprävalenz wurden bei einer Vielzahl von Wildpopulationen mariner Säugetiere durchgeführt. *Brucella*-spezifische Antikörper konnten bei Vertretern der Familien der Schweinswale (*Phocoenidae*), Furchenwale (*Balaenopteridae*), Gründelwale (*Monodontidae*), Delfine (*Delphinidae*), Walrosse (*Odobenidae*), Ohrenrobben (*Otariidae*) und Hundsrobben (*Phocidae*) nachgewiesen werden (6, 48, 54, 67, 88, 96, 99, 101, 108, 121, 122, 124). In Bezug auf das Alter der serologisch positiven Tiere stellten PAYEUR *et al.* (1998) bei ihren Untersuchungen fest, dass positive Titer hauptsächlich bei Jährlingen und subadulten Tieren aller untersuchten Meeressäuger-Spezies nachgewiesen werden konnten. JEPSON *et al.* (1997) fanden vor allem bei juvenilen bis adulten Cetaceen und bei Seehundheulern positive Titer. Allerdings muss hier berücksichtigt werden, dass die Serumproben von Cetaceen hauptsächlich von gestrandeten Tieren und damit i.d.R. von Jährlingen und adulten Tieren stammten. Demgegenüber wurden Serumproben von Seehunden nur in geringer Anzahl von adulten Tieren, sondern hauptsächlich von in Seehundrehabilitationszentren stationär aufgenommenen Seehundheulern gewonnen. Die positiven Titer dieser z.T. noch nicht entwöhnten Tiere könnten eventuell durch maternale Antikörper hervorgerufen worden sein (67).

Die bislang untersuchten seropositiven Tiere stammten aus den unterschiedlichsten geographischen Regionen wie dem Nordatlantik, der Nordsee, dem Mittelmeer, dem Südpazifik und der Antarktis (6, 45, 67, 96, 108, 121, 124). Die Untersuchungsergebnisse aus den Jahren 1997 bis 2002 für Seehunde, Kegelrobben,

Schweinswale und Delfine sind in **Tabelle 2** zusammenfassend dargestellt. In England wurde eine höhere Seroprävalenz bei Schweinswalen im Vergleich zu Seehunden festgestellt, wohingegen in Nordamerika, den USA und Schottland eine höhere Seroprävalenz bei Seehunden nachgewiesen wurde. Diese Unterschiede können auf eine echte Variation in der geographischen Verteilung seropositiver Tiere der beiden Meeressäuger-Spezies hinweisen, sie könnten aber auch in der z. T. sehr geringen Probenzahl begründet sein, aus der eventuell eine Diskrepanz zwischen den nachgewiesenen und den tatsächlichen Seroprävalenzen resultiert (67). Insgesamt weisen die bisherigen serologischen Untersuchungen auf eine weite geographische Verbreitung von Brucellen-Infektionen bei nahezu allen Meeressäuger-Spezies hin.

Zusätzlich konnten bei 297 untersuchten Blutproben von Eisbären (*Ursus maritimus*), die an der Spitze der arktischen marinen Nahrungskette stehen, *Brucella*-Antikörper bei 5,4% der Tiere nachgewiesen werden. Infolgedessen ergibt sich ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Übertragung von Brucellen durch den Verzehr von Beutetieren (123).

Tab. 2: Nachweis von *Brucella*-spezifischen Antikörpern bei verschiedenen Meeressäugerpopulationen

Region	Meeres- säuger- Spezies	Anzahl		Anzahl positiver Tiere (in %)	Nachweis- Methode	Litera- tur- quelle
		getesteter Tiere	positiver Tiere			
England, Wales	Seehund	12	1	8%	cELISA und iELISA	Jepson <i>et al.</i> (1997)
	Kegelrobbe	62	6	10%		
	Schweinswal	35	11	31%		
	Gemeiner Delfin	29	9	31%		
Schottland	Seehund	300	147	49%	cELISA und iELISA	Foster <i>et al.</i> (2002)
	Schweinswal	152	50	33%		
Nordamerika	Seehund	163	21	12,9%	cELISA (O-Ketten- und M84- ELISA)	Nielsen <i>et al.</i> (2001)
	Kegelrobbe	255	10	3,9%		
	Schweinswal	3	0	0%		
USA	Seehund	k. A.	k. A.	32%	k. A.	Rhyan (2001)
	Kegelrobbe	k. A.	k. A.	22%		
	Schweinswal	k. A.	k. A.	23%		
	Gemeiner Delfin	1	1	100%		

k.A. = keine Angaben

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial

Das im Zusammenhang mit dieser Arbeit untersuchte Probenmaterial stammte von Meeressäugern, die im Rahmen eines nationalen Monitoringprogrammes zur Feststellung des allgemeinen Gesundheitszustandes von Meeressäugern der deutschen Nord- und Ostsee untersucht wurden. Dem Projekt angegliedert waren das Forschungs- und Technologiezentrum Westküste in Büsum (Aussenstelle der Christian-Albrecht-Universität Kiel, Schleswig-Holstein), sowie zwei Seehundaufzucht- und Forschungsstationen in Friedrichskoog (Schleswig-Holstein) und Norddeich (Niedersachsen). Bei den untersuchten Meeressäugern handelte es sich um gestrandete oder in Fischernetzen beigefangene Tiere sowie um gerettete oder euthanasierte Tiere aus den Seehundstationen.

3.2 Untersuchungszeitraum und Zahl der untersuchten Tiere

In eigens durchgeführten Untersuchungen wurden im Zeitraum von Juni 2001 bis April 2002 Organ- und Schleimhauttupferproben von insgesamt 42 Seehunden (*Phoca vitulina*) bakteriologisch und mykologisch untersucht. Zusätzlich standen Brucellenstämmen zur Verfügung, die bereits in den Jahren 1997 bis 2002 im Rahmen des Monitoringprogrammes bei der Untersuchung von 214 Seehunden, 175 Schweinswalen, 15 Kegelrobben und 6 anderen Meeressäugern am Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere isoliert wurden.

Serologische Untersuchungen wurden im Zeitraum von 2001 bis 2002 durchgeführt und umfassten Blutproben von 353 Seehunden (*Phoca vitulina*), 13 Schweinswalen (*Phocoena phocoena*), 3 Kegelrobben (*Halichoerus grypus*) und einem Delfin (*Delphinus delphis*).

3.3 Probenentnahme

Organ- und Schleimhauttupferproben wurden im Rahmen der pathologisch-anatomischen Untersuchung der Meeressäuger gewonnen. Eine Organprobenentnahme erfolgte von Leber, Milz, Niere, Lunge und Darm sowie von pathologisch veränderten Organen. In Stuart-Transportmedium versandte Tupferproben stammten von Maul-, Nasen-, After- und/oder Genitalschleimhaut sowie von vorhandenen Hautwunden. Eine Blutentnahme erfolgte bei lebenden Tieren durch Punktion der vertebrealen extraduralen Venen; bei toten Tieren wurde Blut aus den eröffneten Herzkammern oder aus großen Blutgefäßen gewonnen. Zur Serumgewinnung wurden die Blutproben bei 1000 g für 5 min abzentrifugiert.

Alle Proben wurden bei -20°C gelagert.

3.4 Kulturell-bakteriologische Untersuchung von Organ- und Tupferproben zur Isolierung von Brucellen

Organproben wurden im aufgetauten Zustand unter Verwendung eines Bunsenbrenners abgeflammt, mittels einer sterilen Schere angeschnitten und mit der frischen Schnittfläche auf festen Nährböden ausgestrichen. Als Nährböden für die Isolierung von Brucellen dienten Brain-Heart-Infusion- und *Brucella*-Selektiv-Agarplatten. Tupferproben wurden auf denselben Nährböden ausgestrichen und zusätzlich über Nacht bei 37°C in Serumbouillon angereichert. Die beimpften Brain-Heart-Infusion- und *Brucella*-Selektiv-Agarplatten wurden für mindestens 8 Tage bei 37°C und einer CO₂-Spannung von 10 Vol.-% bebrütet und in diesem Zeitraum regelmäßig auf das Wachstum brucellenverdächtiger Kolonien hin bewertet. Verdächtige Kolonien wurden zur Herstellung einer Reinkultur auf Brain-Heart-Infusion- und *Brucella*-Selektiv-Agarplatten subkultiviert und erneut bei 37°C unter 10 Vol.-% CO₂-Spannung bebrütet.

Für die Erfassung der weiteren bakteriellen Keimflora wurden die gewonnenen Proben zusätzlich auf Schafblutagar und Dreifarbenagar nach Gassner, außerdem auf TCBS-Agar (Vibrionen) und auf Rotlaufselektivagar (modifiziert nach Böhm) ausgestrichen. Eine Auswertung erfolgte nach 24- und 48-stündiger Bebrütung bei 37°C. Zum Nachweis von Schimmelpilzen und Hefen wurden Pilz-Agarplatten nach Kimmig verwendet, die bei 30°C für 5 Tage bebrütet wurden.

3.5 Herkunft der verwendeten Brucellen-Kontrollstämme

Die in **Tabelle 3a** und **3b** aufgelisteten Referenz- und Feldstämme wurden in allen phäno- und genotypischen Untersuchungen als Kontrollstämme eingesetzt.

Tab. 3a: Verwendete Brucellen-Referenzstämme

Spezies	Stammbezeichnung	Biovar	Herkunft
<i>B. „maris“</i>	12890*	1	NCTC ¹
<i>B. „maris“</i>	12891 [⊗]	2	NCTC ¹
<i>B. melitensis</i>	16M	1	BfR ²
<i>B. abortus</i>	544	1	BfR ²
<i>B. suis</i>	1330	1	BfR ²
<i>B. canis</i>	RM6/66	1	BfR ²
<i>B. ovis</i>	10512-03	1	NCTC ¹

*Isolat eines Seehundes (*Phoca vitulina*)

⊗Isolat eines Schweinswales (*Phocoena phocoena*)

¹NCTC= National Collection of Type Cultures, London, Großbritannien

²BfR = Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

Tab. 3b: Verwendete Brucellen-Feldstämme

Spezies	Stammbezeichnung	Biovar	Herkunft
<i>B. melitensis</i>	Özyurek	2	BfR ²
<i>B. melitensis</i>	126.087	3	BfR ²
<i>B. melitensis</i>	875		IHIT ³
<i>B. abortus</i>	1766/98	3	BfR ²
<i>B. abortus</i>	6032/84	4	BfR ²
<i>B. abortus</i>	747/67		IHIT ³
<i>B. abortus</i>	Neumünster	1	IHIT ³
<i>B. suis</i>	103.707	2	BfR ²
<i>B. canis</i>	126.518	1	BfR ²

¹NCTC= National Collection of Type Cultures, London, Großbritannien

²BfR = Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

³IHIT= Stammsammlung des Institutes für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, JLU Gießen

3.6 Phänotypische Untersuchungen zur Identifizierung und Differenzierung von Brucellen-Isolaten

3.6.1 Mikroskopische Untersuchungen

Für die mikroskopische Untersuchung der *Brucella*-verdächtigen Isolate wurde die Färbung nach GRAM angewendet.

Der Nachweis der Alkalifestigkeit erfolgte sowohl mittels STAMP- als auch mittels HANSEN- und KÖSTER-Färbung.

3.6.2 Biochemische Untersuchungen

3.6.2.1 Untersuchung auf Katalaseaktivität

Für den Nachweis des Enzyms Katalase wurden auf einem Objektträger 5-10 Kolonien eines Bakterienisolates in 50 µl einer 3%igen H₂O₂-Lösung verrieben. Zeigte sich nach wenigen Sekunden eine Gasbildung, wurde die Reaktion als positiv bewertet.

3.6.2.2 Untersuchung auf Cytochromoxidaseaktivität

Der Nachweis des Enzyms Cytochromoxidase erfolgte durch Verreiben von 5-10 Bakterienkolonien auf frisch mit Oxidasereagenz benetztem Filterpapier. Eine innerhalb weniger Sekunden auftretende Blaufärbung war Ausdruck einer positiven Reaktion.

3.6.2.3 Untersuchung auf Ureaseaktivität

Für den Nachweis des Enzyms Urease wurde Ureaseschrägagar nach Christensen mit 5-10 Bakterienkolonien beimpft und mind. 24 Stunden bei 37°C bebrütet. Ein Farbumschlag des Agars von gelb nach rot zeigte eine positive Reaktion an.

3.6.2.4 Prüfung der Schwefelwasserstoffbildung

Die Bildung von Schwefelwasserstoff wurde mittels zwei verschiedener Verfahren getestet.

Der Nachweis erfolgte erstens durch Beimpfung von Kligleragar mit 5-10 Bakterienkolonien und Bebrütung über mind. 5 Tage bei 37°C. Im Falle einer Schwefelwasserstoffbildung färbte sich der Agar von rot nach schwarz.

In einem zweiten Verfahren wurde Tryptose-Soja-Bouillon mit 5-10 Bakterienkolonien beimpft und nach Positionierung eines Bleiacetatstreifens oberhalb der Flüssigkeitssäule ebenfalls 5 Tage bei 37°C bebrütet. Der Nachweis von Schwefelwasserstoff wurde hier durch Schwarzfärbung des Bleiacetatstreifens angezeigt.

3.6.3 Testung der Farbstoffsensitivität

Eine Prüfung der Farbstoffsensitivität erfolgte unter Verwendung der basischen Farbstoffe Fuchsin, Thionin und Safranin. Die Farbstoffe wurden in Konzentrationen von jeweils 10, 20 und 40 µg/ml in Tryptose-Soja-Agar eingegossen. Die Nährböden wurden mit je einer Bakterienkolonie im unterbrochenen Ausstrichverfahren beimpft und mind. 5 Tage bei 37°C und einer CO₂-Spannung von 10 Vol.-% bebrütet. War nach 10 Tagen kein Bakterienwachstum feststellbar, wurde das Bakterienisolat als sensitiv gegenüber dem eingesetzten Farbstoff bewertet.

3.6.4 Prüfung auf Empfindlichkeit gegenüber lytischen Phagen

Zur Testung der Empfindlichkeit von Bakterienisolaten gegenüber ausgewählten lytischen Phagen wurden die Phagen F1 und F25 (=Bakteriophage Weybridge) verwendet. Die als Lyophilisate vorliegenden Phagen wurden mit je 1 ml Aqua bidest. resuspendiert, und es erfolgte zunächst eine Phagen-Regeneration. Hierzu wurden zwei Ansätze von jeweils 15 ml Brucellen-Bouillon mit je einer Öse *Brucella abortus* 544 beimpft und für 12 h bei 37°C und einer CO₂-Spannung von 10 Vol.-% bebrütet. Dann schloss sich die Zugabe von 0,5 ml der jeweiligen Phagensuspension an. Beide Ansätze wurden für 24 h bei 37°C und einer CO₂-Spannung von 10 Vol.-% bebrütet und anschließend für 60 min bei 2500 x g zentrifugiert. Die gewonnenen Überstände wurden durch 0,2 µm Spritzenfilter steriltriftriert. Die gewonnenen Filtrate entsprachen damit den beiden Phagensuspensionen mit angenommenen Konzentrationen von 10⁰. Sterilitätskontrollen wurden durch Ausstreichen der Phagensuspension auf Brucellen-Agarplatten und nachfolgender Bebrütung für 72 h bei 37°C und einer CO₂-Spannung von 10 Vol.-% durchgeführt.

Zur Erstellung von Phagenverdünnungsreihen wurden in je 6 Röhrchen jeweils 4,5 ml Brucellen-Bouillon vorgelegt. Zur Herstellung einer Verdünnung von 10^{-1} wurden in das erste Röhrchen jeweils 0,5 ml der oben genannten Phagensuspensionen gegeben. Durch fortlaufendes Überführen von 0,5 ml Phagensuspension in das nachfolgende Röhrchen erfolgte die Herstellung weiterer Verdünnungsstufen (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6}).

Alle Ansätze wurden bei 4°C gelagert.

Zur Testung der Empfindlichkeit der Feld- und Referenzstämme gegenüber den zwei verwendeten Phagen wurden pro Stamm jeweils 15 ml Brucellen-Bouillon mit einer Öse des zu untersuchenden Bakterienisolates beimpft und für 24 h bei 37°C und einer CO₂-Spannung von 10 Vol.-% bebrütet. Anschließend wurden jeweils 5 ml der bewachsenen Brucellen-Bouillon auf Brain-Heart-Infusion- bzw. Brucellen-Agarplatten gegeben und 10 min auf den Platten belassen. Nach Absaugen der überschüssigen Zellsuspension folgte das Trocknen der Platten mit leicht geöffnetem Deckel für 1,5 h bei 37°C. Danach wurde für jeden Bakterienstamm die in Sektoren unterteilte Platte mit jeweils 10 µl der Phagenverdünnungen 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} sowie mit 10 µl einer sterilen Brucellen-Bouillon beimpft. Anschließend erfolgte eine Bebrütung für 24 h bei 37°C und einer CO₂-Spannung von 10 Vol.-%. Die Auswertung erfolgte anhand der Beurteilung der Lysis des gewachsenen Bakterienrasens. Hierbei wurde zwischen kompletter Lysis, inkompletter Lysis, Plaques, Spuren bzw. punktförmiger Lysis und ausgebliebener Lysis unterschieden.

3.6.5 Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung

Um die Empfindlichkeit von Bakterienisolaten gegenüber ausgewählten Antibiotika zu testen, wurde der Agardiffusionstest nach den Vorschriften der DIN-Norm 58940 angewendet. Nach Anzucht der Bakterienstämme auf Brain-Heart-Infusion- bzw. Brucellen-Agar wurden 5 ml NBI-Medium mit 5-10 Kolonien eines Bakterienisolates beimpft. Anschließend wurden 100 µl dieser Suspension auf DST-Agarplatten (Fa. Oxoid, Wesel) ausgespatelt und die folgenden Antibiotika in Form von Testplättchen auf die Agarplatten aufgelegt (Dosis in µg/Plättchen): Amoxicillin/Clavulansäure (AM 20, C 10), Ampicillin (AMP 10), Cefalexin (CL 30), Chloramphenicol (C 30), Doxycyclin (DO 30), Enrofloxacin (ENR 5), Gentamycin (CN 10), Lincomycin (MY 15), Neomycin (N 30), Nitrofurantoin (F 100), Penicillin (P 10), Streptomycin (S 25),

Sulfomethoxazol/Trimethoprim (SX 23,75; T 1,25) und Tetracyclin (TE 30). Die Agarplatten wurden für mind. 5 Tage bei 37°C und einer CO₂-Spannung von 10 Vol.-% bebrütet. Die Auswertung der Antibiotikaempfindlichkeit erfolgte durch die Ausmessung der durch Unterdrückung des Keimwachstums im Bereich der Testplättchen entstandenen Hemmhöfe. Der Hemmhofdurchmesser gilt dabei als Maß für die qualitative Beurteilung der Bakterienisolate als resistent, intermediär oder sensibel. Da die DIN-Norm 58940 für die Antibiotika Cefalexin, Doxycyclin, Enrofloxacin, Lincomycin, Neomycin und Streptomycin keine Angaben liefert, wurden hier für die Bewertung die in der AVID-Methodensammlung, Tabelle 2, Stand XII/97 der DVG veröffentlichten Standards herangezogen.

Tab. 4: Bewertung der Hemmhofdurchmesser der verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	Hemmhof in mm		
	r	i	s
Amoxicillin/Clavulansäure	< 20	21-27	> 28
Ampicillin	< 14	15-21	> 22
Cefalexin	< 18	19-20	> 21
Chloramphenicol	< 20	-	> 21
Doxycyclin	< 16	17-21	> 22
Enrofloxacin	< 17	18-21	> 22
Gentamycin	< 14	15-20	> 21
Lincomycin	< 18	19-23	> 24
Neomycin	< 15		> 17
Nitrofurantoin	10	11-15	16
Penicillin	< 12	13-23	> 24
Streptomycin	< 14	15-16	> 17
Sulfomethoxazol/Trimethoprim	< 10	11-15	> 16
Tetracyclin	< 16	17-21	> 22

r=resistent, i=intermediär, s=sensibel

3.6.6 Überprüfung der NaCl-Empfindlichkeit

Zur Testung der NaCl-Empfindlichkeit wurden die zu untersuchenden Bakterienisolate auf Brain-Heart-Infusion-Agarplatten mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen im unterbrochenen Ausstrichverfahren angeimpft. Die Nährböden enthielten NaCl in den Konzentrationen 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5% und 3%. Eine Beurteilung erfolgte nach 5-tägiger Bebrütung bei 37°C und einer CO₂-Spannung von 10 Vol.-%. Konnte innerhalb dieses Zeitraumes kein Bakterienwachstum nachgewiesen werden, wurde das Bakterienisolat als sensitiv gegenüber der eingesetzten NaCl-Konzentration bewertet.

3.6.7 Untersuchung des Lipopolysaccharidprofils mittels spezifischer Antiseren (Objektträgeragglutination)

Zum Nachweis der Brucellen-Oberflächenantigene A, M und R wurden 5-10 Kolonien eines Bakterienstammes in 20 µl des jeweiligen 1:10 verdünnten spezifischen Brucellen-Referenzserums suspendiert. Die spezifischen A-, M- und R-Antiseren waren vom BfR zur Verfügung gestellt worden. Als Systemkontrolle dienten 20 µl sterile Kochsalzlösung. Die Reaktion wurde als positiv bewertet, wenn nach einminütigem Schwenken des Objektträgers eine Ausflockung (Agglutination) erfolgt war.

3.7 Molekulargenetische Untersuchungen zur Identifizierung und Differenzierung von Brucellen-Isolaten

3.7.1 Präparation von bakterieller Gesamt-DNS

3.7.1.1 Lysis by boiling-Verfahren

Nach Anzucht eines Bakterienstammes auf Brain-Heart-Infusion-Agar bei 37°C und 10 %iger CO₂-Spannung über 5 Tage wurde eine Einzelkolonie in 50 µl Aqua bidest. überführt. Die Bakteriensuspension wurde anschließend für 20 min im Wasserbad hitzelysiert und bis zur Verwendung in der PCR (3.7.2.1 und 3.7.2.4) bei -20°C gelagert.

3.7.1.2 DNS-Präparation mittels DNEasy Tissue Kit

Die Präparation der DNS wurde mit dem DNEasy Tissue Kit nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Nach Anzucht eines Bakterienisolates auf Brain-Heart-Infusion-Agar bei 37°C und 10 %iger CO₂-Spannung über 5 Tage wurden jeweils 5 – 10 Einzelkolonien für die Gewinnung der DNS eingesetzt. Eine Ethanol-Präzipitation der anschließend in Aqua bidest. gelösten DNS erfolgte durch Zugabe von 1/10 Volumen Natriumacetat (3M, pH 4,6) und 2 Volumen Ethanol (99%ig). Nach Vortexen der Probe und Zentrifugation bei 15.800 x g für 30 min wurde die DNS zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, in 20 µl Aqua bidest. resuspendiert und bei –20°C gelagert.

3.7.1.3 Quantifizierung von DNS

Die DNS-Konzentration sowie der Reinheitsgrad einer Probe wurde photometrisch bestimmt. Eine Berechnung der DNS-Konzentration erfolgte durch Vergleich der bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessenen Extinktionswerte mit einem standardisierten DNS-Ansatz (50 µg/ml, Extinktion 1,0). Die DNS-Konzentration wurde dabei nach folgender Formel berechnet:

$$C_{\text{DNS}} (\mu\text{g/ml}) = (\text{OD}_{260 \text{ nm}} - \text{OD}_{320 \text{ nm}}) \times 50 \times V$$

C = DNS-Konzentration

OD = Optische Dichte

OD_{260 nm} = Absorptionsmaximum von DNS

OD_{320 nm} = Absorptionsspektrum von Proteinen

V = Verdünnung

3.7.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die in der PCR verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma Roth hergestellt und anschließend auf eine Konzentration von 10 µM eingestellt.

3.7.2.1 *omp2*-PCR nach SIFUENTES-RINCON *et al.* (1997)

Tab. 5: Übersicht der verwendeten Oligonukleotid-Primer

Gen	Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Position des Amplifikates ¹
<i>omp2a</i> und <i>omp2b</i>	2AB5	ACTGACGGATCCGCGCTCAGGCGGCCGACGCAA	2294 - 2326 1332 - 1364
<i>omp2a</i> und <i>omp2b</i>	2AB200	ACTGACTTCGAAACCAGCCATTGCGGTTCGGTAC	2477 - 2509 1159 - 1191
<i>omp2b</i>	2B600	ACTGAAGCTTAGCCGTCGATGTGGTAGT	764 - 791
<i>omp2a</i>	2A900	ACTGACTTCGAATTGCCTTTTCGGGGGCAATGA	3005 - 3037

¹: Position entsprechend den Datenbankangaben zur *omp2*-Sequenz M26034 von *B. abortus*

Der Reaktionsansatz (19 µl) setzte sich zusammen aus:

Prämix	
Reaktionspuffer (10 x)	2,0 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,4 µl
dNTPs (16 mM)	1,0 µl
Primer 2AB5 (10 µM)	1,0 µl
Primer 2AB200 oder 2B600 oder 2A900 (10 µM)	1,0 µl
AmpliTaq Gold Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
Aqua bidest.	11,5 µl

Die Template-DNS (1 µl) aus 3.7.1.1 wurde zuletzt und ausserhalb des PCR-Raumes zugegeben.

Eine Negativkontrolle in Form von Aqua bidest. anstelle von DNS wurde bei jeder PCR mitgeführt.

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler nach folgendem Temperaturprofil:

Initiale Denaturierung	95°C, 5 min
35 Zyklen:	
Denaturierung	95°C, 30 s
Annealing	66°C, 30 s
Extension	72°C, 90 s
Abschließende Extension	72°C, 7 min

Die Auswertung der ermittelten Amplifikationsmuster wurde entsprechend der von Sifuentes-Rincon *et al.* (114) eingeführten Bezeichnung vorgenommen, die eine Numerierung der verschiedenen Amplifikationsmuster mit römischen Ziffern vorgibt (s. 2.4.2.1).

3.7.2.2 *omp2*-PCR nach CLOECKAERT *et al.* (1995)

Tab. 6: Übersicht der verwendeten Oligonukleotid-Primer

Gen	Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Position des Amplifikates ¹
<i>omp2a</i>	2aA	GGCTATTCAAATCTGGCG	2014 - 2033
<i>omp2a</i>	2aB	ATCGATTCTCACGCTTTCGT	3227 - 3246
<i>omp2b</i>	2bA	CCTTCAGCCAAATCAGAATG	1252 - 1271
<i>omp2b</i>	2bB	GGTCAGCATAAAAAGCAAGC	36 - 55

¹: Position entsprechend den Datenbankangaben zur *omp2*-Sequenz M26034 von *B. abortus*

Der Reaktionsansatz (48 µl) setzte sich zusammen aus:

Prämix	
Reaktionspuffer (20 x)	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3,0 µl
dNTPs (16 mM)	2,5 µl
Primer	
2aA und 2aB bzw. 2bA und 2bB (20 µM)	je 2,5 µl
Tfl-DNS-Polymerase (1 U/µl)	1,25 µl
Aqua bidest.	33,75 µl

Die Template-DNS (2 µl bzw. 100 ng) aus 3.7.1.2 wurde zuletzt und ausserhalb des PCR-Raumes zugegeben.

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler nach folgendem Temperaturprofil:

1 Zyklus:	
Denaturierung	95°C, 5 min
Annealing	58°C, 2 min
Extension	70°C, 3 min
30 Zyklen:	
Denaturierung	95°C, 1 min
Annealing	58°C, 2 min
Extension	70°C, 3 min
1 Zyklus:	
Denaturierung	95°C, 1 min
Annealing	58°C, 2 min
Extension	70°C, 10 min

3.7.2.3 *omp2*-XL-PCR

Mittels XL-PCR sollte durch Modifikation der Pufferzusammensetzung, kurze Denaturierungs- und verlängerte Extensionszeiten sowie durch die Verwendung

einer speziellen DNS-Polymerase (*rTth*) die Ausbeute bei der Amplifikation des *omp2a*- und *omp2b*-Gens optimiert werden.

In der XL-PCR wurden die in **Tabelle 6** angegebenen Primer eingesetzt. Zur Durchführung der PCR erfolgte der Ansatz eines Prämixes nach folgendem Angaben:

Prämix	
XL-Puffer (3,3 x)	15,0 µl
Mg(OAC) ₂ (25 mM)	2,2 µl
dNTPs (16 mM)	4,0 µl
Primer (20 µM)	0,8 µl je Primer
Aqua bidest.	25,4 µl (ad 48,2 µl)

Anschließend erfolgte pro Ansatz die Zugabe von 0,8 µl *rTth*-Polymerase (2 U/µl) und 1 µl Template-DNS (50 ng) aus 3.7.1.2.

Die PCR wurde mit folgendem Temperaturprogramm des Thermocyclers durchgeführt:

32 Zyklen:	
Denaturierung	94°C, 15 s
Annealing und Extension	60°C, 5 min
Δt ab Zyklus 16	15 s/Zyklus
abschließende	
Extension	72°C, 7 min

Die gewonnenen Amplikons wurden nachfolgend in einer DNS-Sequenzierung eingesetzt.

In **Abbildung 1** sind alle für die Amplifikation des *omp2*-Lokus eingesetzten Primer, die in 3.7.2.1, 3.7.2.2, 3.7.2.3 sowie in 3.7.6 genannt werden, dargestellt.

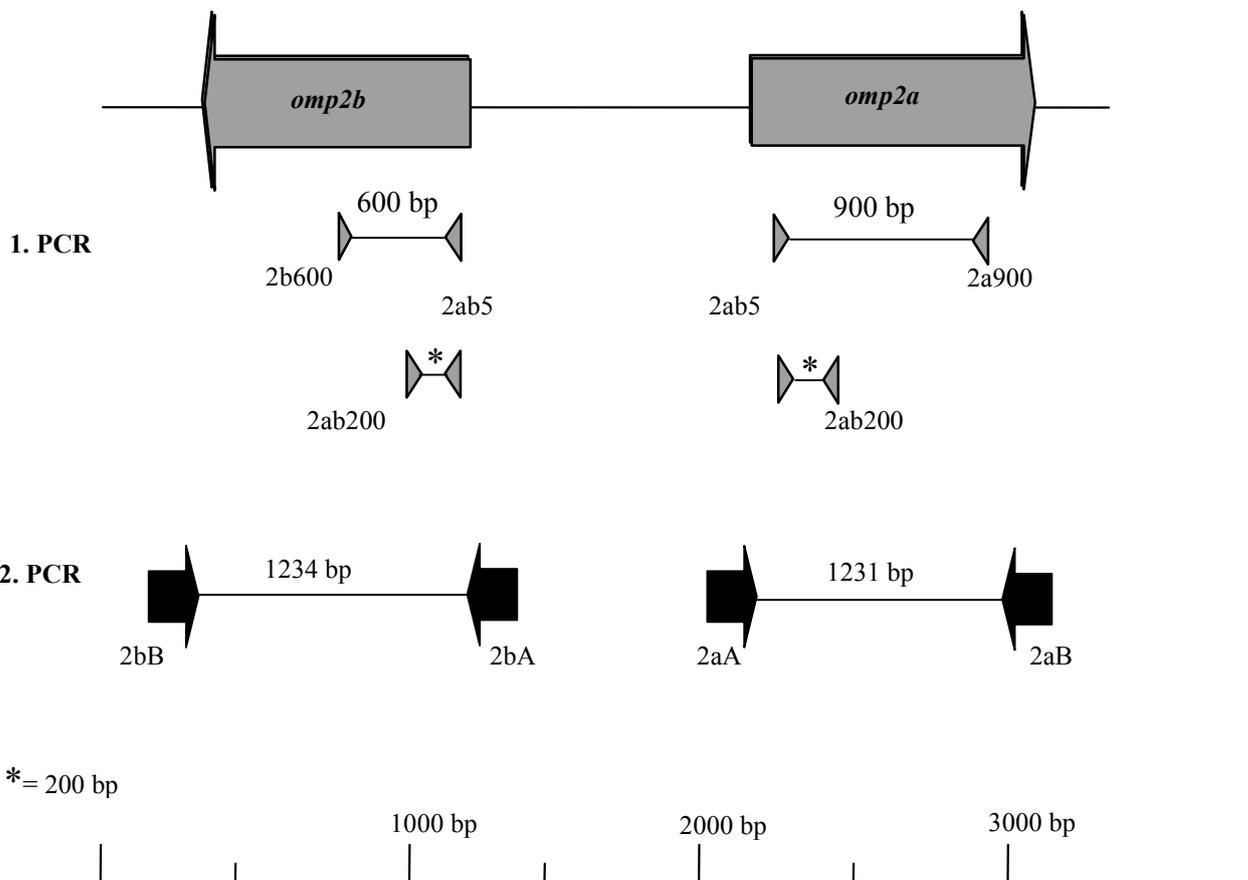


Abb. 1: Darstellung aller verwendeten Primer für die Amplifikation des *omp2*-Lokus

3.7.2.4 *IS711*-PCR nach BRICKER und HALLING (1994)

Tab. 7: Übersicht der verwendeten Oligonukleotid-Primer

Gen	Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Position des Amplifikates ¹
<i>IS711</i>	IR-1	GGCGTGTCTGCATTCAACG	823 - 841
<i>IS711</i>	IR-2	GGCTTGTCTGCATTCAAGG	2 - 20

¹: Position entsprechend den Datenbankangaben zur *IS711*-Sequenz M94960 von *B. ovis*

Der Reaktionansatz (18 μ l) setzte sich zusammen aus:

Prämix	
Reaktionspuffer (10 x)	2,00 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1,20 μ l
dNTPs (16 mM)	1,25 μ l
Primer (20 μ M)	1,00 μ l je Primer
AmpliAq Gold Polymerase (5 U/ μ l)	0,10 μ l
Aqua bidest.	11,45 μ l

Die Template-DNS (2 μ l) aus 3.7.1.1 wurde zuletzt und ausserhalb des PCR-Raumes zugegeben.

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler nach folgendem Temperaturprofil:

Denaturierung	95°C, 5 min
35 Zyklen:	
Denaturierung	95°C, 30 s
Annealing	55°C, 30 s
Extension	72°C, 120 s
Abschließende	
Extension	72°C, 5 min

3.7.3 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNS-Fragmenten erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Die entsprechende Menge Agarose (1,5 - 3 %ig) wurde unter mehrfachem Aufkochen in 1 x TAE-Puffer gelöst, mit Ethidiumbromid versetzt (0,5 μ g/ml) und nach Abkühlung auf 50°C in einen horizontalen Gelschlitten mit eingesetztem PVC-Kamm gegossen. Die Proben wurden bei einem Volumen von 8 μ l mit 1,5 μ l DNS-Probenpuffer und bei einem Volumen von 20 μ l mit 3 μ l DNS-Probenpuffer versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 0,8 - 1 V/cm Gellänge. Die aufgetrennten DNS-Fragmente mit interkaliertem Ethidiumbromid

wurden durch UV-Licht (354 nm) sichtbar gemacht und anschließend photographiert. Die Fragmentgrößen wurden anhand des mitgeführten DNS-Größen-Standards ermittelt.

3.7.4 Spaltung von DNS mit Restriktions-Endonukleasen

3.7.4.1 Restriktionsanalyse des omp2-Gens

Für die Restriktionsanalyse des *omp2*-Gens wurden die Restriktionsenzyme *AluI*, *BanI*, *BglII*, *ClaI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HinfI*, *KpnI*, *NcoI*, *PstI*, *PvuII*, *SylI* und *TaqI* eingesetzt. Die Ansätze in wässriger Lösung mit einem Gesamtvolumen von 20 µl enthielten jeweils 5 µl des PCR-Produktes aus 3.7.2.2 sowie die den Herstellerangaben entsprechenden Puffermengen. Die Inkubation aller Restriktionsansätze exklusive der *TaqI*-Ansätze erfolgte bei 37°C über Nacht. Die Restriktion mit *TaqI* fand bei 65°C über Nacht statt.

Die Auswertung der gewonnenen Restriktionsmuster erfolgte im Vergleich zu den von Cloeckart *et al.* (1995, 2001) ermittelten Restriktionsmustern für klassische und marine Brucellenstämme. Dabei wurde die von den Autoren vorgeschlagene alphabetische Bezeichnung der verschiedenen *omp2*-Varianten entsprechend verwendet (s. 2.4.2.1).

3.7.4.2 Restriktion von Gesamt-DNS zur Vorbereitung der DNS-DNS-Hybridisierung

Für die in wässriger Lösung durchgeführte Reaktion wurde das Restriktionsenzym *EcoRI* verwendet. 1 µg DNS aus 3.7.1.2 wurde in 4 µl 10 x Puffer über Nacht bei 37°C mit 40 U *EcoRI* verdaut.

Die Auftrennung der entstandenen Fragmente erfolgte in einem 0,8 %igen Agarosegel über 20 h bei 30 V.

3.7.5 DNS-DNS-Hybridisierungsverfahren

3.7.5.1 Herstellung einer Digoxigenin-markierten DNS-Sonde

Für die Herstellung und gleichzeitige Digoxigenin-Markierung von PCR-Amplifikaten wurde das unter 3.7.2.4 beschriebene PCR-Verfahren wie folgt modifiziert. Digoxigenin in Form von DIG-11-dUTP (1 mM) und dTTP (10 mM) wurde in den PCR-Ansätzen im Verhältnis 1+3, 1+5 und 1+10 eingesetzt. Ein Ansatz enthielt kein DIG-11-UTP und ein weiterer Ansatz mit Aqua bidest. anstelle von DNS diente als Negativkontrolle. Nach der PCR-Amplifizierung konnte der Erfolg der Markierungsreaktion anhand des unterschiedlichen Laufverhaltens der einzelnen PCR-Amplifikate (Bandenshift) mittels Agargelelektrophorese in einem 2%igen Agarosegel nachgewiesen werden.

3.7.5.2 Southern Blot

Der Transfer von DNS aus Agarose-Gelen (3.7.3) auf eine positiv geladene Nylonmembran wurde nach der Kapillarblot-Methode (SOUTHERN, 1975) durchgeführt.

Nach einer Bestrahlung des Gels mit UV-Licht (254-312 nm; 60 mJ/cm²) wurde die Gelmatrix zweimal in 0,25 N HCl für je 15 min gewaschen, mit Aqua bidest. abgespült und schließlich für 30 min in Denaturierungslösung geschwenkt.

Der Downward-Blot (CHOMCZYNSKI, 1992) wurde wie folgt aufgebaut:

- ca. 10 cm saugfähige Einmalhandtücher
- 2 Lagen Filterpapier
- 2 Lagen Filterpapier mit Denaturierungslösung getränkt
- Nylonmembran, nach 20-minütiger Äquilibrierung in Aqua bidest.
- Agarosegel
- 4 Lagen Filterpapier mit Denaturierungslösung getränkt
- 2 Filterpapierbrücken zu den Vorratsgefäßen mit Denaturierungslösung

Nach 2 Stunden Transferzeit bei Raumtemperatur wurde das Blotpaket schrittweise abgebaut, die Slotpositionen auf der Nylonmembran markiert und die Membran anschließend 10 min in Neutralisierungspuffer geschwenkt. Eine Fixierung der DNS auf der Membran erfolgte durch Lufttrocknung für mindestens 5 min und anschließendes Backen bei 120°C für 30 min.

3.7.5.3 DNS-DNS-Hybridisierung

Die Hybridisierung erfolgte entsprechend der Anleitung zum „DIG-Luminescent-Detection-Kit“. Zur Prähybridisierung wurden die Blots mit 25 ml Hybridisierungslösung pro 100 cm² Membranfläche für 1 h bei 42°C im Hybridisierungssofen inkubiert. Anschließend wurden diese mit 25 ml pro 100 cm² frischer Hybridisierungslösung versetzt. Die Polynukleotidsonde wurde unmittelbar vor der Hybridisierung denaturiert (10 min bei 100°C, danach mind. 15 min auf Eis) und der Hybridisierungslösung in einer Konzentration von 10-200 ng DNS pro ml zugegeben. Die Inkubation der Blots wurde bei 42°C für 16-18 h fortgesetzt.

Nach erfolgter Hybridisierung wurden die Blots 2 x 5 min unter Schwenken bei RT in mind. 50 ml Waschlösung 1 und anschließend 2 x 15 min bei 68°C in Waschlösung 2 gewaschen. Die gewaschenen Blots wurden entweder direkt im Anschluss dem Digoxigenin-Detektionsverfahren unterzogen oder luftgetrocknet bis dahin aufbewahrt.

3.7.5.4 Digoxigenin-Detektionsverfahren

Die Detektion wurde mit geringfügigen Modifikationen nach Anleitung des „DIG Luminescent Detection Kit“ durchgeführt. Sämtliche Inkubationsschritte erfolgten bei RT unter Schwenken. Die Detektionslösungen wurden den Blots nur in den Mengen zugegeben, die für eine vollständige Membranabdeckung erforderlich waren. Dabei wurden die in der Arbeitsanleitung angegebenen Inkubationsvolumina in der Regel unterschritten. Die Expositionsdauer der Blots auf dem Röntgenfilm wurde je nach Verwendungshäufigkeit der Lumigen-Substratlösung auf 1-2 h ausgedehnt.

3.7.6 Sequenzierung des *omp2*-Gens und Auswertung der Sequenzdaten

Die DNS-Sequenzanalyse des aus 3.7.2.3 gewonnenen Amplikons erfolgte mit freundlicher Unterstützung der Arbeitsgruppe Prof. Dr. T. Chakraborty (Medizinische Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität, Gießen) nach der Di-desoxy-Kettenabbruchmethode (SANGER *et al.*, 1977). Dabei diente ein an die zu sequenzierende DNS hybridisiertes Oligonukleotid (Primer) als Ausgangspunkt für die Synthese des komplementären Stranges. Diese erfolgte durch speziell modifizierte DNS-Polymerasen unter Verbrauch von Desoxynukleotiden. Dem Reaktionsansatz

wurden neben den vier verschiedenen Desoxynukleotiden dATP, dCTP, dGTP und dTTP auch einzelne Didesoxynukleotide (z.B. nur ddATP, bzw. ddCTP, ddGTP und ddTTP) zugefügt, die ausser an der 2'-Position der Ribose auch an der 3'-Position keine Hydroxylgruppe tragen. Diese Didesoxynukleotide wurden zwar eingebaut, aber der komplementäre Strang konnte danach nicht verlängert werden, da keine Hydroxylgruppe für eine Phosphodiesterbindung zur Verfügung stand. In vier verschiedenen Ansätzen mit jeweils einem Didesoxynukleotid entstanden so vier Gruppen unterschiedlich terminierter Polynukleotide, deren Länge jeweils Aufschluss über das Auftreten einer komplementären Base an der entsprechenden Position im Template gab. Die Auftrennung der Polynukleotide erfolgte mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).

Die Reaktion erfolgte unter Verwendung der Primer aus 3.7.2.3 und der Primer 2b470 und 2b609 (**Tabelle 8**), welche anhand des Computerprogramms OLIGO[®] Primer Analysis Software 4.0 erstellt wurden.

Tab. 8: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotid-Primer

Gen	Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')	Position des Amplifikates ¹
<i>omp2b</i>	2b470	ATTCCGGATTTCGTCGATAC	470 - 487
<i>omp2b</i>	2b609	CGCTCTCGAACAGGGTGG	609 - 626

¹: Position entsprechend der Datenbankangaben zur *omp2a*-Sequenz AF300819 vom Brucellenisolat eines gemeinen Seehundes

In **Abbildung 2** sind die zur Sequenzierung des *omp2*-Lokus verwendeten Primer dargestellt.

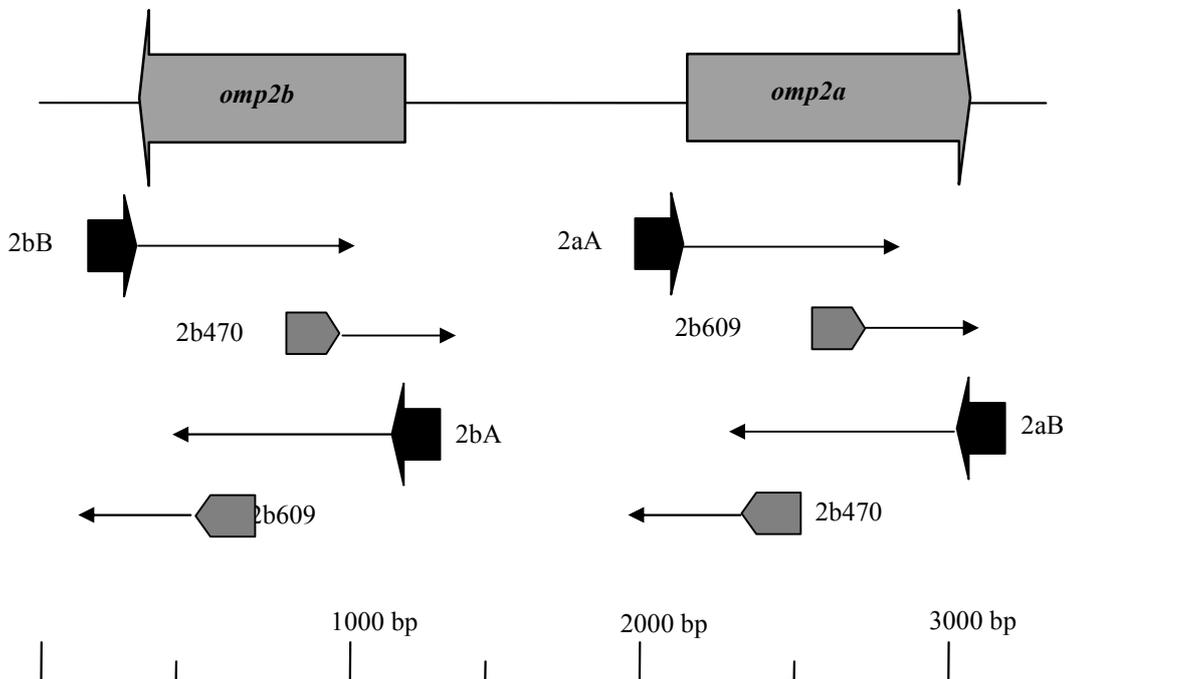


Abb. 2: Darstellung der für die Sequenzierung des *omp2*-Lokus eingesetzten Primer

Eine Analyse der erhaltenen DNS-Sequenzen erfolgte mit Seqman II sowie mit weiteren Programmmodulen von LASERGENE® (EditSeq, MapDraw und MegAlign). Für die statistische Evaluierung der ermittelten Baumtopologie wurde eine Bootstrap-Analyse nach FELSENSTEIN (1985) mit 100 Replikaten unter Verwendung des Programmes „Seqboot“ (PHYLIP-Programmpaket) durchgeführt. Bootstrap-Ergebnisse werden als das Maß für die Wahrscheinlichkeit interpretiert, mit der eine phylogenetische Schätzung die wahre Phylogenetik repräsentiert. Werte über 70% werden als signifikant erachtet.

3.8 Serologische Untersuchung von Blutproben (Serumlangsamagglutination)

Zum Nachweis von *Brucella*-spezifischen Antikörpern wurden Serumproben von insgesamt 353 Seehunden, 13 Schweinswalen, 3 Kegelrobben und einem gemeinen Delfin mittels Langsamagglutinationsverfahren untersucht.

3.8.1 Langsamagglutination mit *Brucella abortus*-Antigen

Die zu untersuchenden Seren wurden in einer Verdünnungsreihe mit physiologischer Kochsalzlösung (isotonischer NaCl) auf die Verdünnungsstufen 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 und 1:640 eingestellt. Es folgte die Zugabe von jeweils der gleichen Menge (0,5 ml) *Brucella abortus*-Antigen, welches vom BfR bezogen worden war. Die Auswertung erfolgte nach 24-stündiger Bebrütung der Ansätze bei 37°C auf der Basis der in **Tabelle 9** aufgeführten Kriterien. Dabei wurde die Verdünnungsstufe als Endtiter angesehen, in der eine noch deutliche (50%ige) Agglutination nachzuweisen war.

3.8.2 Langsamagglutination mit marinem Brucellen-Antigen

Zur Herstellung von marinem Brucellenantigen wurde der *B. „maris“* Referenzstamm 12890 auf Brain-Heart-Infusion-Agar (BHI) bei 37°C und 10 %iger CO₂-Spannung für 5 Tage bebrütet und mit 0,5 % Formalin-enthaltender isotonischer NaCl abgeschwemmt. Zur Inaktivierung schloss sich eine Bebrütung der Keimsuspension für 24 h bei 37°C, gefolgt von einer Sterilitätskontrolle durch Ausstreichen der Brucellen-suspension auf BHI-Agar und dessen Bebrütung über 5 Tage bei 37°C und 10 %iger CO₂-Spannung. Sodann wurde die Suspension auf eine optische Dichte nach McFarland Nr.3 eingestellt. Die hergestellte Antigenlösung wurde, wie unter 3.8.1 beschrieben, in der Langsamagglutination eingesetzt und die Agglutination entsprechend den Kriterien der **Tabelle 9** bewertet.

Tab. 9: Bewertung des Agglutinationsverhaltens

Agglutination	Überstehende Flüssigkeit	Sonstiges	Bewertung
vollständig	100 % geklärt	Klümpchen beim Aufschütteln	++++
nahezu vollständig	75 % geklärt	Klümpchen beim Aufschütteln	+++
noch deutlich	50 % geklärt	Klümpchen beim Aufschütteln	++
Spuren	< 50 % geklärt	wenige, feine Klümpchen beim Aufschütteln	+
keine	gleichmäßig trübe Suspension	knopfartiger Bodensatz, der beim Neigen des Röhrchens ausläuft	-

4 Ergebnisse

4.1 Kulturell-bakteriologischer Nachweis von brucellenverdächtigen Bakterienisolaten aus Organproben von Meeressäugern

Im Zeitraum von Juni 2001 bis April 2002 konnten in eigens durchgeführten Untersuchungen bei 3 von 42 untersuchten Seehunden Bakterienisolate nachgewiesen werden, die in ihren kulturell-morphologischen Eigenschaften den Vertretern der Gattung *Brucella* entsprachen und bis zu ihrer weitergehenden Identifizierung als brucellenverdächtige Bakterien bezeichnet wurden. Im einzelnen wurden diese bei einem Tier aus Lungengewebe sowie einem Lungenwurm (*Parafilaroides gymnurus*) und bei den anderen beiden Tieren jeweils aus Darm- bzw. Lebergewebe isoliert. Bereits in den Jahren 1997 bis 2002 waren am hiesigen Institut bei 25 von 214 untersuchten Seehunden, bei einer von 15 Kegelrobben sowie bei einem von 175 untersuchten Schweinswalen ebenfalls derartige Bakterien kulturell nachgewiesen worden. Die Mehrzahl dieser Isolate konnte aus Lungengewebe der untersuchten Tiere kultiviert werden. Am zweithäufigsten gelang ihre Anzucht aus der Milz; vergleichsweise seltener wurden derartige Erreger in Niere, Darmlymphknoten sowie Lungenlymphknoten der Tiere nachgewiesen. Aus Darm und Leber gelang die Isolierung bei zwei Tieren. Eine Kultivierung aus Haut-, Zungen- und Magenlymphknotengewebe erfolgte jeweils bei nur einem Tier. Von den insgesamt 30 Tieren mit brucellenverdächtigen Erregern konnten diese bei 6 Tieren in mindestens zwei Organen nachgewiesen werden. Schließlich wiesen zwei Lungenwürmer von Meeressäugern mit *Brucella*-verdächtigen Keimen in der Lunge ebenfalls diese Bakterien auf. Eine Übersicht über die Herkunft aller 49 brucellenverdächtigen Bakterienstämme gibt **Tabelle 10**.

Tab. 10: Herkunft der brucellenverdächtigen Bakterienstämme

Stamm-Nr.	Tier-Nr.	Herkunft	Stamm-Nr.	Tier-Nr.	Herkunft
1	945	Darmlymphknoten	26	1615	Lungenlymphknoten
2	945	Lunge	27	1615	Tupfer Lungenlymphknoten
3	952	Lunge	28	1615	Magenlymphknoten
4	848	Lunge	29	1551	Lungenlymphknoten
5	581	Lunge	30	1551	Magen
6	559	Lunge	31	659	Lunge
7	667	Lunge	32	1685	Lunge
8	657	Lunge	33	1745	Milz
9	670	Lunge	34	1745	Niere
10	666	Lunge	35	1745	Lunge
11	1353	Lunge	36	1745	Darm
12	1348	Darmlymphknoten	37	1674	Lunge
13	1400	Milz	38	1675	Milz
14	1542	Lunge	39	1675	Niere
15	1588	Darm	40	1675	Lunge
16	1603	Zunge	41	1615	Lungenwurm
17	1614	Leber	42	1948	Lunge
18	1614	Milz	43	1950	Lunge
19	1614	Niere	44	1790	Lunge
20	1614	Lunge	45	1789	Lunge
21	1614	Darmlymphknoten	46	ohne Nr.	Leber
22	1614	Haut	47	106/01	Darm
23	1615	Leber	48	9/02	Lunge
24	1615	Milz	49	9/02	Lungenwurm
25	1615	Lunge			

Insgesamt lag die Nachweisrate für die untersuchten Seehunde bei 10,9%, für die Kegelrobben bei 6,7% und für die Schweinswale bei 0,6%.

Das Durchschnittsalter der Tiere mit brucellenverdächtigen Keimen lag unter einem Jahr. Von diesen 30 Meeressäugern waren 17 (56,7%) männlich und 13 (43,3%) weiblich.

Die Mehrzahl der Tiere (10 bzw. 33,3%) wurde auf der Insel Sylt gefunden, weitere 5 Tiere (16,7%) konnten von der Insel Helgoland geborgen werden. 4 (13,3%) bzw. 3 Tiere (je 10%) stammten von der Insel Amrum bzw. aus Büsum. Die Fundorte von jeweils zwei Tieren (je 6,6%) waren in St. Peter Ording bzw. auf Langeoog lokalisiert. Nur jeweils ein Tier (je 3,3%) wurde von den Stränden der Hallig Hooge, Pellworm, aus dem Hamburger Hafen und von Wangerooge geborgen.

Die Funddaten der 30 Meeressäuger, bei denen brucellenverdächtige Bakterien isoliert werden konnten, sind in **Tabelle 11** zusammenfassend dargestellt. Eine graphische Darstellung der Fundorte dieser Meeressäuger befindet sich in **Abbildung 3**.

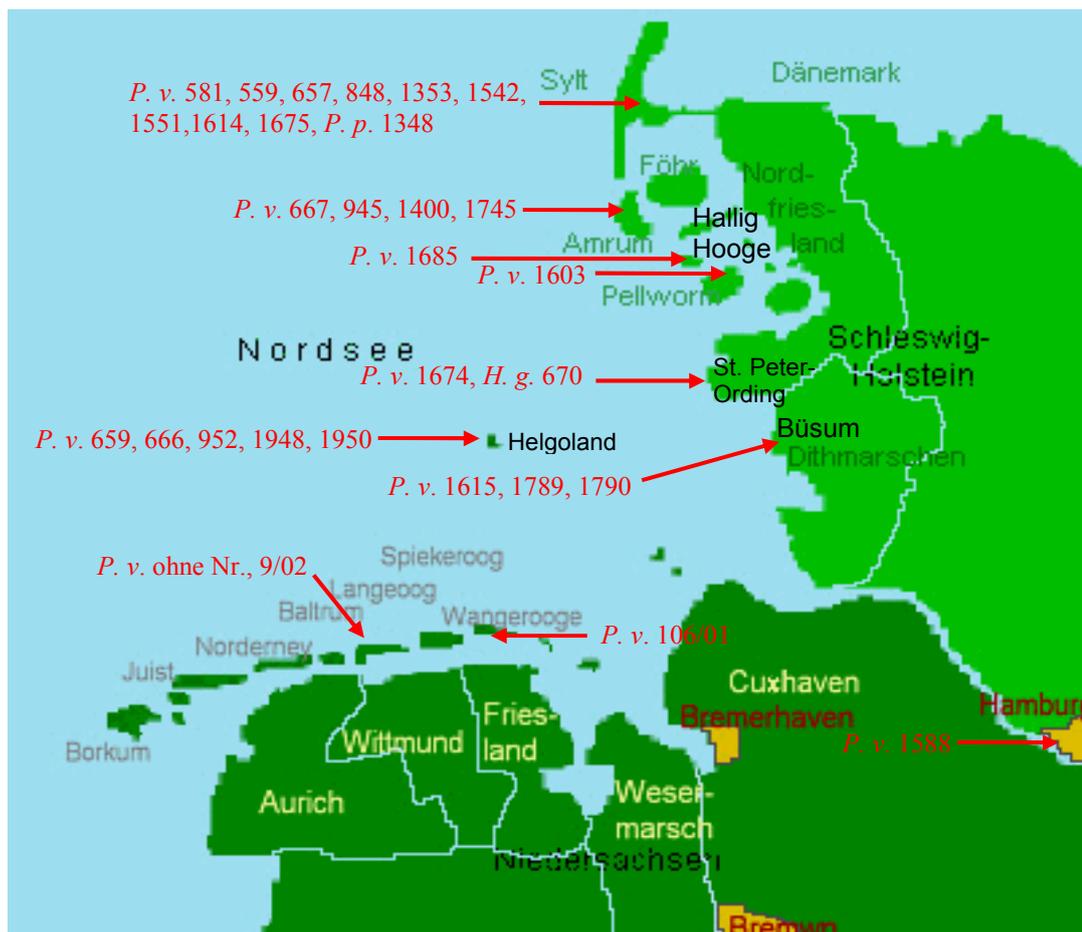


Abb. 3: Graphische Darstellung der Fundorte der 30 Meeressäuger, von denen brucellenverdächtige Kolonien isoliert werden konnten

Tab. 11: Funddaten der Meeressäuger

Tiernummer	Tierart	geschätztes Geburtsjahr	Geschlecht	Fundort	Funddatum
581	Seehund	1997	männlich	Wenningstedt / Sylt	30.09.1997
667	Seehund	1997	weiblich	Amrum	17.10.1997
559	Seehund	1997	männlich	Hörnum / Sylt	09.11.1997
657	Seehund	1997	männlich	List / Sylt	06.01.1998
659	Seehund	1997	männlich	Helgoland	14.03.1998
670	Kegelrobbe	1997	männlich	St. Peter Ording	14.03.1998
945	Seehund	1997	männlich	Amrum	15.03.1998
666	Seehund	1997	männlich	Helgoland	20.03.1998
952	Seehund	1997	weiblich	Helgoland	17.06.1998
848	Seehund	1997	weiblich	Westerland / Sylt	28.06.1998
1353	Seehund	1998	weiblich	Sylt	17.01.1999
1400	Seehund	1998	männlich	Amrum	02.03.1999
1348	Schweinswal	1999	weiblich	Sylt	16.07.1999
1542	Seehund	1999	weiblich	Hörnum / Sylt	27.12.1999
1551	Seehund	1999	weiblich	Westerland / Sylt	26.01.2000
1614	Seehund	1999	männlich	List / Sylt	14.06.2000
1615	Seehund	1999	männlich	Büsum	14.07.2000
1588	Seehund	2000	weiblich	Hamburger Hafen	01.08.2000
1603	Seehund	2000	weiblich	Pellworm	08.08.2000
1674	Seehund	2000	männlich	St. Peter Ording	04.01.2001
1675	Seehund	2000	männlich	Sylt	09.02.2001
1685	Seehund	2001	weiblich	Hallig Hooge	19.06.2001
1745	Seehund	2000	weiblich	Nebel / Amrum	21.07.2001
106/01	Seehund	2001	männlich	Wangerooge	28.09.2001
ohne Nummer	Seehund	2001	männlich	Langeoog	23.12.2001
9/02	Seehund	2001	männlich	Langeoog	21.02.2002
1789	Seehund	2001	weiblich	Büsum	31.10.2001
1790	Seehund	2001	weiblich	Büsum	06.11.2001
1948	Seehund	2001	männlich	Helgoland	04.02.2002
1950	Seehund	2001	männlich	Helgoland	08.12.2002

Die bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung der 30 Meeressäuger erhobenen Befunde sind in **Tabelle 12** zusammenfassend aufgeführt.

Tab. 12: Pathologische Befunde der Meeressäuger

Tier-Nr.	Pathologische Befunde
581	eitrige Polyarthrit; katarrhalische, verminöse Bronchopneumonie
667	eitrig abszedierende Bronchopneumonie
559	katarrhalisch-eitrige, verminöse Bronchopneumonie
657	granulomatöse, teils nekrotisierende, verminöse Bronchopneumonie
659	katarrhalisch-eitrige Bronchopneumonie
670	granulomatöse, teils eitrige, verminöse Bronchopneumonie
945	granulomatöse, teils nekrotisierende, verminöse Bronchopneumonie
666	granulomatöse, verminöse Bronchopneumonie
952	granulomatöse, verminöse Bronchopneumonie
848	granulomatös-eitrige, teils abszedierende, verminöse Bronchopneumonie
1353	katarrhalisch-eitrige, teils granulomatöse, verminöse Bronchopneumonie
1400	katarrhalisch-verminöse Bronchopneumonie
1348	Fettleber; unklarer perinataler Tod
1542	granulomatöse, verminöse Bronchopneumonie, granulomatöse, teils eitrig-nekrotisierende Gastritis mit finaler Sepsis
1551	granulomatöse, teils eitrige, verminöse Bronchopneumonie
1614	granulomatöse, teils eitrig-nekrotisierende, verminöse Bronchopneumonie
1615	granulomatöse, verminöse Bronchopneumonie
1588	Lungenblutungen, <i>E.coli</i> -Sepsis
1603	Abmagerung, Euthanasie
1685	Kryptosporidienenteritis
1745	hochgradiger Seehundlausbefall
106/01	Magendilatation, Herzwürmer, verminöse Bronchopneumonie
ohne Nummer	Magendilatation, Herzwürmer, Herztamponade

Tab. 12 (Fortsetzung): Pathologische Befunde der Meerssäuger

Tier-Nr.	Pathologische Befunde
9/02	Gastritits, paralytischer Ileus, verminöse Bronchopneumonie
1674	Bronchopneumonie
1675	Bronchopneumonie
1948	Bronchopneumonie
1950	Bronchopneumonie
1790	alveoläres, diffuses Lungenödem und -emphysem, verminöse Bronchopneumonie
1789	Abmagerung, Bronchopneumonie, Streptokokkensepsis

Die primäre Anzucht der 49 brucellenverdächtigen Bakterienisolate gelang ausschließlich unter kapnophilen Bedingungen bei einer CO₂-Spannung von 10 Vol.-%. Nach 5-tägiger Bebrütung bei 37°C stellten sich die Kulturen auf Brucellen-Agar als 0,5-2,5 mm große, runde, erhabene, glänzende, bläuliche Kolonien und auf Brain-Heart-Infusion-Agar als 0,5-3 mm große, runde, erhabene, glänzende, weißgräuliche Kolonien dar. Eine Hämolyse war nicht nachzuweisen.

Alle 49 Isolate wurden zur weiteren Identifizierung und Charakterisierung einer phänotypischen und genotypischen Untersuchung unterzogen.

4.2 Phänotypische Charakterisierung

4.2.1 Mikroskopische Morphologie

Alle 49 kultivierten marinen Bakterienisolate stellten sich in der Färbung nach GRAM als kleine, gramnegative, kokkoide Stäbchen dar. Eine Alkalifestigkeit aller 49 Isolate konnte mittels HANSEN-Färbung (Blaufärbung) bzw. mittels Brucellenfärbung nach KÖSTER und STAMP (Rotfärbung) nachgewiesen werden.

4.2.2 Biochemische Eigenschaften

Alle 49 Isolate zeigten eine positive Katalase- und Cytochromoxidaseaktivität.

Bei 48 Bakterienisolaten konnte nach 19 h eine Ureaseaktivität durch Farbumschlag des Indikators Phenolrot im Harnstoffagar detektiert werden. Der Stamm Nr. 20 zeigte bereits nach 3 Stunden eine positive Ureasereaktion.

Bei keinem der getesteten marinen Bakterienstämme konnte eine H₂S-Bildung nachgewiesen werden.

4.2.3 Farbstoffsensitivität

Keines der 49 marinen Bakterienisolate erwies sich als sensitiv gegenüber den basischen Farbstoffen Fuchsin und Safranin in den Konzentrationen 10, 20 und 40 µg/ml sowie gegenüber Thionin in den Konzentrationen 10 und 20 µg/ml.

48 Bakterienisolate wuchsen auf Agarplatten, die Thionin in einer Konzentration von 40 µg/ml enthielten. Der Stamm Nr. 8 hingegen erwies sich als sensitiv gegenüber der Thioninkonzentration von 40 µg/ml. In **Tabelle 13** sind die Ergebnisse der Farbstoffsensitivitätsprüfung im Vergleich zu den Kontrollstämmen zusammenfassend dargestellt.

Tab. 13: Ergebnisse der Farbstoffsensitivitätsprüfung

Isolat-Bezeichnung	F10	F20	F40	T10	T20	T40	S10	S20	S40
<i>B. „maris“</i> Nr. 1 - 7; 9 - 49	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. „maris“</i> Nr. 8	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Kontollstämmе	F10	F20	F40	T10	T20	T40	S10	S20	S40
<i>B. „maris“</i> 12890	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. „maris“</i> 12891	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. melitensis</i> 16M	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>B. melitensis</i> Özyurek	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>B. melitensis</i> 126.087	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>B. abortus</i> 544	+	+	+	-	-	-	+	+	+
<i>B. abortus</i> 1766/98	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>B. abortus</i> 6032/84	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>B. suis</i> 1330	-	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>B. suis</i> 103.707	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>B. canis</i> RM6/66	+	-	-	+	+	+	+	+	-
<i>B. ovis</i> 10512-03	+	+	+	+	+	+	+	+	+

F10 = Fuchsin 10 µg/ml

F20 = Fuchsin 20 µg/ml

F40 = Fuchsin 40 µg/ml

T10 = Thionin 10 µg/ml

T20 = Thionin 20 µg/ml

T40 = Thionin 40 µg/ml

S10 = Safranin 10 µg/ml

S20 = Safranin 20 µg/ml

S40 = Safranin 40 µg/ml

+ = Keimwachstum

- = Kein Keimwachstum

4.2.4 Phagenlysis

Die Phagen F1 und F25 (Bakteriophagen Weybridge) zeigten bei 46 Bakterienisolaten keine lytische Aktivität. Isolat Nr. 27 wies eine inkomplette Lysis bei der Phagenkonzentration 10^0 auf. Die Isolate Nr. 7 und 29 waren in Anwesenheit der Phagen F1 und F25 nicht anzüchtbar. In **Tabelle 14 und 15** sind die Ergebnisse der Phagenlysis im Vergleich zu den Kontrollstämmen aufgeführt.

Tab. 14: Ergebnisse der Phagenlysis durch den Phagen F1

Isolat-Bezeichnung	Kontrolle	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
<i>B. „maris“</i> Nr. 1 - 6, 8 – 26, 28, 30 – 49	W	W	W	W	W	W	W	W
<i>B. „maris“</i> Nr. 27	W	I	W	W	W	W	W	W
<i>B. „maris“</i> Nr. 7 und Nr. 29	-	-	-	-	-	-	-	-
Kontrollstämme	Kontrolle	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
<i>B. „maris“</i> 12890	W	W	W	W	W	W	W	W
<i>B. „maris“</i> 12891	W	W	W	W	W	W	W	W
<i>B. melitensis</i> 16M	W	I	P	W	W	W	W	W
<i>B. melitensis</i> Özyurek	W	K	I	P	W	W	W	W
<i>B. melitensis</i> 126.087	W	I	W	W	W	W	W	W
<i>B. abortus</i> 544	W	K	K	I	P	W	W	W
<i>B. suis</i> 103.707	W	W	W	W	W	W	W	W
<i>B. canis</i> RM6/66	W	W	W	W	W	W	W	W
<i>B. ovis</i> 10512-03	W	W	W	W	W	W	W	W

Kontrolle = sterile *Brucella*-Bouillon

W = Keimwachstum ohne Lysis

P = Plaques

I = inkomplette Lysis

K = Komplette Lysis

- = Kein Keimwachstum

Tab. 15: Ergebnisse der Phagenlysis durch den Phagen 25

Isolat-Bezeichnung	Kontrolle	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
<i>B. „maris“</i> Nr. 1 - 6, 8-26, 28, 30 – 49	W	W	W	W	W	W	W	W
<i>B. „maris“</i> Nr. 27	W	I	W	W	W	W	W	W
<i>B. „maris“</i> Nr. 7 und Nr. 29	-	-	-	-	-	-	-	-
Kontrollstämme	Kontrolle	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
<i>B. „maris“</i> 12890	W	W	W	W	W	W	W	W
<i>B. „maris“</i> 12891	W	W	W	W	W	W	W	W
<i>B. melitensis</i> 16M	W	I	W	W	W	W	W	W
<i>B. melitensis</i> Özyurek	W	K	I	P	W	W	W	W
<i>B. melitensis</i> 126.087	W	I	W	W	W	W	W	W
<i>B. abortus</i> 544	W	K	K	I	P	P	W	W
<i>B. suis</i> 103.707	W	W	W	W	W	W	W	W
<i>B. canis</i> RM6/66	W	W	W	W	W	W	W	W
<i>B. ovis</i> 10512-03	W	W	W	W	W	W	W	W

Kontrolle = sterile *Brucella*-Bouillon

W = Keimwachstum ohne Lysis

P = Plaques

I = inklompette Lysis

K = Komplette Lysis

- = Kein Keimwachstum

4.2.5 Antibiotikaempfindlichkeit

Alle 49 getesteten marinen Isolate sowie alle Brucellen-Kontrollstämme waren sensibel gegenüber Amoxycillin/Clavulansäure, Ampicillin, Chloramphenicol, Enrofloxacin, Gentamycin, Neomycin, Streptomycin und Tetracyclin. Die Empfindlichkeit gegenüber Cefalexin konnte bei *B. suis* Biovar 2 als intermediär bewertet werden, alle weiteren getesteten Isolate erwiesen sich als sensibel

gegenüber Cefalexin. Mit einer Ausnahme waren alle untersuchten Brucellen-Isolate empfindlich gegenüber Doxycyclin. *B. canis* zeigte gegenüber Doxycyclin eine intermediäre Empfindlichkeit. Gegenüber Sulfomethoxazol/Trimethoprim erwies sich nur das marine Feldisolat Nr. 22 als resistent. Gegenüber Penicillin waren 56 aller untersuchten Bakterienisolate sensibel; der marine Feldstamm Nr. 22 sowie der *B. „maris“* Referenzstamm 12891 zeigten eine intermediäre Empfindlichkeit und 4 klassische Brucellenstämme erwiesen sich als resistent gegenüber Penicillin. In **Tabelle 16** sind die Ergebnisse der Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung der 51 marinen Feldisolate sowie der zwei marinen Brucellen-Referenzstämme im Vergleich zu den 11 untersuchten klassischen Brucellen-Isolaten zusammenfassend dargestellt.

Tab. 16: Antibiotikaempfindlichkeit der 49 marinen Feldisolate sowie der zwei marinen Brucellen-Referenzstämme im Vergleich zu 11 klassischen Brucellen-Isolaten

Antibiotikum	Marine Isolate (n = 51)			Klassische Brucellen (n = 11)		
	resistent (%)	inter-mediär (%)	sensibel (%)	resistent (%)	inter-mediär (%)	sensibel (%)
Amoxicillin/ Clavulansäure	0	0	51 (100)	0	0	11 (100)
Ampicillin	0	0	51 (100)	0	0	11 (100)
Cefalexin	0	0	51 (100)	0	1 (9,1)	10 (90,9)
Chloramphenicol	0	0	51 (100)	0	0	11 (100)
Doxycyclin	0	0	51 (100)	0	1 (9,1)	10 (90,9)
Enrofloxacin	0	0	51 (100)	0	0	11 (100)
Gentamycin	0	0	51 (100)	0	0	11 (100)
Lincomycin	51 (100)	0	0	10 (90,9)	1 (9,1)	0
Neomycin	0	0	51 (100)	0	0	11 (100)
Penicillin	0	2 (3,9)	49 (96,1)	4 (36,4)	0	7 (63,6)
Streptomycin	0	0	51 (100)	0	0	11 (100)
Sulfomethoxazol/ Trimethoprim	1 (2)	0	50 (98)	0	0	11 (100)
Tetracyclin	0	0	51 (100)	0	0	11 (100)

4.2.6 NaCl-Empfindlichkeit

Alle 49 getesteten marinen Bakterienisolate sowie alle Brucellen-Kontrollstämme erwiesen sich als unempfindlich gegenüber einer NaCl-Konzentration von 1% im Nährmedium. Bei einer Konzentration von 1,5% NaCl war bei *B. suis* bv.2 und *B. ovis* kein Wachstum nachweisbar. In Anwesenheit von 2% NaCl konnten alle marinen Feldisolate sowie die zwei marinen Brucellen-Referenzstämme weiterhin angezüchtet werden, wohingegen das Wachstum aller klassischen Brucellen-Isolate vollständig unterdrückt wurde. Nur der Referenzstamm *B. „maris“* 12891 konnte bei einer NaCl-Konzentration von 2,5% und 3% weiterhin kultiviert werden. Bei einer Konzentration von 3,5% bzw. 4% NaCl im Nährmedium war ein Wachstum bei keinem der untersuchten Bakterienisolate feststellbar. Die NaCl-Empfindlichkeit der einzelnen Bakterienstämme ist in **Tabelle 17** zusammenfassend dargestellt.

Tab. 17: Wachstum ausgewählter Bakterienisolate bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen

Isolat- Bezeichnung	1% NaCl	1,5% NaCl	2% NaCl	2,5% NaCl	3% NaCl	3,5% NaCl	4% NaCl
<i>B. „maris“</i> Nr.5	+	+	+				
<i>B. „maris“</i> Nr.9	+	+	+				
<i>B. „maris“</i> Nr.20	+	+	+				
Kontrollstämme	1% NaCl	1,5% NaCl	2% NaCl	2,5% NaCl	3% NaCl	3,5% NaCl	4% NaCl
<i>B. „maris“</i> 12890	+	+	+				
<i>B. „maris“</i> 12891	+	+	+	+	+		
<i>B. melitensis</i> 16M	+	+					
<i>B. melitensis</i> 126.087	+	+					
<i>B. abortus</i> 544	+	+					
<i>B. suis</i> 103.707	+						
<i>B. canis</i> RM6/66	+	+					
<i>B. ovis</i> 10512-03	+						

+ = Wachstum

4.2.7 Lipopolysaccharidprofil

Bei allen 49 marinen Bakterienisolaten konnte mittels Objektträgeragglutination ein A-dominantes Lipopolysaccharidprofil nachgewiesen werden. Kein Isolat wies ein M- bzw. R-dominantes Lipopolysaccharidprofil auf. **Tabelle 18** stellt die Ergebnisse der Untersuchungen zum Lipopolysaccharidprofil der marinen Bakterienisolate im Vergleich zu den Brucellen-Kontrollstämmen dar.

Tab. 18: Ergebnisse der Untersuchungen zum Lipopolysaccharidprofil der marinen Bakterienisolate im Vergleich zu den Brucellen-kontrollstämmen (Objektträgeragglutination)

Stamm-Bezeichnung	Anti-A-Antiserum	Anti-M-Antiserum	Anti-R-Antiserum
<i>B. „maris“</i> Nr. 1 - 49	+	-	-
Kontrollstämme	Anti-A-Antiserum	Anti-M-Antiserum	Anti-R-Antiserum
<i>B. „maris“</i> 12890	+	-	-
<i>B. „maris“</i> 12891	+	-	-
<i>B. melitensis</i> 16M	-	+	-
<i>B. melitensis</i> Özyurek	+	-	-
<i>B. melitensis</i> 126.087	+	+	-
<i>B. melitensis</i> 875	-	+	-
<i>B. abortus</i> 544	+	-	-
<i>B. abortus</i> 1766/98	+	-	-
<i>B. abortus</i> 6032/84	-	+	-
<i>B. abortus</i> 747/67	-	+	-
<i>B. suis</i> 1330	+	-	-
<i>B. suis</i> 103.707	+	-	-
<i>B. canis</i> RM6/66	-	-	+
<i>B. canis</i> 126.518	-	-	+

+ = Agglutination

- = keine Agglutination

Alle 49 untersuchten marinen Bakterienisolate konnten anhand der durchgeführten phänotypischen Untersuchungen als Zugehörige der Gattung

Brucella identifiziert werden. Sie ließen sich aber keiner der sechs bekannten Brucellen-Spezies zuordnen.

4.3 Molekulargenetische Charakterisierung

Eine weitergehende Differenzierung der 49 marinen Brucellen-Isolate erfolgte anhand molekulargenetischer Untersuchungen des gattungsspezifischen *omp2*- und *IS711*-Lokus.

4.3.1 Nachweis des *Brucella*-gattungsspezifischen *omp2*-Lokus

Bei allen 49 isolierten marinen Brucellen konnte mittels PCR das für die Gattung *Brucella* spezifische *omp2a*-Gen mit einer Größe von 1234 bp sowie das *omp2b*-Gen mit einer Größe von 1231 bp nachgewiesen werden. In **Abbildung 4 und 5** sind die Amplifikate der *omp2a*- bzw. *omp2b*-Gene von fünf marinen Feldisolaten, des marinen Referenzstammes 12890 und von 5 klassischen Brucellenstämmen exemplarisch dargestellt. Entsprechende Amplifikate konnten mit Ausnahme von *B. abortus* auch bei allen untersuchten klassischen *Brucella* sp. nachgewiesen werden. Der Referenzstamm *B. abortus* 544 wies im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Brucellen-Isolaten ein kleineres *omp2a*-Amplifikat mit einer Größe von 1114 bp auf (nicht dargestellt).

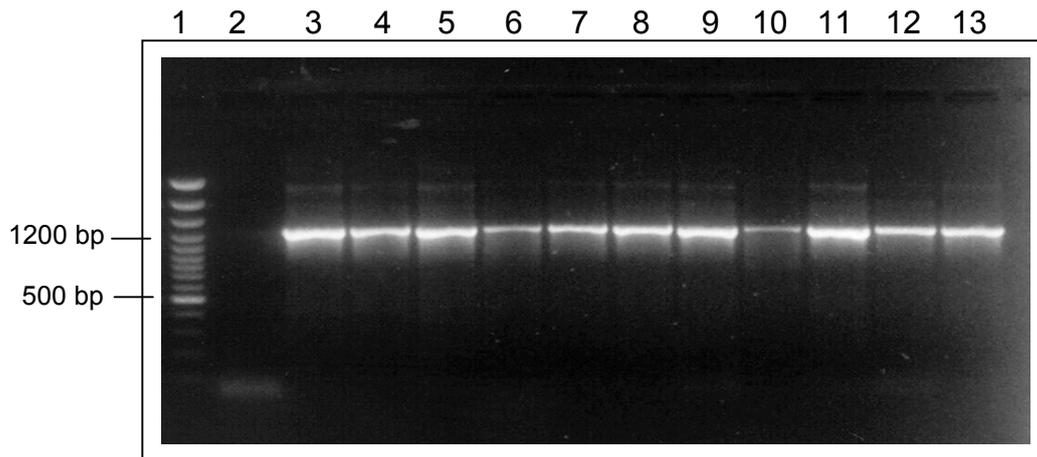


Abb. 4: Elektropherogramm von PCR-Amplifikaten zum Nachweis des *omp2a*-Gens bei *Brucella*-Isolaten (1,5%iges Agarosegel, 110 V, 60 min Laufzeit)

Spur 1: 100 bp-Ladder

Spur 2: Aqua bidest.

Spur 3: *B. „maris“* 12890

Spur 4: *B. suis* 1330

Spur 5: *B. suis* 103.707

Spur 6: *B. canis* RM6/66

Spur 7: *B. canis* 126.518

Spur 8: *B. „maris“* Stamm Nr. 32

Spur 9: *B. „maris“* Stamm Nr. 33

Spur 10: *B. „maris“* Stamm Nr. 34

Spur 11: *B. „maris“* Stamm Nr. 35

Spur 12: *B. „maris“* Stamm Nr. 36

Spur 13: *B. melitensis* Özyurek

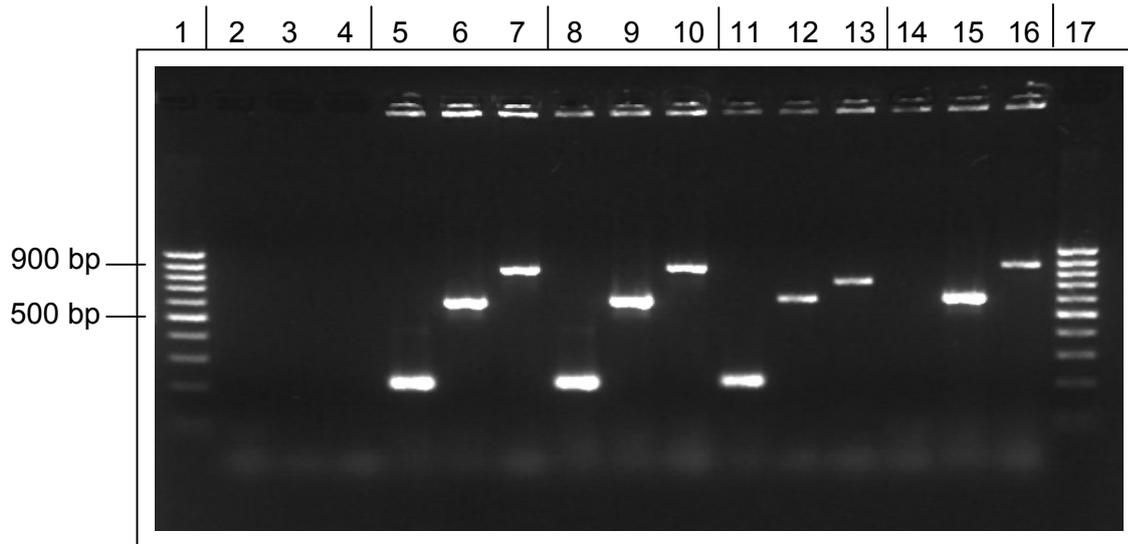


Abb. 5: Elektropherogramm von PCR-Amplifikaten zum Nachweis des *omp2b*-Gens bei *Brucella*-Isolaten (1,5%iges Agarosegel, 110 V, 60 min Laufzeit)

Spur 1: 100 bp-Ladder

Spur 2: Aqua bidest.

Spur 3: *B. „maris“* 12890

Spur 4: *B. suis* 1330

Spur 5: *B. suis* 103.707

Spur 6: *B. canis* RM6/66

Spur 7: *B. canis* 126.518

Spur 8: *B. „maris“* Stamm Nr. 32

Spur 9: *B. „maris“* Stamm Nr. 33

Spur 10: *B. „maris“* Stamm Nr. 34

Spur 11: *B. „maris“* Stamm Nr. 35

Spur 12: *B. „maris“* Stamm Nr. 36

Spur 13: *B. melitensis* Özyurek

4.3.2 PCR-Amplifikationsmuster des *omp2*-Lokus

Unter Verwendung der Primer 2AB5, 2AB200, 2B600 und 2A900, die innerhalb des *omp2a*- bzw. *omp2b*- Gens coamplifizieren, konnten für die klassischen Brucellen folgende Amplifikationsmuster nachgewiesen werden: *B. melitensis* 16M (Biovar 1), *B. melitensis* Özyurek (Biovar 2), *B. melitensis* 126.087 (Biovar 3) und *B. suis* 103.707 wiesen das Amplifikationsmuster I auf, das durch drei Banden mit einer Größe von 900, 600 und 200 bp repräsentiert wird. Das Amplifikationsmuster II mit einer 720, 600 und 200 bp-Bande wurde bei *B. abortus* 544 (Biovar 1) nachgewiesen. *B. canis* RM6/66 und *B. canis* 126.518 zeigten das Muster III mit einer 900 und 600 bp-Bande. Bei *B. ovis* 10512-03

wurde das Amplifikationsmuster IV mit einer 900 bp-Bande nachgewiesen (nicht in **Abbildung 6** dargestellt). Die bei den klassischen Brucellen ermittelten Amplifikationsmuster sind in **Abbildung 6** dargestellt.

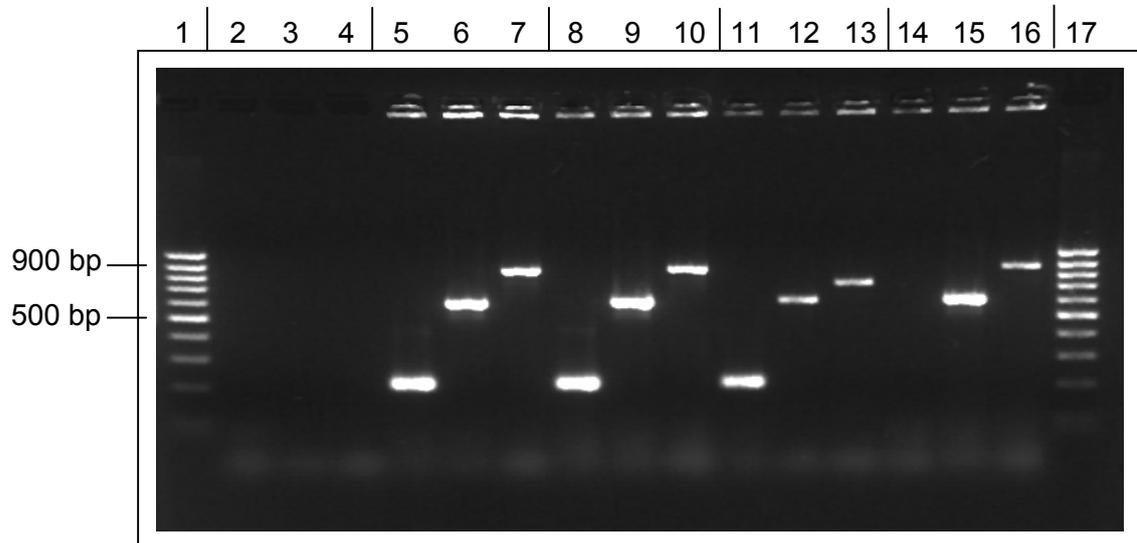


Abb. 6: Elektropherogramm von unterschiedlichen PCR-Amplifikationsmustern des *omp2*-Lokus klassischer *Brucella*-Isolate (2%iges Agarosegel, 90 V, 60 min Laufzeit)

Spur 1 und 17: 100 bp ladder

Spur 2: Aqua bidest., Primer 2AB5 und 2AB200

Spur 3: Aqua bidest., Primer 2AB5 und 2B600

Spur 4: Aqua bidest., Primer 2AB5 und 2A900

Spur 5: *B. melitensis* 16M, Primer 2AB5 und 2AB200

Spur 6: *B. melitensis* 16M, Primer 2AB5 und 2B600

Spur 7: *B. melitensis* 16M, Primer 2AB5 und 2A900

Spur 8: *B. suis* 103.707, Primer 2AB5 und 2AB200

Spur 9: *B. suis* 103.707, Primer 2AB5 und 2B600

Spur 10: *B. suis* 103.707, Primer 2AB5 und 2A900

Spur 11: *B. abortus* 544, Primer 2AB5 und 2AB200

Spur 12: *B. abortus* 544, Primer 2AB5 und 2B600

Spur 13: *B. abortus* 544, Primer 2AB5 und 2A900

Spur 14: *B. canis* RM6/66, Primer 2AB5 und 2AB200

Spur 15: *B. canis* RM6/66, Primer 2AB5 und 2B600

Spur 16: *B. canis* RM6/66, Primer 2AB5 und 2A900

Mittels der vier eingesetzten Primer konnte bei 48 der 49 untersuchten marinen Brucellen-Isolate sowie bei den marinen Referenzstämmen 12890 und 12891 das Amplifikationsmuster III nachgewiesen werden, welches durch zwei Banden mit einer Größe von 600 und 900 bp repräsentiert wird. Der *B. „maris“* Stamm Nr. 8 zeigte abweichend von allen anderen untersuchten marinen Isolat das Amplifikationsmuster IV mit einer Bande von 900 bp (**Abbildung 7**).

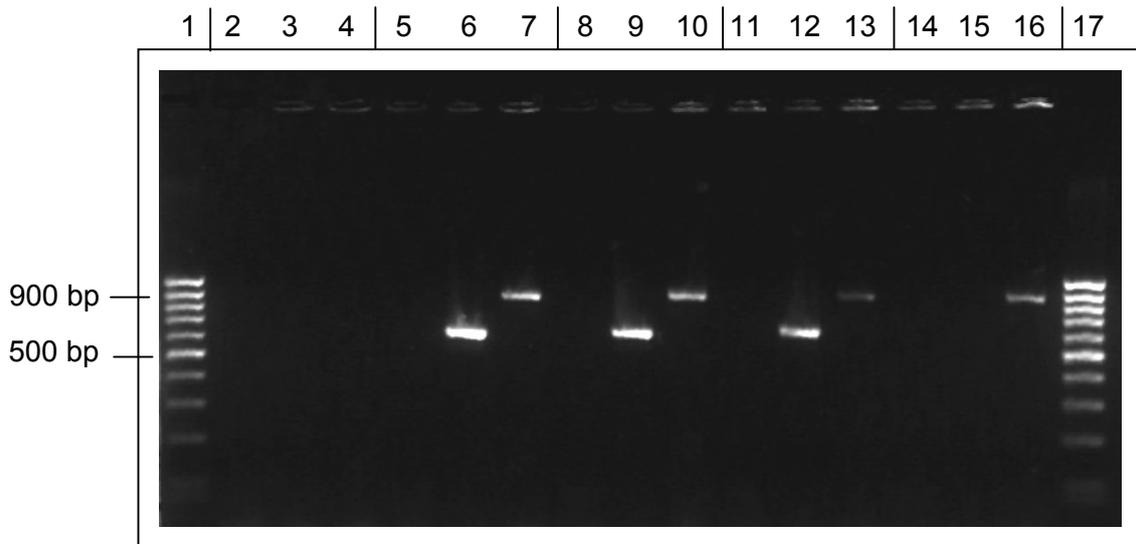


Abb. 7: Elektropherogramm von unterschiedlichen PCR-Amplifikationsmustern des *omp2*-Lokus marinen *Brucella*-Isolaten (2%iges Agarosegel, 90 V, 60 min Laufzeit)

Spur 1 und 17: 100 bp ladder

Spur 2: *E. coli*, Primer 2AB5 und 2AB200

Spur 3: *E. coli*, Primer 2AB5 und 2B600

Spur 4: *E. coli*, Primer 2AB5 und 2A900

Spur 5: *B. „maris“* 12891, Primer 2AB5 und 2AB200

Spur 6: *B. „maris“* 12891, Primer 2AB5 und 2B600

Spur 7: *B. „maris“* 12891, Primer 2AB5 und 2A900

Spur 8: *B. „maris“* 12890, Primer 2AB5 und 2AB200

Spur 9: *B. „maris“* 12890, Primer 2AB5 und 2B600

Spur 10: *B. „maris“* 12890, Primer 2AB5 und 2A900

Spur 11: *B. „maris“* Stamm Nr. 2, Primer 2AB5 und 2AB200

Spur 12: *B. „maris“* Stamm Nr. 2, Primer 2AB5 und 2B600

Spur 13: *B. „maris“* Stamm Nr. 2, Primer 2AB5 und 2A900

Spur 14: *B. „maris“* Stamm Nr. 8, Primer 2AB5 und 2AB200

Spur 15: *B. „maris“* Stamm Nr. 8, Primer 2AB5 und 2B600

Spur 16: *B. „maris“* Stamm Nr. 8, Primer 2AB5 und 2A900

4.3.3 PCR-RFLP-Muster des *omp2*-Lokus

Unter Verwendung der Primerpaare 2aA/2aB und 2bA/2bB, die das gesamte *omp2a*- und *omp2b*-Gen coamplifizieren, und durch eine anschließende Restriktionsanalyse mit 13 Enzymen (nach CLOECKAERT *et al.*, 1995) konnten bei den untersuchten **klassischen** Brucellenstämmen für das *omp2a*-Gen 6 unterschiedliche Restriktionsmuster (A-E, G) nachgewiesen werden. Die Restriktionsanalyse des *omp2b*-Gens führte zur Identifizierung von 5 verschiedenen *omp2b*-Varianten (Restriktionsmuster A, B, E, G, H).

Die Ergebnisse der PCR-RFLP-Studien der untersuchten klassischen Brucellenstämmen sind in **Tabelle 19** aufgeführt.

Tab. 19: Ergebnisse der PCR-RFLP-Studien des *omp2*-Lokus der klassischen Brucellenstämmen

Stamm-Bezeichnung	Restriktionsmuster	
	<i>omp2a</i> -Gen	<i>omp2b</i> -Gen
<i>B. melitensis</i> 16M	C	B
<i>B. melitensis</i> Özyurek	B	E
<i>B. melitensis</i> 126.087	B	E
<i>B. melitensis</i> 875	B	B
<i>B. abortus</i> 544	A	A
<i>B. abortus</i> 1766/98	B	B
<i>B. abortus</i> 6032/84	neues Muster	B
<i>B. abortus</i> 747/67	B	B
<i>B. suis</i> 1330	D	B
<i>B. suis</i> 103.707	E	B
<i>B. ovis</i> 10512-03	G	H
<i>B. canis</i> RM6/66	D	G
<i>B. canis</i> 126.518	D	G

Die Untersuchung der **marinen** Brucellen-Isolate lieferte für den Referenzstamm *B. „maris“* 12890 das Muster I für das *omp2a*-Gen und das Muster L für das *omp2b*-Gen. Beim Referenzstamm *B. „maris“* 12891 konnte für das *omp2a*-Gen das Restriktionsmuster J und für das *omp2b*-Gen das Muster M nachgewiesen werden. Alle 49 untersuchten marinen Feldisolates wiesen das Restriktionsmuster I für das *omp2a*-Gen auf (**Abbildung 8**). Für das *omp2b*-Gen konnte das Restriktionsmuster L bei 44 Feldisolaten nachgewiesen werden (**Abbildung 9**). Fünf marine Isolate wiesen im Vergleich zu den anderen untersuchten Feldisolaten unterschiedliche *omp2b*-Restriktionsmuster auf.

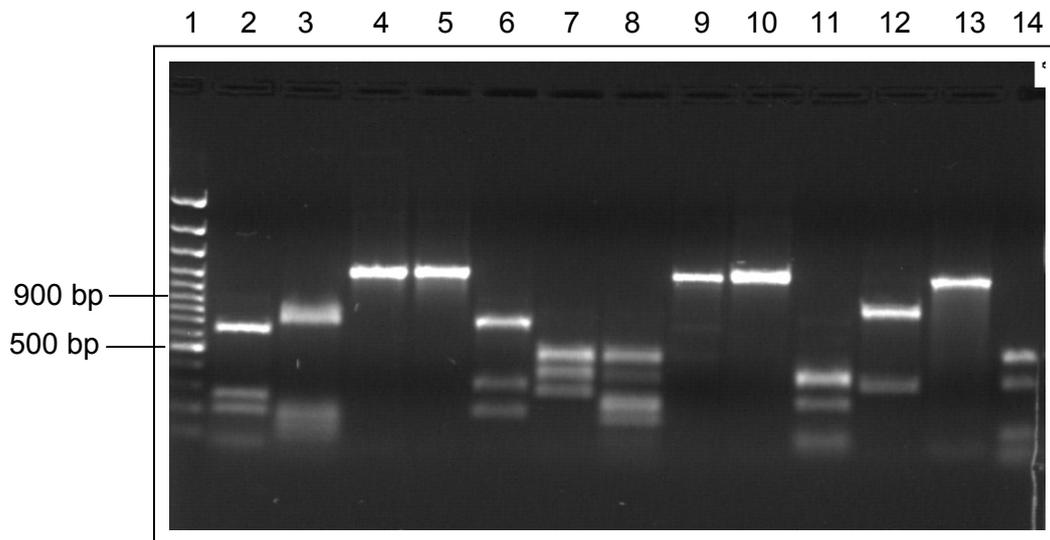


Abb. 8: Elektropherogramm nach Restriktion des *omp2a*-Gens des marinen Feldisolates Nr. 17 mit 13 Restriktionsenzymen), Restriktionsmuster I (1,5%iges Agarosegel, 120 V, 70 min Laufzeit)

Spur 1: 100bp ladder plus

Spur 2: *AluI*

Spur 3: *BanI*

Spur 4: *BglII*

Spur 5: *Clal*

Spur 6: *EcoRI*

Spur 7: *HaeIII*

Spur 8: *HinIII*

Spur 9: *KpnI*

Spur 10: *NcoI*

Spur 11: *PstI*

Spur 12: *PvuI*

Spur 13: *StyI*

Spur 14: *TaqI*

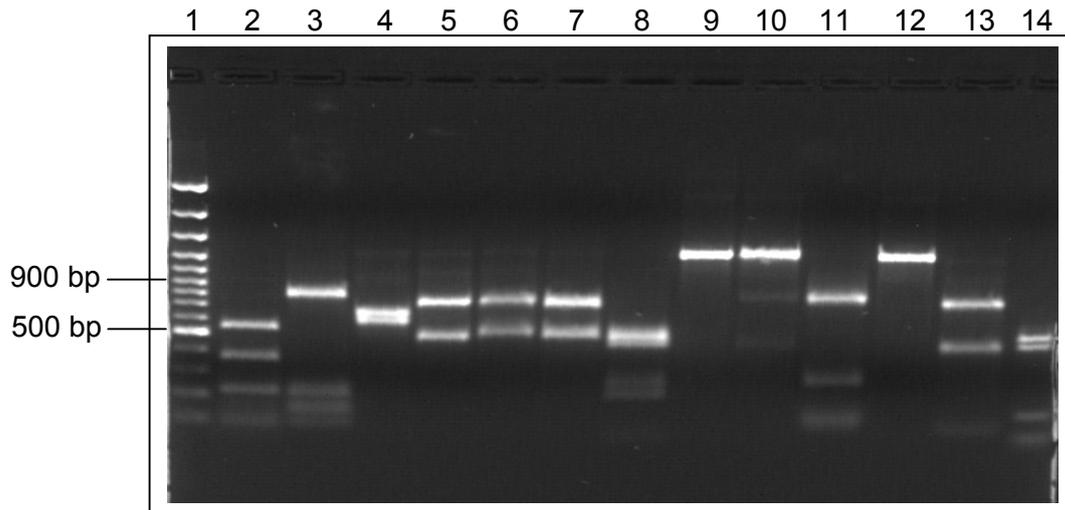


Abb. 9: Elektropherogramm nach Restriktion des *omp2b*-Gens des marinen Feldisolates Nr. 17 mit 13 Restriktionsenzymen, Restriktionsmuster L (1,5%iges Agarosegel, 120 V, 70 min)

Spur 1: 100bp ladder plus

Spur 2: *AluI*

Spur 3: *BanI*

Spur 4: *BglII*

Spur 5: *ClaI*

Spur 6: *EcoRI*

Spur 7: *HaeIII*

Spur 8: *HinfIII*

Spur 9: *KpnI*

Spur 10: *NcoI*

Spur 11: *PstI*

Spur 12: *PvuI*

Spur 13: *StyI*

Spur 14: *TaqI*

Im Einzelnen wurde für das marine Feldisolat Nr. 9 das Restriktionsmuster O und für das Isolat Nr. 44 das Restriktionsmuster M für das *omp2b*-Gen nachgewiesen. Das *omp2b*-Gen des Brucellen-Isolates Nr. 22 konnte aufgrund des *EcoRI*-Restriktionsmusters keinem der bisher beschriebenen Muster zugeordnet werden. Bei der Restriktion des *omp2b*-Gens der Isolate Nr. 8 und Nr. 10 ergaben die Enzyme *BanI*, *HinfI*, *KpnI*, *NcoI* und *TaqI* identische, aber bisher nicht beschriebene Restriktionsmuster. Das *omp2a*-Muster dieser beiden Isolate war abgesehen von den Restriktionsmustern mit den Enzymen *EcoRI* und *HinfIII* identisch mit dem *omp2b*-Restriktionsmuster. In **Abbildung 10 und 11** sind exemplarisch die *omp2a*- und *omp2b*-Restriktionsmuster des Isolates Nr. 8 dargestellt. Das Isolat Nr. 10 wies bei der Restriktion mit der Endonuclease *EcoRI* ein weiteres bisher nicht beschriebenes *omp2b*-

Restriktionsmuster auf. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der PCR-RFLP-Studien der untersuchten marinen Brucellen-Isolate gibt **Tabelle 20**.

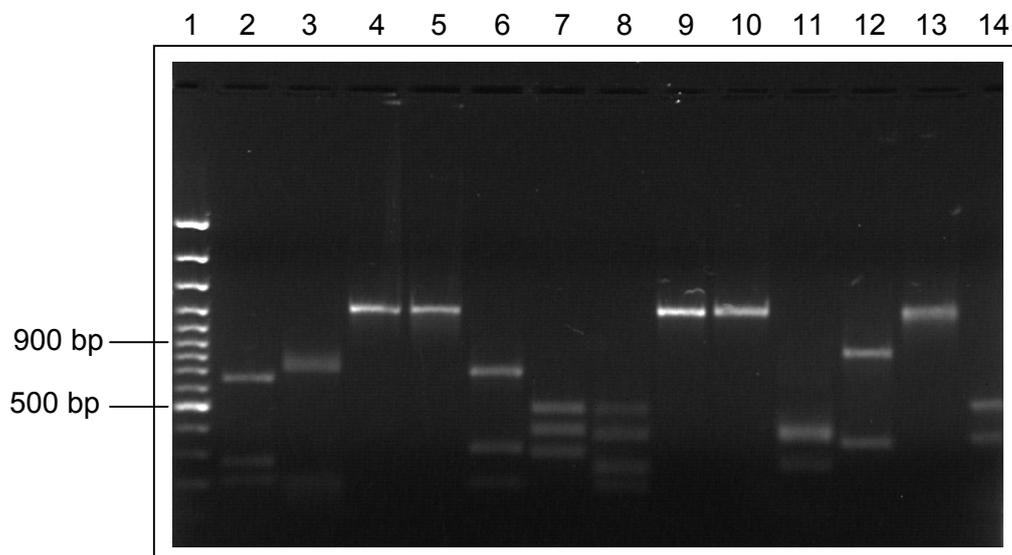


Abb. 10: Elektropherogramm nach Restriktion des *omp2a*-Gens des marinen Feldisolates Nr. 8 mit 13 Restriktionsenzymen (1,5%iges Agarosegel, 110 V, 70 min Laufzeit)

Spur 1: 100bp ladder plus

Spur 2: *AluI*

Spur 3: *BanI*

Spur 4: *BglII*

Spur 5: *Clal*

Spur 6: *EcoRI*

Spur 7: *HaeIII*

Spur 8: *HinIII*

Spur 9: *KpnI*

Spur 10: *NcoI*

Spur 11: *PstI*

Spur 12: *PvuI*

Spur 13: *StyI*

Spur 14: *TaqI*

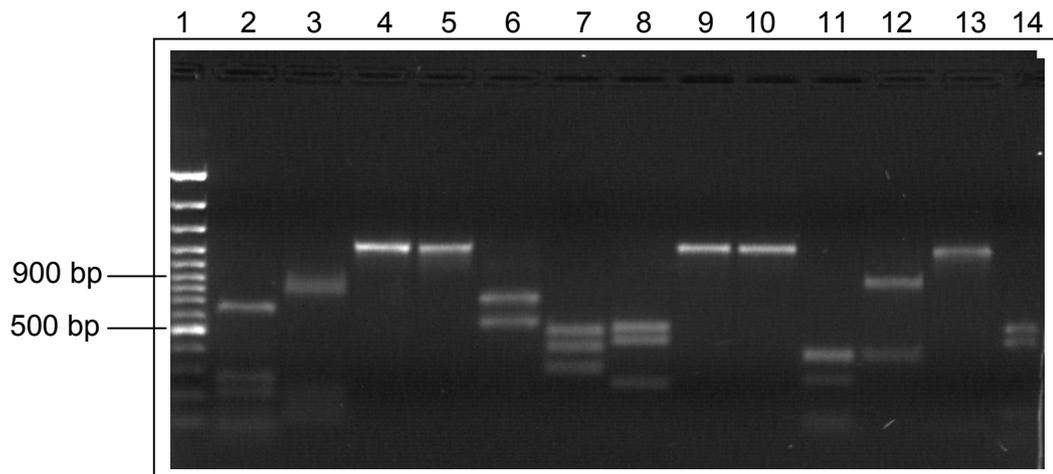


Abb. 11: Elektropherogramm nach Restriktion des *omp2b*-Gens des marinen Feldisolates Nr. 8 mit 13 Restriktionsenzymen (1,5%iges Agarosegel, 120 V, 60 min Laufzeit)

Spur 1: 100bp ladder plus

Spur 2: *AluI*

Spur 3: *BamI*

Spur 4: *BglII*

Spur 5: *ClaI*

Spur 6: *EcoRI*

Spur 7: *HaeIII*

Spur 8: *HinfIII*

Spur 9: *KpnI*

Spur 10: *NcoI*

Spur 11: *PstI*

Spur 12: *PvuI*

Spur 13: *StyI*

Spur 14: *TaqI*

Tab. 20: Ergebnisse der PCR-RFLP-Studien am *omp2*-Lokus der marinen Brucellen-Isolate

Stamm-Bezeichnung	Tierart	Restriktionsmuster	
		<i>omp2a</i> -Gen	<i>omp2b</i> -Gen
<i>B. „maris“</i> NCTC 12890	Seehund	I*	L*
<i>B. „maris“</i> NCTC 12891	Schweinswal	J	M
<i>B. „maris“</i> Nr. 1-7, 11, 13-21, 23-43, 45-49	Seehund	I	L
<i>B. „maris“</i> Nr. 8	Seehund	I	neues Muster
<i>B. „maris“</i> Nr. 9	Kegelrobbe	I	O
<i>B. „maris“</i> Nr. 10	Seehund	I	neues Muster
<i>B. „maris“</i> Nr. 12	Schweinswal	I	L
<i>B. „maris“</i> Nr. 22	Seehund	I	neues Muster
<i>B. „maris“</i> Nr. 44	Seehund	I	M

* Erläuterung der Restriktionsmuster siehe S. 17

4.3.4 Amplifikation des *omp2*-Lokus mittels XL-PCR

Mittels XL-PCR konnte unter Verwendung der Primerpaare 2aA/2aB sowie 2bA/2bB das gesamte *omp2a*- und *omp2b*-Gen des marinen Feldisolates Nr. 8 mit einer Größe von 1230 bp amplifiziert werden. Die gewonnenen Amplikons wurden nachfolgend in einer DNS-Sequenzanalyse eingesetzt.

4.3.5 Sequenzanalyse des *omp2*-Lokus

Mittels Doppelstrangdideoxysequenzierung (SANGER *et al.*, 1977) der nach 4.3.4 gewonnenen *omp2*-Amplifikate des marinen Feldisolates Nr. 8 konnten die in **Abbildung 12** und **13** dargestellten Nukleotidsequenzen und die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen ermittelt werden. Die Sequenzen wurden in der Gendatenbank unter den Zugangsnummern DQ059380 und DQ059381 abgelegt.

Ergebnisse

```

1  ATGAACATCAAGAGCCTTCTCCTTGGCTCCGCTGCAGCTCTGGTTGCAGCTTCCGGCGCT
1  M N I K S L L L G S A A A L V A A S G A

61  CAGGCTGCCGACGCAATCGTCGCGCCAGAGCCCGAAGCCGTTGAATATGTCCGCGTTTGC
21  Q A A D A I V A P E P E A V E Y V R V C

121 GACGCTTACGGCGCTGGCTACTTCTACATTCCGGGCACCGAAACCTGCCTGCGCATCAGC
41  D A Y G A G Y F Y I P G T E T C L R I S

181 GGCTACGTCCGTTACGACGTAAAGGGCGGCGACGACGTTTATACCGGCTCGGATCGTAAA
61  G Y V R Y D V K G G D D V Y T G S D R K

241 GGCTGGGACAAGGGCGCTCGTTTTGCACTCATGTTCAACACGAATTCGGAAACCGAACTC
81  G W D K G A R F A L M F N T N S E T E L

301 GGCACACTCGGCACCTATACTCAGCTGCGCTTCAACTACACCAGCAACAATTCACGTCAT
101 G T L G T Y T Q L R F N Y T S N N S R H

361 GATGGCCAATACGGCGATTTTCAGCGATGATCGTGATGTCGCTGATGGCGGCGTAAGCACC
121 D G Q Y G D F S D D R D V A D G G V S T

421 GGCACCGATCTGCAGTTTGCATATATCACGCTTGGTGGTTTTCAAGGTTGGTATCGACGAA
141 G T D L Q F A Y I T L G G F K V G I D E

481 TCCGAATTCATACCTTCACCGGTTACCTCGGTGATGTCATCAACGATGATGTCGTCGCT
161 S E F H T F T G Y L G D V I N D D V V A

541 GCTGGCTCCTACCGCACCGGCAAGATCGCCTACACCTTCACCGGCGGAAACGGCTTCTCG
181 A G S Y R T G K I A Y T F T G G N G F S

601 GCTGTGATCGCTCTCGAACAGGGTGGCGAAGACGTTGACAACGATTACACGATCGACGGT
201 A V I A L E Q G G E D V D N D Y T I D G

661 TACATGCCGCACGTTGTTGGCGGCCTGAAATATGCTGGCGGCTGGGGTTTCGATCGCTGGT
221 Y M P H V V G G L K Y A G G W G S I A G

721 GTTGTTCCTATGACTCGGTCATCGAAGAATGGGCTACAAAGGTTTCGTGGCGACGTC AAC
241 V V A Y D S V I E E W A T K V R G D V N

781 ATCACCGACCGGTTCTCGGTATGGCTGCAGGGCGCATATTCGTCCGCGAGCGACGCCGAAC
261 I T D R F S V W L Q G A Y S S A A T P N

841 CAGAACTACGGTCAGTGGGGCGGCGATTGGGCTGTCTGGGGTGGTGCAAAGTTCATTGCC
281 Q N Y G Q W G G D W A V W G G A K F I A

901 ACCGAAAAGGCAACCTTCAATCTGCAGGCTGCGCATGACGACTGGGGCAAGACCGCAGTT
301 T E K A T F N L Q A A H D D W G K T A V

961 ACCGCCAACGTCGCTTATCAGCTCGTTCCCGGATTCACCATTACGCCGGAAGTTTCTCTAC
321 T A N V A Y Q L V P G F T I T P E V S Y

1021 ACCAAATTTGGTGGCGAGTGGAAAGACACCGTTGCTGAAGACAATGCCTGGGGCGGTATC
341 T K F G G E W K D T V A E D N A W G G I

1081 GTTCGCTTCCAGCGCTCGTTCTAA  NS
361 V R F Q R S F *  AS

```

Abb. 12: Nukleotidsequenz (NS) und abgeleitete Aminosäuresequenz (AS) des *omp2a*-Gens des marinen Feldisolates Nr. 8

Ergebnisse

```

1  ATGCCCAGACCCATTTTTAACTTTGACTGGAGGTCAGAAATGAACATCAAGAGCCTTCTC
1  M P R P I F N F D W R S E M N I K S L L

61  CTTGGCTCCGCTGCAGCTCTGGTTGCAGCTTCCGGCGCTCAGGCTGCCGACGCAATCGTC
21  L G S A A A L V A A S G A Q A A D A I V

121  GCGCCAGAGCCCCGAAGCCGTTGAATATGTCCGCGTTTTCGACGCTTACGGCGCTGGCTAC
41  A P E P E A V E Y V R V C D A Y G A G Y

181  TTCTACATTCCGGGCACCGAAACCTGCCTGCGCATCAGCGGCTACGTCCGTTACGACGTA
61  F Y I P G T E T C L R I S G Y V R Y D V

241  AAGGGCGGCGACGACGTTTATACCGGCTCGGATCGTAAAGGCTGGGACAAGAGCGCTCGT
81  K G G D D V Y T G S D R K G W D K S A R

301  TTCGCACTCCGCGTTTCCACCGGTTTCGAAACCGAACTCGGCACACTCGGCACCTATACT
101  F A L R V S T G S E T E L G T L G T Y T

361  CAGCTGCGCTTCAACTACACCAGCAACAATTCACGTCATGATGGCCAATACGGCGATTTTC
121  Q L R F N Y T S N N S R H D G Q Y G D F

421  AGCGATGATCGTGATGTCGCTGATGGCGGCGTAAGCACCGGCACCGATCTGCAGTTTGA
141  S D D R D V A D G G V S T G T D L Q F A

481  TATATCACGCTTGGTGGTTTTCAAGGTTGGTATCGACGAATCCGAATTCATACCTTACC
161  Y I T L G G F K V G I D E S E F H T F T

541  GGTTACCTCGGTGATGTCATCAACGATGATGTCGTCGCTGCTGGCTCCTACCGCACCGGC
181  G Y L G D V I N D D V V A A G S Y R T G

601  AAGATCGCCTACACCTTCCACCGGCGGAAACGGCTTCTCGGCTGTGATCGCTCTCGAACAG
201  K I A Y T F T G G N G F S A V I A L E Q

661  GGTGGCGAAGACGTTGACAACGATTACACGATCGACGTTACATGCCGCACGTTGTTGGC
221  G G E D V D N D Y T I D G Y M P H V V G

721  GGCCTGAAATATGCTGGCGGCTGGGGTTCGATCGCTGGTGTGTTGCCTATGACTCGGTC
241  G L K Y A G G W G S I A G V V A Y D S V

781  ATCGAAGAATGGGCTACAAAGGTTTCGTGGCGACGTCAACATCACCGACCGGTTCTCGGTA
261  I E E W A T K V R G D V N I T D R F S V

841  TGGCTGCAGGGCGCATATTCGTCCGCAGCGACGCCGAACCAGAACTACGGTCAGTGGGGC
281  W L Q G A Y S S A A T P N Q N Y G Q W G

901  GCGGATTGGGCTGTCTGGGGTGGTGCAAAGTTCATTGCCACCGAAAAGGCAACCTTCAAT
301  G D W A V W G G A K F I A T E K A T F N

961  CTGCAGGCTGCGCATGACGACTGGGGCAAGACCGCAGTTACCGCCAACGTCGCTTATCAG
321  L Q A A H D D W G K T A V T A N V A Y Q

1021  CTCGTTCCCGGCTTACCGTTACGCCGGAAGTTTCTACACCAAGTTTGGTGGCGAGTGG
341  L V P G F T V T P E V S Y T K F G G E W

1081  AAGAACACCGTTGCTGAAGACAATGCTTGGGGCGGTATCGTTTCGCTTCCAGCGTTCGTTTC
361  K N T V A E D N A W G G I V R F Q R S F

1141  TAA  NS
381  *   AS

```

Abb. 13: Nukleotidsequenz (NS) und abgeleitete Aminosäuresequenz (AS) des *omp2b*-Gens des marinen Feldisolates Nr. 8

Die für das *omp2a*- und *omp2b*-Gen ermittelten Sequenzen des marinen Feldisolates Nr. 8 wurden mittels des Computerprogrammes MegAlign anhand der ClustalW (Slow/Accurate, IUB) - Methode miteinander sowie mit den bereits veröffentlichten *omp2*-Lokussequenzen U26440 (*B. melitensis*), U26438 (*B. abortus*), U26439 (*B. canis*), U26441 (*B. neotomae*), U26442 (*B. ovis*), U26443 (*B. suis*), AF027601 (Brucellenfeldisolat B202R von einem Minkwal) und den *omp2a*- und *omp2b*-Gensequenzen AF300820 und AF300821 (Brucellenfeldisolat 7763/2 von einem Flaschennasendelphin), AF300818 und AF300819 (Brucellenfeldisolat B2/94 von einem gemeinen Seehund), AF300816 und AF300817 (Brucellenfeldisolat B1/94 von einem Schweinswal) und AF300814 und AF300815 (Brucellenfeldisolat B14/94 von einem Delfin) verglichen. Ein anhand der Sequenzvergleiche erstellter phylogenetischer Stammbaum inklusive der ermittelten, über 70% liegenden Bootstrap-Ergebnisse ist in **Abbildung 14** dargestellt. Für die *omp2a*- und *omp2b*-Nukleotidsequenzen des marinen Feldisolates Nr. 8 wurde eine Sequenzhomologie von 98,4% ermittelt. Der Vergleich der *omp2a*-Sequenz des marinen Feldisolates Nr. 8 mit der *omp2a*-Sequenz AF300819 eines gemeinen Seehundes zeigte eine Übereinstimmung von 100%. Dieser Verwandtschaftsgrad wird durch Bootstrap-Werte von 95% unterstützt. Die *omp2a*-Sequenz des Feldisolates Nr. 8 zeigte mit 14% die größte Divergenz (errechnet durch den Sequenzvergleich in Relation zur Phylogenie von MegAlign) im Vergleich zu den *omp2b*-Sequenzen von *B. abortus*, *B. melitensis* und *B. suis*. Die *omp2b*-Sequenz des Feldisolates Nr. 8 wies mit 12% die größte Divergenz im Vergleich mit der *omp2b*-Sequenz von *B. melitensis* auf.

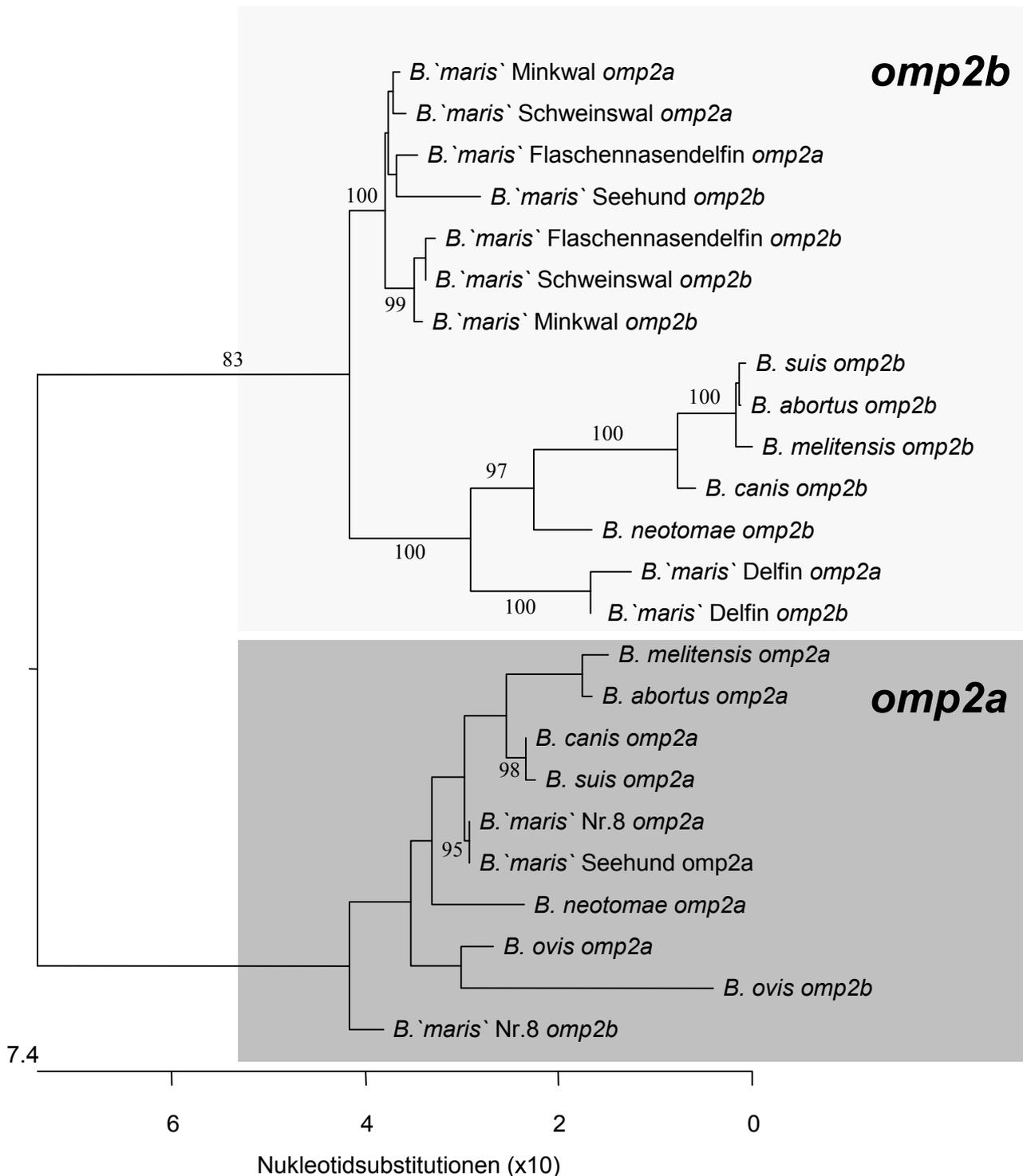


Abb. 14: Stammbaum unterschiedlicher Brucellen-Isolate nach Vergleich der *omp2a*- und *omp2b*-Gensequenzen
 (Vergleich der Sequenzen mit ClustaW [Slow/Accurate, IUB], Erstellung des Stammbaums mit der Neighbor-joining-Methode, Angabe der >70% liegenden Bootstrap-Werte)

4.3.6 Nachweis des gattungsspezifischen *IS711*-Lokus

Mit dem Primerpaar IR1/IR2 konnte bei allen untersuchten *Brucella*-Isolaten das gattungsspezifische *IS711*-Gen mit einer Größe von 849 bp amplifiziert werden (Abbildung 15).

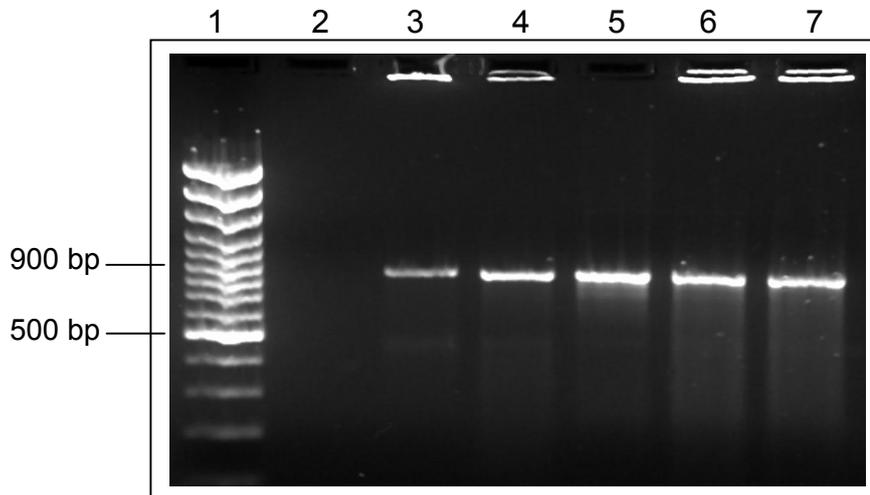


Abb. 15: Elektropherogramm von PCR-Amplifikaten zum Nachweis des *IS711*-Lokus bei Brucellen (2%iges Agarosegel, 80 V, 60 min Laufzeit)

Spur 1: 100 bp ladder plus

Spur 2: Aqua bidest.

Spur 3: *B. melitensis* 16M

Spur 4: *B. „maris“* 12890

Spur 5: *B. „maris“* Stamm Nr. 9

Spur 6: *B. „maris“* Stamm Nr. 12

Spur 7: *B. „maris“* Stamm Nr. 37

4.3.7 *IS711*-Fingerprinting

Da das gattungsspezifische repetitive Insertionselement *IS711* eine weitere Möglichkeit zur molekularen Differenzierung von *Brucella* sp. bietet, wurde die unterschiedliche Anzahl und Verteilung der *IS711*-Kopien durch Southern Blot-Analyse von *EcoRI*-verdauter genomischer DNS, die mit einer Digoxigenin-markierten *IS711*-Sonde hybridisiert wurde, untersucht. Alle untersuchten klassischen Brucellenspezies, mit Ausnahme von *B. ovis* 10512-03, wiesen

eine deutlich geringere Kopienanzahl im Vergleich zu den marinen Brucellen-Isolaten auf. Im Einzelnen konnte bei *B. melitensis* 16M und *B. melitensis* 875 (beide Biovar 1) sowie bei *B. abortus* 1766/98 (Biovar 3) ein einheitliches Hybridisierungsmuster mit 5 *IS711*-Kopien nachgewiesen werden (**Abbildung 16**). Das Hybridisierungsmuster von *B. abortus* 544 (Biovar 1) und *B. abortus* 6032/84 (Biovar 4) war gekennzeichnet durch ein übereinstimmendes Muster mit 6 *IS711*-Kopien (**Abbildung 17**). *B. melitensis* Özyurek (Biovar 2) und *B. melitensis* 126.087 (Biovar 3) zeigten ebenfalls einheitliche Hybridisierungsmuster mit jeweils 8 *IS711*-Kopien (**Abbildung 16**). Bei *B. suis* 1330 (Biovar 1) konnten 6 *IS711*-Kopien detektiert werden, *B. suis* 103.707 (Biovar 2) wies hingegen 12 *IS711*-Kopien auf. Bei *B. canis* RM6/66 wurden nur 4 *IS711*-Kopien nachgewiesen (**Abbildung 16**).

Alle 49 untersuchten marinen Brucellen-Isolate zeigten jeweils übereinstimmende Hybridisierungsmuster mit 23 *IS711*-Kopien (**Abbildung 17, 18 und 19**). Der von einem Seehund isolierte Referenzstamm *B. „maris“* 12890 war nur durch eine zusätzliche *IS711*-Kopie auf einem 3000 bp-großen *EcoRI*-Fragment von den eigenen marinen Feldisolaten zu unterscheiden. Bei dem von einem Schweinswal isolierten Referenzstamm *B. „maris“* 12891 konnten neben der genannten Kopie auf dem 3000 bp-Fragment noch zwei weitere *IS711*-Kopien detektiert werden (**Abbildung 17**). *B. ovis* 10512-03 wies mit ca. 19 Kopien als einziger klassischer Brucellenstamm eine ähnlich hohe *IS711*-Kopienanzahl wie die marinen Isolate auf (**Abbildung 18**). Bei allen untersuchten marinen Brucellen-Isolaten wurde ein gemeinsamer *IS711*-Genlocus auf einem 1,7 kb-*EcoRI*-Fragment nachgewiesen, der bei keinem der klassischen Brucellenstämme nachgewiesen wurde und damit als spezifisch für die marinen Isolate identifiziert werden konnte (**Abbildung 17**).

Bei den Stämmen *B. abortus* 747/67 und *B. canis* 126.518 war eine Visualisierung von *IS711*-Kopien nicht möglich (**Abbildung 17 und 19**).

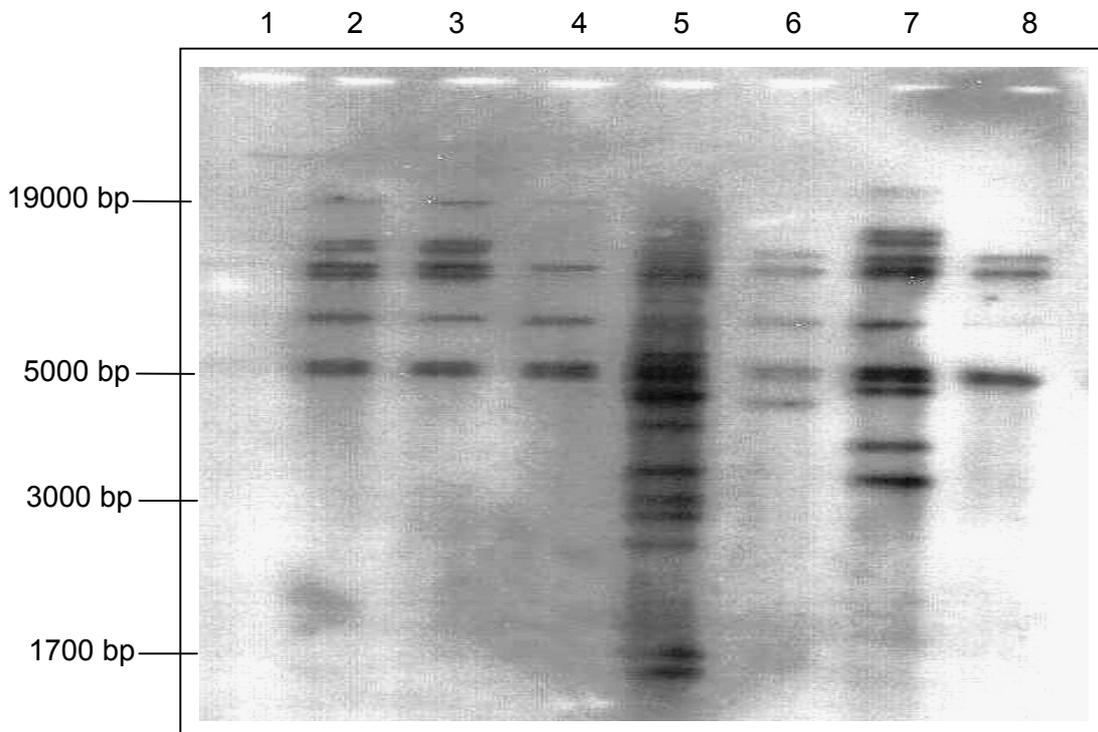


Abb. 16: Southern Blot von *Eco*RI verdauter DNS verschiedener mariner und klassischer Brucellen nach Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten *IS711*-Sonde

Spur 1: Lambda *Hind*III Marker

Spur 2: *B. melitensis* Özyurek

Spur 3: *B. melitensis* 126.087

Spur 4: *B. melitensis* 875

Spur 5: *B. „maris“* 12890

Spur 6: *B. suis* 1330

Spur 7: *B. suis* 103.707

Spur 8: *B. canis* RM6/66

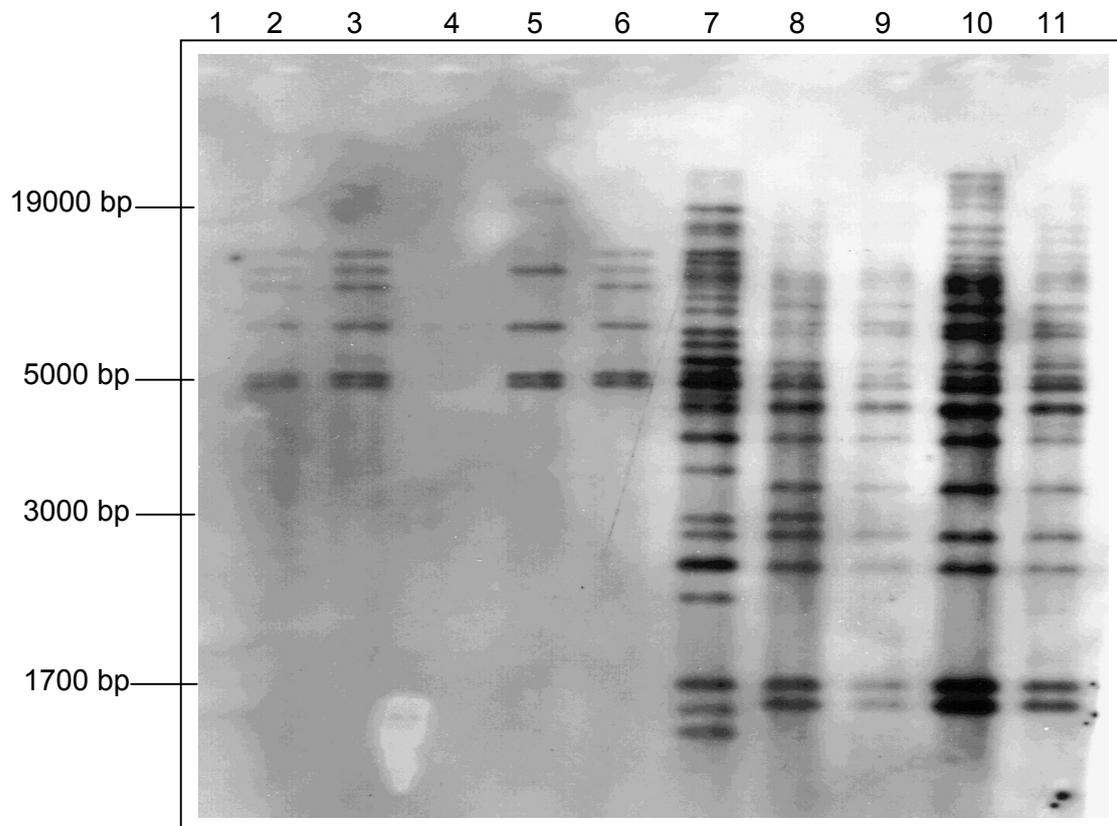


Abb. 17: Southern Blot von *Eco*RI verdauter DNS verschiedener mariner und klassischer Brucellen nach Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten *IS711*-Sonde

Spur 1: Lambda *Hind*III Marker

Spur 2: *B. abortus* 544

Spur 3: *B. abortus* Neumünster

Spur 4: *B. abortus* 747/67

Spur 5: *B. abortus* 1766/98

Spur 6: *B. abortus* 6032/84

Spur 7: *B. „maris“* 12891

Spur 8: *B. „maris“* 12890

Spur 9: *B. „maris“* Stamm Nr.33

Spur 10: *B. „maris“* Stamm Nr.34

Spur 11: *B. „maris“* Stamm Nr.35

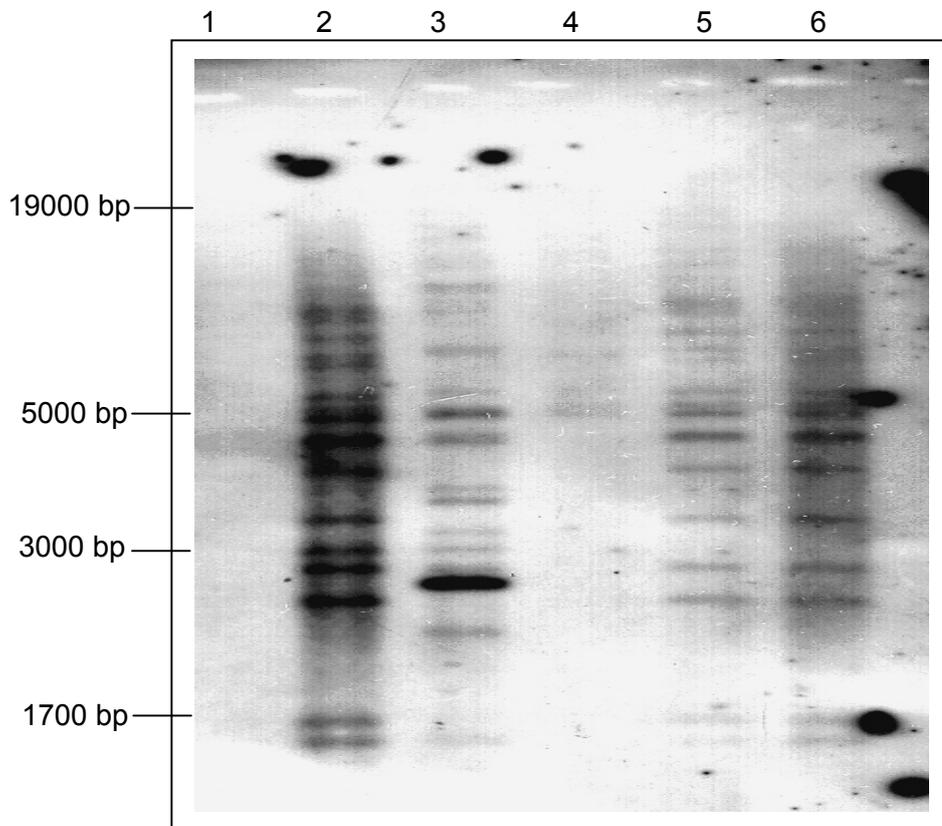


Abb. 18: Southern Blot von *Eco*RI verdauter DNS verschiedener mariner und klassischer Brucellen nach Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten *IS711*-Sonde

Spur 1: Lambda *Hind*III Marker

Spur 2: *B. „maris“* 12890

Spur 3: *B. ovis* 10512-03

Spur 4: *B. canis* 126.518

Spur 5: *B. „maris“* Stamm Nr.10

Spur 6: *B. „maris“* Stamm Nr.25

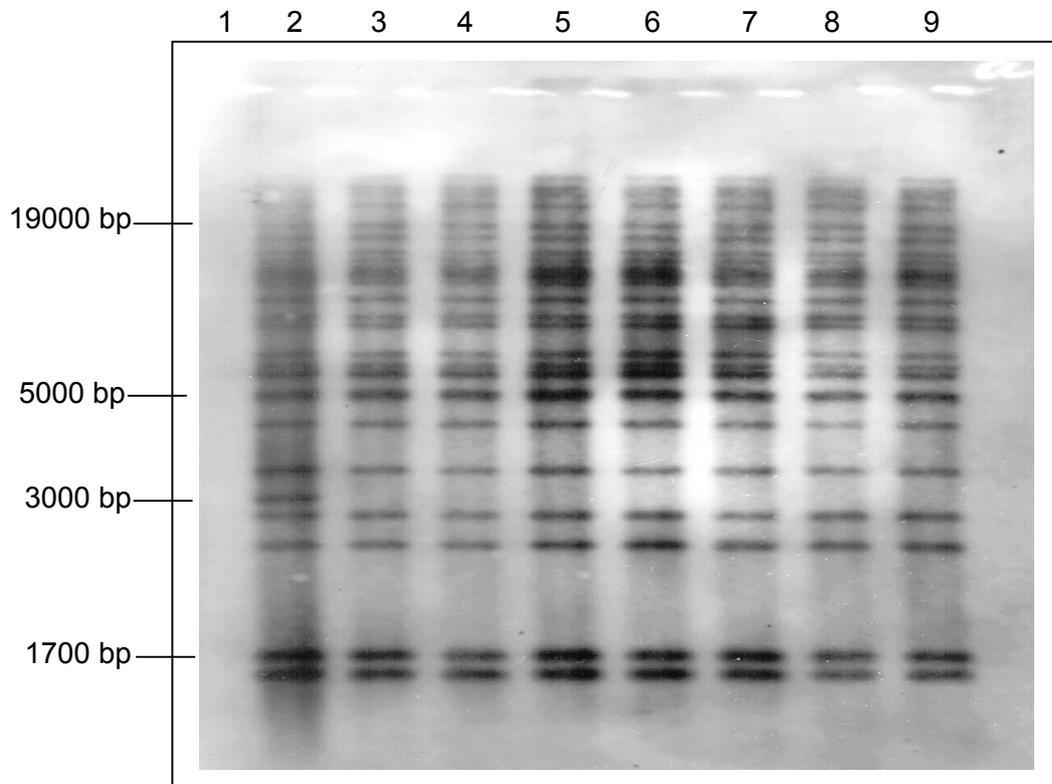


Abb. 19: Southern Blot von *EcoRI* verdauter DNS verschiedener mariner *Brucellen* nach Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten *IS711*-Sonde

Spur 1: Lambda *HindIII* Marker

Spur 2: *B. „maris“* 12890

Spur 3: *B. „maris“* Stamm Nr.8

Spur 4: *B. „maris“* Stamm Nr.17

Spur 5: *B. „maris“* Stamm Nr.18

Spur 6: *B. „maris“* Stamm Nr.19

Spur 7: *B. „maris“* Stamm Nr.20

Spur 8: *B. „maris“* Stamm Nr.21

Spur 9: *B. „maris“* Stamm Nr.22

4.4 Nachweis von *Brucella*-spezifischen Antikörpern in Seren von Meeressäugern

4.4.1 Ergebnisse der Langsamagglutination mit *B. abortus*-Antigen

Bei der Untersuchung von insgesamt 353 Seren von Seehunden konnten bei 46 Tieren (13 %) *Brucella*-spezifische Antikörper nachgewiesen werden (Titer \geq 20). Dabei handelt es sich im einzelnen um 6 von 120 Heulern sowie 40 von 233 älteren Wildfängen, deren genaues Alter aber nicht bekannt war. Die Untersuchung von 13 Serumproben von Schweinswalen ergab nur für ein Tier ein positives Ergebnis (Titer 640, 7,7 %). Die Untersuchung von 3 Proben von Kegelrobben sowie einer Probe eines Delfins verlief negativ. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in **Tabelle 21** dargestellt.

Tab. 21: Ergebnisse der serologischen Untersuchungen

Meeressäuger- spezies	Anzahl		Anzahl positiver Tiere (in %)
	getesteter Tiere	positiver Tiere	
Seehunde (insgesamt)	353	46	13
Heuler	120	6	5
Wildfänge (Alter unbekannt)	233	40	17,2
Kegelrobbe	3	0	0
Schweinswal	13	1	7,7
Gemeiner Delfin	1	0	0

Eine Übersicht der Titerverteilungen der 46 positiven Serumproben von Seehunden gibt **Tabelle 22**.

Tab. 22: Verteilung der Titerstufen 1:20 bis 1:≥640 der 46 positiven Serumproben von gemeinen Seehunden

Titerstufe	20	40	80	160	320	≥640
Probenanzahl	8	10	5	6	3	14

Bei 5 der 14 Serumproben von Seehunden, die einen Titer von 640 aufwiesen, wurde eine weiterführende Verdünnungsreihe durchgeführt. Bei jeweils einer Probe konnten daraufhin Endtiter von 1280, 2560 bzw. 5120 nachgewiesen werden. Bei zwei Serumproben wurde ein Titer von 20480 detektiert. Eine zusätzliche Isolation von Brucellen aus Organproben gelang bei 3 seropositiven Seehunden.

4.4.2 Ergebnisse der Langsamagglutination mit Antigenen von marinen *Brucella*-Isolaten

Die Ergebnisse der Langsamagglutination von 27 ausgesuchten Seren mit Antigenen von marinen *Brucella*-Isolaten sind in **Tabelle 23** zusammengefasst. Alle in der Langsamagglutination mit *B. abortus*-Antigenen negativ getesteten Tiere zeigten in der Langsamagglutination mit Antigenen von marinen Brucellen ebenfalls keine Reaktion. Bei den Serumproben Nr. 1 und 2 waren die Titerstufen in der Langsamagglutination mit Antigenen von marinen Isolaten höher (640 bzw. 320) als in der Langsamagglutination mit *B. abortus*-Antigenen (160 bzw. 80). Die Proben Nr. 3 und 18 wiesen übereinstimmende Titer bei beiden Agglutinationsreaktionen auf. Bei den Proben Nr. 11, 14, 15, 16, 17 und 19 lagen die Titer bei der Agglutination mit Antigenen von marinen Isolaten niedriger als bei der Agglutination mit *B. abortus*-Antigenen.

Tab. 23: Ergebnisse der Langsamagglutination von 27 ausgesuchten Serumproben mit Antigenen von marinen Brucellen und von *B. abortus*

Fortlaufende Probenr.	Titerstufe mit Antigenen von marinen Brucellen	Titerstufe mit Antigenen von <i>B. abortus</i>
1	640	160
2	320	80
3	640	640
11	160	5120
12	640	2560
13	640	1280
14	160	20480
16	80	320
18	40	40
19	80	160
15, 17	<20	40
4-10, 20-27	<20	<20

5 Diskussion

Nach der erstmaligen Mitteilung über den Nachweis von Brucellen bei Meeressäugern im Jahre 1994 an der schottischen Küste wurde an mehreren Orten der südlichen und nördlichen Hemisphäre das Vorkommen von Bakterien des Genus *Brucella* bei marinen Säugetieren bestätigt (107, 124). In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass auch die Meeressäugerpopulation der deutschen Nordsee mit *Brucella* sp. infizierte Tiere aufweist. In dem hier abgehandelten Zeitraum von 1997 bis 2002 waren es insgesamt 49 Brucellen-Isolate, die aus Organen von 30 Meeressäugern (28 Seehunde, 1 Schweinswal und 1 Kegelrobbe) stammten. Nach den Untersuchungen von FOSTER *et al.* (2002) konnten an der schottischen Küste Brucellenkulturen von 54 Tieren (37 Schweinswale, 17 Seehunde) isoliert werden. Der vermehrte Nachweis von Brucellen aus Organen von Seehunden in der deutschen Nordsee ist zum einen auf deren im Vergleich zu Kegelrobben dortige höhere Populationsdichte zurückzuführen. Zum anderen ist bei einer höheren Adaptation von Seehunden an das Festland, wie im Bereich der deutschen Nordsee, eher mit der Sichtung und Erfassung von geschwächten oder toten Tieren auf Sandbänken oder an Stränden und ihrer Verbringung in entsprechende Untersuchungszentren zu rechnen, als bei den schroffen Anbindungen der schottischen Küste an die Nordsee.

Eine Korrelation zwischen der Isolation von Brucellen und dem Geschlecht der Tiere konnte nicht festgestellt werden.

Auf Grund der geographischen Verteilung der hier vorliegenden Fälle gibt die Tatsache, dass von den *Brucella*-positiven Meeressäugern 10 aus dem Bereich der Insel Sylt stammten, zu Spekulationen Anlass. So könnten größere Tierdichten in diesem Lebensbereich zu einer vermehrten Verbreitung dieser Keimgruppe in der Seehundpopulation geführt haben, doch müssen auch andere mögliche Einflüsse, wie Meeresströmungen, Beutetierbesatz und weitere Aspekte hierzu genauer sondiert werden. In diesem Zusammenhang erscheint es bemerkenswert, dass die Isolierung der Brucellen insgesamt zwar aus verschiedenen Organen, hauptsächlich aber aus der Lunge gelang. Auffallend war auch, dass gleichzeitig bei den meisten Tieren im Rahmen der Sektion eine Bronchopneumonie festgestellt werden konnte, welche überwiegend mit einer Lungenwurminfektion (*Parafilaroides* sp.) assoziiert

war. Allerdings ist die mit einer Lungenwurminfektion vergesellschaftete Bronchopneumonie generell eine der häufigsten Todesursachen bei jungen Seehunden (U. SIEBERT, persönliche Mitteilung). In der Literatur finden sich indes auch wiederholt Angaben zur Isolierung von Brucellen aus verschiedenen Organen, wobei vermehrt diverse Lymphknoten genannt werden (45, 46, 48, 54, 57). FOSTER *et al.* (2002) und GARNER *et al.* (1997) dagegen bestätigten mit ihren Untersuchungen an unterschiedlichen Meeressäugerspezies die Lunge als Hauptisoliationsorgan (48, 54).

Brucella-spezifische pathologische Veränderungen wurden bei Meeressäugern insgesamt nur selten festgestellt. So deutete z. B. ein schlechtes Allgemeinbefinden auf eine Bakteriämie durch Brucellen hin (48). Als signifikante pathologische Veränderungen, die mit dem Nachweis von Brucellen in Zusammenhang gestellt wurden, sind subkutane Läsionen, Blubber (Unterhautfettgewebe)-Abszesse, nicht suppurative Meningoencephalitis, Placentitis und anschließender Abort sowie Hoden- und Uterusveränderungen genannt worden (46, 57, 79, 90). Ein Organotropismus der marinen Brucellen für die Organe des Reproduktionstraktes und das retikulendotheliale System, wie bei den klassischen Brucellenspezies vorkommend, konnte bisher nur in vereinzelten Fällen nachgewiesen werden. Zumindest zeigte ein Infektionsversuch an trächtigen Milchkühen mit einem marinen Brucellenstamm bei dieser Tierart den erwarteten Zielzelltropismus (102). Somit kann wie bei den terrestrischen Brucellen auch bei den marinen Isolaten eine venereale oder vertikale Transmission der Erreger bisher nicht ausgeschlossen werden (48).

Hierzu passend erscheint die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte erfolgreiche Anzüchtung von marinen Brucellen aus Lungenwürmern des Genus *Parafilaroides* sowie der häufige Zusammenhang zwischen Isolierung mariner Brucellen und verminöser Bronchopneumonie, was auf eine mögliche Rolle der Parasiten als Überträger dieser Bakterien hinweisen könnte. In der Tat wiesen bereits GARNER *et al.* (1997) marine Brucellen in Uterus und Darmlumen adulter Lungenwürmer aus brucelleninfizierten Lungen mit für *Parafilaroides*-Spezies typischen pathologischen Veränderungen nach. Viele Mikrogranulome, welche sich um die Parasiten herum gebildet hatten, enthielten ebenfalls marine Brucellen. Allerdings lässt sich nicht ausschließen, dass die Lungenwürmer die marinen Brucellen erst im Rahmen ihrer Migration durch die Lunge aufgenommen haben können. Betrachtet man den

Lebenszyklus von *Parafilaroides decorus*, der bei Seelöwen häufigsten Lungenwurmspezies, fällt auf, dass hier ein Fisch (*Girella nigricans*) als Zwischenwirt fungiert. Für das *San Miguel sea lion virus* type 5 konnte z. B. eine Übertragung durch *Parafilaroides decorus* und *Girella nigricans* nachgewiesen werden (SMITH *et al.*, 1980). Infolgedessen müssen auch Fische als eventuelle Brucellenüberträger in Betracht gezogen werden. Untersuchungen von SALEM und MOHSEN (1997) an Afrikanischen Welsen (*Clarias* sp.) haben zumindest eine Empfänglichkeit dieser Fische für *B. melitensis* Biovar 3 nachgewiesen.

Die Charakterisierung der 49 marinen Feldisolate mittels konventioneller Methoden ergab ein vergleichsweise einheitliches phänotypisches Verhalten untereinander, gegenüber den klassischen Brucellenspezies hingegen in einzelnen Aspekten mehr oder weniger deutliche Abweichungen. So war die kulturelle Anzucht aller marinen Isolate außer dem Referenzstamm 12891 nur unter 10%iger CO₂-Spannung möglich, eine Eigenschaft, die sonst nur bei *B. abortus* Biovar 1-4 und *B. ovis* vorhanden ist (3). Die CO₂-Abhängigkeit der Isolate von Seehunden entspricht den Angaben in der Literatur (45, 46, 48, 65, 96). Auch das Vorkommen eines kapnophilen Brucellenstammes bei einer Cetaceenspezies (Isolat Nr. 12) stellt trotz der Taxonomie-vorschläge, *Brucella* sp. von Meeressäugern in CO₂-abhängige Stämme von Flossenfüsslern und CO₂-unabhängige Stämme von Walartigen zu unterteilen, angesichts der allgemeinen relativ begrenzten Wirtsspezifität von Brucellen keine Besonderheit dar.

Die mittels der 3 unterschiedlichen Elektivfärbungen (Färbung nach HANSEN, nach KÖSTER, nach STAMP) bei den marinen Brucellen-Isolaten nachgewiesene Alkalifestigkeit bzw. Widerstandsfähigkeit gegen eine Dekolorisierung mit schwachen Säuren unterstreicht ihre Zugehörigkeit zur Gattung *Brucella* (3, 26).

In ihren biochemischen Verhaltensmustern unterschieden sich die Meeressäugerisolate in Bezug auf Katalase-, Oxidaseaktivität sowie H₂S-Bildung nicht von denen der klassischen Brucellen bzw. von den Angaben in der Literatur (3, 18, 45, 65, 96). Ihre Ureaseaktivität, d. h. die Zeitdauer von der Beimpfung des Harnstoffagars bis zum Auftreten einer positiven Reaktion, blieb hingegen mit 19 h bei einer Ausnahme (Stamm Nr. 20) deutlich hinter denen von *B. suis*, *B. canis* und *B. neotomae* (0-30 min.) sowie *B. abortus* (1-2 h) zurück (7). Verschiedentlich sind auch für marine Brucellen schnellere Reaktionszeiten beschrieben worden, so von PAYEUR *et al.*

(1997) mit 3 h, von FORBES *et al.* (2000) mit 1,25 h oder von JAHANS *et al.* (1997), die sogar über einige marine Brucellen-Isolate berichteten, die nach 1 h bei Raumtemperatur eine positive Ureasereaktion zeigten. Da die Dauer bis zum Eintreten einer positiven Reaktion wesentlich auch von der Dichte der Keimeinsaat abhängen dürfte, sind die aufgeführten Zeitangaben nur begrenzt untereinander zu vergleichen und entsprechend nur von geringer Aussagekraft.

Bei der Überprüfung der Sensitivität der Brucellen gegenüber den Farbstoffen Fuchsin, Thionin und Safranin war eine höhere Unempfindlichkeit der marinen Isolate (Ausnahme Stamm Nr. 8: kein Wachstum bei 40 µg/ml Thionin) gegenüber den klassischen Brucellen zu beobachten. Lediglich *B. ovis* war wie die marinen Stämme gegen alle geprüften Konzentrationen der 3 Farbstoffe unempfindlich. Dagegen wurden *B. melitensis*, *B. abortus* Biovar 3, 5, 6, 7 und 9 sowie *B. suis* Biovar 2 durch Thionin in der Konzentration von 40 µg/ml gehemmt. *B. neotomae* war gegenüber Thionin nur in der Konzentration von 10 µg/ml unempfindlich. Eine hohe Sensitivität gegenüber Thionin zeigten *B. abortus* Biovar 1, 2 und 4, die in Anwesenheit dieses Farbstoffes gar kein Keimwachstum aufwiesen. Gegenüber dem Farbstoff Fuchsin zeigten sich die meisten Brucellen-Isolate wesentlich unempfindlicher. Nur *B. suis* Biovar 1 und 2 waren empfindlich gegenüber 10 µg/ml Fuchsin im Nährmedium. Durch die Zugabe von Fuchsin in der Konzentration von 20 µg/ml zum Nährmedium sistierte das Keimwachstum bei *B. canis*, *B. neotomae* und *B. abortus* Biovar 2 und 4 (7). Die bisher beschriebenen marinen Brucellen-Isolate von Seehunden und Schweinswalen hatten sich als resistent gegenüber Fuchsin- und Thionin-Konzentrationen von bis zu 40 µg/ml und gegenüber Safranin-Konzentrationen von bis zu 100 µg/ml erwiesen (54, 65). Von den klassischen Brucellenspezies tolerierte *B. abortus* Safranin (77, 112). *B. suis* und *B. neotomae* wurden dagegen von Safranin inhibiert (119). Laut CLAVAREAU *et al.* (1998) wies ein mariner, aus einem Minkwal isolierter Brucellenstamm erst eine Sensitivität gegenüber 100 µg/ml Safranin auf. FORBES *et al.* (2000) hingegen beschrieben für die Brucellen-Isolate von vier Ringelrobben und einer Sattelrobbe sogar eine Resistenz gegenüber 200 µg/ml Safranin.

Die unterschiedliche Sensitivität gegenüber den Farbstoffen soll wesentlich auf einer unterschiedlichen Struktur der Brucellenporine, wie z. B. OMP2a und OMP2b beruhen (32). Porine sind Außenmembranproteine, die wassergefüllte Diffusionskanäle mit einem Durchmesser von ca. 1,2 nm bilden. Die Passage von gelösten

Molekülen ist abhängig vom Moleküldurchmesser und der Hydrophobizität. Fuchsin kann als relativ großes Molekül mit einem Durchmesser von 1,5 nm die Porine normalerweise nicht penetrieren. Eine erhöhte Sensitivität wie bei *B. suis* Biovar 1 und 2 lässt demnach entweder auf größere Porendurchmesser oder auf eine Passage von Fuchsin durch die Lipiddoppelschicht schließen. Thionin ist ein hydrophiles und mit einem Durchmesser von 0,7 nm kleineres Molekül, wodurch die Passage durch die Porine erleichtert wird und zumindest die erhöhte Sensitivität einiger Brucellenstämme erklärt werden kann. DOUGLAS *et al.* (1984) konnten z. B. für Thionin-sensitive *B. abortus*-Stämme größere Porindurchmesser als für *B. melitensis*-Stämme, die gegen bis zu 20 µg/ml Thionin resistent waren, nachweisen. Demgemäß könnte, bezogen auf den marinen Brucellenstamm Nr. 8 mit seiner geringen Thioninresistenz, an eine Abweichung in dessen Porinstruktur im Vergleich mit den anderen 48 untersuchten marinen Brucellen-Isolaten gedacht werden. Allerdings muss auch beachtet werden, dass nicht nur die Porine und ihre unterschiedlichen Durchmesser die Diffusion von Molekülen beeinflussen. Allein damit ließe sich eine konzentrationsabhängige Empfindlichkeit/Resistenz der Brucellen nicht erklären. Auch die Struktur der Lipiddoppelschicht dürfte eine Rolle spielen, wie z. B. bei *B. canis*-Isolaten, die trotz großem Porindurchmesser resistent gegen Thionin waren. In diesem Fall wurde von DOUGLAS *et al.* (1984) angenommen, dass die bei rauhen Brucellenstämmen vorhandene andere Außenmembranstruktur die Diffusion beeinflusst.

Die orientierende Untersuchung der marinen Feldisolate auf Phagenlysis unter Verwendung der Weybridge-Phagen F1 und F25 erbrachte insgesamt mit der ausschließlich beobachteten inkompletten Lysis des Stammes Nr. 27 eine nur sehr geringe Phagenaktivität. Dagegen hatten JAHANS *et al.* (1997) bei 12 von 21 marinen Brucellen-Isolaten zumindest eine partielle Lysis durch den Weybridge-Phagen nachweisen können, und auch CLAVAREAU *et al.* (1998) sowie FORBES *et al.* (2000) detektierten bei dem Minkwal-Isolat bzw. Ringel- und Sattelrobben-Isolaten Lysis bzw. unvollständige Lysis durch den Weybridge-Phagen. Angesichts der nur spärlichen Reaktionsausfälle bei den eigenen Untersuchungen und der unterschiedlichen und uneinheitlichen Ergebnisse in der Literatur bei Austestung weiterer Brucellenphagen erscheint eine Gruppierung mariner Brucellen-Isolate auf dieser Basis wenig erfolgversprechend. Zudem hat diese Methode zur Differenzierung und Typisierung von Brucellen in letzter Zeit an Bedeutung verloren, da unter den

klassischen Brucellenspezies vermehrt atypisch reagierende Stämme aufgetreten sind (53, 65).

Erstmalig wurden in dieser Arbeit Untersuchungen zur Antibiotikaempfindlichkeit der marinen Brucellen-Isolate durchgeführt. Dabei zeigten sich kaum Abweichungen vom Resistenzmuster der klassischen *Brucella*-Kontrollstämmen: Von den insgesamt 13 geprüften Antibiotika erwiesen sich 10 in vitro gleichermaßen als wirksam und eines (Lincomycin) als unwirksam. Ein marines Feldisolat (Nr. 22) wies als einziges eine Resistenz gegenüber Sulfamethoxazol/Trimethoprim auf, und in Bezug auf Penicillin standen zwei marine Stämme mit intermediärer Empfindlichkeit insgesamt 4 der klassischen Brucellen mit Penicillinresistenz gegenüber. Diese Daten decken sich weitgehend mit den Angaben in der Literatur: Namentlich die durchgehende Resistenz gegenüber dem zur Gruppe der Lincosamide gehörenden Lincomycin wird als charakteristisch für alle klassischen *Brucella* sp. beschrieben (26) und von HORNSBY *et al.* (2000) bestätigt. Die Ursache für diese totale Resistenz der Brucellenstämmen könnte durch eine Methylierung des Adenins der 50S-Untereinheit der Ribosomen bedingt sein, was eine Bindung der beiden Wirkstoffe an die 50S-Untereinheit verhindert (69). Die teilweise gegenüber Penicillin festgestellte Resistenz bzw. eingeschränkte Empfindlichkeit, die von Seiten der Bakterien auf einer Bildung von β -Lactamasen oder einer Veränderung der Porinstrukturen in der Zellwand beruhen könnten (58, 69, 105), zeigen ebenso wie die Resistenz des marinen Isolates Nr. 22 hinsichtlich Sulfamethoxazol/Trimethoprim und die einzelnen Berichte über vom typischen Verhalten abweichende Resistenzergebnisse bei verschiedenen *Brucella* sp. (63, 110), dass wie bei den zahllosen anderen Bakterienspezies gelegentlich auch bei klassischen wie marinen Brucellen eine Resistenzentstehung möglich ist. Ursächlich kann dabei offenbar die Möglichkeit einer Resistenzentwicklung durch Transfer von resistenztragenden Plasmiden ausgeschlossen werden, da bisher bei Brucellen laut RIGBY und FRASER (1989) sowie VERGER *et al.* (1993) natürlich auftretende Plasmide nicht nachgewiesen werden konnten.

In Bezug auf die Behandlung von Brucelleninfektionen beim Menschen, auch durch marine Brucellen, bedeutet dies, dass die Auswahl der therapeutisch einzusetzenden Antibiotika außer von der prinzipiell in vivo erforderlichen guten Gewebegängigkeit und intrazellulären Aktivität auch von ihrer nachgewiesenen in-vitro-Wirksamkeit bestimmt werden muss.

Aufgrund der salinen Umweltbedingungen, denen die marinen Brucellen im Meer im Gegensatz zu den klassischen Brucellenspezies an Land ausgesetzt sind, wurden in dieser Arbeit erstmalig Untersuchungen zur NaCl-Empfindlichkeit der Brucellenspezies durchgeführt. Dabei zeigte es sich, dass die getesteten marinen Brucellenstämme eine Konzentration von bis zu 2% NaCl tolerierten. Der marine Referenzstamm 12891 war sogar bis zu einer Konzentration von 3% NaCl zum Wachstum befähigt.

Die klassischen Brucellenspezies (Ausnahme: *B. ovis*) waren demgegenüber nur bis zu 1,5% NaCl nicht in ihrem Wachstum gehemmt. Für *B. ovis* lag die Toleranzgrenze bei 1% NaCl im Nährmedium.

Der Salzgehalt der Nordsee beträgt zwischen 3,2 und 3,5% NaCl und liegt damit nur knapp über der Toleranzgrenze der marinen Brucellenstämme. Die größere Toleranz der marinen Brucellen-Isolate im Vergleich zu den klassischen Brucellenspezies könnte auf eine evolutionäre Anpassung an den marinen Lebensraum hindeuten. Nach VREELAND (1987) sind mindestens drei Mechanismen bekannt, die für eine Anpassung an Lebensräume mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen verantwortlich sind. Der erste Mechanismus besteht aus einem passiven Ausgleich des Cytoplasmaionengehalts im Vergleich zum Mediumionengehalt. Bei dem zweiten Mechanismus kommt es zu einer Konzentrierung von Osmotika bzw. kompatiblen Soluten im Organismus. Diese Osmotika, die entweder aus der Stoffklasse der Zucker, der Alkohole oder der Aminosäuren stammen, werden im Organismus de novo synthetisiert oder aus der Umgebung aufgenommen. Die maximale Syntheseleistung bzw. Akkumulation von Osmotika ist dabei eine genetisch festgelegte Eigenschaft (74). Der dritte Mechanismus beinhaltet eine Veränderung der Zellphysiologie, welche die Kontrolle der Wasserbewegung beeinflusst, wie z. B. beim salztoleranten Bakterium *Halomonas elongata*, welches bei erhöhter Salzkonzentration des Mediums u. a. eine kompaktere Zellwand bildet und den Anteil negativ geladener Lipide erhöht (135).

Mikroorganismen, die aus Meerwasser isoliert werden, sind meistens sogar auf eine bestimmte NaCl-Konzentration im Medium angewiesen. Solche, als halophil bezeichnete Organismen, sind z.B. *Vibrio fischeri* oder *Halobacterium salinarum*. Demgegenüber gehören Bakterien, die eine gewisse Reduktion der Wasseraktivität im Medium ausgleichen können, aber besser bei höherer Wasseraktivität wachsen, zu den halotoleranten Organismen, wie z. B. *Staphylococcus aureus* (Madigan).

Einige Cyanobakterien besitzen eine Salztoleranz von bis zu 12% NaCl (52). In Japan untersuchte shigatoxinproduzierende *Escherichia coli* O157 tolerierten 5% NaCl im Medium (80) und bestimmte *Peptococcus*-Spezies wurden anhand ihrer unterschiedlichen, zwischen 2,5% und 5% NaCl liegenden Salztoleranz, differenziert (16). Auch die marinen Brucellen können aufgrund der vorliegenden Ergebnisse als halotolerant bezeichnet werden.

Die Objektträgeragglutination diente dem Nachweis der Oberflächenantigene der Brucellen. Dabei wiesen alle 49 getesteten marinen *Brucella*-Feldisolate ein A-dominantes LPS-Profil auf.

Dies steht im Einklang mit den Literaturangaben, wonach fast alle bisher untersuchten marinen Brucellen-Isolate als A-dominant charakterisiert worden waren (5, 18, 45, 54, 65, 96). Lediglich EWALT *et al.* (1994) beschrieben den bisher einzigen Nachweis eines M-dominanten Brucellen-Isolates aus einem kalifornischen Flaschennasendelfin. In Untersuchungen von BAUCHERON *et al.* (2002) war dagegen ein von diesen Autoren untersuchtes Isolat eines Flaschennasendelfins A-dominant. JAHANS *et al.* (1997) wiederum detektierten zumindest bei einigen marinen Brucellen-Isolaten eine variable Agglutination mit dem Anti-M-Antiserum. Infolgedessen besaßen diese Brucellenstämme möglicherweise mehr M-LPS-Anteile als konventionelle A-dominante Brucellen-Isolate (65).

Für eine weitergehende Differenzierung der 49 marinen Brucellen-Isolate wurden die Polymorphismen des *omp2*- und des *IS711*-Lokus im Genom mittels PCR, RFLP und Southern Blot untersucht.

Das Genarrangement des *omp2*-Lokus ist bei allen Brucellenspezies hochkonserviert (42). Durch den Nachweis der Gene *omp2a* und *omp2b* des gattungsspezifischen *omp2*-Lokus bei allen 49 marinen Isolaten in der PCR nach 4.3.1.1 konnte die Zugehörigkeit der Isolate zum Genus *Brucella* auch genotypisch und somit das Ergebnis der phänotypischen Untersuchungen bestätigt werden. Die nachgewiesenen *omp2a*- und *omp2b*-Amplifikate wiesen eine Größe von je ca. 1230 bp auf. Eine erfolgreiche Amplifikation dieser beiden Gene inklusive der Shine-Dalgarno-Sequenz und der vermutlichen Transkriptions-Terminator-Sequenz wurde bei den klassischen Brucellenspezies zunächst von CLOECKAERT *et al.* (1995) beschrieben. Die Größen der *omp2a*- und *omp2b*-Amplifikate waren bei allen

Brucellenspezies nahezu gleich. Nur *B. abortus* Biovar 1, 2, 4 und R wiesen kürzere *omp2a*-Amplifikate auf, da sie eine Deletion von 120 bp beinhalten (42). Diese Deletion konnte auch in dieser Arbeit bei *B. abortus* Biovar 1, aber nicht bei *B. abortus* Biovar 4 detektiert werden. Die Amplifikation der *omp2a*- und *omp2b*-Gene von unterschiedlichen MeeressäugerBrucellen-Isolaten erfolgte bereits von CLOECKAERT *et al.* (2001), wobei alle Amplifikate die auch in dieser Arbeit nachgewiesene Größe besaßen.

Um eine weitergehende Differenzierung der Brucellen-Isolate untereinander anhand des *omp2*-Lokus zu ermöglichen, wurden die 49 marinen Brucellen-Isolate sowie die Referenzstämme erstmalig mittels der PCR nach SIFUENTES-RINCON *et al.* (1997) untersucht. Nur der marine Brucellenstamm Nr. 8 zeigte ein Amplifikationsmuster des Typ IV mit einem 900 bp großen Amplifikat, welches bei den klassischen Brucellenspezies nur bei *B. ovis* nachgewiesen wurde. Alle anderen getesteten marinen Brucellen inklusive der beiden marinen Referenzstämme 12890 und 12891 wiesen zwei Amplifikate mit einer Größe von 600 bzw. 900 bp auf, so dass diese, wie bei den klassischen Brucellenspezies *B. canis*, dem Amplifikationstyp III zugeordnet werden konnten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die 48 marinen Feldisolate, sowie die beiden marinen Referenzstämme und *B. canis* eine Veränderung der Gensequenz im *omp2a*- und *omp2b*-Gen im Bereich der Bindungsstelle des Primers 2AB200 aufweisen. Diese Veränderung könnte sich bei Betrachtung des gesamten *omp2*-Lokus zwischen den Nukleotiden 1160 bis 1192 im *omp2b*-Gen und 2477 bis 2509 im *omp2a*-Gen befinden. Außerdem liegt die Vermutung nahe, dass der Feldstamm Nr. 8 zusätzlich zu dieser Veränderung noch eine weitere im Bereich der Bindungsstelle des Primers 2B600 im *omp2b*-Gen aufweist. Diese Veränderung müsste sich im Bereich der Nukleotide 746 bis 791 befinden. Desweiteren konnte in dieser Arbeit erstmalig für *B. melitensis* Biovar 3 und *B. suis* Biovar 2 der Amplifikationstyp I beschrieben werden. Insgesamt war festzustellen, dass die marinen Brucellenstämme anhand der PCR nach SIFUENTES *et al.* (1997) nicht von den klassischen Brucellenspezies *B. canis* bzw. *B. ovis* differenziert werden können.

Um letztendlich eine Differenzierung der marinen Brucellen-Isolate von den klassischen Brucellenspezies zu ermöglichen, war eine Restriktion der Amplifikate aus 4.3.1.1 mit 13 Restriktionsenzymen nötig, wie sie bei CLOECKAERT *et al.* (1995, 2001) beschrieben wurde (Tab. 20). Alle 49 marinen Brucellenstämme wie

auch der Referenzstamm 12890 wiesen danach das Restriktionsmuster I für das *omp2a*-Gen auf. Das bei dem *omp2b*-Gen des Referenzstammes 12890 nachgewiesene Muster L wiesen 44 der marinen Feldstämme auf, inklusive des Isolates eines Schweinswales (Nr. 12). Auch CLOECKAERT *et al.* (2001) beschrieben den Nachweis des Musters L für das *omp2b*-Gen bei der Mehrzahl der von ihnen untersuchten Seehundisolate. Durch die Restriktion der *omp2b*-Gene der Feldstämme Nr. 8 und Nr. 10 entstanden Restriktionsmuster, die mit keinem bisher bekannten Muster vergleichbar sind. Auffallend war die Ähnlichkeit dieser Restriktionsmuster mit dem Muster der dem Stamm entsprechenden *omp2a*-Gene. Der Feldstamm Nr. 9 (von einer Kegelrobbe) zeigte ein *omp2b*-Restriktionsmuster, welches dem von CLOECKAERT *et al.* (2001) beschriebenen Muster O entspricht und von diesen Autoren bei zwei Seehundisolaten detektiert wurde, während das dort untersuchte Kegelrobbeisolat das Muster L aufwies. Das *omp2b*-Restriktionsmuster des Feldisolates Nr. 22 war nur aufgrund eines abweichenden *EcoRI*-Musters nicht dem Restriktionstyp L zuzuordnen, was auf eine Veränderung der Nukleotidsequenz bei einer *EcoRI*-Bindungsstelle schließen läßt. Der marine Stamm Nr. 44 wies das *omp2b*-Restriktionsmuster M auf, welches auch von CLOECKAERT *et al.* (2001) bei dem *omp2b*-Gen eines Seehundisolates detektiert wurde. Insgesamt gesehen, konnte auch in dieser Arbeit die von CLOECKAERT *et al.* bereits 1995 beschriebene größere Diversität innerhalb der *omp2b*-Gene bestätigt werden. Die beschriebenen *omp2a*-Restriktionsmuster J und K, sowie die *omp2b*-Muster N und P, die von CLOECKAERT *et al.* (2001) hauptsächlich bei Cetaceenisolaten nachgewiesen wurden, konnten in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Die *omp2a*-Muster J und K unterschieden sich deutlich von den *omp2a*-Restriktionsmustern der terrestrischen Brucellenspezies. Im Gegensatz dazu zeigte das *omp2a*-Muster I der marinen Brucellen-Isolate nur bei der Restriktion durch das Enzym *Styl* ein von den klassischen Brucellenspezies abweichendes Muster. Somit weisen auch die in dieser Arbeit untersuchten marinen Isolate in Bezug auf das *omp2a*-Gen eine relativ geringe Divergenz im Vergleich zu den klassischen Brucellenspezies auf. Auch die Zuordnung entsprechend der Wirtsspezies und der ökologischen Nische trifft in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich zu. Insgesamt gesehen bestätigen diese Untersuchungen die Thesen von CLOECKAERT *et al.* (2001), dass der *omp2*-Lokus der Seehundisolate im Vergleich zu den klassischen Brucellenspezies einen höheren Divergenzlevel aufweist. Der Vorschlag, zwei neue

Speziesnamen je nach Wirtsspezies, *B. pinnipediae* und *B. cetaceae*, einzuführen, kann in dieser Arbeit weitestgehend unterstützt werden. 47 der untersuchten marinen Brucellenstämme konnten eindeutig der Spezies *B. pinnipediae* zugeordnet werden, da sie die *omp2a*-Restriktionsmuster I in Verbindung mit den *omp2b*-Restriktionsmustern L, M oder O aufwiesen. Dazu gehört auch das Schweinswalisolat Nr. 12, welches nicht das für Cetaceenisolate typische Muster, sondern die für Pinnipediaestämme typischen *omp2a* und *omp2b*-Muster I und L zeigt. Leider konnten keine weiteren Schweinswalisolate aus der deutschen Nordsee untersucht werden, um dieses Ergebnis zu bestätigen. Die enge geographische Verbindung innerhalb der deutschen Nordsee könnte eine Ursache für die Infektion einer Cetaceenspezies mit der bei *Pinnipediae* vorkommenden Brucellen-Spezies sein. Das Isolat Nr. 12 konnte ebenso wie das Seehundisolat Nr. 11 im Jahre 1999 von Tieren, die auf der Insel Sylt gefunden wurden, isoliert werden. Auch in späteren Jahren konnten von Seehunden der Insel Sylt Brucellen isoliert werden, die die Restriktionsmuster I und L aufwiesen. In diesem Bereich könnten diese Seehundbrucellen demnach endemisch sein. Laut VERGER *et al.* (1989) kann es in endemischen Gebieten auch zu einer Isolation von Brucellenspezies aus Tieren kommen, die nicht der präferierten Wirtsspezies angehören. CLOECKAERT *et al.* (2001) beschrieben in diesem Zusammenhang z.B. die Isolation eines Brucellenisolates von einem Seehund, welches nach der vorgeschlagenen neuen Benennung als *B. cetaceae* zu bezeichnen wäre. In Bezug auf das Isolat Nr. 22 erscheint aufgrund der nur gering vorhandenen Abweichung im *EcoRI*-Muster des *omp2b*-Gens eine Zuordnung zur Spezies *B. pinnipediae* gerechtfertigt.

Die *omp2b*-Muster der marinen Stämme Nr. 8 und Nr. 10 wiederum zeigten nach Restriktion mit den Enzymen *AluI*, *BanI*, *BglII*, *Clal*, *HaeIII*, *KpnI*, *PstI*, *PvuII*, *StyI* und *TaqI* die gleichen Fragmente wie bei der Restriktion des jeweiligen *omp2a*-Gens. Bei dem Stamm Nr. 10 stimmte zusätzlich auch das *EcoRI*-Restriktionsmuster der beiden Gene überein. Um die beiden *omp2*-Gene besser miteinander vergleichen zu können, wurde der *omp2*-Lokus des marinen Isolates Nr. 8 sequenziert. Hierfür wurden die Amplifikate aus 3.7.2.3 eingesetzt. Die ermittelten Sequenzen ergaben eine Übereinstimmung der beiden *omp2*-Gene von 95,2%. Ein Vergleich der *omp2a*-Sequenz AF300819 des Referenzseehundisolates 12890 mit der *omp2a*-Sequenz des marinen Stammes Nr. 8 zeigte eine Übereinstimmung von 100%. Diese Übereinstimmung wird statistisch abgesichert durch einen hohen Bootstrap-Wert von

95%. Zwischen dem *omp2b*-Gen des Isolates Nr. 8 und der *omp2b*-Sequenz AF300818 des Referenzstammes 12891 konnte nur eine Übereinstimmung von 85,6% festgestellt werden. In Anbetracht dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass das marine Feldisolat Nr. 8 zwei *omp2a*-Gene besitzt und keine *omp2b*-Sequenz, wobei die *omp2a*-Sequenz des Feldisolates mit der des Referenzisolates 12890 identisch ist. Bei dem Vergleich der bereits veröffentlichten *omp2a*-Sequenzen von marinen Isolaten und dem Feldisolat Nr.8 mit den *omp2a*-Sequenzen der klassischen Brucellenspezies fällt auf, dass die *omp2a*-Sequenz des Feldisolates Nr. 8 ebenso wie die Sequenz AF300819 die geringste Divergenz unter den marinen Brucellen-Isolaten zu den klassischen Spezies aufweisen. Das bestätigt die These von CLOECKAERT *et al.* (2001), wonach die Seehundisolate eventuell eine evolutionäre Verbindung zwischen den terrestrischen und den Cetaceenbrucellen-Spezies darstellen. Im Gegensatz dazu steht allerdings die hohe Divergenz des „*omp2b*-Gens“ des Feldisolates Nr. 8 im Vergleich zum *omp2b*-Gen der klassischen Brucellenspezies, mit Ausnahme von *B. ovis*, welches als einzige Brucellenspezies ebenfalls zwei *omp2a*-Gene besitzt.

Das Auftreten von zwei *omp2a*-Genen könnte auch für eine veränderte Synthese des von diesem Locus codierten Porins verantwortlich sein. Damit ließe sich unter Umständen zumindest teilweise die erhöhte Empfindlichkeit des Feldisolates Nr. 8 gegenüber Thionin (Konzentration: 40 µg/ml) erklären. So wiesen MARQUIS und FICHT (1993) für *omp2a*-transformierte *E.coli* eine stärkere hydrophile Permeabilität als für *omp2b*-Varianten nach. Zudem stellten sie die Hypothese auf, dass Omp2a ein größere Pore bilden könnte. Im Falle der Expression eines Omp2a-Proteins könnte bei dem Feldisolat Nr. 8 somit eine Passage des hydrophilen Thionins möglich sein. Die völlige Farbstoffresistenz der zahlreichen weiteren marinen Isolate ließe sich demgegenüber, falls sie wie die meisten klassischen Brucellenspezies Omp2b exprimieren (41), mit der Bildung kleinerer Poren mit geringerer hydrophiler Permeabilität erklären. Allerdings sollte im Rahmen dieser These auch *B. ovis* aufgrund seiner fehlenden *omp2b*-Sequenz eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Thionin aufweisen, was jedoch nicht nachgewiesen werden konnte. Die Studie von MOBASHERI *et al.* (1997) zeigte, dass Omp2a-Poren von variabler Größe gebildet werden, die kleiner als die Omp2b-Poren sind und unterstützt somit den vermuteten Zusammenhang zwischen der Expression von Omp2a und der erhöhten Thioninempfindlichkeit nicht.

Das Auftreten von zwei *omp2a*-Genen wird weniger auf eine *omp2*-Deletion als auf eine Genkonversion zurückgeführt (20). Genkonversion bedeutet, dass ein nicht reziproker Austausch von allelen DNS-Abschnitten im Genom stattfindet. Existieren in einer Zelle zwei unterschiedliche Formen des gleichen Gens, kann eine Form „korrigiert“ werden, so dass sie der anderen entspricht (71). Derartige Korrekturen gibt es in beiden Richtungen, wie z.B. bei der Entstehung der zwei *omp2a*-Gene von *B. ovis* und dem Feldisolat Nr. 8 oder bei den zwei *omp2b*-Genen der Cetaceen-isolate (24, 42). Die Wahrscheinlichkeit einer Genkonversion erhöht sich mit der Verringerung des Abstands zwischen den Genen, so dass die *omp2*-Gene mit einem Abstand von 830 bp für diesen Vorgang prädestiniert sind. Desweiteren spricht für eine Genkonversion und gegen eine *omp2*-Deletion mit anschließender *omp2a*-Duplikation, dass wie bei den *omp2a*-Sequenzen von *B. ovis* eine erfolgreiche PCR-Amplifikation des "*omp2b*-Gens" des Stammes Nr. 8 erfolgte (siehe 4.3.1.1). Das weist darauf hin, dass die an das "*omp2b*-Gen" angrenzenden Sequenzen ähnlich den *omp2b*-angrenzenden Sequenzen der anderen Brucellenspezies sind und sich von den *omp2a*-angrenzenden Sequenzen unterscheiden (18). Die These der Genkonversion wird weiterhin unterstützt von PAQUET *et al.* (2001), da in deren Studie deutlich wurde, dass ein Motivaustausch zwischen *omp2a*- und *omp2b*-Genen bei allen Brucellenspezies vorkommt, was nur durch Genkonversion zu erklären ist. Das Phänomen der Genkonversion scheint demnach in der Evolution der Brucellen einige Male vorgekommen zu sein und erklärt die *omp2b*-Variationen der einzelnen Stämme. Über die Ursachen der Genkonversion kann nur spekuliert werden. PAQUET *et al.* (2001) und FICHT *et al.* (1989) vermuten einen selektiven Vorteil durch die Verwendung von *omp2a* als Donorgen bei der Genkonversion. Würde *Omp2a* tatsächlich eine größere Pore bilden, könnte das ein Vorteil für das intrazelluläre Wachstum in Form von verbesserter Nährstoffaufnahme für die Brucellen bedeuten. Weitere Untersuchungen sind für die Klärung dieser These wie auch der Frage nötig, ob es sich bei dem *omp2a*-Gen im Gegensatz zu *omp2b* um ein stilles Gen handelt, welches nur unter bestimmten Umweltbedingungen exprimiert wird (41).

Wie der *omp2*-Lokus ist auch der *IS711*-Lokus für Brucellen genuspezifisch und kommt bei allen Brucellenspezies in unterschiedlicher Kopienanzahl vor. Mittels Southern Blot von *EcoRI*-verdauter DNS wurden die 49 marinen Brucellen-Isolate

auf das Vorkommen von *IS711*-Kopien untersucht. Alle 49 marinen Isolate wiesen mit 23 *IS711*-Kopien eine deutlich höhere Anzahl als die klassischen Brucellenspezies auf. Eine Ausnahme bildete *B. ovis* mit 19 *IS711*-Kopien. Allerdings differierten die Hybridisierungsmuster der marinen Brucellen-Isolate, wie auch von BRICKER *et al.* (2000) nachgewiesen, deutlich von dem *B. ovis*-Hybridisierungsmuster. Verglichen mit den Ergebnissen von OUAHRANI *et al.* (1993) wurde in dieser Arbeit bei allen klassischen Brucellenspezies eine geringere Kopienanzahl festgestellt, der Zahlenunterschied war jedoch stets geringfügig. Da die Auszählung der Fragmente, die eine *IS711*-Kopie beinhalteten, nicht maschinell erfolgte, ist v.a. die Auswertung nah aneinander liegender Kopien schwierig. Mit der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass zumindest 4 der 5 *IS711*-Kopien von *B. melitensis* Biovar 1 auch bei allen anderen getesteten Brucellenspezies vorkommen und somit als hochkonserviert anzusehen sind. Die speziesspezifische Lokalisation von *IS711*-Kopien bei den klassischen Brucellen-Isolaten konnte indes nicht bestätigt werden, da z. B. *B. abortus* Biovar 3 und *B. melitensis* Biovar 1 das gleiche Hybridisierungsmuster aufwiesen. Die deutlich höhere Anzahl an *IS711*-Kopien im Genom der marinen Brucellen-Isolate weist darauf hin, dass es sich bei diesen wahrscheinlich um mindestens eine neue Spezies handelt. Die hohe *IS711*-Kopienzahl bei marinen Brucellen-Isolaten wurde auch von CLAVAREAU *et al.* (1998) bei der Untersuchung eines Minkwalisolates und von BRICKER *et al.* (2000) durch die Untersuchung von 23 Isolaten aus sieben Meeressäugerspezies beschrieben. Der Referenzstamm 12891, der von einem Schweinswal isoliert wurde, war mit 26 *IS711*-Kopien deutlich von den 49 Brucellen-Isolaten der deutschen Nordsee zu unterscheiden. Der Seehundreferenzstamm 12890, der aus England stammt, wies nur eine Kopie auf einem 3000 bp großen *EcoRI*-Fragment mehr auf als die marinen Brucellen-Isolate aus der deutschen Nordsee. Diese IS-Position war bei keinem der 49 marinen Isolate vorhanden. Die hohe IS-Anzahl bei den marinen Brucellen lässt sich durch die höhere Aktivität des Insertionselementes 711 erklären (10), was auch OUAHRANI *et al.* (1993) schon für *B. ovis* vermuteten. Ob diese Aktivität anhält oder ob sie mit der Wirtsadaptation in Verbindung steht, ist noch nicht geklärt. Die Insertionselemente führen zu genetischen Rearrangements und infolgedessen zu einer Geninaktivierung durch insertionale Mutagenese oder Deletion bzw. zu einer Genaktivierung durch Insertion oder Formation von *upstream* Promotoren (50, 64). Die stärkere Präsenz von *IS711* kann eine Eigenschaft mit

selektiver Wirkung in Bezug auf Veränderungen in der Pathogenität/Virulenz oder Wirtsspezifität solcher Brucellen darstellen. Ob indes eine geringere Virulenz in Bezug zu setzen ist mit einer höheren *IS711*-Kopienanzahl, wie von OUAHRANI *et al.* (1993) vermutet wird und durch die für den Menschen avirulente Spezies *B. ovis* bestätigt würde, bleibt fraglich. Die marinen Brucellen weisen im Vergleich zu den klassischen Spezies zumindest bei Meerschweinchen-Virulenztests eine geringere Pathogenität auf (96). Auch *B. suis* Biovar 2, welches für den Menschen nur schwach virulent ist, weist mehr *IS711*-Kopien auf als die anderen Biovare von *B. suis*, die weniger *IS711*-Kopien besitzen (92). Die Isolation von marinen Brucellen aus zwei Patienten mit intracerebralen Granulomen und einem Labormitarbeiter mit grippeähnlichen Symptomen weist allerdings zumindest auf ein gewisses pathogenes Potential beim Menschen im Gegensatz zu *B. ovis* hin (8, 116). Gegen den Zusammenhang von hoher *IS711*-Kopienzahl und geringer Virulenz für den Menschen spricht allerdings die geringe *IS711*-Kopienanzahl bei der für den Menschen apathogenen Brucellenspezies *B. neotomae*.

Das von BRICKER *et al.* (2000) beschriebene Meeressäuger-spezifische *IS711*-Element auf einem 1700 bp großen *EcoRI*-Fragment konnte auch in dieser Arbeit bei allen 49 marinen Brucellenstämmen nachgewiesen werden. Das Vorkommen einer solchen Meeressäuger-spezifischen *IS711*-Kopie könnte ein Hinweis auf einen gemeinsamen Ursprungstamm sein, der sich von dem der terrestrischen Brucellenspezies unterscheidet. In diesem Fall wären die marinen Brucellen laut CLAVAREAU *et al.* (1998) phylogenetisch weiter von den terrestrischen Brucellen entfernt, wobei *B. ovis* nach den Untersuchungen von BRICKER *et al.* (2000) den phylogenetisch engsten Verwandten der marinen Brucellen darstellten würde. Innerhalb der marinen Brucellenstämme besteht zwischen dem Referenzstamm 12890 und den 49 marinen Isolaten eine enge Verwandtschaft, so dass von einem gemeinsamen Ursprungstamm ausgegangen werden kann. Die Tatsache, dass die 49 marinen Brucellenstämme anhand ihres Hybridisierungsmusters nicht voneinander zu differenzieren waren, weist auf eine enge klonale Verwandtschaft innerhalb der Isolate der deutschen Nordsee hin. Somit ist eine Assoziation zwischen regionaler Herkunft und den jeweiligen Klonen anzunehmen. Allerdings konnten BRICKER *et al.* (2000) auch bei Isolaten aus einem geographisch eng begrenzten Raum unterschiedliche Hybridisierungsmuster detektieren.

Die Untersuchungen von BRICKER *et al.* (2000) zeigten auch, dass die Hybridisierungsmuster dazu tendierten, sich je nach Wirtsspezies gruppieren zu lassen. In der vorliegenden Arbeit wiesen alle marinen Isolate der deutschen Nordsee das gleiche Muster auf, allerdings konnten auch nur drei unterschiedliche Meeressäugerspezies untersucht werden, wobei von je zwei Spezies nur ein Isolat zur Verfügung stand. Für eine zuverlässige Gruppierung je nach Wirtsspezies steht die Untersuchung an einer größeren Anzahl an Stämmen von Meeressäugern unterschiedlicher Spezies noch aus.

Um einen weiteren Nachweis des Kontakts der marinen Säuger mit Brucellen in der deutschen Nordsee zu erhalten, wurden insgesamt 370 Serumproben von 4 unterschiedlichen Meeressäugerspezies auf Brucellen-Antikörper mittels Langsamagglutination untersucht. Zunächst erfolgte die serologische Untersuchung mit *B. abortus*-Antigen, welches routinemäßig bei Untersuchungen auf *Brucella*-Antikörper in der Serumlangsamagglutination eingesetzt wird. Von 353 Serumproben von gemeinen Seehunden wiesen 13% einen positiven Titer auf, wovon 13% Heuler und 87% Wildfänge mit vermutlich höherem Alter waren. Von 13 getesteten Schweinswal-Serumproben zeigten sich nur bei einer Probe *Brucella*-spezifische Antikörper. Bei den Serumproben von einem Delfin und drei Kegelrobben konnten keine *Brucella*-Antikörper detektiert werden. Von drei serologisch positiven Tieren konnten zusätzlich Brucellenstämme aus Organproben isoliert werden. Im Vergleich mit bisher veröffentlichten Untersuchungen zur Seroprävalenz von *Brucella*-Antikörpern fällt auf, dass in Schottland und den USA höhere (49 % bzw. 32 %) und in England und Nordamerika/Kanada bei Seehunden niedrigere Prozentzahlen positiver Tiere (8 % bzw. 12,9 %) festgestellt wurden (48, 67, 88, 101). Diese Differenz kann auf einer echten geographisch unterschiedlichen Verteilung seropositiver Tiere beruhen oder aber durch den Anteil der unterschiedlichen Altersklassen an der Gesamtprobenzahl beeinflusst sein. JEPSON *et al.* (1997) gewannen die Seehundserumproben hauptsächlich von saugenden bzw. früh entwöhnten Heulern aus Aufzuchtzentren und konnten bei diesen Tieren nur eine Prävalenz von 8 % feststellen. Im Gegensatz dazu stammten die Serumproben der Cetaceen von angestrandeten Tieren, die i. d. R. mindestens juvenil bis adult waren und bei denen eine Prävalenz von 31 % detektiert wurde. Die Untersuchungen von PAYEUR *et al.* (1997) ergaben, dass Jährlinge und Subadulte die Altersklassen mit

der höchsten Anzahl positiv getesteter Tiere waren. Den niedrigsten Anteil wiesen adulte weibliche Tiere und Heuler mit einem Alter von unter 2 Monaten auf. Bei zwei Cetaceenspezies konnten VAN BRESSEM *et al.* (2001) ebenfalls eine höhere Prävalenz bei erwachsenen Tieren feststellen. Auch in der vorliegenden Studie wurde bei den adulten Seehunden eine höhere Anzahl positiv getesteter Tiere beobachtet. Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass sich die Brucelleninfektion bei Meeressäugern, ebenso wie bei terrestrischen Säugetieren nachgewiesen, bevorzugt bei geschlechtsreifen Tieren manifestiert (124). Die noch saugenden bzw. gerade entwöhnten Tiere könnten aufgrund geringerer Infektionsmöglichkeiten (wie die anfangs noch ausbleibende Fischaufnahme, ein geringerer Parasitenbefall, eingeschränkte Mobilität, das Fehlen einer eventuell bedeutsamen venerealen Übertragung sowie das seltene Auftreten von durch Rangordnungskämpfe verursachten Traumata) stattdessen unter Umständen durch congenitale und/oder maternale Transmission von Antikörpern einen positiven Titer aufweisen (48, 67). Im Gegensatz dazu stehen die Untersuchungen von RAVERTY *et al.* (2001), die bei Heulern aus Seehundstationen in Kanada eine hohe Seroprävalenz von 40 % nachweisen konnten. Allerdings wurde in dieser, wie auch in der hier vorliegenden Studie, nur ein serologisches Testsystem eingesetzt. Der Serumagglutinationstest stellt als einfache und billige Standardmethode ein gutes Testsystem dar. Da dieses System jedoch anfällig für falsch positive Reaktionen durch kreuzreagierende Antikörper ist und in einem späteren Infektionsstadium eine geringere Sensitivität aufweist, sollte zusätzlich ein weiteres Testsystem eingesetzt werden (2, 87, 89). Bei Meeressäugerproben hat sich der kompetitive ELISA als am besten geeignetes Testsystem herausgestellt, da durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern eine höhere Spezifität als beim indirekten ELISA erreicht wird (124). Um die Spezifität der Serumlangsamagglutination zu erhöhen, wurde anstelle des *B. abortus*-Antigens marines Antigen eingesetzt. Allerdings zeigte sich nur bei zwei Serumproben eine Titererhöhung durch den Einsatz des marinen Antigens im Gegensatz zu dem Testansatz mit *B. abortus*-Antigen. Infolgedessen kann auf eine ausreichende Spezifität des *B. abortus*-Antigens für die Untersuchung von Meeressäugerserumproben mittels der Langsamagglutination geschlossen werden.

Insgesamt konnte erstmalig festgestellt werden, dass die bereits beschriebenen marinen Brucellen auch bei Meeressäugerpopulationen der deutschen Nordsee

nachzuweisen sind. Aufgrund der vorliegenden Untersuchungen kann die von CLOECKAERT *et al.* (2001) vorgeschlagene Aufteilung der marinen Brucellen in zwei Spezies, *B. cetaceae* und *B. pinnipediae*, unterstützt werden. Die Mehrzahl der Brucellen-Isolate von Meeressäugern der deutschen Nordsee konnte demnach der Spezies *B. pinnipediae* zugeordnet werden.

Die Bedeutung der marinen Brucellen sowohl für die Meeressäuger als auch für die Umwelt ist unklar. Für die Untersuchung des pathogenen Potentials ist die Durchführung von Tierversuchen vonnöten. Bisher zeigten Infektionsversuche mit Meerschweinchen, Schafen und Rindern eine geringere Virulenz im Vergleich mit den klassischen Brucellen-Spezies (48, 96, 102). RHYAN *et al.* (2001) beobachteten einen Tropismus eines untersuchten Seehundbrucellenstammes für bovines Placentagewebe. MILLER *et al.* (1999), EWALT *et al.* (1994) und FOSTER *et al.* (2002) beschrieben Brucelleninfektionen bei Meeressäugern im Zusammenhang mit Aborten. Diese Berichte lassen auf einen eventuellen Zusammenhang von Brucelleninfektionen bei Meeressäugern mit Reproduktionsstörungen schließen. In Anbetracht der weltweit nachgewiesenen Prävalenzzahlen könnten die marinen Brucellen somit eine nicht unwesentliche Rolle in der Populationsdynamik der Meeressäuger spielen (48). Eine Beeinflussung der Reproduktivität wäre besonders bei Meeressäugern mit einer geringen Reproduktionsrate von Bedeutung, wie z. B. Walrossen, Weißwalen und Narwalen (88). Ein besonders hohes pathogenes Potential wird für bisher naive Populationen, wie die Baikalseerobbe, bei Erstkontakt mit marinen Brucellen vermutet (88).

Desweiteren bleibt die Frage nach der Übertragung der marinen Brucellen offen. Im Falle eines Tropismus für Reproduktionsorgane kann eine venerische Übertragung, wie bei den klassischen Brucellen beschrieben, möglich sein (91, 101, 121). Bei terrestrischen Säugern ist zusätzlich die congenitale Infektion und eine Infektion der Neonaten über die Muttermilch beschrieben, so dass diese Übertragungswege auch bei marinen Brucellen nicht ausgeschlossen werden können (48, 70, 91). Durch die enge soziale Struktur vieler Meeressäugerpopulationen, v. a. der Seehunde, könnte auch eine direkte Übertragung möglich sein (48). Die Isolation von marinen Brucellen aus subkutanen Läsionen und Abszessen deutet auf eine Transmission durch bei Rangordnungskämpfen verursachte Traumata hin. Allerdings waren einige der Abszesse unterhalb des Blubber (Fettschicht) lokalisiert und zeigten eine Beteiligung der Muskulatur, so dass eine hämatogene Entstehung wahrscheinlicher ist (48).

Durch den Nachweis von marinen Brucellen in Lungenwürmern von Meeressäugern, der auch in der vorliegenden Studie gelang, kommen zudem Parasiten als Vektoren der Erreger in Frage (54). Eine ähnliche Infektionsroute wurde für wirtsadaptierte Salmonellen von Schweinswalen in Großbritannien vermutet (47). Auch durch Ingestion der Erreger kann eine Übertragung erfolgen. Zum einen konnte die Empfänglichkeit von Fischen, die Nahrungsgrundlage vieler Meeressäuger sind, für die Gattung *Brucella* nachgewiesen werden (109). Zum anderen stellen z. B. Seehunde und Seelöwen selbst einen Teil der Nahrung von größeren Cetaceenspezies, wie z. B. Killerwalen, dar (48). Auf diesem Weg besteht zusätzlich die Möglichkeit der Übertragung auf terrestrische Säugetiere. Seehunde sind z. B. Nahrungsbestandteil von Eisbären (*Ursus maritimus*). TRYLAND *et al.* (2001) konnten bei 5,4 % von 297 untersuchten Eisbären *Brucella*-spezifische Antikörper nachweisen. Viele Meeressäugerkadaver werden an den Küsten angespült und sind dort gut zugänglich für Vögel und andere wildlebende terrestrische Säugetiere. In den USA wurden bei zwei Waschbären *Brucella*-spezifische Antikörper nachgewiesen (96). Desweiteren befinden sich die bevorzugten Geburtsorte der *Pinnipediae* auf Sandbänken in Küstennähe bzw. direkt an der Küste (113). Somit besteht auch hier die Möglichkeit für andere Tierarten Placentagewebe oder Totgeburtenanteile aufzunehmen oder in die angrenzende Umgebung zu verschleppen (96). An der deutschen Nordseeküste besteht in dieser Hinsicht die Gefahr der Übertragung auf die in Küstennähe weidenden Schafe. Die Empfänglichkeit von Schafen für marine Brucellen und eine damit verbundene geringgradig erhöhte neonatale Mortalität wurde von FOSTER *et al.* (2002) nachgewiesen. Durch eine eventuelle Verbreitung der marinen Brucellen durch Vögel ist auch eine Übertragung auf Rinder denkbar. Diese könnte sich angesichts der Untersuchungen von RHYAN *et al.* (2001) in Serokonversion und Aborten niederschlagen.

Das zoonotische Potential der marinen Brucellen stellt weiterhin ein nicht einschätzbares Risiko dar. BREW *et al.* (1999) beschrieben die Infektion eines Labormitarbeiters mit einem marinen Brucellenstamm. Der Patient war seropositiv und zeigte Symptome wie Kopfschmerzen, Sinusitis und Mattigkeit. Infolgedessen kann angenommen werden, dass die marinen Brucellen die Fähigkeit besitzen, auch beim Menschen eine Infektion zu verursachen. In Anbetracht der vielen unterschiedlichen Übertragungswege der Brucellen muss vor allem für Fischer,

Zoologen, Laborarbeiter, Tierärzte, Tierpfleger und andere Mitarbeiter in Meeressäugerrehabilitationszentren von einem erhöhten Infektionsrisiko ausgegangen werden (48, 122). Im Rahmen eines 2002 durchgeführten Screenings bei Personen (n=10) mit Kontakt zu Seehunden der deutschen Nordseeküste verliefen die Untersuchungen auf Brucellen-Antikörper allerdings in allen Fällen negativ (R. WEISS, U. SIEBERT, persönliche Mitteilung).

Häufig sind die Lebensräume der Meeressäuger gleichzeitig beliebte Tourismusziele, wie z. B. die Insel Sylt. Hier kann es durch unsachgemäßes Verhalten der Touristen zu Kontakt mit von ihren Muttertieren verlassenen Seehundheulern kommen. Ein weiteres Risiko besteht in bestimmten Regionen in der Verwendung von Meeressäugerprodukten als menschliche Nahrung (48). Eine Infektion während der Fleischverarbeitung ist ebenfalls nicht auszuschließen (122). Durch Erhitzung des Fleisches ist eine Übertragung von Brucellen zwar relativ sicher zu vermeiden, durch Einfrieren werden die Bakterien allerdings nicht abgetötet. Ein erhöhtes Risiko einer Infektion besteht schließlich auch beim Menschen durch den Verzehr von roher Leber, die bei einigen Inuit-Stämmen als Delikatesse gilt (48).

Die Aufklärung von Pathogenese, Übertragungswegen und des zoonotischen Potentials der marinen Brucellen sind somit von beträchtlichem Interesse und sollten unbedingt Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von aus Meeressäugern der deutschen Nordsee isolierten Brucellen sowie die Klärung ihres Verwandtschaftsgrades mit klassischen *Brucella* sp. und mit marinen Brucellen anderer geographischer Herkunft. Für die Untersuchungen standen 49 *Brucella*-Feldisolate, die zwischen 1997 und 2001 aus unterschiedlichen Organen von 28 Seehunden (*Phoca vitulina*), einem Schweinswal (*Phocoena phocoena*) und einer Kegelrobbe (*Halichoerus grypus*) isoliert werden konnten, zur Verfügung.

Auf der Basis der phänotypischen Untersuchungen ließen sich alle 49 marinen Isolate der Gattung *Brucella*, jedoch keiner der bisher bekannten klassischen Brucellenspezies zuordnen. Eine im Rahmen dieser Untersuchungen festgestellte erhöhte NaCl-Resistenz der marinen Isolate im Vergleich zu den klassischen terrestrischen Brucellenarten wurde dabei als Ausdruck einer Anpassung an den Lebensraum Meer gedeutet.

Die molekulare Charakterisierung der 49 Brucellen-Isolate erfolgte durch Analyse des *omp2*-Genlokus und *IS711*-Fingerprinting.

Der *omp2*-Genlokus, bestehend aus den Genen *omp2a* und *omp2b*, wurde u.a. einer PCR-RFLP-Analyse mit 13 Restriktionsenzymen unterzogen, was die Klassifikation von 47 der 49 marinen Feldisolate als Angehörige der erst kürzlich neu vorgeschlagenen Spezies *Brucella pinnipediae* ermöglichte. Im Rahmen dieser Analyse ließ sich für die Mehrheit (n=44) der marinen Feldisolate dasselbe RFLP-Muster (*omp2a*:Muster I, *omp2b*:Muster L) wie für den Referenzstamm NCTC 12890 ermitteln. In Kombination mit dem *omp2a*-Muster I zeigte ein Stamm das *omp2b*-Muster O, ein weiterer das *omp2b*-Muster M und ein drittes Isolat wies ein bisher nicht beschriebenes *omp2b*-Muster auf. Bei den zwei restlichen Isolaten aus zwei verschiedenen Seehunden wichen die *omp2b*-Muster deutlich von denen der anderen Feldisolate ab und zeigten große Ähnlichkeiten mit dem *omp2a*-Muster. Durch eine daraufhin eingeleitete Sequenzierung der *omp2*-Gene dieser Isolate konnte erstmals die Anwesenheit von zwei *omp2a*-Genen anstelle je eines *omp2a*- und eines *omp2b*-Gens bei marinen *Brucella*-Spezies, ähnlich wie für *Brucella ovis* beschrieben, nachgewiesen werden.

Alle marinen Isolate inklusive der beiden marinen Referenzstämme NCTC 12890 und NCTC 12891 wiesen im Vergleich zu den klassischen Brucellenspezies eine

wesentlich höhere *IS711*-Kopienanzahl im Genom auf. Außerdem konnte bei allen marinen Feldisolaten die als marinspezifisch angesehene *IS711*-Kopie auf einem ca. 1,7 kbp-großen *EcoRI*-Fragment detektiert werden. Die *IS711*-Hybridisierungsmuster lassen auf einen hohen Verwandtschaftsgrad zwischen dem Referenzstamm NCTC 12890, der von einem Seehund der britischen Küste stammt, und den eigenen marinen Feldisolaten schliessen.

Schließlich wurden in dieser Arbeit 370 Serumproben von vier unterschiedlichen Meeressäugerspezies (353 Seehunde, 3 Kegelrobben, 13 Schweinswale, 1 Delfin) mittels Langsamagglutination serologisch untersucht. Dabei konnten *Brucella*-spezifische Antikörper in 13% der Proben von Seehunden sowie in 7,7% der Sera von Schweinswalen nachgewiesen werden. Diese die immunologische Auseinandersetzung der Wirtstiere mit den marinen *Brucella* sp. widerspiegelnden Daten sind als orientierende epidemiologische Hinweise über die Verbreitung von Brucellen in den Meeressäugerpopulationen der deutschen Nordsee anzusehen. Hinsichtlich der klinischen Bedeutung dieser Bakterien für die marinen Säugetiere ergaben sich im Rahmen dieser Untersuchungen indes keine neuen Aspekte.

7 Summary

The aim of the present study was to identify and characterize *Brucella* strains isolated from marine mammals of the German North Sea and to clarify how they correspond to marine *Brucella* isolates from other geographical regions.

Investigations were performed with 49 *Brucella* strains isolated between 1997 and 2001 from different organ samples of 28 common seals (*Phoca vitulina*), one harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) and one grey seal (*Halichoerus grypus*).

According to the classical phenotypic criteria for *Brucella* differentiation, all 49 isolates were identified as CO₂-dependent *Brucella* sp. not belonging to one of the species known so far. In comparison to the terrestrial species an increased NaCl-resistance of the marine *Brucella* strains could be stated, indicating a possible strain adaptation to the ecosystem of the ocean.

Molecular characterization was performed utilizing the *omp2* and *IS711* gene loci. The *omp2* gene locus, consisting of the *omp2a* and *omp2b* gene, was the target of PCR-RFLP studies by use of 13 restriction endonucleases, resulting in the classification of 47 from 49 marine *Brucella* isolates as members of the recently proposed species *Brucella pinnipediae*. The majority (n=44) of the marine field strains studied yielded the same RFLP-patterns (*omp2a*: pattern I, *omp2b*: pattern L) like the reference strain NCTC12890. Three other strains with *omp2a* restriction pattern I revealed *omp2b* patterns of type O, type M and, respectively, of a so far unknown type. As for the remaining two strains originating from two other seals, their *omp2b* RFLP pattern differed definitely from those of the other marine isolates, in that resembling highly to the *omp2a* pattern. Sequencing of the *omp2* genes of one of the strains revealed the presence of two *omp2a* genes while an *omp2b*-gene was lacking. This to my knowledge first demonstration of a twofold *omp2a* gene presence in a *Brucella* strain of marine mammal origin has been described before for *Brucella ovis* only.

In comparison to classical *Brucella* strains all marine *Brucella* isolates including both marine reference strains NCTC 12890 and NCTC 12891 possessed a definitely higher number of *IS711* copies in their genome. The *IS711* copy on a 1,7 kbp *EcoRI* fragment accounted marine specific could be detected in all 49 marine *Brucella* isolates as well. Hybridization patterns of *IS711* indicate a close relationship between

the investigated *Brucella* isolates and the reference strain NCTC 12890 originating from a common seal of the british coast.

Serologically, a total of 370 serum samples from four different marine mammal species (353 harbour seals, 3 grey seals, 13 harbour porpoises, 1 dolphin) have been investigated by slow tube agglutination test. *Brucella* specific antibodies could be detected in 13% of the tested seal samples as well as in 7,7% of the investigated porpoises samples. These results are indicative of an immunological response of the marine hosts to *Brucella* sp. and can be interpreted as an orientating hint concerning the epidemiological spreading of the agent in the marine mammal population of the German North Sea. As for the clinical significance of these organisms for marine as well as terrestrial hosts further studies are needed.

8 Literaturverzeichnis

1. **Allardet-Servent, A., Bourg, G., Ramuz, M., Pages, M., Bellis, M. & Roizes, G.** 1988. DNA polymorphism in strains of the genus *Brucella*. J. Bacteriol. 170, 4603-4607.
2. **Alonso-Urmeneta, B., Marin, C., Aragon, V., Blasco, J. M., Diaz, R. & Moriyon, I.** Evaluation of lipopolysaccharides and polysaccharides of different epitopic structures in the indirect enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of brucellosis in small ruminants and cattle. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 5, 749-754.
3. **Alton, G. G., Jones, L. M., Angus, R. D. & Verger, J. M.** 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. 44.
4. **Anon.** 1986. Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis, 6th report. World Health Organization, Geneva.
5. **Baucheron, S., Grayon, M., Zygmunt, M. S. & Cloeckaert, A.** 2002. Lipopolysaccharide heterogeneity in *Brucella* strains isolated from marine mammals. Res. Microbiol. 153, 277-80.
6. **Blank, O., Retamal, P., Torres, D. & Abalos, P.** 2000. New data on anti-*Brucella* antibodies detection in *Arctocephalus gazella* from Cape Shirreff, Livingston Island, Antarctica. CCAMLR Science 8, 147-154.
7. **Bisping, W. & Amtsberg, G.** 1988. Farbatlas zur Diagnose bakterieller Infektionserreger der Tiere. Paul Parey, Berlin und Hamburg. 246-262.
8. **Brew, S. D., Perrett, L. L., Stack, J. A., MacMillan, A. P. & Staunton, N. J.** 1999. Human exposure to *brucella* recovered from a sea mammal. Vet. Rec. 144, 483.
9. **Bricker, B. J. & Halling, S. M.** 1994. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv.1 by PCR. J. Clin. Microbiol. 32, 2660-2666.

10. **Bricker, B. J., Ewalt, D. R., MacMillan, A. P., Foster, G. & Brew, S.** 2000. Molecular characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. J Clin. Microbiol. 38, 1258-1262.
11. **Bricker, B. J.** 2002. Diagnostic strategies used for the identification of *Brucella*. Vet Microbiol. **90**, 433-434:
12. **Bricker, B. J.** 2002. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. Vet Microbiol. **90**, 435-446.
13. **Busch, U & Nitschko, H.** 1999. Methods for differentiation of microorganisms. J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 5, 263-278.
14. **Bundle, D. R., Cherwonogrodzky, J. W., Gidney, M. A. J., Meikle, P. J., Malcom, B. P. & Peters, T.** 1989. Definition of *Brucella* A and M epitopes by monoclonal typing reagents and synthetic oligosaccharides. Inf. Immun. 57, 2829-2836.
15. **CBC News** 2001. [Online]
<http://cbc.ca/cgi-bin/templates/print.cgi?/2001/08/08/08be>; Letzter Zugang 01.07.2002.
16. **Chatterjee, B. D. & Chakraborti, C. K.** 1994. Rapid diagnosis of anaerobic gram-positive cocci by salt tolerance. J. Indian. Med. Assoc. 92 (8), 255-256.
17. **Chomzcynski, P.** 1992. One hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. Anal. Biochem. 201, 134-139.
18. **Clavareau, C., Wellemans, V., Walravens, K., Tryland, M., Verger, J.-M., Grayon, M., Cloeckaert, A., Letesson, J.-J. & Godfroid, J.** 1998. Phenotypic and molecular characterization of a *Brucella* strain isolated from a minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*). Microbiology 144, 3267-3273.
19. **Cloeckaert, A., Zygmunt, M. S., de Wergifosse, P., Dubray, G. & Limet, J. N.** 1992. Demonstration of peptidoglycan-associated *Brucella* outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies. J.Gen.Microbiol.138, 1543-1550.
20. **Cloeckaert, A., Verger, J.-M., Grayon & Grepinet, O.** 1995. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. Microbiology 141, 2111-2121.

21. **Cloekaert, A., Verger, J.-M., Grayon, M., Zygmunt, M. S. & Grepinet, O.** 1996. Nucleotid sequence and expression of the gene encoding the major 25-kilodalton outer membrane protein of *Brucella ovis*: Evidence for antigenic shift, compared with other *Brucella* species, due to a deletion in the gene. *Infect. Immun.* 64, 2047-2055.
22. **Cloekaert, A., Weynants, V., Godfroid, J., Verger, J.-M., Grayon, M & Zygmunt, M. S.** 1998. O-polysaccharide epitopic heterogeneity at the surface of *Brucella* spp. studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5, 862-870.
23. **Cloekaert, A., Grayon, M. & Grepinet, O.** 2000. An *IS711* element downstream of the *bp26* gene is a specific marker of *Brucella* spp. isolated from marine mammals. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7, 835-839.
24. **Cloekaert, A., Verger, J.-M., Grayon, Paquet, J.-Y., Garin-Bastuji, B., Foster, G. & Godfroid, J.** 2001. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus. *Microbes Infect.* 3, 729-738.
25. **Cloekaert, A., Vizcaino, N., Paquet, J.-Y., Bowden, R. A & Elzer, P. H.** 2002. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. *Vet. Microbiol.* 90, 229-247.
26. **Corbel, M. J. & Brinley-Morgan, W. J. B.** 1984. Genus *Brucella* Meyer and Shaw 1920 . In: Krieg, N. R., Holt, J. G. (Eds.), *Bergey's Manual of systematic Bacteriology* Vol. 1, Williams and Wilkins, Baltimore. 377-388.
27. **Corbel, M. J.** 1997. Brucellosis: An overview. *Emerg. Infect. Dis.* 3, 213-221.
28. **Da Costa, M., Guillou, J.-P., Garin-Basruji, B., Thiebaud, M. & Dubray, G.** 1996. Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 267-75.
29. **Davis, D. S.** 1990. Brucellosis in wildlife. In: K. Nielsen & R. J. Duncan (Eds.). *Animal brucellosis.* CRC Press, Florida, 321-334.
30. **Davis, D. S. & Elzer, P. H.** 2002. *Brucella* vaccines in wildlife. *Vet. Microbiol.* 90, 533-544.

31. **Dornand, J., Gross, A., Lafont, V., Liautard, J., Oliaro, J. & Liautard, J.-P.** 2002. The innate immune response against *Brucella* in humans. *Vet. Microbiol.* 90, 383-394.
32. **Douglas, J. T., Rosenberg, E. Y., Nikaido, H., Verstrete, D. R. & Winter, A. J.** 1984. Porins of *Brucella* species. *Infect. Immun.* 44, 16-21.
33. **Douglas, J. T., Palmer, D. A.** 1988. Use of monoclonal antibodies to identify the distribution of A and M epitopes on smooth *Brucella* species. *J. Clin. Microbiol.* 26, 1353-1356.
34. **Dubray, G. & Charriaut, C.** 1983. Evidence of three major polypeptide species and two major polysaccharide species in the *Brucella* outer membrane. *Ann. Rech. Vet.* 14, 311-318.
35. **Duignan, P. J.** 2000. New Zealand's Animal Health Status. [Online] <http://www.maf.govt.nz/mvg/vol27-3/surv27-3.pdf>; Letzter Zugang Mai 2001.
36. **Essenberg, R. C., Seshadri, R., Nelson, K. & Paulsen, I.** 2002. Sugar metabolism by *Brucellae*. *Vet. Microbiol.* 90, 249-261.
37. **Ewalt, D. R. & Bricker, B. J.** 2000. Validation of the abbreviated *Brucella* AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of *Brucella abortus* field strain isolates and the vaccine strains, 19 and RB51. *J. Clin. Microbiol.* 38, 3085-3086.
38. **Ewalt, D. R., Payeur, J. B., Martin, B. M., Cummins, D. R. & Miller, W. G.** 1994. Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 448-452.
39. **Felsenstein, J.** 1985. Confidence limits on phylogenetics: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
40. **Ferguson, M. A.** 1997. Rangiferine brucellosis on Baffin Island. *J. Wildl. Dis.* 33 (3), 536-543.
41. **Ficht, T. A., Bearden, S. W., Sowa, B. A. & Adams, L. G.** 1989. DNA sequence and expression of the 36-kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 57, 3281-3291.

42. **Ficht, T. A., Bearden, S. W., Sowa, B. A. & Marquis, H.** 1990. Genetic variation at the *omp2* porin locus of the *brucellae*: species-specific markers. *Mol. Microbiol.* 4, 1135-1142.
43. **Ficht, T. A.** 2002. Intracellular survival of *Brucella*: defining the link with persistence. *Vet. Microbiol.* 90, 213-223.
44. **Fiori, P. L., Mastrandrea, S., Rappelli, P & Cappuccinelli, P.** 2000. *Brucella abortus* infection acquired in microbiology laboratories. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2005-2006.
45. **Forbes, L. B., Nielsen, O., Measures, L & Ewalt, D. R.** 2000. Brucellosis in ringed seals and harp seals from Canada. *J. Wildl. Dis.* 36, 595-598.
46. **Foster, G., Jahans, K. L., Reid, R. J. & Ross, H. M** 1996. Isolation of *Brucella* species from cetaceans, seals and an otter. *Vet. Rec.* 138, 583-586.
47. **Foster, G., Patterson, I. A. & Munro, D. S.** 1999. Monophasic group B *Salmonella* species infecting harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) inhabiting Scottish coastal waters. *Vet. Microbiol.* 65 (3), 227-231.
48. **Foster, G., MacMillan, A. P., Godfroid, J., Howie, F., Ross, H. M., Cloeckaert, A., Reid, R. J., Brew, S. & Patterson, I. A. P.** 2002. A review of *Brucella* sp. infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. *Vet. Microbiol.* 90, 563-580.
49. **Fox, G. E., Wisotzkey, J. D. & Jurtschuk, P. Jr.** 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 166-170.
50. **Galas, D. J. & Chandler, M.** 1989. Bacterial insertion sequences. In: Berg, D. E. & Howe, M. M. (Eds.), *Mobile DNA*. American Society for Microbiology, Washington, DC, 109-162.
51. **Gandara, B., Lopez Merino, A., Rogel, M. A. & Martinez-Romero, E.** 2001. Limited genetic diversity of *Brucella* spp.. *J. Clin. Microbiol.* 39, 235-240.
52. **Garcia-Pichel, F., Nubel, U. & Muyzer, G.** 1998. The phylogeny of unicellular, extremely halotolerant cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* 169 (6), 469-482.
53. **Gargani, G & Tolari, F.** 1986. *Brucella* phagotypes: their relation to the spread of infection in Italy. *Eur. J. Epidemiol.* 2, 67-79.

54. **Garner, M. M., Lambourn, D. M., Jeffries, S. J., Briggs Hall, P., Rhyan, J. C., Ewalt, D. R., Polzin, L. M. & Cheville, N. F.** 1997. Evidence of *Brucella* infection in *Parafilaroides* lungworms in a Pacific Harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*). J. Vet. Diagn. Invest. 9, 298-303.
55. **Geyik, M. F., Dikici, B., Kokoglu, O. F., Bosnak, M., Celen, M. K., Hosoglu, S. & Ayaz, C.** 2003. Therapeutic effect of spiramycin in brucellosis. Pediatr. Int. 45, 31-34.
56. **Godfroid, J.** 2002. Brucellosis in wildlife. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 21 (2), 277-286.
57. **Gonzales, L., Patterson, I. A., Reid, R. J., Foster, G., Barberan, M., Blasco, J. M., Kennedy, S., Howie, F. E., Godfroid, J., MacMillan, A. P., Schock, A. & Buxton, D.** 2002. Chronic meningoencephalitis associated with *Brucella* sp. in live-stranded Striped Dolphins (*Stenella coeruleoalba*). J. Comp. Pathol. 126, 147-52.
58. **Hall, W. H. & Manion, R. E.** 1970. In vitro susceptibility of *Brucella* to various antibiotics. Appl. Microbiol. 20, 600-604.
59. **Halling, S. M. & Zehr, E. S.** 1990. Polymorphism in *Brucella* spp. due to highly repeated DNA. J. Bacteriol. 172, 6637-6640.
60. **Halling, S. M., Tatum, F. M & Bricker, B. J.** 1993. Sequence and characterization of an insertion sequence, *IS711*, from *Brucella ovis*. Gene 133, 123-127.
61. **Hoover, D. L. & Friedlander, M. D.** Brucellosis. [Online].
https://ccc.apgea.army.mil/sarea/products/textbook/Web_Version/chapters/chapter_25.htm; Letzter Zugang 30.06.05.
62. **Hornsby, R. L., Jensen, A. E., Olsen, S. C. & Thoen, C. O.** 2000. Selective media for isolation of *Brucella abortus* strain RB51. Vet. Microbiol. 73, 51-60.
63. **Hurtado, R.** 2001. Brucellosis – new and old issues regarding diagnosis and management. [Online] <http://mgh.harvard.edu/id/images/brucellosis.pdf>; Massachusetts General Hospital Education, Harvard medical school. Letzter Zugang März 2003.

64. **Iida, S., Meyer, J. & Arber, W.** 1983. Procaryotic IS elements. In: Shapiro, J. A. (Ed.), Mobile Genetic Elements. Academic Press, New York, NY, 159-221.
65. **Jahans, K. L., Foster, G. & Broughton, E. S.** 1997. The characterisation of *Brucella* strains isolated from marine mammals. Vet. Microbiol. 57, 373-382.
66. **Jensen, A. E., Cheville, N. F., Thoen, C. O., MacMillan, A. P. & Miller, W. G.** 1999. Genomic fingerprinting and development of a dendrogram for *Brucella* spp. isolated from seals, porpoises, and dolphins. J. Vet. Diagn. Invest. 11, 152-157.
67. **Jepson, P. D., MacMillan, A. P., Baker, J. R., Barnett, J., Kirkwood, J. K., Kuiken, T., Robinson, I. R. & Simpson, V. R.** 1997. Antibodies to *Brucella* in marine mammals around the coast of England and Wales. Vet. Rec. 141, 513-515.
68. **Kim, J.-A. & Mayfield, J.** 2000. Identification of *Brucella abortus* OxyR and its role in control of catalase expression. J. Bacteriol. 182, 5631-5633.
69. **Kroker, R., Löscher, W., Simunek, J., Trolldenier, H. & Ungemach, F. R.** 1996. Chemotherapeutika bakterieller Infektionen In: Frey, H. H./Löscher, W. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie der Veterinärmedizin. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart. 454-508.
70. **Leal-Klevezas, D. S., Martinez-Vazquez, I. O., Lopez-Merino, A. & Martinez-Soriano, J. P.** 1995. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. J. Clin. Microbiol. 33 (12), 3087-3090.
71. **Lewin, B.** 1998. Molekularbiologie der Gene. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin. 443.
72. **Löffler, G. & Petrides, P. E.** 1998. Biochemie und Pathobiochemie. 6. Auflage. Springer Verlag. Berlin Heidelberg New York.
73. **Ludwig, W., Amann, R., Martinez-Romero, E., Schönhuber, W., Bauer, S., Neef, A. & Schleifer, K.-H.** 1998. rRNA based identification and detection systems for rhizobia and other bacteria. Plant and Soil 204, 1-19.
74. **Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J.** 2000. In: Brock, T. D. Biology of Microorganisms. 9th edition. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey. 156-158.

75. **Marquis, H. & Ficht, T.** 1993. The *omp2* gene locus of *Brucella abortus* encodes two homologous outer membrane proteins with properties characteristic of bacterial porins. *Infect. Immun.* 61, 3785-3790.
76. **Martinez de Tejada, G., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E. & Moriyon, I.** 1995. The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infect. Immun.* 63, 3054-3061.
77. **Meyer, K. F. & Shaw, E. B.** 1920. A comparison of the morphologic, cultural and biochemical characteristics of *B. abortus* and *B. melitensis* from cattle. Studies on the genus *Brucella* nov. gen. *J. Infect. Dis.* 27, 173-184.
78. **Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Jumas-Bilak, E., Guigue-Talet, P., Allardet-Servent, A., O'Callaghan, D & Ramuz, M.** 1997. Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. *J. Bacteriol.* 179, 3244-3249.
79. **Miller, W. G., Adams, L. G., Ficht, T. A., Cheville, N. F., Payuer, J. P., Harley, D. R., House, C. & Ridgway, S. H.** 1999. *Brucella*-induced abortion and infection in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *J. Zoo. Wildl. Med.* 30 (1), 100-110.
80. **Miyagi, K., Omura, K., Ogawa, A, Hanafusa, M., Nakano, Y., Morimatsu, S. & Sano, K.** 2001. Survival of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in marine water and frequent detection of the Shiga toxin gene in marine water samples from the estuary port. *Epidemiol. Infect.* 126 (1), 129-133.
81. **Mobasheri, H., Ficht, T. A., Marquis, H., Lea, E. J. A. & Lakey, J. H.** 1997. *Brucella omp2a* and *omp2b* porins: single channel measurements and topology prediction. *FEMS Microbiol. Lett.* 155, 23-30.
82. **Moreno, E., Cloeckaert, A & Moriyon, I.** 2002 *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet. Microbiol.* 90, 209-227.
83. **Morgan, W. T. B. & McDiarmid, A.** 1960. The excretion of *Brucella abortus* in the milk of experimentally infected cattle. *Res. Vet. Sci.* 1, 53-56.
84. **Morgan, W. J. & Corbel, M. J.** 1976. Recommendations for the description of species and biotypes of the genus *Brucella*. *Dev. Biol. Stand.* 31, 27-37.
85. **Nicoletti, P.** 1980. The epidemiology of bovine brucellosis. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 24, 69-84.

86. **Nicoletti, P.** 2002. A short history of brucellosis. *Vet. Microbiol.* 90, 5-9.
87. **Nielsen, K.** 2002. Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet. Microbiol.* 90, 447-459.
88. **Nielsen, O., Stewart, R. E. A., Nielsen, K., Measures, L. & Duignan, P.** 2001. Serologic survey of *Brucella* species antibodies in some marine mammals of North America. *J. Wildl. Dis.* 37, 89-100.
89. **Nöckler, K., Kutzer, P., Rosenberger, N., Draeger, A. P., Bahn, P., Göllner, C. & Erlbeck, C.** 2003. Brucellose des Hundes – eine Fallbeschreibung. *BMTW* 116, 368-372.
90. **Ohishi, K., Zenitani, R., Bando, T., Goto, Y., Uchida, K., Maryama, T., Yamamoto, S., Miyazaki, N. & Fujise, Y.** 2003. Pathological and serological evidence of *Brucella*-infection in baleen whales (Mysticeti) in the western pacific. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 26 (2), 125-36.
91. **OIE.** 2000. Manual of standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 4th edition. Chapter 2.4.2. Caprine and ovine brucellosis [Online] http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00063.htm; Update vom 22.04.2002. Letzter Zugang 20.01.03.
92. **Ouahrani-Bettache, S., Michaux, S., Sri Widada, J., Bourg, G., Tournebize, R., Ramuz, M & Liautard, J.-P** 1993. Identification and sequence analysis of *IS6501*, an insertion sequence in *Brucella* spp.: relationship between genomic structure and the number of *IS6501* copies. *J. Gen. Microbiol.* 139, 3265-3273.
93. **Ouahrani-Bettache, S., Soubrier, M.-P. & Liautard, J.-P.** 1996. *IS6501*-anchored PCR for the detection and identification of *Brucella* species and strains. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 154-160.
94. **Palmer, A. D. & Douglas, J. T.** 1989. Analysis of *Brucella* lipopolysaccharide with specific and cross-reacting monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 27, 2331-2337.
95. **Paquet, J.-Y., Diaz, M. A., Genevrois, S., Grayon, M., Verger, J.-M., de Bolle, X., Lakey, J. H., Letesson, J.-J. & Cloeckert, A.** 2001. Molecular, antigenic, and functional analysis of omp2b porin size variants of *Brucella* spp. *J. Bacteriol.* 183, 4839-4847.

96. **Payeur, J. B., Carpenter, L., Ewalt, D. R., Garner, M. M., Jeffries, S. J., Lambourn, D. M., Norberg, B., Polzin, L. & Rhyan, J. C.** 1998. Evidence of *Brucella* species infection in Pacific Harbor seals (*Phoca vitulina richardsi*), California Sea lions (*Zalophus californianus*) and Harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) in Pudget Sound, Washington. OIE International Congress with WHO-Cosponsorship on Anthrax, Brucellosis, CBPP, Clostridial and Mycobacterial diseases. Berg-en-Dal, Kruger National Park, South Africa. 173-177.
97. **Queipo-Ortuno, M. I., Morata, P., Ocon, P., Manchado, P. & de Dios Colmenero, J.** 1997. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2927-2930.
98. **Quinn, P. J., Markey, B. K., Carter, M. E., Donnelly, W. J. C. & Leonard, F. C.** 2002. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. London. Blackwell Science Ltd. 162-167.
99. **Raverty, S., Stephen, C., Fiessel, W. & Carlsen, K.** 2001. A preliminary microbiological and serological investigation into *Brucella* spp. in neonatal and juvenile Harbour seals (*Phoca vitulina richardsi*) presented to the Vancouver Aquarium Marine Mammal Centre and Saltspring Island Wildlife Natural Care Centre. *Diagnostic Diary* 11, 13-14.
100. **Redkar, R., Rose, S., Bricker, B. & DeVecchio, V.** 2001. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Mol. Cell. Probes* 15, 43-52.
101. **Rhyan, J. C.** 2001 Brucellosis research - Where we are and what do we need? National Institute for Animal Agriculture Proceedings [Online] http://www.animalagriculture.org/Proceedings2001%20Proc/Brucellosis_Research_Where.htm; Letzter Zugang 06.02.02.
102. **Rhyan, J. C., Gidlewski, T., Ewalt, D. R., Hennager, S. G., Lambourne, D. M. & Olsen, S. C.** 2001. Seroconversion and abortion in cattle experimentally infected with *Brucella* sp. isolated from a Pacific Harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*). *J. Vet. Diagn. Invest.* 13, 379-382.
103. **Rigby, C. E. & Fraser, A. D. E.** 1989. Plasmid transfer and plasmid-mediated genetic exchange in *Brucella abortus*. *Can. J Vet. Res.* 53, 326-330.

104. **Rijpens, N. P., Jannes, G., Van Asbroeck, M., Rossau, R. & Herman, L. M. F.** 1996. Direct detection of *Brucella* spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S – 23S rRNA spacer probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1683-1688.
105. **Robertson, L., Farrell, I. D. & Hinchcliffe, P. M.** 1973. The sensitivity of *Brucella abortus* to chemotherapeutic agents. *J. Med. Microbiol.* 6, 549-557.
106. **Romero, C., Gamazo, C., Pardo, M. & Lopez-Goni, I.** 1995. Specific detection of *Brucella* by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33, 615-617.
107. **Ross, H. M., Foster, G., Reid, R. J., Jahans, K. L. & MacMillan, A. P.** 1994. *Brucella* species infection in sea-mammals. *Vet. Rec.* 134, 359.
108. **Ross, H. M., Jahans, K. L., MacMillan, A. P., Reid, R. J., Thompson, P. M. & Foster, G.** 1996. *Brucella* species infection in North Sea seal and cetacean populations. *Vet. Rec.* 138, 647-648.
109. **Salem, S. F. & Mohsen, A.** 1997. Brucellosis in fish. *Vet. Med. (Praha).* 42, 5-7.
110. **Samarina, I. V., Taran, I. F., Proskurina, V. A. & Liapustina, L. V.** 1991. Sensitivity of *Brucella melitensis* to various antibiotics, drug preparations and their combinations. *Antibiot. Khimiother.* 36 (4), 22-23.
111. **Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 74, 5463-5467.
112. **Schmidt, J.** Familie *Bacteriaceae*. In: Schmidt, J. and Weis, F. (Eds): *Bakterielle Naturhistorik Grundlag für det Bakteriologische Studium*, Morten Porsild, Kobenhavn, 1899-1901, 1901, pp. 248-296.
113. **Schütz, C.** [Online]
<http://www.bfn.de/natursport/test/SportinfoHTML/seehund.php>; Letzter Zugang: April 2005.
114. **Sifuentes-Rincon, A. M., Revol, A. & Barrera-Saldana, H. A.** 1997. Detection and differentiation of the six *Brucella* species by polymerase chain reaction. *Mol. Med.* 3, 734-739.
115. **Smith, A. W., Skilling, D. E. & Brown, R. J.** 1980. Preliminary investigation of a possible lung worm (*Parafilaroides decorus*), fish (*Girella nigricans*), and

- marine mammal (*Callorhinus ursinus*) cycle for San Miguel sea lion virus type 5. Am. J. Vet. Res. 41 (11), 1846-1850.
116. **Sohn, A. H., Probert, W. S., Glaser, C. A., Gupta, N., Bollen, A. W., Wong, J. D., Grace, E. M. & McDonald, W. C.** 2003. Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. Emerg. Infect. Dis. 9, 485-488.
117. **Southern, E. M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503.
118. **Sowa, B. A., Kelly, K. A., Ficht, T. A., Frey, M. & Adams, L. G.** 1991. SDS-soluble and peptidoglycan-bound proteins in the outer membrane-peptidoglycan complex of *Brucella abortus*. Vet. Microbiol 27, 351-369.
119. **Stoener, H. G., Lackman, D. B.** 1957. A new species of *Brucella* isolated from the desert wood rat, *Neotoma lepida* Thomas. J. Am. Vet. Med. Assoc. 18, 947-951.
120. **Taylor, D. C.** 1982. A case of brucellosis in a killer whale. In: Proceedings of the 10th Symposium for the European Association for Aquatic Mammals, Antwerpen. Aquat. Mamm. 9, 4-5.
121. **Tryland, M., Kleivane, L., Alfredsson, A., Kjeld, M., Arnason, A., Stuen, S. & Godfroid, J.** 1999. Evidence of *Brucella* infection in marine mammals in the North Atlantic Ocean. Vet. Rec. 144, 588-592.
122. **Tryland, M.** 2000. Zoonoses of arctic marine mammals. Infect. Dis. Rev. 2, 55-64.
123. **Tryland, M., Derocher, A. E., Wiig, O. & Godfroid, J.** 2001. *Brucella* sp. antibodies in polar bears from Svalbard and the Barents sea. J. Wildl. Dis. 37, 523-31.
124. **Van Bresseem, M.-F., Van Waerebeek, K., Raga, J. A., Godfroid, J. Brew, S. D. & MacMillan, A. P.** 2001. Serological evidence of *Brucella* species infection in odontocetes from the south Pacific and the Mediterranean. Vet. Rec. 148, 657-661.
125. **Vemulapalli, R., McQuiston, J. R., Schurig, G. G., Sriranganathan, N., Halling, S. M. & Boyle, S. M.** 1999. Identification of an *IS711* element

- interrupting the *wboA* gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. Clin Diagn Lab Immunol. 6, 760-764.
126. **Verger, J.-M., Grimont, F., Grimont, B. M. & Grayon, M.** 1985. *Brucella* A monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. Int. J. Syst. Bacteriol. 35, 292-295.
127. **Verger, J.-M., Garin-Bastuji, B., Grayon, M. & Mahe, A. M.** 1989. Bovine brucellosis caused by *Brucella melitensis* in France. Ann. Rech. Vet. 20 (1), 93-120.
128. **Verger, J.-M., Grayon, M., Chaslus-Dancla, E., Meurisse, M. & Lafont, J. P.** 1993. Conjugative transfer and in vitro/in vivo stability of the broad-host-range IncP R751 plasmid in *Brucella* spp. Plasmid 29 (2), 142-146.
129. **Verger, J.-M., Grayon, M., Cloeckert, A., Lefevre, M., Ageron, E. & Grimont, F.** 2000. Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals using DNA-DNA hybridization and ribotyping. Res. Microbiol. 151, 797-799.
130. **Verstraete, D. R., Creasy, M. T., Caveney, N. T., Baldwin, C. L., Blab, M. W. & Winter, A. J.** 1982. Outer membrane proteins of *Brucella abortus*: isolation and characterization. Inf. Immun. 35, 979-989.
131. **Vizcaino, N., Cloeckert, A., Zygmunt, M. S. & Dubray, G.** 1996. Cloning, nucleotide sequence and expression of the *Brucella melitensis omp31* gene coding for an immunogenic outer membrane protein. Inf. Immun. 64, 3744-3751.
132. **Vizcaino, N., Verger, J. M., Grayon, M., Zygmunt, M. S. & Cloeckert, A.** 1997. DNA polymorphism at the *omp31*-locus of *Brucella* spp.: Evidence for a large deletion in *Brucella abortus*, and other species-specific markers. Microbiology 143, 2913-2921.
133. **Vizcaino, N., Cloeckert, A., Zygmunt, M. S. & Fernandez-Lago, L.** 1999. Molecular characterization of a *Brucella* species large DNA fragment deleted in *Brucella abortus* strains: Evidence for a locus involved in the synthesis of a polysaccharid. Infect. Immun. 67, 2700-2712.

134. **Vizcaino, N., Kittelberger, R., Cloeckert, A., Marin, C. M. & Fernandez-Lago, L.** 2001. Minor nucleotide substitutions in the *omp31* gene of *Brucella ovis* result in antigenic differences in the major outer membrane protein that it encodes compared to those of the other *Brucella* species. *Infect. Immun.* 69, 7020-7028.
135. **Vreeland, R. H., Anderson, R. & Murray, R. G.** 1984. Cell wall and phospholipid composition and their contribution to the salt tolerance of *Halomonas elongata*. *J. Bacteriol.* 160 (3), 879-883.
136. **Vreeland, R. H.** 1987. Mechanisms of the halotolerance in microorganisms. *Crit. Rev. Microbiol.* 14 (4), 311-356.
137. **Weynants, V., Gilson, D., Cloeckert, A., Tibor, A., Denoel, P. A., Godfroid, F., Limet, J. N. & Letesson, J.-J.** Characterization of smooth lipopolysaccharides and O polysaccharides of *Brucella* species by competition binding assays with monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 65, 1939-1943.
138. **WHO** 1997. Brucellosis. WHO fact sheets N173.
139. **Wright, A. E. & Smith, F.** 1897. On the application of the serum test to the differential diagnosis of typhoid and Malta fever. *Lancet* 1, 656-659.

9 Anhang

Reagenzien

Agarose D-Low EEO	Fa. MAGV, Rabenau
Agar Agar	Fa. Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Fa. New England Biolabs, Frankfurt
Desoxyadenosintriphosphat (dATP)	Fa. MBI Fermentas, St. Leon - Rot
Desoxycytidintriphosphat (dCTP)	Fa. MBI Fermentas, St. Leon - Rot
Desoxyguanosintriphosphat (dGTP)	Fa. MBI Fermentas, St. Leon - Rot
Desoxythymidintriphosphat (dTTP)	Fa. MBI Fermentas, St. Leon - Rot
EDTA Na ₂ x 2 H ₂ O	Fa. Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Fa. Merck, Darmstadt
Ethanol (99%)	Fa. Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Fa. Serva, Heidelberg
Formamid	Fa. Sigma, Deisenhofen
Fuchsin	Fa. Merck, Darmstadt
HCl	Fa. Merck, Darmstadt
Maleinsäure	Fa. Merck, Darmstadt
Methanol	Fa. KMF Laborchemie Handels GmbH, St. Augustin
MgCl	Fa. Merck, Darmstadt
Na-Acetat	Fa. Roth, Karlsruhe
NaCitrat	Fa. Merck, Darmstadt
NaCl	Fa. Merck, Darmstadt
Na-Dodecylsulfat (SDS)	Fa. Merck, Darmstadt
N-Lauroylsarkosin	Fa. Sigma, Deisenhofen
NaOH	Fa. Serva, Heidelberg
Proteinase K	Fa. Sigma, Deisenhofen
Safranin	Fa. Merck, Darmstadt
Thionin	Fa. Merck, Darmstadt
Tris	Fa. Roth, Karlsruhe
Tween 20	Fa. Roth, Karlsruhe

Geräte

Autoklav	Fa. Integra biosciences, Fernwald
Backofen	Fa. Memmert, Schwabach
Brutschränke	Fa. Heraeus, Hanau
Bunsenbrenner	Fa. Schütt, Göttingen
Eismaschine	Fa. Ziegler, Isernhagen
Elektrophoresekammern	Fa. Hybaid/MWG, Ebersberg,
	Fa. Keutz, Reiskirchen, Fa. Pharmacia, Freiburg
Feinwaage	Fa. Mettler-Waagen GmbH, Giessen
Gefriertruhen	Fa. Bosch, Jungingen, Fa. Heraeus, Hanau
	Fa. Kendro laboratory products
Geldokumentationsgerät	Fa. Herolab, Wiesloch
Hybridisierungssofen	Fa. Hybaid/MWG, Ebersberg

Kamera	Fa. Herolab, Wiesloch
Magnetrührer	Fa. Janke und Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen
Mikrowellenofen	Fa. Moulinex, Hamburg
pH-Meter	Fa. WTW, Weilheim
Pipetten	Fa. Eppendorf, Hamburg
Spektralphotometer	Fa. Beckman Instruments, Inc. Felleron, U.S.A.
Sterilbank	Fa. Heraeus, Hanau
Thermocycler	Fa. Perkin Elmer, Überlingen
Tischzentrifuge	Fa. Eppendorf, Hamburg, Fa. Heraeus, Hanau
UV-Lampe	Fa. Herolab, Wiesloch
Vortex	Fa. Bender & Hobel, Fa. Heidolph
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Zentrifuge	Fa. Beckmann, München

Verbrauchsmaterialien

Blotpapier	Fa. MAGV, Rabenau
Parafilm	Fa. MAGV, Rabenau
Pipettenspitzen	Fa. MAGV, Rabenau
Reaktionsgefäße	Fa. Eppendorf, Hamburg, Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark

Kulturmedien

Blutagar:

-Blutagar (Fa. Merck, Darmstadt)	50 g
-Schafblut	50 ml
-Aqua bidest	ad 1000 ml

Brain-Heart-Infusion-Agar:

-Brain-Heart-Infusion-Agar (Fa. Oxoid, Wesel)	47 g
-Hefe (Fa. Merck, Darmstadt)	5 g
-Schafblut	50 ml
-Aqua bidest	ad 1000 ml

Brucella-Selektiv-Agar:

- <i>Brucella</i> -Agar (Fa. Merck, Darmstadt)	41 g
-Kristallviolettlösung 0,1 %ig (Fa. Merck, Darmstadt)	1,4 ml
- <i>Brucella</i> selective supplement (Fa. Oxoid, Wesel)	2 Ampullen
-Aqua bidest	ad 1000 ml

DST-Agar:

-Müller-Hinton-Agar (Fa. Merck, Darmstadt)	40 g
-Schafblut	50 ml
-Aqua bidest	ad 1000 ml

Gassneragar:

-Gassneragar (Fa. Oxoid, Wesel)	77 g
-Aqua bidest.	ad 1000 ml

Kligleragar:		
-Kligleragar (Fa. Merck, Darmstadt)	55 g	
-Aqua bidest		ad 1000 ml
NBI-Bouillon:		
-StandardI-Nährbouillon (Fa. Merck, Darmstadt)	25 g	
-Aqua bidest		ad 1000 ml
Pilzagar nach Kimmig:		
-Pilzagar (Fa. Merck, Darmstadt)	50 g	
-Glycerin (Fa. Merck, Darmstadt)	5 ml	
-Penicillin (Fa. Merck, Darmstadt)	0,05 g	
-Streptomycinsulfat (Fa. Merck, Darmstadt)	0,025 g	
-Aqua bidest.		ad 1000 ml
Rotlaufselektivagar modifiziert nach Böhm:		
-StandardI-Nähragar (Merck, Darmstadt)	37 g	
-Agar-Agar (Fa. Merck, Darmstadt)	1,5 g	
-Pepton (Fa. Merck, Darmstadt)	10 g	
-Natrium-Acid-Stammlösung (Fa. Merck, Darmstadt)	10 ml	
-gesättigte Phenollösung (Fa. Merck, Darmstadt)	1 ml	
-Kanamycinsulfat (Fa. Serva, Heidelberg)	0,1 g	
-Saccharose (Fa. Merck, Darmstadt)	50 g	
-Wasserblau 1%ig (Fa. Bayer, Leverkusen)	10 ml	
-Aqua bidest.		950 ml
Serumbouillon:		
-Standard I-Nährbouillon (Fa. Merck, Darmstadt)	25 g	
-Rinderserum	100 ml	
-Aqua bidest.		ad 1000 ml
Stuartmedium:		
-Stuartmedium (Fa. Oxoid, Wesel)	16 g	
-Aqua bidest		ad 1000 ml
TCBS-Agar:		
-TCBS-Cholera-Medium (Fa. Oxoid, Wesel)	16 g	
-Aqua bidest		ad 1000 ml
Tryptose-Soja-Agar:		
-CASO (TSB)-Bouillon (Fa. Merck, Darmstadt)	88 g	
Aqua bidest.		ad 1000 ml
Tryptose-Soja-Bouillon:		
-CASO (TSB)-Bouillon (Fa. Merck, Darmstadt)	30 g	
-Aqua bidest.		ad 1000 ml
Ureaseagar nach Christensen:		
-Harnstoffagar nach Christensen (Fa. Merck, Darmstadt)	21 g	

-Harnstoff (Fa. Merck, Darmstadt) 20 g
 -Aqua bidest. ad 1000 ml

PCR

AmpliTaq Gold	Fa. Roche, Mannheim
10x Puffer	Fa. Roche, Mannheim
MgCl ₂ -Lösung 25 mM	Fa. Roche, Mannheim
Mg(OAC) ₂ 25 mM	Fa. Perkin-Elmer, Überlingen
3,3x XL-Puffer	Fa. Perkin-Elmer, Überlingen
r <i>Tth</i> -DNS-Polymerase	Fa. Perkin-Elmer, Überlingen
20x <i>Tfl</i> -Reaktionspuffer	Fa. Biozym, Hess. Oldendorf
<i>Tfl</i> -DNS-Polymerase	Fa. Biozym, Hess. Oldendorf

Restriktionsenzyme

<i>AluI</i>	Amersham, Freiburg
<i>BanI</i>	New England Biolabs, Frankfurt
<i>BglII</i>	MBI Fermentas, St. Leon – Rot
<i>Clal</i>	Amersham, Freiburg
<i>EcoRI</i>	MBI Fermentas, St. Leon – Rot
<i>HaeIII</i>	Amersham, Freiburg
<i>HinfI</i>	Amersham, Freiburg
<i>KpnI</i>	Amersham, Freiburg
<i>NcoI</i>	New England Biolabs, Frankfurt
<i>PstI</i>	MBI Fermentas, St. Leon – Rot
<i>PvuII</i>	Amersham, Freiburg
<i>StyI</i>	New England Biolabs, Frankfurt
<i>TaqI</i>	Sigma, Deisenhofen

Agarosegelelektrophorese

50x TAE-Puffer	
Tris Base	2 M
Essigsäure	1 M
EDTA pH 8,0	50m M

Auftragspuffer
 Bromphenolblau 6x loading dye (Fa. MBI Fermentas)

Größenstandards	
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Fa. MBI Fermentas, St. Leon - Rot
GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus	Fa. MBI Fermentas, St. Leon - Rot
Lambda DNA / <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i> Marker	Fa. MBI Fermentas, St. Leon - Rot

Sondenmarkierung mit Digoxigenin

DIG-11-dUTP
DIG DNA-Labeling Kit

Fa. Boehringer, Ingelheim
Fa. Boehringer, Ingelheim

Southern Blot

Nylonmembran Nr.1417240

Fa. Roche, Mannheim

0,25M HCL

Denaturierungs-Lösung

NaCl 1,5 M
NaOH 0,5 M

Neutralisierungs-Lösung

NaCl 1,5 M
Tris pH 8 0,5 M
EDTA pH 8 1 mM

SSC (20x)

NaCl 3,0 M
Na₃-Citrat 0,3 M
pH 7,0

DNS-DNS-Hybridisierung

Hybridisierungs-Lösung

Formamid 50 %
SSC 5 x
Blockierungsreagens 2 %
N-Lauroylsarkosin 0,1 %
SDS 0,02 %

SDS-Lösung

(in A. bidest.) 10 %

Waschlösung I

SSC 2 x
SDS-Lösung 0,1 %

Waschlösung II

SSC 0,5 x
SDS-Lösung 0,1 %

Digoxigenin-Lumineszenz-Detektion

Blocking Reagenz		Fa. Roche, Mannheim
Puffer 1		
	Maleinsäure	0,1 M
	NaCl	0,15 M
	NaOH	ad pH 7,5 (20°C)
Puffer 3		
	Tris-HCl	0,1 M
	NaCl	0,1 M
	MgCl ₂	50 mM
	HCl	ad pH 9,5 (20°C)
Waschpuffer		
	Tween 20 (Fa. Serva, Heidelberg)	3 ml
	Puffer 1	997 ml
Antikörper-Konjugat-Lösung		
	Anti-Dig-AP-Konjugat (Fa. Boehringer, Mannheim)	2 µl
	Puffer 1	20 ml
Substrat-Lösung		
	CSPD-Stammlösung	0,1 ml
	Puffer 3	9,9 ml

Röntgenfilmentwicklung

Filmentwickler Variospeed, TETENAL	10 %
Filmfixierer Expressfixiersalz, TETENAL	1 Beutel/l Leitungswasser
Röntgenfilm	Cronex Medical X-Ray Film 4, Fa. Siemens, Erlangen

Kommerzielle Systeme

DNS-Präparation	
DNEasy-Tissue Kit	Fa. Qiagen, Hilden

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer für die Überlassung des Themas, den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz, die Bereitstellung aller für diese Promotion benötigten Mittel sowie für die stets gewährte Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Ein ganz herzlicher Dank gilt meinen Betreuern Herrn Dr. Reinhard Weiß und Frau Dr. Astrid König. Ihre große Bereitschaft, Wissen zu vermitteln und ihre Geduld haben mein Interesse an der Mikrobiologie verstärkt und außerdem maßgeblich dazu beigetragen, dass ich diese Arbeit mit Freude erstellt habe.

Ein besonderes Dankeschön geht an Frau Dr. Stefanie Barth. Ihre große Hilfsbereitschaft nicht nur in Bezug auf Computerprobleme haben mir das Leben oft erleichtert.

Bei den Mitarbeiterinnen der bakteriologischen Diagnostik, bei allen weiteren namentlich nicht genannten Mitarbeitern des Instituts sowie bei allen Doktoranden möchte ich mich herzlich für die freundliche Unterstützung und das gute Arbeitsklima bedanken.

Frau Dr. Ursula Siebert danke ich für das zur Verfügung gestellte Probenmaterial aus dem Forschungs- und Technologiezentrum Westküste, Büsum.

Herrn Peter Lienau danke ich für die Ermöglichung der Probenentnahme von Meeressäugern während ihres Aufenthalts in der Seehundaufzucht- und Forschungsstation Norden/Norddeich.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Michael Stede für die fachliche Unterstützung während meiner Aufenthalte in der Seehundaufzucht- und Forschungsstation Norden/Norddeich.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern der Sekundäraufzucht- und Forschungsstation Norden/Norddeich für die freundliche Aufnahme.

Heike und Derk Trei gilt mein ganz besonderer Dank. Ihre Anregungen entfachten mein Interesse für Meeressäuger. Außerdem habe ich mich sehr über die stets herzliche Aufnahme in Ostfriesland gefreut.

Axel Cloeckert danke ich für seine Diskussionsbereitschaft und sehr hilfreiche Hinweise in Bezug auf die *omp2*-Analyse.

Bei all meinen Freunden möchte ich mich sowohl für den fachlichen als auch für den emotionalen Beistand bedanken.

Mein großer Dank gilt meiner Familie. Ohne ihre Unterstützung wären weder Studium noch Promotion möglich gewesen. Außerdem hatten sie jederzeit ein offenes Ohr für kleinere und größere Schwierigkeiten.

Ich erkläre: Ich habe vorgelegte Dissertation selbständig 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.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-89687-314-8



9 7 8 3 8 9 6 1 8 7 3 1 4 9