

**Vergleichende Analyse der Multilokus-Sequenztypen
und der Hämolysingene stark und schwach
hämolysierender *Brachyspira* spp.
unter Berücksichtigung ihrer hämolytischen
und/oder zytotoxischen Aktivität**



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

Jessica Jörling

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;
detaillierte bibliografische Daten sind im Internet abrufbar über
<http://dnb.ddb.de>

© 2020 by Verlag:

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH, Gießen
Printed in Germany

Foto Titelseite:

Bild von agurri auf Pixabay

ISBN 978-3-86345-542-2

1. Auflage 2020

Verlag:

DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
Tel.: 0641/24466
info@dvj.de
www.dvj.de

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: Prof. Dr. C. Ewers

Vergleichende Analyse der Multilokus-Sequenztypen und der Hämolysingene stark und schwach hämolysierender *Brachyspira* spp. unter Berücksichtigung ihrer hämolytischen und/oder zytotoxischen Aktivität

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Jessica Jörling

Tierärztin aus Steinfurt

Gießen, 2020

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

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

Gutachter und Prüfer: Prof. Dr. Christa Ewers
Prof. Dr. Axel Wehrend

Tag der Disputation: 24.06.2020

Meiner Familie

Die Ergebnisse der vorgelegten Dissertation haben Eingang in folgende Veröffentlichungen gefunden:

Originalartikel:

Joerling, J., Barth, S., Schlez, K., Willems, H., Herbst, W., Ewers, C. (2018): Phylogenetic diversity, antimicrobial susceptibility and virulence gene profiles of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from pigs in Germany. Plos One 13 (1):e0190928.

Joerling, J., Willems, H., Ewers, C.*, Herbst W.* (*geteilte Autorenschaft) (2020): Differential expression of hemolysin genes in weakly and strongly hemolytic *B. hyodysenteriae* strains. BMC Vet Research 16 (1):169.

Vortrag:

Joerling, J., Schlez, K., Barth, S., Rohde, J., Heuser, J., Ewers, C., Herbst, W. (2016): Determining *B. hyodysenteriae* sequence types and possible relations to virulence genes and antimicrobial susceptibility. Tagung der Fachgruppe Bakteriologie und Mykologie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, 31. August - 2. September 2016, Jena.

Joerling, J., Schlez, K., Barth, S.A., Rohde, J., Heuser, J., Ewers, C., Herbst, W. (2016): Determining *B. hyodysenteriae* sequence types and possible relations to virulence genes and antimicrobial susceptibility. Proceedings of the 7th International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, 6th-7th October 2016, Hannover, Germany.

Poster:

Joerling, J., Reiher, A., Barth, S., Ewers, C., Herbst, W. (2016): Use of a hemolysin inhibition test to demonstrate antibodies to *Brachyspira hyodysenteriae* hemolysin. Tagung der Fachgruppe Bakteriologie und Mykologie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, 31. August - 2. September 2016, Jena.

Herbst, W., Joerling, J., Reiher, A., Barth, S., Ewers, C. (2016): Genetic and phenotypic studies on the hemolysin of different *Brachyspira* spp. Tagung der Fachgruppe Bakteriologie und Mykologie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, 31. August - 2. September 2016, Jena.

Herbst W., Joerling J., Reiher A., Barth S.A., Ewers C. (2016): Genetic and phenotypic studies on the hemolysin of different *Brachyspira* spp. Proceedings of the 7th International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, 6th-7th October 2016, Hannover, Germany.

Diese Arbeit wurde gefördert durch ein Stipendium der **Akademie für Tiergesundheit e. V.**

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1. Einleitung.....	1
2. Schrifttum	3
2.1. Die Schweinedysenterie: aktuelle Forschungsschwerpunkte.....	3
2.2. Die Gattung <i>Brachyspira</i>	3
2.2.1. <i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	4
2.2.2. <i>Brachyspira suanatina</i>	6
2.2.3. <i>Brachyspira hampsonii</i>	6
2.2.4. Schwach hämolysierende <i>Brachyspira</i> spp.	7
2.2.4.1. <i>Brachyspira intermedia</i>	8
2.2.4.2. <i>Brachyspira innocens</i>	8
2.2.4.3. <i>Brachyspira murdochii</i>	9
2.2.4.4. <i>Brachyspira pilosicoli</i>	9
2.3. Diversität von <i>B. hyodysenteriae</i>	10
2.3.1. Serologische Diversität von <i>B. hyodysenteriae</i>	10
2.3.2. Genetische Diversität von <i>Brachyspira</i> spp.	11
2.3.2.1. Multilokus-Sequenztypisierung von <i>Brachyspira</i> spp.	11
2.3.2.2. Genom-basierte Studien bei <i>Brachyspira</i> spp.	12
2.4. Der stark hämolysierende Phänotyp von <i>B. hyodysenteriae</i> , <i>B. suanatina</i> und <i>B. hampsonii</i>	14
2.4.1. Die Pathogenese der Schweinedysenterie unter besonderer Berücksichtigung der Hämolysine von <i>B. hyodysenteriae</i>	15
2.5. Hämolysine verschiedener <i>Brachyspira</i> spp.	20
2.5.1. Das Hämolysin TlyA.....	23
2.5.2. Die Hämolysine TlyB und TlyC.....	25
2.5.3. Das Hämolysin HlyA.....	26
2.5.4. Die mutmaßlichen Hämolysingene <i>BHWA1_RS02195</i> (hemolysin III) und <i>BHWA1_RS09085</i>	27
2.5.5. Die mutmaßlichen Hämolysingene <i>BHWA1_RS02885</i> („hemolysin activation protein“) und <i>BHWA1_RS04705</i>	27
3. Material und Methoden	29
3.1. Materialien	29
3.1.1. Verbrauchsmaterialien, Puffer und Nährmedien	29
3.1.2. Bakterienstämme	29
3.1.3. Additive zur Vermehrung der <i>Brachyspira</i> spp.....	29
3.1.4. Verwendete Zellkulturen, Kultivierung und Archivierung der Zellen	31

Inhaltsverzeichnis

3.1.5. Antiseren	32
3.2. Bakteriologische Methoden	32
3.2.1. Vermehrung von Bakterien	32
3.2.2. Keimzahlbestimmung	33
3.2.3. Reinheitskontrolle	33
3.3. Molekularbiologische Methoden	34
3.3.1. Präparation von DNS aus Bakterienkulturen	34
3.3.2. Oligonukleotidprimer	34
3.3.3. Polymerase-Kettenreaktion	34
3.3.4. Multilokus-Sequenztypisierung (MLST)	37
3.3.5. Agarosegelelektrophorese	37
3.3.6. Sequenzierung von Hämolysingenen	38
3.3.7. Bestimmung der Transkriptionsaktivität der Hämolysingene	38
3.4. Bestimmung phänotypischer Charakteristika der <i>Brachyspira</i> spp. Hämolysine	40
3.4.1. Bestimmung des Hämolysetyps	40
3.4.2. Quantitative und semiquantitative Bestimmung der Hämolyseaktivität	41
3.4.3. Hämolysin-Präparation	43
3.4.4. Hämolysinfreisetzung bei Vermehrung diverser <i>Brachyspira</i> spp. in Bouillon	44
3.4.5. Temperaturstabilität der Hämolysine stark und schwach hämolysierender <i>Brachyspira</i> spp.	45
3.4.6. Biologische Aktivität der Hämolysine stark und schwach hämolysierender <i>Brachyspira</i> spp. bei verschiedenen Temperaturen	45
3.4.7. Porenbildende Aktivität der Hämolysine stark und schwach hämolysierender <i>Brachyspira</i> spp.	46
3.4.8. Untersuchungen zur Ursache der zeitlich begrenzten Hämolysinfreisetzung bei stark hämolysierenden <i>Brachyspira</i> spp.	46
3.4.9. Nachweis eines CAMP-Phänomens bei stark und schwach hämolysierenden <i>Brachyspira</i> spp.	46
3.4.10. Zytotoxizität von Kulturfiltraten verschiedener <i>B. hyodysenteriae</i> -Stämme in Abhängigkeit verschiedener Zusätze zur Nährbouillon	47
3.5. Serologische Methoden	48
3.5.1. Nachweis Hämolysin-inhibierender Antikörper (Hämolysin-Inhibitions-Test)	48
3.6. Datenhaltung und Auswertung	49
3.6.1. Bilddokumentation und Auswertung	49
3.6.2. Auswertung der DNS-Sequenzdaten	49
3.6.3. Überprüfung des Vorhandenseins der Hämolysingene bei diversen <i>Brachyspira</i> spp. und Überprüfung der Primer zum Nachweis der Hämolysingene	49
3.6.4. Vergleich der Hämolysingensequenzen von <i>B. hyodysenteriae</i> -Stämmen	50
3.6.5. Korrelationen zwischen dem Sequenztyp und den Hämolysingensequenzen von 32 ausgewählten <i>B. hyodysenteriae</i> -Stämmen	50

Inhaltsverzeichnis

3.6.6. Transkriptionsaktivität der Hämolysingene stark und schwach hämolysierender <i>B. hyodysenteriae</i> -Stämme	50
3.6.7. Auswertung der Ergebnisse des Hämolysin-Inhibitions-Tests	51
3.6.8. Statistische Bewertung	51
4. Ergebnisse.....	52
4.1. Molekularbiologische Untersuchungen	52
4.1.1. Speziesidentifizierung der <i>Brachyspira</i> spp.-Stämme	52
4.2. Untersuchungen zur Phylogenie von <i>B. hyodysenteriae</i> mittels MLST	53
4.2.1. Ermittelte Sequenztypen im Rahmen der MLST	54
4.3. Vergleichende Analyse der Hämolysingene verschiedener <i>Brachyspira</i> spp.	58
4.3.1. Nachweis der acht Hämolysingene bei stark und schwach hämolysierenden <i>Brachyspira</i> spp. mittels PCR	58
4.3.1.1. Hämolysingensequenzen ausgewählter <i>B. hyodysenteriae</i> -Stämme	60
4.3.1.2. Analyse der potenziellen Promotorregion des Hämolysingens <i>hlyA</i>	61
4.3.1.3. <i>In silico</i> -Analyse der Genome verschiedener <i>Brachyspira</i> spp. auf das Vorhandensein von Hämolysingenen	64
4.3.1.4. Bestimmung von Virulenz-assoziierten Genen und putativen Fitnessgenen bei <i>B. hyodysenteriae</i> mittels PCR	68
4.3.1.5. Nachweis möglicher Korrelationen zwischen dem Sequenztyp und Virulenzgenen bei <i>B. hyodysenteriae</i> -Stämmen	70
4.3.1.6. Korrelationen zwischen dem Sequenztyp und den Hämolysingensequenzen verschiedener <i>B. hyodysenteriae</i> -Stämme	70
4.4. Vergleichende Analyse der Hämolysingen-Transkriptionsaktivitäten eines stark und schwach hämolysierenden <i>B. hyodysenteriae</i> -Stammes	74
4.5. Vergleichende Analyse des hämolytischen und zytotoxischen Phänotyps der stark und schwach hämolysierenden <i>Brachyspira</i> spp.	79
4.5.1. Temperaturstabilität der Hämolysine	81
4.5.2. Hämolytische Aktivität der Hämolysine bei unterschiedlichen Temperaturen	83
4.5.3. Freisetzung der Hämolysine	85
4.5.4. Hämolytische Aktivität von Kulturfiltraten aus verschiedenen zeitlichen Abschnitten der Vermehrung stark hämolysierender <i>Brachyspira</i> spp.	88
4.5.5. Porenbildende Aktivität der Hämolysine.	89
4.5.6. CAMP-Phänomen präparierter Hämolysine	91
4.5.7. Zytotoxische Aktivität von <i>B. hyodysenteriae</i> -Stämmen in CrFK-Zellen	92
4.6. Hämolysin-inhibierende Antikörper in Antiseren <i>B. hyodysenteriae</i> -infizierter Schweine und vakzinierter Kaninchen	100
5. Diskussion.....	104
5.1. Populationsstruktur von <i>B. hyodysenteriae</i>	105
5.2. Vorkommen der acht Hämolysingene	109
5.3. Vorkommen weiterer Virulenzgenen und Korrelation von Virulenzgenen mit dem Sequenztyp von <i>B. hyodysenteriae</i>	121

Inhaltsverzeichnis

5.4.	Kriterien zur Unterscheidung der Hämolyse/Zytotoxine stark und schwach hämolyzierender <i>Brachyspira</i> spp. und serologische Untersuchungen zur Antigenität	123
6.	Zusammenfassung	134
7.	Summary	138
8.	Literaturverzeichnis	142
9.	Anhang	157
10.	Abbildungsverzeichnis	193
11.	Tabellen	195
12.	Danksagung	196
13.	Schriftliche Erklärung	197

Verzeichnis der Abkürzungen

°C	Grad Celsius
Acc.	Accession
ACP	Acyl-Carrier-Protein
AS	Aminosäure
Aqua dest.	Aqua destillata
<i>B.</i>	<i>Brachyspira</i>
BHI	Brain-Heart-Infusion (Nährbouillon)
BHIF	Brain-Heart-Infusion (Nährbouillon) mit 20% FKS
<i>BHWA1_RS04705</i>	Hämolysin-kodierendes Gen zu Protein BHWA1_RS04705
<i>BHWA1_RS09085</i>	Hämolysin-kodierendes Gen zu Protein BHWA1_RS09085
<i>BHWA1_RS02195</i>	Hämolysin-kodierendes Gen zu Protein BHWA1_RS02195
<i>BHWA1_RS02885</i>	Hämolysin-kodierendes Gen zu Protein BHWA1_RS02885
bp	Basenpaare
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
CBS	Cystathionin- β -Synthase
d	Tage
DLV	Doppelokus-Variante („double locus variant“)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>F.</i>	<i>Fusobacterium</i>
Fa.	Firma
FAD	Flavinadenindinukleotid
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
<i>hlyA</i>	Hämolysin-kodierendes Gen zu Protein HlyA
HE	hämolysierende Einheit
HIT	Hämolysin-Inhibitions-Test
inkl.	inklusive
IHIT	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, JLU Gießen
IL-1	Interleukin 1
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen

Verzeichnis der Abkürzungen

kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
LKZ	Lebendkeimzahl
<i>L.</i>	<i>Listeria</i>
LOS	Lipooligosaccharid
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
MG	Molekulargewicht
min	Minute
ml	Milliliter
MLV	Multilokus-Varianten
MLST	Multilokus-Sequenztypisierung
mM	Millimol
mRNS	Boten-RNS („messenger“ RNS)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
n	Stichprobenumfang
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
ng	Nanogramm
NJT	Neighbour-Joining-Tree
<i>nox</i>	Gen der NADH-Oxidase für Aerotoleranz
NS	Nukleinsäure
OD	optische Dichte
OMP	äußeres Membranprotein („outer membrane protein“)
ORF	offener Leserahmen („open reading frame“)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung („phosphate-buffered saline“)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PFE	Schweinefäzesextrakt („porcine feces extract“)
<i>p.i.</i>	<i>post infectionem</i>
<i>p.vac.</i>	<i>post vaccinationem</i>
<i>prae inf.</i>	<i>prae infectionem</i>
<i>prae vac.</i>	<i>prae vaccinationem</i>
RNS	Ribonukleinsäure
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
r	rekombinant

Verzeichnis der Abkürzungen

RT	Real-Time
S.	<i>Staphylococcus</i>
s	Sekunde
Sc.	<i>Streptococcus</i>
SD	Schweinedysenterie
sH	starke Hämolyse („strong hemolysis“)
SDS	Natrium(= Natrium)-Dodecylsulfat
SLV	Einzellocus-Variante („single locus variant“)
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus („single nucleotide polymorphism“)
SPF	spezifisch Pathogen-frei
spp.	Spezies
ST	Sequenztyp
syn.	synonym
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TiHo	Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
<i>tlyA</i>	Hämolysin-kodierendes Gen zu Protein TlyA
<i>tlyB</i>	Hämolysin-kodierendes Gen zu Protein TlyB
<i>tlyC</i>	Hämolysin-kodierendes Gen zu Protein TlyC
TLV	Tripellocus-Variante („triple locus variant“)
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
TSA	Trypticase-Soja-Agar
U	Unit
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
u.U.	unter Umständen
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumenprozent
VSH	Virus von <i>B. hyodysenteriae</i> („virus of <i>Serpulina hyodysenteriae</i> “)
WGS	Ganzgenom-Sequenzierung („whole genome sequencing“)
WbE	Wachstums-bildende Einheiten
wH	schwache Hämolyse („weak hemolysis“)
w/v	Masse pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1. Einleitung

Bei der Schweinedysenterie (SD) handelt es sich um eine weltweit verbreitete und wirtschaftlich bedeutsame Erkrankung, die klinisch vorwiegend während der Mastperiode als mukohämorrhagische Diarrhoe sichtbar wird. Ursächlich sind die zum Genus *Brachyspira* zählenden, anaeroben Spirochäten *Brachyspira* (*B.*) *hyodysenteriae*, *B. suanatina* sowie *B. hampsonii*. Gemeinsames Kennzeichen dieser Spezies ist die Ausprägung einer starken Hämolyse („strong hemolysis“, sH) auf bluthaltigen Nährböden. Andere beim Schwein vorkommende *Brachyspira*-Arten induzieren lediglich eine schwache Hämolyse („weak hemolysis“, wH) und sind verantwortlich für die sogenannte Spirochätendiarrhoe (*B. pilosicoli*) und für milde Colitiden (*B. intermedia*, *B. murdochii*) oder gelten als apathogen (*B. innocens*) (Hampson et al., 2015). Vor dem Hintergrund des Auftretens neuer stark hämolysierender *Brachyspira*-Spezies wie *B. suanatina* und *B. hampsonii* sowie von schwach hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämmen traten epidemiologische Untersuchungen zur Verbreitung von *Brachyspira* in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Die Multilokus-Sequenztypisierung (MLST) rückte in den 2000er Jahren in den Fokus, da erneute Ausbrüche der SD in den Vereinigten Staaten stattfanden. Ziel war es die Verwandtschaftsverhältnisse der aktuellen Stämme mit den Stämmen aus früheren Jahren zu vergleichen (Mirajkar und Gebhart, 2014). Zusätzlich können mit Hilfe der MLST Aussagen über die Verwandtschaftsverhältnisse der *Brachyspira* spp. im internationalen Kontext getroffen werden. Weitergehend wird der Nutzen der MLST als noch höher eingestuft, indem es möglich sein soll Transmissionswege der unterschiedlichen Stämme zu beleuchten (Hampson et al., 2015). Möglicherweise kann auch die Abschätzung der Virulenz über eine Verknüpfung der Virulenzgene mit dem Sequenztyp (ST) erfolgen. Die für die sH verantwortlichen Hämolysine scheinen eine besondere Bedeutung für die Pathogenese der SD zu besitzen. Experimentelle Untersuchungen belegen, dass es sich bei den Hämolysinen von *B. hyodysenteriae* gleichzeitig um Zytotoxine handelt (Lysons et al., 1991; Muir et al., 1992; ter Huurne et al., 1994). Untersuchungen zur Aufklärung des stark hämolysierenden Phänotyps bei *Brachyspira* spp. sind jedoch trotz der möglichen Bedeutung für die Pathogenese der SD selten. Im Rahmen der Sequenzierung des Genoms von *B. hyodysenteriae*-Stamm WA1, der in den 1980er Jahren in Westaustralien von einem Schwein isoliert wurde, beschrieben die Autoren acht Hämolysingene (Bellgard et al., 2009; Wanchanthuek et al., 2010). Lediglich für die Hälfte dieser Gene bzw. kodierten Proteine liegen auch Informationen zum Phänotyp vor. Hierzu gehören die als Porenbildner bezeichneten Hämolysine TlyA, TlyB und TlyC (Muir et al., 1992; ter Huurne et al., 1994) sowie das Hämolysin HlyA (Hsu et al., 2001). Zu den putativen Hämolysingenen zählen *BHWA1_RS02195*, *BHWA1_RS09085*, *BHWA1_RS02885* sowie *BHWA1_RS04705* (Bellgard et al., 2009; Wanchanthuek et al.,

1 Einleitung

2010). HlyA wurde als Auslöser der sH betrachtet und es wurde diskutiert, ob TlyA, TlyB und TlyC tatsächlich Hämolsine oder eher Regulatorproteine darstellen, die mglw. bei *Escherichia (E.) coli* eine Hochregulierung des Hämolsins SheA bewirkten (Hsu et al., 2001; Stanton, 2006). Untersuchungen zu den mutmaßlichen Promotorregionen der Hämolsingene *hlyA*, *tlyB*, *BHWA1_RS02195* und *BHWA1_RS02885* ließen Unterschiede zwischen den stark und schwach hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämmen erkennen (La et al., 2016b; Card et al., 2019), endgültige Bestätigungen fehlen jedoch.

Diese Arbeit soll einerseits die Phylogenie von *B. hyodysenteriae*-Isolaten untersuchen und zum anderen einen Einblick in den genetischen Hintergrund der starken Hämolyse dieser Spezies geben. Durch die Charakterisierung von *B. hyodysenteriae*-Isolaten aus Deutschland mittels MLST sollte die genetische Diversität dieser Spezies bestimmt werden. Angeschlossen wurde eine Analyse geographischer und temporärer Verteilungsmuster der STs von Isolaten aus Deutschland sowie unter Einbeziehung publizierter MLST-Daten ihrer Einordnung in den globalen phylogenetischen Kontext. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob bzw. in welchem Umfang die acht bekannten Hämolsingene unter den stark hämolysierenden *Brachyspira* spp. verbreitet sind. Durch die Einbeziehung weiterer Virulenz-assoziiierter Gene und Fitnessgene (Eisenmetabolismus, äußere Membranproteine) sollte das Virulenzgenspektrum sowie das generelle Vorkommen weiterer Virulenzgene im Vergleich zu den Hämolsingenen untersucht werden. Weiterführende Sequenzierungen der Hämolsingene sollten die Häufigkeit und Lokalisation von Mutationen aufdecken. Die anschließende Bestimmung der Transkriptionsaktivitäten der Hämolsingene sollte weitere Einblicke zu den Hämolyse-assoziierten Genen geben. Schließlich sollten mögliche Zusammenhänge zwischen *B. hyodysenteriae*-Sequenztypen und der Verteilung von Virulenzgenen geprüft werden. Auf phänotypischer Ebene wurden Kriterien zur Differenzierung der Hämolsine der stark bzw. schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp. gesucht und anhand von Zellkulturuntersuchungen die vermeintliche Zytotoxizität der Hämolsine überprüft. Abschließend sollten durch den Nachweis Hämolsin-inhibierender Antikörper in Serumproben von Schweinen, die mit *B. hyodysenteriae*-Stämmen infiziert wurden als auch in Serumproben von Kaninchen, die mit inaktivierten *B. hyodysenteriae*-Stämmen immunisiert wurden, weitere Belege für die Immunogenität der Hämolsine gesammelt werden.

2. Schrifttum

2.1. Die Schweinedysenterie: aktuelle Forschungsschwerpunkte

Die durch die stark hämolysierenden *Brachyspira* (*B.*) - Spezies, *B. hyodysenteriae*, *B. suanatina* und *B. hampsonii* hervorgerufene Schweinedysenterie (SD) ist eine wirtschaftlich bedeutsame Krankheit des Mastschweins mit weltweiter Verbreitung. Klinisch ist die SD durch eine mukohämorrhagische Diarrhoe gekennzeichnet. Weitere *Brachyspira* spp. sind schwach hämolysierend und rufen die porcine intestinale Spirochätose (PIS, *B. pilosicoli*), milde Colitiden und Durchfallerkrankungen hervor (*B. intermedia*, *B. murdochii*) oder besiedeln als Kommensalen den Intestinaltrakt (*B. innocens*). Als weitere Spezies sind *B. aalborgii* beim Menschen und *B. alvinipulli* beim Geflügel beschrieben. Weiterhin existieren sogenannte vorgeschlagene Spezies („*B. canis*“, „*B. christiani*“, „*B. corvi*“, „*B. ibaraki*“, und „*B. pulli*“) deren eindeutige taxonomische Zuordnung noch aussteht (Mapple et al., 2014). Im Vordergrund wissenschaftlicher Arbeiten stehen augenblicklich Untersuchungen zu der neu auftretenden schwach hämolysierenden Variante der Spezies *B. hyodysenteriae*, der Diversität von *B. hyodysenteriae* u.a. durch Studien zur Phylogenie des Erregers mittels Multilokus-Sequenztypisierung (MLST) oder Gesamtgenom-Sequenzierung (WGS, „whole genome sequencing“) sowie die Untersuchungen zur Entwicklung von Antibiotikaresistenzen (Hampson et al., 2015; Mirajkar und Gebhart, 2014; Hampson et al., 2019). Gesamtgenom-Sequenzen bilden außerdem die Grundlage für die Bestimmung neuer potenzieller Virulenzgene. Eine weiterführende Charakterisierung dieser mutmaßlichen Virulenzgene erfolgt durch Proteom- und Transkriptionsanalysen, der sich experimentelle Untersuchungen zur möglichen pathogenetischen Bedeutung der Virulenzgene, die auch potenzielle Hämolysingene mit einschließen, anschließt (Casas et al., 2016). Im Hinblick auf weitere Forschungsergebnisse bei *Brachyspira* spp. beim Schwein wird auf frühere Dissertationen mit entsprechender Thematik (u.a. Serotypisierung von *B. hyodysenteriae*-Stämmen, Prävalenzstudien, Antibiotika-Empfindlichkeit) aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere (IHIT) verwiesen (Richter, 2009; Schlez, 2011; Reiher, 2012; Schneider, 2014; Vögely, 2015).

2.2. Die Gattung *Brachyspira*

Die Gattung *Brachyspira* gehört zur Ordnung der Spirochaetales. Basierend auf den Ergebnissen der 16S rRNS-Gen-Analyse bilden die Spirochäten eine monophyletische Abteilung innerhalb der Bakterien (Paster und Dewhirst, 2000). Morphologisch handelt es sich bei den Spirochäten um Gram-negative schraubenförmige Bakterien, die mit periplasmatischen Flagellen (Anzahl variiert in Abhängigkeit von der Spezies) ausgestattet sind und eine Resistenz

2 Schrifttum

gegenüber Rifampicin aufweisen sollen. Spirochäten gelten als fakultativ bis obligat anaerob, wobei Spezies der Gattung *Brachyspira* in der Lage sind Sauerstoff mittels NADH-Oxidase zu metabolisieren (Paster und Dewhirst, 2000). Die Abgrenzung von Spezies der einzigen Gattung innerhalb der Familie Brachyspiraceae (Stanton, 2006) basiert auf phäno- und genotypischen Charakteristika der Erreger. Es existieren keine Leitlinien mit fest definierten Kriterien, die sich speziell der Familie der Brachyspiraceae widmen, wie es z.B. innerhalb der Familie der Campylobacteriaceae der Fall ist (Ursing et al., 1994; On et al., 2017). Entsprechend der Beschreibung neuer Spezies, wie z.B. aktuell von *B. hampsonii*, dienen die nachfolgenden Kriterien zur Differenzierung gegenüber den schon etablierten Spezies (Mirajkar et al., 2016): Wachstumsverhalten, Hämolyseverhalten (qualitativ/quantitativ), biochemische Eigenschaften, Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Antibiotika, Protein-Profil (bestimmt mittels MALDI-TOF MS = Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung mit Flugzeitanalyse freigesetzter Ionen zur Massenspektrometrie) sowie das Pathogenitätspotential. Genotypisch wurde herangezogen: Sequenzanalyse des *nox*-Gens und des 16S rRNS-Gens, Bestimmung des G+C-Gehalts der DNS, MLST, DNS-DNS-Hybridisierung, WGS sowie die Genom-Genom-Distanz zwischen der betreffenden Spezies und bereits bekannten *Brachyspira*-Spezies. In der Veröffentlichung von Stanton (2006) existiert ebenso ein Leitfaden zur Identifizierung unterschiedlicher *Brachyspira* spp., der allerdings vor dem Auftreten weiterer stark hämolysierender Spezies geschrieben wurde.

2.2.1. *Brachyspira hyodysenteriae*

Die Spezies *B. hyodysenteriae* war lange Zeit der einzige bekannte Erreger der SD. Der Speziesname setzt sich aus den Wörtern *Hus Huos* (Schwein) und „dysenteria“ zusammen. Phänotypisch handelt es sich um ein schlankes, spiralförmiges, obligat anaerobes, aber aertolerantes Bakterium mit einer Länge von 5 - 11 µm und einem Durchmesser von 0,29 - 0,38 µm. Die Anzahl der sich in der Mitte des Erregers überlappenden periplasmatischen Flagellen variiert zwischen 14 und 18 (Harris et al., 1972). Eine biochemische Charakterisierung des Erregers zur Abgrenzung von anderen intestinalen Spirochäten erfolgt über eine typischerweise positive Indol-, α-Glucosidase- sowie β-Glucosidasereaktion, während die α-Galactosidasereaktion und die Hippurat-Spaltung negativ verlaufen (Fellström und Gunnarsson, 1995). Bei der Kultivierung auf bluthaltigen Nährböden grenzt sich *B. hyodysenteriae* durch die Ausbildung einer vollständigen bzw. sH (β-Hämolyse) von anderen als weniger virulent eingestuften *Brachyspira* spp. ab, die ausnahmslos eine unvollständige β-Hämolyse verursachen. Die Verdopplungszeit von *B. hyodysenteriae* liegt, wie bei den meisten anderen *Brachyspira* spp. auch, bei 2 - 4 h (Stanton, 2006). Bakteriellies Wachstum kann nach frühestens drei Tagen unter anaeroben Bedingungen bei 37 - 42 °C auf einer bluthaltigen Agarplatte in Form

2 Schrifttum

einer beginnenden sH beobachtet werden. Lichtmikroskopisch finden sich neben der typischen helikalen Morphologie auch abgekugelte Formen mit einem Durchmesser von 2 - 3 µm, deren Vorkommen mit dem Alterungsprozess der Kultur in Verbindung zu stehen scheint. Auch wenn Funktion und Reversibilität zur spiraligen Form nicht abschließend geklärt sind, ist davon auszugehen, dass diese abgekugelten Formen organisierte Gebilde darstellen, lebensfähig sind und als Adaptationsmechanismus an sich ändernde Umweltfaktoren angesehen werden können (Wood et al., 2006).

In experimentellen Untersuchungen zur Tenazität des Erregers konnte gezeigt werden, dass *B. hyodysenteriae* 112 Tage im Schweinekot überlebensfähig war (Boye et al., 2001). Ältere Daten verweisen auf eine geringere Tenazität. So war *B. hyodysenteriae* bis zu 48 Tage in zwischen 0 und 10 °C gelagertem Dysenterie-Kot nachweisbar (Chia und Taylor, 1978). Im Erdboden konnte *B. hyodysenteriae* nach zehn Tagen noch kulturell nachgewiesen werden (Boye et al., 2001). Der Erreger ist bei niedrigen Temperaturen lange infektiös, weshalb Eradikationsprogramme vorzugsweise in den Sommermonaten (> 15 °C) stattfinden sollten (Sieverding, 2010). Entscheidend bei der Sanierung sind neben der antimikrobiellen Therapie vor allem die Hygiene- und Managementmaßnahmen, sodass Reinfektionen durch den Zukauf klinisch gesunder Ferkel aus chronisch infizierten Betrieben möglich sind (Waldmann und Plonait, 2004). Ein weiterer Faktor bei der Sanierung ist eine adäquate Schädnerbekämpfung, da in den Caeca wilder Nagetiere (Ratten, Mäuse) *B. hyodysenteriae* kulturell nachweisbar war und somit eine Übertragung des Erregers möglich ist (Joens und Kinyon, 1982).

Schwach hämolysierende *B. hyodysenteriae*

Über *B. hyodysenteriae*-Stämme, die sich durch eine wH auszeichnen, wurde in Deutschland, Belgien und Australien berichtet (Mahu et al., 2016; La et al., 2016b; La et al., 2016a). Keiner dieser Stämme war aus Schweinen, die an SD erkrankt waren, isoliert worden. Die klinischen Symptome entsprachen eher einer milden Diarrhoe (Mahu et al., 2016). Die wH ging mit Austausch in den Aminosäure (AS) -Sequenzen einher, die insbesondere in den mutmaßlichen Hämolytinen BHWA1_RS02885, BHWA1_RS02195, BHWA1_RS04705 und BHWA1_RS09085 zu finden waren, aber auch in den phänotypisch charakterisierten Hämolytinen TlyA, TlyB und HlyA. TlyC wies bei einem Vergleich von stark und schwach hämolysierenden Stämmen keine Mutationen auf (Mahu et al., 2016; La et al., 2016b). Nachdem zahlreiche Versuche zur Entwicklung einer Vakzine erfolglos blieben (Olson et al., 1994; La et al., 2004; Song et al., 2009), wird derzeit an der protektiven Wirkung von attenuierten, schwach hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämmen geforscht (Mahu et al., 2016b; La et al., 2019).

2.2.2. *Brachyspira suanatina*

Seit der Jahrtausendwende häufen sich Berichte über die Isolierung einer stark hämolysierenden *Brachyspira* sp., die nicht der Spezies *B. hyodysenteriae* zugeordnet werden konnte (Råsbäck et al., 2006). Diese Spezies konnte, basierend auf einer vergleichenden 16S rRNS-Gen-Analyse in Dänemark und Schweden sowohl aus Schweinen (*Sus scrofa domesticus*), als auch aus Stockenten (*Anas platyrhynchos*) isoliert werden (Råsbäck et al., 2007a). Dieser Fakt führte zur Bezeichnung der neuen Spezies als *B. suanatina*. Es gelang mit einem stark hämolysierenden *Brachyspira* sp.-Stamm aus Stockenten das Schwein zu infizieren. Nach Kolonisation des Schweinedickdarms kam es zu breiigem bis wässrigem Kot, während vereinzelt auch SD-ähnliche Symptome auftraten. Als Übertragungsweg muss somit die natürliche Übertragung von *Brachyspira* spp. zwischen (Wild-)Vögeln und Schweinen in Betracht gezogen werden. Inzwischen konnte *B. suanatina* auch in Deutschland aus Schweinen mit klinischen Symptomen der SD isoliert werden (Rohde et al., 2018). Phänotypisch wird die Spezies durch eine starke β -Hämolyse, schwach positive Indolreaktion, positive β -Glucosidasereaktion sowie negative Hippurat- bzw. α -Glucosidasereaktion charakterisiert. Analog zu *B. hyodysenteriae* vermehrten sich aus Schweinen isolierte Stämme auf bluthaltigen Agarplatten unter anaeroben Bedingungen bei 37 - 42 °C innerhalb von drei Tagen, sodass eine sH sichtbar wurde, während Stämme aus Stockenten ein langsames Wachstum aufwiesen. Trotz mehrfacher Wiederholungen konnte bei keinem der sechs untersuchten Stämme (Råsbäck et al., 2007a) das Hämolysingen *tlyA*, welches nach dem damaligen Stand der Wissenschaft für die sH verantwortlich gemacht wurde (Hyatt et al., 1994), mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) nachgewiesen werden. Da die Ergebnisse der DNS-DNS-Hybridisierung mit den bis dato anerkannten *Brachyspira* spp. zwischen 16 % (*B. innocens*) und 64 % (*B. hyodysenteriae*, *B. intermedia*) lagen, wurde *B. suanatina* als eigenständige Spezies betrachtet (Mushtaq et al., 2015). Zur aktuellen taxonomischen Definition einer neuen Spezies muss das Ergebnis der DNS-DNS-Hybridisierung unter 70 % liegen (Wayne et al., 1987). Durchschnittlich beträgt die DNS-DNS-Homologie unterschiedlicher Spezies derselben Gattung mindestens 30 % (Fox et al., 1992), jedoch bestehen auch hier Ausnahmen, sodass bspw. innerhalb der Gattung *Burkholderia* Hybridisierungsergebnisse von 9 % erreicht werden (Goris et al., 2007).

2.2.3. *Brachyspira hampsonii*

Im Jahr 2007 brach in den Vereinigten Staaten und in Kanada gehäuft die SD aus. Diagnostische Untersuchungen zum Nachweis von *B. hyodysenteriae* mittels PCR verliefen negativ, obwohl stark hämolysierende *Brachyspira* aus Kotproben betroffener Schweine kultiviert wurden. Nach näherer Untersuchung wurden die Stämme einer neuen Spezies, *B. hampsonii*, zugeordnet (Chander et al., 2012). Dieser Speziesname wurde zur Ehrung von Dr. David

2 Schrifttum

Hampson gewählt, der als Pionier auf dem Gebiet der Brachyspiren-Forschung gilt. Die Stämme (n = 20) zeichneten sich durch negative Indol-, Hippurat- und α -Glucosidasreaktionen aus. Anhand der negativen Indolreaktion ließ sich *B. hampsonii* somit von den anderen beiden stark hämolysierenden Spezies (*B. hyodysenteriae*, *B. suanatina*), die typischerweise eine positive Indol-Reaktion hervorrufen, abgrenzen. Die Zellenden von *B. hampsonii* sind mit jeweils 10 bis 14 Flagellen, die der aktiven Fortbewegung dienen, ausgestattet. Zum aktuellen Zeitpunkt erfolgt eine Einteilung des Erregers, basierend auf vergleichenden MLST-Analysen, in die vier Genomovare I - IV (n = 98 Stämme aus Schweinen bzw. (Wild-)Vögeln aus den Vereinigten Staaten, Kanada, Deutschland, Belgien und Spanien) (Chander et al., 2012; Mirajkar et al., 2015; Mirajkar et al., 2016). Eine solche Unterscheidung innerhalb der Spezies existiert bislang nur bei *B. hampsonii*. In experimentellen Versuchen gelang es mit zwei Stämmen (*B. hampsonii*-Stamm 30446 sowie 30599), die die Genomovare I bzw. II repräsentierten, Schweine experimentell zu infizieren. Klinisch zeigte sich bei beiden Stämmen eine mukohämorrhagische Diarrhoe mit unterschiedlicher Ausprägung (Rubin et al., 2013; Costa et al., 2014). In einem zuvor durchgeführten Screening konnte bereits eine geringgradige Kolonisation mit *B. hampsonii* 30446 in den Versuchsschweinen nachgewiesen werden. Dieser Befund lässt vermuten, dass es sich zumindest bei diesem Stamm nicht um einen obligat pathogenen Erreger handelt (Rubin et al., 2013). Ähnliche Beobachtungen bezüglich der Pathogenität wurden schon früh bei *B. hyodysenteriae*-Infektionen gemacht (Wilcock und Olander, 1979a).

2.2.4. Schwach hämolysierende *Brachyspira* spp.

Die nachfolgenden schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp. führen - mit Ausnahme von *B. pilosicoli* - kaum zu klinisch sichtbaren Erkrankungen, sodass bislang davon ausgegangen wird, dass es sich hierbei um mäßig virulente oder apathogene Erreger handelt. Da in den meisten Proben aus Durchfallgeschehen auch andere darmpathogene Keime isoliert werden können, wird eine Aussage über die Pathogenität der schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp. zusätzlich erschwert (Rothkamp et al., 2005). Allerdings können auch Fehler beim Probentransport und/oder bei der Anzucht von *Brachyspira* spp. zu falsch-negativen Resultaten führen (Wendt et al., 2006). Hierbei kommt der Methodik zum Nachweis des Erregers ein entscheidender Faktor zu. So lag die Nachweisrate bei kulturellen Untersuchungen deutlich unter der Nachweisrate, die bei Untersuchungen mittels PCR erzielt werden konnte. Die Arbeitsgruppe um Kinyon et al. (1977) definierte folgende Kriterien zur Abgrenzung der schwachen von der starken β -Hämolysen der Brachyspiren: sie sei weniger intensiv, habe schwach abgegrenzte Ränder und werde in der Regel erst nach sechstägiger Inkubation sichtbar.

2.2.4.1. *Brachyspira intermedia*

Namensgebend für diesen Erreger war die Tatsache, dass seine biochemischen Eigenschaften diejenigen von *B. hyodysenteriae* und *B. innocens* vereinen, denn der Erreger ist ebenso wie *B. hyodysenteriae* in der Lage Indol zu produzieren, unterscheidet sich von diesem aber durch die fehlende sH (Lee et al., 1993). *B. intermedia*-Stämme konnten bereits aus Schweinen mit Durchfall isoliert werden (Binek und Szykiewicz, 1984; Fellström und Gunnarsson, 1995; Hudson et al., 1976; Jensen und Boye, 2005; Rothkamp et al., 2005; Wendt et al., 2006; Komarek et al., 2009). Gleichzeitig konnte durch *in situ*-Hybridisierung die Invasion von *B. intermedia* bei bestehender Colitis in die *Lamina propria mucosae* belegt werden (Jensen und Boye, 2005). Die Nachweisraten von *B. intermedia* beim Schwein belaufen sich in deutschen Betrieben auf Werte zwischen 1,7 bis 34,5 % (Rothkamp et al., 2005; Wendt et al., 2006; Vögely, 2015). Das Wirtsspektrum umfasst auch das Geflügel, wo der Erreger die aviäre intestinale Spirochätose auslösen kann (Griffiths et al., 1987; McLaren et al., 1997).

2.2.4.2. *Brachyspira innocens*

Die schwach hämolysierende Spezies *B. innocens* wird für das Schwein als apathogen eingestuft (Kinyon und Harris, 1979), woraus sich auch der Name der Spezies ableitet (lat.: *innocens* = harmlos, unschädlich). Zur pathogenen Spezies *B. hyodysenteriae* besteht nach DNS-DNS-Hybridisierung nur eine 28 %-ige Homologie (Miao et al., 1978). Infektionsversuche mit *B. innocens* an gnotobiotischen Ferkeln führten in 15 % der Fälle zu leichten Colitiden, während bei konventionell gehaltenen Ferkeln keine Symptome auftraten (Neef et al., 1994; Burrough et al., 2012). Auch die Tatsache, dass in Untersuchungen von Kotproben durchfallkranker Schweine in 42 % der Fälle der alleinige Nachweis von *B. innocens* gelang, ließ Zweifel an der generellen Apathogenität von *B. innocens* aufkommen (Rothkamp et al., 2005). Dies steht im Widerspruch zu einer anderen Untersuchung, laut der *B. innocens* nur in zwei von elf Fällen (18,2 %) als Monoinfektion auftrat (Jensen und Boye, 2005). Die Nachweisrate in deutschen Betrieben variiert in Abhängigkeit von der gewählten Nachweismethode (PCR, Kultur und/oder Biochemie) zwischen 13,7 bis 52 % (Rothkamp et al., 2005; Verspohl et al., 2001; Wendt et al., 2006; Vögely, 2015). Auch bei Jungpferden mit chronischer Diarrhoe gelang es im Einzelfall den Erreger nachzuweisen. Da zuvor der Nachweis anderer Bakterien bzw. Parasiten negativ verlief, kann eine Kausalität angenommen werden (Hampson et al., 2006a).

2.2.4.3. *Brachyspira murdochii*

Die Namensgebung erfolgte nach erstmaliger Identifizierung dieses Erregers an der Murdoch University (Westaustralien). Elf bis dreizehn Flagellen pro Zellende sorgen für die aktive Fortbewegung des Erregers (Stanton et al., 1997). *B. murdochii* gilt als Kommensale im Dickdarm des Schweines (Stanton et al., 1997), allerdings sind auch Fälle beschrieben, in denen der Erreger nach natürlicher Infektion aus durchfallkranken Schweinen isoliert werden konnte (Jensen und Boye, 2006; Weissenböck et al., 2005; Palzer und Ritzmann, 2008). Die Prävalenzen in hessischen Betrieben belaufen sich auf bis zu 65,3 % (Vögely, 2015). Das Wirtsspektrum schließt auch das Geflügel ein (Trott und Hampson, 1998; Stephens et al., 2005; Bano et al., 2008). Einer schwedischen Studie zufolge konnte *B. murdochii* auch im Kot durchfallkranker Hunde nachgewiesen werden, allerdings war eine eindeutige Kausalität nicht nachzuweisen (Fellström et al., 2001a). Auch wenn das klassische Habitat der Brachyspiren der Darmtrakt zu sein scheint, wurde *B. murdochii* aus dem Hüftgelenk eines lahmdenden Schweins isoliert. Es wurde nicht geklärt, ob der Erreger selbst die Ursache der Lahmheit war, zuvor bereits eine Entzündung in diesem Gelenk vorlag oder es im Rahmen einer Septikämie zur Ausbreitung des Erregers kam (Hampson et al., 1999).

2.2.4.4. *Brachyspira pilosicoli*

Bei der porcinen intestinalen Spirochätose (PIS) handelt es sich um eine milde bis moderate Form der Typhlocolitis, die mit wässrigen bis mukoiden Fäzes einhergeht (Hampson und Trott, 1999). Abgeleitet wurde der Name aus dem Lateinischen (*pilosus* = behaart; *colon* = Grimmdarm) und bezieht sich darauf, dass durch die Anlagerung der Bakterien der Eindruck eines „falschen“ Bürstensaums im Dickdarm entsteht. Der Schweregrad der Diarrhoe steht dabei in keinem Verhältnis zur SD (Thomson et al., 1997; Trott et al., 1996b). Der schwach hämolysierende Erreger *B. pilosicoli* wurde 1980 erstmals isoliert und ist in der Lage in experimentell infizierten Schweinen klinische Symptome und typische Läsionen zu verursachen (Taylor et al., 1980). Typischerweise besitzt *B. pilosicoli* vier bis fünf Flagellen pro Zellende, womit er weniger Flagellen als *B. hyodysenteriae* aufweist. Molekularbiologisch besteht zwischen beiden Spezies nur eine 24-25 %-ige Identität auf Basis der DNS. Im Gegensatz zu *B. hyodysenteriae* hat *B. pilosicoli* eine kürzere Generationszeit von 1 - 2 h und zeigt eine negative Indolreaktion (Trott et al., 1996b). Neben unblutiger Diarrhoe gelten Gewichtsverluste, Wachstumsverzögerungen, schlechtere Futtermittelverwertung und Anorexie als Hauptsymptome der Erkrankung, in deren Folge es zu einer verlängerten Mastdauer kommen kann (Girard et al., 1995; Thomson et al., 1997). Während gelegentlich Fieber auftreten kann, spielen Todesfälle bei der PIS im Gegensatz zur SD keine Rolle (Hampson und Trott, 1999). Die Prävalenzen bei durchfallkranken Schweinen liegen in Deutschland unter 10 % (Werner et al., 2011a; Vögely,

2015). *B. pilosicoli* kann im Gegensatz zu *B. hyodysenteriae* sensibel gegenüber Rifampicin und Spiramycin sein, was in einer falsch-negativen Befundung bei Verwendung von Selektivnährmedien, die diese Antibiotika enthalten, resultieren kann (Trott et al., 1996c). Im Unterschied zu anderen *Brachyspira* spp. handelt es sich bei *B. pilosicoli* um einen Zoonoseerreger (Hampson et al., 2006b; Trott et al., 1996a). Eine Infektion ist am wahrscheinlichsten bei Kontakt mit kontaminiertem Wasser, infizierten Tieren - besonders Vögel, die in der Regel mehrere Spezies beherbergen - oder deren Ausscheidungen (Hampson et al., 2006b). Die humane intestinale Spirochätose tritt gehäuft bei Menschen mit einer Immunsuppression auf, die bspw. im Rahmen einer HIV-Infektion erworben wird. Des Weiteren findet man ein gehäuftes Auftreten in Entwicklungsländern (Margawani et al., 2004; Trivett-Moore et al., 1998; Käsbohrer et al., 1990; Law et al., 1994). Wirtschaftliche Auswirkungen haben *B. pilosicoli*-Infektionen auch in der Geflügelindustrie, da es hier neben wässrigen Fäzes auch zu einer deutlich reduzierten Legeleistung kommen kann (Stephens und Hampson, 2002).

2.3. Diversität von *B. hyodysenteriae*

2.3.1. Serologische Diversität von *B. hyodysenteriae*

Stämme der Spezies *B. hyodysenteriae* können zum aktuellen Zeitpunkt in die Serotypen 1 - 9 sowie die Serogruppen A - K eingeteilt werden (Harris et al., 1999, Li et al., 1992, Hampson et al., 1997). Da in diesem Schema Stämme aus europäischen Ländern nur in geringer Anzahl vertreten sind, ist allerdings von einer höheren Anzahl an Serotypen auszugehen (Herbst et al., 2017). Die serologische Einteilung basiert auf der antigenen Vielfalt des Lipooligosaccharids (LOS) (Baum und Joens, 1979a). Da das LOS ein bedeutsamer Virulenzfaktor ist und die Bildung von Antikörpern gegen das LOS einen Schutz vor der SD vermittelt, haben Kenntnisse über vorherrschende Serotypen großen Nutzen für die Entwicklung von Vakzinen (Joens et al., 1979a; Joens et al., 1983). Die geographisch unterschiedlich verteilten Serotypen sowie die geringe Kreuzimmunität untereinander (Olson et al., 1994) stellen einen der Gründe dar, weshalb die Entwicklung einer effektiven Vakzine bisher misslang. Darüber hinaus hat die Serotypisierung bei *B. hyodysenteriae* keine derartige Bedeutung erlangt wie es z.B. bei *Salmonellen* (Kaufmann-White Schema) der Fall ist. Derzeitig liegt der Fokus zur Darstellung der Diversität der *Brachyspiren* eher auf sequenzbasierten Techniken als auf serologischen Methoden.

2.3.2. Genetische Diversität von *Brachyspira* spp.

2.3.2.1. Multilokus-Sequenztypisierung von *Brachyspira* spp.

Vor Nutzung der MLST und der WGS dienten zahlreiche PCR-basierte Techniken der genetischen Differenzierung von *Brachyspira*-Spezies. Sequenzbasierte Techniken konzentrierten sich vorrangig auf die Analyse der 16S rRNS-Gene, die lange Zeit als Goldstandard für die Klassifizierung von Bakterien galt (Woese, 1987; Ludwig und Klenk, 2001). Bei der Gattung *Brachyspira* lieferte diese Analyse jedoch keine vollständig zufriedenstellenden Ergebnisse (Pettersson et al., 1996, Stanton et al., 1996). Wie bereits oben beschrieben (s. Punkt 2.2.4.1) können die beiden Spezies *B. hyodysenteriae* und *B. intermedia* basierend auf der Analyse der 16S rRNS-Gene nicht unterschieden werden. Die MLST (Maiden et al., 1998) zielt auf den Nachweis von Polymorphismen in verschiedenen konservierten Regionen des Genoms ab, ist somit fähig zur Untersuchung der Diversität innerhalb einer Spezies und wurde vor einigen Jahren auch für Vertreter der Gattung *Brachyspira* etabliert (La et al., 2009b; Råsbäck et al., 2007b). Um MLST-Daten von *B. hyodysenteriae* zu generieren, werden partielle Sequenzen der sieben „Housekeeping“-Gene *adh* (alcohol dehydrogenase), *alp* (alkaline phosphatase), *est* (esterase), *gdh* (glutamate dehydrogenase), *glpK* (glucose kinase), *pgm* (phosphoglucosyltransferase) sowie *thi* (acetyl-CoA acetyltransferase) analysiert (Råsbäck et al., 2007b). Die resultierenden Sequenzen für jedes dieser Gene werden mit Zahlen nummeriert, woraus ein Allelprofil resultiert, welches den Sequenztyp (ST) des Stammes bestimmt (Jolley et al., 2004). Die Allelprofile der Stämme können miteinander verglichen werden, um Aufschluss über Verwandtschaftsverhältnisse und die geographische Verteilung bestimmter STs innerhalb einer Spezies zu erhalten. Trotz zunehmender Bedeutung der WGS, die deutlich mehr genetische Informationen liefert, handelt es sich bei der MLST um eine einfache und derzeit kostengünstigere Methode, die zur Darstellung der Phylogenie der Brachyspiren angewendet wird.

In einer ersten MLST-Studie über Brachyspiren wurden 66 *Brachyspira* spp.-Stämme, die überwiegend aus Schweden stammten, charakterisiert. Mit dem angewandten MLST-Schema konnte das gesamte Genus *Brachyspira* untersucht werden, was die Möglichkeit bot, Beziehungen zwischen den Spezies zu analysieren (Råsbäck et al., 2007b). Bis auf wenige Ausnahmen bildeten die jeweiligen *Brachyspira* spp. ein separates Cluster im Dendrogramm, wodurch sich die MLST-Analyse als geeignetes Verfahren zur Ermittlung der Spezieszugehörigkeit erwies. Die darauffolgende Studie befasste sich mit der Typisierung von *B. hyodysenteriae*-Stämmen aus Australien. Erstmals wurde hier festgestellt, dass auf unterschiedlichen Betrieben Stämme mit gleichem ST vorkommen können, wodurch die MLST möglicherweise zu einem neuen „Tool“ für die Untersuchung von Infektionswegen werden könnte (La et al., 2009b). Als eine mögliche Ursache der Verbreitung bestimmter STs wurden die Handelswege

2 Schrifttum

angeführt (Osorio et al., 2012). Durch die Untersuchung anderer Säugetiere und Vögel bezüglich der Ausscheidung von *B. hyodysenteriae* konnten potenzielle Reservoirwirte aufgedeckt werden (Mirajkar und Gebhart, 2014; Zeeh et al., 2018). Im Rahmen weiterer Studien konnte gezeigt werden, dass es eine kontinuierliche Weiterentwicklung der STs gibt, da sich diese beim Vergleich von Stämmen vor und nach der Jahrtausendwende, wenn auch geringgradig, voneinander unterscheiden (Mirajkar und Gebhart, 2014; La et al., 2016a). Während es sich bei *B. pilosicoli* eher um einen Erreger mit hoher genetischer Diversität handelt (Neo et al., 2013), scheint *B. hyodysenteriae* eine klonale Population zu bilden (La et al., 2009b; Osorio et al., 2012; Mirajkar und Gebhart, 2014). Aktuell (Stand 28.11.2019) gibt es auf der MLST-Website (<https://pubmlst.org/brachyspira/>) 217 verschiedene STs für die Spezies *B. hyodysenteriae*. Zu beachten ist, dass die Sequenzdaten der spanischen Arbeitsgruppe um Osorio et al. (2012) nicht auf der Webseite zu finden sind. Im Rahmen der genannten Arbeit wurden sieben neue STs identifiziert. Mehrfach nachgewiesene STs aus der italienischen Arbeitsgruppe von Gasparri et al. (2017) fanden ebenfalls nicht vollständig Eingang in die Datenbank, neue STs wurden jedoch eingepflegt. Auch wenn es sich bei *B. hyodysenteriae* um eine klonale Spezies handelt, so belegt das Auftreten von „single locus“-Varianten (SLV) und „double locus“-Varianten (DLV) eine gewisse Diversität innerhalb der Spezies. Eine weitere Diversifikation kann in dem Auftreten von „triple locus“-Varianten (TLV) und „multiple locus“-Varianten (MLV) gesehen werden.

2.3.2.2. Genom-basierte Studien bei *Brachyspira* spp.

Insbesondere bei Krankheitsausbrüchen erlangt der Nachweis von unterschiedlichen Klonen und STs eine wichtige epidemiologische Bedeutung. Vor der Einführung der WGS erfolgte die Verwandtschaftsanalyse von Stämmen mittels Makrorestriktionsanalyse und anschließender Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) (Salipante et al., 2015). Die Methode der PFGE weist jedoch zahlreiche Einschränkungen auf. So sind Ergebnisse aus unterschiedlichen Laboren nur eingeschränkt vergleichbar, die zu untersuchenden Stämme sollten aus einem begrenzten Zeitraum stammen und die Auflösung gegenüber der WGS ist geringer.

Die meisten PFGE-Studien wurden bei der Spezies *B. pilosicoli* durchgeführt. Hier weisen Untersuchungen an humanen, caninen und porcinen Stämmen auf eine hohe Heterogenität innerhalb dieser Spezies hin. Zudem belegen einige Studien, dass die Besiedlung von Menschen mit *B. pilosicoli*-Stämmen unterschiedlicher Pulsotypen (differierende PFGE-Muster) möglich ist (Atyeo et al., 1996; Rayment et al., 1997; Brooke et al., 2003; Oxberry und Hampson, 2003; Margawani et al., 2004). Der Nachweis gleicher Pulsotypen bei caninen und

2 Schrifttum

humanen Stämmen wurde so gedeutet, dass eine Übertragungsmöglichkeit besteht und somit ein zoonotisches Potential von *B. pilosicoli* ausgeht (Trott et al., 1998). Auch der Nachweis identischer Pulsotypen bei *B. pilosicoli*-Stämmen von Schweinen und Ratten deutet auf eine Übertragungsmöglichkeit hin (Backhans et al., 2011). Beim Vergleich porciner und caniner *B. pilosicoli*-Stämme fiel auf, dass die caninen Stämme in ein „Cluster“ geordnet werden konnten, was möglicherweise für eine Wirtsadaptation des Erregers sprechen könnte (Fellström et al., 2001a). Für *B. hyodysenteriae* existieren kontroverse Studien: Meist wird diese Spezies als klonal eingestuft (Fellström et al., 1999; Fellström et al., 2008), während andere Autoren eine Diversität der Spezies nachweisen konnten (Hidalgo et al., 2010; Atyeo et al., 1999). Im direkten Vergleich mit *B. pilosicoli* und *B. intermedia* weist *B. hyodysenteriae* jedoch eine geringere Diversität auf (Rayment et al., 1997; Fellström et al., 2008). Die später entwickelte MLST weist bei der Untersuchung einer Bakterienpopulation eine mitunter geringere, jedoch phylogenetisch stabilere diskriminierende Power als die PFGE auf und bietet dabei den Vorteil der besseren Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit.

Im Gegensatz zu anderen Erregern mit hoher infektionsepidemiologischer Bedeutung sind über die Gattung *Brachyspira* bislang nur wenige (vergleichende) Daten auf Genomebene verfügbar. In einer vergleichenden Analyse von 19 *B. hyodysenteriae*-Genomen, die unterschiedliche STs repräsentierten, betrug die Übereinstimmung der NS-Sequenzen zwischen den Stämmen mindestens 94,96 %. Dies deutet trotz unterschiedlicher STs eher auf eine Spezies mit geringer Mikroevolution hin. Auf Ebene der Proteine ergab sich eine Übereinstimmung von 75 - 88 %, was hinweisend auf dieselbe Spezieszugehörigkeit war (Black et al., 2015). Vergleiche innerhalb verschiedener *Brachyspira* spp. finden sich nur vereinzelt, so wurde anhand eines phylogenetischen Baums (UPGMA-Methode) gezeigt, dass *B. hyodysenteriae*-Stamm WA1 zu *B. murdochii*-Stamm 56-150 eine höhere genetische Verwandtschaft als zu *B. pilosicoli*-Stamm 95/1000 aufwies. Auffallend war zudem, dass die Abfolge der Gene auf dem Chromosom innerhalb der drei Spezies nicht konserviert war (Wanchanthuek et al., 2010). Nachdem auch das vermehrte Auftreten von schwach hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämmen beschrieben wurde, erfolgte eine vergleichende Genom-basierte Untersuchung der unterschiedlich hämolysierenden Stämme. Von 35 schwach hämolysierenden Stämmen konnten 34 einer gemeinsamen Untergruppe („sub-clade“) innerhalb der Spezies *B. hyodysenteriae* zugeordnet werden (Card et al., 2019).

2.4. Der stark hämolysierende Phänotyp von *B. hyodysenteriae*, *B. suanatina* und *B. hampsonii*

Als Hämolysine werden bakterielle Toxine bezeichnet, die die Fähigkeit besitzen Erythrozyten durch Schädigung der Zellmembran zu lysieren. Eine Vielzahl an Bakterien verfügt über Hämolysine, die als Virulenzfaktoren fungieren, wie bspw. *Streptococcus* (*Sc.*) spp., *Listeria* (*L.*) spp., *Escherichia* (*E.*) *coli* und *Staphylococcus* (*S.*) *aureus* (Javadi und Katzenmeier, 2016). Hämolysine können über die folgenden Wirkmechanismen zur Zerstörung von Erythrozyten führen: Hämolysen durch (i) Porenbildung; (ii) enzymatische Aktivität, bspw. in Form einer Sphingomyelinase; und (iii) Detergenzien-Wirkung.

B. hyodysenteriae besitzt nach aktuellem Wissensstand acht Hämolysingene. Die phänotypischen Charakteristika der mit der sH assoziierten Hämolysine lassen sich wie folgt skizzieren: Bei der Vermehrung von stark hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämmen konnten zu Beginn der exponentiellen Phase der Vermehrung Hämolysine aus dem Überstand gewonnen werden. Die hämolytische Aktivität des Überstands nahm mit Beginn der stationären Phase stetig ab. Die Produktion des Hämolysins konnte durch die Zugabe von 1 %-iger (Hefe-)RNS in die Kultur gesteigert werden, ohne dass dabei die Zellzahl beeinflusst wurde (Saheb et al., 1980). Dies wurde mehrfach beschrieben (Knoop, 1981; Lemcke und Burrows, 1982; Kent et al., 1988). Hinsichtlich des präparierten Hämolysins kamen die genannten Autoren insbesondere beim Molekulargewicht (MG) zu unterschiedlichen Ergebnissen: Dieses schwankte zwischen 19 und 78 kDa, was für das Vorhandensein unterschiedlicher Hämolysine bei *B. hyodysenteriae* sprechen könnte. Die erste WGS des Stammes *B. hyodysenteriae* WA1 (Schwein in 1980er Jahren, Westaustralien) bestätigt das Vorliegen von acht Hämolysingenen (Bellgard et al., 2009). Die phänotypischen Charakteristika der untersuchten *B. hyodysenteriae*-Stämme deuten auf ein gleichartiges hämolytisches Prinzip hin. Beim Vergleich mit anderen hämolytischen Mechanismen fallen Ähnlichkeiten zum Streptolysin S der Streptokokken auf. Bei den Hämolysinen von *B. hyodysenteriae* und dem Streptolysin handelt es sich um sauerstofftolerante, aber hitzelabile Proteine (Saheb et al., 1980; Knoop, 1981; Lemcke und Burrows, 1982; Kent et al., 1988). Bei einer Temperatur von 60 °C konnten die Hämolysine von *B. hyodysenteriae* vollständig inaktiviert werden. Bei <10 °C kam es zur Reduktion der Hämolysen (Saheb und Lafleur, 1980), während eine Lagerung bei -20 °C die hämolytische Aktivität nicht beeinflusste (Knoop, 1981; Lemcke und Burrows, 1982; Kent et al., 1988). Eventuell bindet das Hämolysin bei niedrigen Temperaturen an die Erythrozytenmembran, da nach Zentrifugation der Hämolysin-Erythrozyten-Mischung kaum freies Hämolysin im Überstand nachzuweisen war. Eine temperaturabhängige Hämolysen erfolgte, nachdem der unzentrifugierte Testansatz bei 37 °C inkubiert wurde (Saheb und Lafleur, 1980). Die hämolytische Aktivität der untersuchten, nicht näher bezeichneten Hämolysine von *B. hyodysenteriae* scheint

2 Schrifttum

im Gegensatz zum Hämolsin HlyA von *E. coli* (Ludwig et al., 1988) nicht an das Vorhandensein divalenter Ionen, wie Calcium oder Magnesium, gebunden zu sein (Saheb et al., 1980; Lemcke und Burrows, 1982). Wie die Hämolsine von *B. hyodysenteriae* genau wirken ist nicht abschließend geklärt. Ein enzymatischer Abbau der Erythrozytenmembran erscheint unwahrscheinlich, da proteolytische oder lipolytische Aktivitäten in den präparierten Hämolsinen nicht nachgewiesen wurden. Daten aus Hämolsin-Inhibitionsversuchen mit Zuckern unterschiedlicher MGs deuten darauf hin, dass es sich vermutlich um Porenbildner handelt (Saheb und Lafleur, 1980).

Auch die Frage, warum es Unterschiede in der hämolytischen Aktivität verschiedener *Brachyspira* spp. gibt, wurde adressiert. Auffallend war in diesem Zusammenhang, neben Unterschieden im MG, dass die Hämolsine von *B. innocens* (Stamm PA2 und PA4) im Gegensatz zu den Hämolsinen von *B. hyodysenteriae* (Stamm PM14 und PM25) unterschiedlich sensitiv gegenüber Phospholipiden waren. Durch Zugabe von Cardiolipin erfolgte eine vollständige, durch Sphingomyelin oder Phosphatidylserin eine 50 %-ige Reduktion der hämolytischen Aktivität der Hämolsine von *B. innocens*, während die Hämolsine von *B. hyodysenteriae* von keinem Phospholipid in ihrer hämolytischen Aktivität beeinflusst wurden (Saheb et al., 1981). Untersuchungen zum stark hämolytischen Phänotyp der beiden Spezies *B. suanatina* und *B. hamptonii* gibt es in der Literatur bislang nicht.

2.4.1. Die Pathogenese der Schweinedysenterie unter besonderer Berücksichtigung der Hämolsine von *B. hyodysenteriae*

Die Pathogenese der SD ist sehr komplex und nicht vollständig geklärt. Erschwert wird dies dadurch, dass es sich um eine Faktorenkrankheit handelt, deren Schweregrad in Abhängigkeit von der Fütterung, dem Betriebsmanagement und der Virulenz des Erregers variieren kann. Am anschaulichsten sind die Virulenzeigenschaften von *B. hyodysenteriae* anhand der Kolonisationsschritte des Erregers und der nachfolgenden Entstehung der Dysenterie zu erklären. Virulenzfaktoren bestimmen die krankmachende Wirkung von Mikroorganismen und wirken in unterschiedlichen Stadien der Infektion entweder einzeln oder in Kombination (Wu et al., 2008). Zu den bekannten Virulenzmechanismen bei der Gattung *Brachyspira* zählen die positive Chemotaxis zu Muzin, die durch Flagellen vermittelte Motilität, die Adhäsionsfähigkeit (u.a. vermittelt durch äußere Membranproteine), die Sauerstofftoleranz, die Hämolsine und das LOS sowie als spezielle Eisenaufnahmesysteme die Komponenten BitA - F („*Brachyspira* iron transport“) und FtnA (putatives Ferritin-Protein) (Dugourd et al., 1999; Davis et al., 2005). Zusätzlich gibt es noch eine Vielzahl variabler Oberflächenproteine, die zum Teil in mehreren

2 Schrifttum

Kopien pro Bakterium vorliegen und wahrscheinlich durch Antigenvariation helfen, das Immunsystem des Wirts zu umgehen oder als Adaptionsmechanismus an Umwelt-induzierten Stress anzusehen sind (McCaman et al., 2003). Im Genom des *B. hyodysenteriae*-Stammes WA1 (GenBank Accession-Nr. CPOO1357) (Bellgard et al., 2009) wurden 314 mutmaßliche Virulenzfaktoren gefunden, darunter verschiedene Proteasen, Peptidasen, Phospholipasen sowie Ankyrin-Proteine, die an einer Vielzahl von Zellvorgängen (u.a. Transkription, Entzündungsreaktion und Endozytose) beteiligt sein können (Mosavi et al., 2004). Auch ein 36 kb großes Plasmid (pBHWA1, GenBank Accession-Nr. CPOO1360) enthält unter anderem Gene, die an der Rhamnose-Biosynthese beteiligt sind. Dieser Zucker ist Bestandteil des LOS. Außerdem befinden sich dort Gene, die für weitere Glycosyltransferasen kodieren. Zudem kodiert das Plasmid für S-Adenosylmethionin-Proteine, die im Rahmen des „quorum-sensing“ eine Rolle spielen (La et al., 2014). Von 264 molekularbiologisch untersuchten *B. hyodysenteriae*-Feldstämmen in Australien fehlte nur einem Stamm (WA400) das Plasmid. Dies ist auch bei dem schwach virulenten *B. hyodysenteriae*-Stamm A1 der Fall (La et al., 2011; La et al., 2014). Allerdings ist bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht endgültig geklärt, ob das Fehlen bestimmter Plasmidgene bzw. des gesamten Plasmids tatsächlich einen Einfluss auf die Virulenz des Erregers hat (La et al., 2016b).

Der erste Schritt bei einer Infektion mit *B. hyodysenteriae* ist die orale Aufnahme von erregerehaltigem Kot. Der Infektionsdruck korreliert nur indirekt mit der aufgenommenen Erregermenge, da ein unbestimmter Prozentsatz durch die Magensäure abgetötet wird (Hampson et al., 1997; Alvarez-Ordóñez et al., 2013). Der restliche Anteil der aufgenommenen Brachyspiren übersteht die Magenpassage, weil sie im Mukus eingehüllt sind. Allerdings müssen noch weitere Faktoren eine Rolle spielen, da in Versuchen mit gnotobiotischen und konventionell gehaltenen Ferkeln nur letztere Symptome der SD entwickelten. Eine Kolonisation des Dickdarms gnotobiotischer Ferkel war nur durch die vorherige Verabreichung von Natriumhydrogencarbonat zur Neutralisation der Salzsäure möglich. Es wurde angenommen, dass bei gnotobiotischen Ferkeln eine Neutralisation der Magensäure nötig war, um eine ausreichende Infektionsdosis zu erreichen, die bei konventionell gehaltenen Schweinen durch synergistische Effekte mit anderen Bakterien ausgeglichen werden konnte (Brandenburg et al., 1977). Im Dickdarm können sich die Brachyspiren aufgrund ihrer Flagellen aktiv innerhalb der Mukusschicht bewegen, adhären jedoch nicht an der Epitheloberfläche (Kennedy et al., 1988). Die Motilität ist wiederum an die Chemotaxis gebunden, entfaltet in viskösen Medien ihre größte Wirkung und ist bei virulenten Stämmen deutlich ausgeprägter, als bei avirulenten Stämmen (Milner und Sellwood, 1994). Diese Beobachtungen konnten bei „knock-out“-Mutanten bestätigt werden (Rosey et al., 1995; Kennedy et al., 1997). Die Brachyspiren können jedoch auch

2 Schrifttum

in die Becherzellen eindringen und dort persistieren, was in Stresssituationen zu einer erneuten Ausscheidung der Erreger führen kann (Heinritzi, 2006).

Einen essenziellen Virulenzfaktor stellt die NADH-Oxidase (*nox*-Gen) dar, die molekularen Sauerstoff zu Wasser reduzieren kann. Dadurch kann der geringe, jedoch vorhandene Sauerstoffgehalt im Dickdarm toleriert werden und der Erreger kann zudem für einige Zeit in der Umwelt überleben (Stanton und Jensen, 1993). *Nox*-Gen-Mutanten wiesen nach einer 8-stündigen Inkubation mit Luftsauerstoff kein Wachstum mehr auf, während der *B. hyodysenteriae*-Wildtyp sein Wachstum erst nach 12-stündiger Exposition einstellte. Außerdem konnte im Tierversuch eine reduzierte Virulenz der *nox*-Gen-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden (Stanton et al., 1999).

Das makroskopische und mikroskopische Bild der mukohämorrhagischen Diarrhoe lässt sich am ehesten durch die Wirkung des LOS und der Hämolysine erklären. Da es sich um eine Faktorenkrankheit handelt, wird eine (sekundäre) Beteiligung anderer Bakterien und Protozoen vermutet. Als Hinweis hierfür gilt die Verschiebung des Spektrums der Darmmikrobiota in Richtung der Gram-negativen Bakterien (Robinson et al., 1984). Als Folge der mukofibrinösen, diphteroiden bis hämorrhagisch-nekrotisierenden Colitis kommt es zu Ödemen, Hämorrhagien und Leukozyteninfiltrationen. Das LOS wurde im Jahr 1979 (Baum und Joens, 1979a) erstmals beschrieben, ist im Gegensatz zum LPS von *E. coli* infolge einer fehlenden repetitiven O-Seitenkette rau und besitzt eine schwächere biologische Aktivität als dieses (Greer und Wannemuehler, 1989b; Greer und Wannemuehler, 1989a). Über seine endotoxische Aktivität soll es direkt schädigend auf Epithelzellen des Dickdarms wirken (Nuessen et al., 1983), sowie indirekt über den Anstieg von Entzündungsmediatoren, wie IL-1 und TNF- α , entzündliche Reaktionen hervorrufen (Greer und Wannemuehler, 1989b). Ein Vergleich des LOS von *B. hyodysenteriae*-Stamm B204 mit dem von *B. innocens*-Stamm B1555a blieb dabei ohne signifikanten Unterschied, sodass die bestehenden Virulenzunterschiede der beiden Stämme nicht auf das LOS zurückzuführen waren (Greer und Wannemuehler, 1989a). Eine zentrale Rolle bei der Epithelschädigung nehmen vermutlich die Hämolysine ein, denn durch die Injektion hämolysierender Extrakte in Darmschlingen von Ferkeln konnte das Auftreten SD-typischer Läsionen beobachtet werden (Lysons et al., 1991).

Schon 1977 kam die Vermutung auf, dass die Enteropathogenität von Brachyspiren eng an ihre hämolytische Aktivität gekoppelt zu sein scheint. Von 25 stark hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämmen riefen 23 Stämme nach oraler Inokulation (10^5 - 10^8 WbE/ml) bei spezifisch Pathogen-freien (SPF) Ferkeln die Symptome der SD hervor (Kinyon et al., 1977). Mit den beiden stark hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämmen B171 und B259 konnte keine SD ausgelöst werden. Parallel wurde auch die Enteropathogenität von 13 schwach hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämmen untersucht, die aus SD-unverdächtigen Schweinen

2 Schrifttum

isoliert wurden. Mit keinem der 13 Stämme konnten klinische Symptome der SD ausgelöst werden. Vier der 13 Stämme stellten jedoch nachweislich Vertreter von *B. innocens* (B256, 4/71) und *B. pilosicoli* (B359, B1555a) dar. In Ermangelung molekularbiologischer Methoden wurden die Spirochäten nur mittels Phasenkontrastmikroskopie identifiziert. Inwiefern es sich bei den übrigen neun *Brachyspira* spp. um schwach hämolysierende *B. hyodysenteriae*-Stämme handelt bleibt daher ungeklärt. Versuche, in denen hämolysierende Extrakte des *B. hyodysenteriae*-Stammes P18A in Darmschlingen (terminales Ileum und Colon) von SPF-Ferkeln injiziert wurden, legten den Schluss nahe, dass es sich bei den Hämolytinen gleichzeitig um Zytotoxine handelt. Nach einer dreistündigen Exposition mit einer Konzentration von 100.000 HU/ml („hemolytic units“) zeigte sich, dass die Zotten nahezu vollständig fehlten. Auffallend war, dass die Zellen eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber den hämolysierenden/zytotoxischen Substanzen aufwiesen, denn während Becherzellen intakt blieben, wiesen die Zellen an der Spitze der Zotten nach kurzer Zeit Schäden auf (Lysons et al., 1991). Bei der Untersuchung von stark und schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp. konnte festgestellt werden, dass Stämme mit sH auch eine ausgeprägtere Typhlocolitis induzierten und somit der Phänotyp gut mit der Enteropathogenität korrelierte. Untermauert wurde diese These durch die Entdeckung der zwei stark hämolysierenden Spezies *B. suanatina* und *B. hampsonii*, die aus Schweinen mit Symptomen der SD isoliert wurden (Råsbäck et al., 2007a; Chander et al., 2012).

Einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung der Rolle der Hämolytine/Zytotoxine erhoffte man sich durch die Herstellung von *tlyA*-Deletionsmutanten der *B. hyodysenteriae*-Stämme C5 und B204 (ter Huurne et al., 1992; Hyatt et al., 1994). Die Deletionsmutante C5 wies im Gegensatz zum Wildtyp eine verminderte hämolysierende Aktivität auf, wobei das Ausmaß der Reduktion nicht näher beschrieben wurde. Aufgrund der verbliebenen hämolysierenden Aktivität wurde jedoch geschlossen, dass es neben TlyA noch weitere Hämolytine geben müsse. Schweine, die mit *tlyA*-Deletionsmutanten der Stämme B204 und C5 inokuliert wurden, zeigten keine klinischen Symptome der SD (Hyatt et al., 1994). In anschließenden Versuchen sollte die protektive Wirksamkeit der Deletionsmutanten gegenüber einer Reinfektion mit stark hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämmen ermittelt werden. Eine Angabe zur Zeitspanne zwischen Inokulation der Deletionsmutante und Reinfektion mit dem virulenten Stamm B204 ist der Publikation nicht zu entnehmen. Schweine, die zuvor mit der Mutante C5 inokuliert wurden, zeigten weder klinische Symptome noch Läsionen im Colon nach Infektion mit dem Wildtyp B204. Obwohl dieses Ergebnis aufgrund geringer Tierzahlen nicht statistisch abgesichert wurde, schien die Deletionsmutante in der Lage zu sein den Schweinedarm zu kolonisieren

2 Schrifttum

und eine Immunantwort hervorzurufen. Da die Stämme B204 und C5 unterschiedlichen Serotypen angehören, wurde eine Serotyp-übergreifende Immunität angenommen (Hyatt et al., 1994).

Auffallend ist, dass *B. hyodysenteriae*-Stämme über eine unterschiedliche Virulenz verfügen, die beim stark virulenten Stamm B204 nicht durch die Anzahl der Passagen beeinflussbar war. Ebenso unbeeinflusst blieb der hämolytische Phänotyp (Kinyon et al., 1977). Neben B78 gelten die Stämme B169, B8044, B6933 und Ack 300/8 als mäßig virulent, da sie klinisch nicht regelmäßig mit einer mukohämorrhagischen Diarrhoe assoziiert werden konnten (Achacha et al., 1996). Man spekuliert, dass einige Stämme anfälliger für Mutationen sind (Achacha et al., 1996), z.B. induziert durch UV-Licht (Stanton et al., 2001).

Neben ihrer kontrovers diskutierten Rolle in der Pathogenese sind die Hämolsine der Brachyspiren essenzielle Proteine, die der Bereitstellung von Cholesterol und Phospholipiden dienen. Während der Kolonisation des Dickdarms beziehen die Bakterien diese Lipidverbindungen vermutlich aus den Futterinhaltsstoffen im Darm, dem intestinalen Mukus und aus den Membranen der Epithelzellen. In der akuten Phase der Erkrankung dienen als Quelle wahrscheinlich das Blutserum sowie die Erythrozyten (Stanton und Cornell, 1987).

Was neben der genauen Bedeutung der Hämolsine ebenfalls bisher nicht geklärt wurde, ist die Frage warum Versuche an gnotobiotischen Ferkeln, die allein mit *B. hyodysenteriae* (isoliert von einem Schwein mit SD) und in Kombination mit *Campylobacter coli* (früher *Vibrio coli*) und/oder *Peptostreptococcus* spp. inokuliert wurden, keine klinischen Anzeichen der SD zeigten (Brandenburg et al., 1977; Joens et al., 1981; Whipp et al., 1982). Möglicherweise interagieren Brachyspiren synergistisch mit anderen (anaeroben) Bakterien, wie beispielsweise *Bacteroides vulgatus* oder *Fusobacterium (F.) necrophorum*, wodurch Kolonisation, Entzündungen und Läsionen im Intestinaltrakt stark beeinflusst werden könnten (Harris et al., 1978; Whipp et al., 1979; Joens et al., 1981). Kinyon et al. (1977) belegten durch experimentelle Infektion von 68 SPF-Ferkeln mit *B. hyodysenteriae*, dass Monoinfektionen mit dem Erreger durchaus möglich sind, da 52 Ferkel Symptome der SD entwickelten. Die mukohämorrhagische Diarrhoe kann bis zu zehn Tage anhalten und ist Folge des Zusammenspiels zwischen (a) dem Verlust des Oberflächenepithels, welches zu Hämorrhagien führt, (b) der Degeneration von Becherzellen, die für die schleimige Komponente sorgt und (c) der Zerstörung der epithelialen Transportmechanismen, die zu einer osmotischen Diarrhoe führt. Der anhaltende Flüssigkeits- und Elektrolytverlust führt zu systemischer Dehydratation, Azidose und Hyperkaliämie in deren Folge es zu Todesfällen kommen kann (Argenzio et al., 1980; Waldmann und Lindemann, 1991). Um Todesfälle zu vermeiden, sollte neben einer symptomatischen Therapie der therapeutische Einsatz antimikrobieller Substanzen erfolgen. Trotz intensiver Forschung gibt es zum aktuellen Zeitpunkt keinen geeigneten ELISA-Test zur Erkennung von

Trägertieren, bspw. im Rahmen des Zukaufs. Ein valider Test wäre auch für das Auffinden subklinisch infizierter Tiere wünschenswert, da diese zwar keine Durchfallssymptome zeigen, sich die Infektion aber in schlechteren Mastergebnissen niederschlagen kann.

2.5. Hämolyse verschiedener *Brachyspira* spp.

Der Kenntnisstand über die Hämolyse bei den verschiedenen *Brachyspira* spp. ist überwiegend den in jüngster Zeit durchgeführten Genomanalysen zu verdanken. Im Zuge dieser Analysen wurden beim *B. hyodysenteriae*-Stamm WA1 die Hämolysegene *tlyA*, *tlyB*, *tlyC*, *hlyA*, *BHWA1_RS02885*, *BHWA1_RS02195*, *BHWA1_RS04705* und *BHWA1_RS09085*, entdeckt (Bellgard et al., 2009; Wachanthuek et al., 2010). Für die Hämolyse TlyA, TlyB, TlyC und HlyA liegen bereits phänotypische Daten vor (Muir et al., 1992; ter Huurne et al., 1994; Hsu et al., 2001). Die Genomsequenzierung von 19 weiteren *B. hyodysenteriae*-Stämmen bestätigte die Anwesenheit der acht Hämolysegene in den untersuchten Stämmen. Da die Identität der Hämolysegene innerhalb der Spezies *B. hyodysenteriae* sehr hoch (> 97 %) war, wurde geschlossen, dass es sich bei den Hämolyseproteinen um konservierte Proteine handelt (Black et al., 2015). Interessanterweise konnten bei den kürzlich in den Fokus gerückten schwach hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämmen auch alle acht Hämolysegene nachgewiesen werden. Diese wiesen jedoch im Gegensatz zu den stark hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämmen geringere Nukleotid-Ähnlichkeiten zum stark hämolysierenden Referenzstamm *B. hyodysenteriae* WA1 auf (Mahu et al., 2016; La et al., 2016b). Bislang ist nicht bekannt, welche Mutationen zur Abschwächung der Hämolyse führen könnten. Das Hämolysegen III (syn.: YplQ oder *BHWA1_RS02195*) wies unter den schwach hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämmen die höchste Anzahl an Mutationen auf. Aber auch bei den stark hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämmen fanden sich auf NS-Ebene bis zu 15 Mutationen, die auf AS-Ebene zu maximal sechs Austauschungen führten. Der abweichende Phänotyp könnte aber auch durch unterschiedliche posttranskriptionale Prozesse bedingt sein (La et al., 2016b): In neuen Untersuchungen wurden Mutationen im Promotorbereich von *hlyA* gefunden und als Ursache der wH betrachtet. Entsprechende Insertionen, SNPs („single nucleotide polymorphism“) und Deletionen waren in allen untersuchten (n = 3) schwach hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämmen nachzuweisen, während diese bei den stark hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämmen fehlten. Unabhängig von der Richtigkeit dieser Hypothese belegt diese Beobachtung, dass der Nachweis eines Hämolysegens zwar eine notwendige Voraussetzung für das Vorliegen eines hämolytischen Phänotyps liefert, Mutationen in den übergeordneten Regulationssystemen aber dennoch dazu führen können, dass die Ausbildung einer Hämolyse unterbleibt. Eine Übersicht über die wichtigsten Eigenschaften der acht bekannten Hämolyseproteine kann der Tabelle 1 entnommen werden.

Tabelle 1: Charakteristische Merkmale der acht bei *B. hyodysenteriae* WA1 beschriebenen Hämolyse

		Kenntnisstand über die bei <i>B. hyodysenteriae</i> WA1 beschriebenen Hämolyse (synonyme Bezeichnung)							
		BHWA1 ₁ RS01170 (TlyA)	BHWA1 ₂ RS05965 (TlyB)	BHWA1 ₃ RS06925 (TlyC)	BHWA1 ₄ RS12830 (HlyA)	BHWA1 ₅ RS02195 (YpIQ, Hämolyisin III)	BHWA1 ₆ RS09085	BHWA1 ₇ RS02885 (Hly)	BHWA1 ₈ RS04705
Referenz		Muir et al. 1992	ter Huurne et al. 1994	ter Huurne et al. 1994	Hsu et al. 2001	Bellgard et al. 2009	Bellgard et al. 2009	Bellgard et al. 2009	Wanchan-thuek et al. 2010
Größe (kDa)		26,88	93,28	30,76	8,93	25,77	25,56	53,25	48,1
Zytotoxizität		ja	ja	ja	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
Hemmung durch		Hitze, Pronase	Hitze, Protease	Hitze, Protease	Hitze, Lipase, Protease	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
keine Hemmung durch		EDTA, Sachharose, Raffinose, Dextran 5000	EDTA, Sachharose, Raffinose, Dextran 4	EDTA, Sachharose, Raffinose, Dextran 4	Trypsin	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
Wirkmechanismus		vmtl. Porenbildung	vmtl. Porenbildung	vmtl. Porenbildung	n. b.	vmtl. Porenbildung	vmtl. Porenbildung	n. b.	n. b.
Funktion/ Homologie		Methyltransferase	ATP-Bindung, Clp Protein	Oxidoreduktase-Aktivität	Acyl-Carrier-Protein	Zytolyse, Hämolyisin III-Superfamilie	Hämolyisin III-Superfamilie, Kanalprotein	Oxidoreduktase-Aktivität	Oxidoreduktase-Aktivität
Basenpaare (bp)		723	2487	807	237	675	672	1389	1299

Tabelle 1: Charakteristische Merkmale der acht bei *B. hyodysenteriae* WA1 beschriebenen Hämolyse (Fortsetzung)

		Kenntnisstand über die bei <i>B. hyodysenteriae</i> WA1 beschriebenen Hämolyse (synonyme Bezeichnung)					
	BHWA1 ₋ RS01170 (TlyA)	BHWA1 ₋ RS05965 (TlyB)	BHWA1 ₋ RS06925 (TlyC)	BHWA1 ₋ RS12830 (HlyA)	BHWA1 ₋ RS02195 (YplQ, Hämoly- ysin III)	BHWA1 ₋ RS02885 (Hly)	BHWA1 ₋ RS04705
Amino- säuren	240	828	268	78	224	462	432
Lokalisation	Zytoplasma	Zytoplasma	Zytoplasma	Zytoplasma	Zytoplasma/ Membran	Zytoplasma/ Membran	Zytoplasma/ Membran
Familie und Domänen	RNS-Bin- dungs-Domäne	UVR- Domäne, "coiled coil"- Domäne	CBS- Domäne, CorC-HlyC- Domäne	Acyl-Carrier- Domäne, zwi- schen <i>fabF</i> und <i>fabG</i> ge- legen	helikale Transmembran- Domänen	helikale Transmembran- Domänen, CBS- Domäne, CorC-HlyC- Domäne	helikale Transmembran- Domänen, CBS- Domäne, CorC-HlyC- Domäne

kDA = Kilodalton, n. b. = nicht bestimmt, CBS = Cystathionin- β -Synthase, vmtl. = vermutlich

2.5.1. Das Hämolsin TlyA

Zur Aufklärung der Frage, welches Hämolsin für den stark hämolysierenden Phänotyp von *B. hyodysenteriae* bzw. weiterer stark hämolysierender Spezies der Familie Brachyspiraceae verantwortlich sein könnte, wurden Untersuchungen mit dem zuerst entdeckten Hämolsingen *tlyA* unternommen. Hierbei zeigte sich, dass ein das *tlyA*-Gen umfassende Genomfragment nach Transformation des *E. coli* K-12 Laborstammes DH5 α zur Hämolyse der Empfängerzelle führte (Muir et al., 1992). Da sich jedoch auf dem klonierten Fragment neben *tlyA* weitere Nukleotide bzw. ein weiterer offener Leserahmen (ORF, „open reading frame“) befanden, konnte nicht eindeutig gezeigt werden, dass TlyA allein für die Ausprägung der sH verantwortlich ist. Da eine hämolytische Aktivität unabhängig von der Orientierung des Inserts nachweisbar war, wurde angenommen, dass das klonierte Fragment von 1,5 kb auch über Transkriptions- bzw. Regulationsfaktoren von *B. hyodysenteriae* verfügen müsste. Das aus den *E. coli*-Stämmen gewonnene rekombinante Hämolsin wies ein MG von 26,9 kDa auf.

Sowohl das Hämolsin aus dem Kulturüberstand von *B. hyodysenteriae* als auch das rekombinant gewonnene Hämolsin aus *E. coli* waren empfindlich gegenüber Behandlungen mit Pronase. Außerdem führte eine Hitzebehandlung zur Inaktivierung (5 min, 100 °C). Nach der Zugabe von EDTA kam es hingegen zu keinerlei Einschränkung der hämolytischen Aktivität. Somit war dieses Hämolsin auch in Abwesenheit von divalenten Ionen, die bspw. für das *E. coli*-Hämolsin HlyA nötig sind, aktiv (Ludwig et al., 1988). Zur Überprüfung, ob es sich bei dem Hämolsin TlyA um einen Porenbildner handelt, wurden Kohlenhydrate mit unterschiedlichen MGs zu einem Hämolsin-Erythrozytengemisch gegeben. Die Zugabe von Saccharose (0,9 nm), Raffinose (1,2-1,4 nm) und Dextran 5000 (1,5-2,3 nm) zeigte keine inhibierende Wirkung auf die beiden unterschiedlich gewonnenen Hämolsine (rekombinant und nativ). Da die Arbeitsgruppe um Muir et al. (1992) eine enzymatisch vermittelte hämolytische Aktivität ausschließen konnte, müssten die generierten Poren kleiner als 0,9 nm oder größer als 2,3 nm sein. Eine andere Arbeitsgruppe beschrieb, dass es sich bei der Hämolyse um einen kolloid-osmotischen Prozess handeln könnte. In den Experimenten mit dem nativen sowie dem rekombinant hergestellten TlyA konnte gezeigt werden, dass Rubidium 86 früher als das Hämoglobin aus den radioaktiv markierten Erythrozyten freigesetzt wurde. Somit war davon auszugehen, dass es durch das Hämolsin zunächst zu einer gestörten Permeabilität der Erythrozytenmembran und erst nachfolgend zur Bildung von Poren kommt (Hyatt und Joens, 1997).

Neben der Fähigkeit zur Hämolyse, besitzt sowohl das native als auch das rekombinant hergestellte Protein zytotoxische Wirkung auf CHO (chinese hamster ovary)-, HeLa (Henrietta Lacks, Zervixkarzinom)- und MDCK (Madin-Darby Canine Kidney)-Zellen (Muir et al., 1992).

2 Schrifttum

Das TlyA zeigt als einziges der acht Hämolyse von *B. hyodysenteriae* Übereinstimmungen zur Methyltransferase und besitzt eine RNS-Bindungs-Domäne (<https://www.uniprot.org/uniprot/>).

Knapp zehn Jahre nach der Beschreibung dieses Hämolyse wurde postuliert, dass es sich bei TlyA lediglich um ein Regulatorprotein handele, das im Empfängerorganismus *E. coli* dafür Sorge, dass bspw. das *E. coli*-eigene Hämolyse SheA induziert würde (Hsu et al., 2001, Stanton, 2006). Bei der Analyse des *sheA* von *E. coli* wurde gezeigt, dass dieses Gen unter der negativen Kontrolle von zwei nicht näher beschriebenen Proteinen steht (del Castillo et al., 1997). Gegen die Hypothese, dass es sich bei TlyA lediglich um ein Regulatorprotein handelt sprechen aktuelle Berichte über die Klonierung des *tlyA* von *B. hamptonii*-Stamm 30446 (GenBank Accession-Nr. NZ_ALNZ00000000) in *E. coli* und dem nachfolgendem Nachweis der hämolytischen Aktivität des rekombinanten Hämolyse (Keith et al., 2016). Diese kontroversen Befunde machen eine endgültige Beurteilung des TlyA schwierig. Wünschenswert wären Bestätigungen durch „knock-out“-Experimente, die jedoch bei dem Genus *Brachyspira* nur unter erheblichem methodischen Aufwand möglich sind (Mapple et al., 2014).

Das Hämolysegen *tlyA* kommt Serotyp- und Sequenztyp-übergreifend in allen mittels PCR untersuchten *B. hyodysenteriae*-Stämmen vor (Fellström et al., 2001b; Barth et al., 2012). Bei *B. innocens*-Stamm B256 konnte *tlyA* im Zuge einer Southern Blot-Hybridisierung nicht nachgewiesen werden (Muir et al., 1992). Auch bei der Untersuchung mehrerer Feldstämme der Spezies *B. pilosicoli*, *B. intermedia*, *B. innocens* und *B. murdochii* aus Deutschland konnte *tlyA* mittels PCR nicht nachgewiesen werden (Barth et al., 2012).

Die neu entdeckte Spezies *B. suanatina* wurde ebenso auf das Vorhandensein von *tlyA* untersucht. Allerdings konnte hier im Zuge von PCR-Untersuchungen kein positives Ergebnis erzielt werden. Dies führte zunächst zu dem Schluss, dass es sich bei TlyA nicht um das für die sH verantwortliche Protein handeln könne (Råsbäck et al., 2007a). Im Rahmen der Gesamtgenom-Sequenzierung von *B. suanatina* AN4859/03 (GenBank Accession-Nr. NZ_CVLB01000000) konnte *tlyA* jedoch nachgewiesen werden. Dies spricht für das Vorliegen von Sequenzdiversitäten dieses Gens innerhalb der Gattung *Brachyspira*. Auch in den beiden sequenzierten Genomen von *B. hamptonii* (GenBank Accession-Nr. NZ_ALNZ01000000 und NZ_AOMM01000000) wurde *tlyA* nachgewiesen.

E. coli DH1-Stämme, die mit *tlyA*-Genen verschiedener Bakterien (*Mycobacterium (M.) tuberculosis*, *M. smegmatis*, *Streptomyces coelicolor*, *Thermus thermophilus*, *B. hyodysenteriae* und *Geobacillus stearothermophilus*) transformiert wurden, zeigten anschließend eine gesteigerte hämolytische Aktivität. Allerdings gibt es unter den Mykobakterien auch Stämme (*M. bovis* ATCC 35740), die keine hämolytische Aktivität besitzen, aber dennoch über das *tlyA*

verfügen, welches in seiner NS-Sequenz identisch mit dem *tlyA* des hämolysierenden Stammes *M. tuberculosis* H37Rv ist (Monshupanee, 2013). Übertragen auf *B. hyodysenteriae* könnten diese Ergebnisse dafür sprechen, dass ein Zusammenspiel verschiedener Hämolysine zur Ausprägung der sH nötig ist und dass vorhandene Hämolysingene in schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp. möglicherweise aufgrund fehlender Transkriptionsfaktoren nicht exprimiert werden können.

2.5.2. Die Hämolysine TlyB und TlyC

Das Hämolysin TlyB wurde ähnlich wie das TlyA unter Verwendung von Genbibliotheken über den Plasmidvektor pBluescript im *E. coli* K-12-Stamm DH5 α rekombinant hergestellt (ter Huurne et al., 1994). Das Hämolysingen *tlyB* liegt innerhalb eines offenen Leserahmens, der 2484 bp umspannt und für ein Protein mit einem MG von 93,3 kDa kodiert. Der kleinste hämolysierende *E. coli*-Klon beinhaltete das Fragment pSMURV, welches 1600 bp des *tlyB*-Gens umspannte, aber dennoch zur Ausbildung eines hämolytischen Phänotyps führte. Folglich müsste die hämolytische Aktivität von TlyB durch einen selbstständigen Bereich innerhalb des gesamten Proteins kodiert sein.

Die Herstellung von TlyC erfolgte analog in dem Cosmidvektor pLAFR2. Der hämolysierende Klon pMVHOLF3 (1,5 kb) beinhaltete das Hämolysingen *tlyC* mit einer Größe von 804 bp. Das entsprechende Protein wies ein MG von 30,8 kDa auf (ter Huurne et al., 1994).

Die rekombinant hergestellten Hämolysine TlyB und TlyC waren empfindlich gegenüber Proteinase K und Hitze (30 min, 60 °C). Es handelt sich vermutlich um Porenbildner mit der Bildung von Poren < 0,9 nm oder > 3,5 nm (ter Huurne et al., 1994). TlyB weist Ähnlichkeiten zu Clp-Proteinen (Caseinolytische Protease) auf, die als molekulare Chaperone die vitalen Zellkomponenten vor Temperaturstress schützen sollen, aber naturgemäß nicht hämolysierend sind (Squires und Squires, 1992). Das TlyB besitzt eine UVR-Domäne und vier „coiled-coil“-Strukturen. Die UVR-Domäne ist Bestandteil der Proteine UvrA - UvrC, welche bei *E. coli* an der DNS-Reparatur beteiligt sind (van Houten und Snowden, 1993). Das TlyC weist genau wie BHWA1_RS04705 und BHWA1_RS02885 zwei Cystathionin- β -Synthase-Domänen (CBS) auf. Die beiden rekombinant hergestellten Proteine TlyB und TlyC erwiesen sich in Zellkulturmodellen mit Henle Intestinal (Int-407) und HeLa-Zellen als zytotoxisch (ter Huurne et al., 1994). Untersuchungen an den nativen Hämolysinen fanden nicht statt.

Diskutiert wird, ähnlich wie beim TlyA, ob es sich bei TlyB und TlyC auch eher um Regulatorproteine handelt, die die hämolytische Aktivität von *E. coli* beeinflussen (Stanton, 2006; Hsu et al., 2001). Einschränkend ist anzumerken, dass, ähnlich wie beim TlyA, in den Studien zu TlyB und TlyC jeweils die „up“- und „downstream“ der offenen Leserahmen gelegenen DNS-

Sequenzen mitkloniert wurden. Welche Funktionen diese Regionen haben, ist nicht geklärt. In einer weiteren Studie, in der TlyA, TlyB, TlyC und HlyA rekombinant hergestellt wurden, blieb die hämolytische Aktivität der rekombinant hergestellten Genprodukte aus (Reiher, 2012). Eine andere Studie konnte die hämolytische Aktivität des rTlyA von *B. hamptonii* in *E. coli* nachweisen, während rTlyC keine hämolytische Aktivität aufwies (Keith et al., 2016).

2.5.3. Das Hämolysin HlyA

Dieses Hämolysin wurde im Gegensatz zu TlyA bis TlyC bei der Erstentdeckung aus Kulturüberständen des Stammes *B. hyodysenteriae* B204 gewonnen, gereinigt und N-terminal sequenziert. Aus der daraus abgeleiteten NS-Sequenz wurden degenerierte Primer hergestellt. Mit Hilfe dieser Primer erfolgte eine DNS-Hybridisierung mit der zuvor hergestellten Genbibliothek von *B. hyodysenteriae*, um das gesuchte Gen *hlyA* zu identifizieren. Insgesamt konnten drei positive Ergebnisse (Klon pISM1235 - pISM1237) erzielt werden. Nachdem diese DNS in ein Plasmid eingebaut und in den *E. coli*-Stamm SOLR transformiert wurde, kam es zur Hämolyse des zuvor nicht hämolysierenden *E. coli*-Stammes. Wie die anderen Hämolysine (TlyA - C), wurde auch das HlyA von *E. coli* nicht aktiv sezerniert, sondern erst nach Ultraschallbehandlung in den Überstand freigesetzt. Neben dem *hlyA*-Gen wurden noch zwei weitere flankierende Gene kloniert. Das Protein HlyA mit einem MG von 8,9 kDa zeigte sich empfindlich gegenüber Proteasen und Lipasen, wohingegen eine Trypsin-Behandlung die hämolytische Aktivität nicht inhibieren konnte (Hsu et al., 2001). Dies deutet darauf hin, dass es sich bei dem Hämolysin HlyA um ein Lipoprotein handelt, wie bereits von Saheb et al. (1980) vermutet. Diese Arbeitsgruppe hat ihr untersuchtes Hämolysin allerdings nicht näher beschrieben, sodass unklar ist, ob es sich bei den beiden Hämolysinen um dasselbe Genprodukt handelt. Allerdings weichen die beschriebenen Hämolysine deutlich in ihrem MG voneinander ab (8,9 kDa vs. 74 kDa), weshalb es eher unwahrscheinlich erscheint, dass die beiden Hämolysine übereinstimmen. Das von der Arbeitsgruppe Hsu et al. (2001) beschriebene HlyA wies eine Acyl-Carrier-Domäne (ACP) auf, schien maßgeblich am Lipidstoffwechsel beteiligt zu sein und wurde von den Genen *fabF* (kodiert für ACP Synthase) und *fabG* (kodiert für ACP Reduktase) flankiert, die ebenfalls mitkloniert wurden und mutmaßlich für die Ausprägung der sH verantwortlich sein sollen (Wanchanthuek et al., 2010; Zuerner et al., 2004). Das ACP wies ein Phosphopantetheinsäure-Muster an der AS-Position 32 - 47 auf, welches möglicherweise für eine posttranskriptionale Modifikation des Proteins verantwortlich sein könnte. In diesem Zusammenhang war interessant, dass dem HlyA eine sieben AS lange Signalsequenz vorgeschaltet war, die bei den anderen Hämolysinen nicht beobachtet wurde und die auch im posttranskriptional modifizierten HlyA nicht mehr nachzuweisen war. Da der Sekretionsweg von Proteinen

bei *Brachyspira* spp. nicht ausreichend erforscht ist, kann derzeit keine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich um ein sekretorisches Hämolyysin handelt. Die Sekundärstruktur von HlyA war durch α -Helix-Strukturen gekennzeichnet (Hsu et al., 2001). In *E. coli* ist das ACP daran beteiligt Prohämolyisine durch Acylierung in ihre aktive Form zu überführen (Issartel et al., 1991) und auch hier wird das ACP von ähnlichen Genen (*fabG* und *fabF*) flankiert (Rawlings 1992). Mutationen in den umgebenden Genen könnten zu einem veränderten Fettsäuremuster von HlyA führen (Price et al., 2001). In den bisher veröffentlichten Genomsequenzen verschiedener *Brachyspira* spp. war *hlyA* stets nachweisbar (Mappley et al., 2014). Ein Vergleich des HlyA von *B. hyodysenteriae*-Stamm B78 und *B. pilosicoli*-Stamm P43/6/78 ergab eine Abweichung von zwei AS innerhalb des Proteins, jedoch erheblich mehr Sequenzunterschiede in den FabF- und FabG-Proteinen. Dies könnte zu einem veränderten Lipidmuster des HlyA führen und Einfluss auf die hämolytische Aktivität nehmen. Denkbar sind ebenso Unterschiede im intergenischen Bereich vor dem Gen *hlyA*, was sich auf die Transkription auswirken könnte (Zuerner et al., 2004).

2.5.4. Die mutmaßlichen Hämolyisingene *BHWA1_RS02195* (hemolysin III) und *BHWA1_RS09085*

Die Hämolyisingene *BHWA1_RS02195* und *BHWA1_RS09085* wurden, ebenso wie die zwei folgenden mutmaßlichen Hämolyisine (s. Punkt 2.5.5), nach der Sequenzierung des Genoms von *B. hyodysenteriae*-Stamm WA1 durch *in silico*-Vorhersage der ORFs entdeckt (Bellgard et al., 2009; Wanchanthuek et al., 2010). Phänotypische Daten liegen für keines der vier neu entdeckten Hämolyisine vor. *BHWA1_RS02195* und *BHWA1_RS09085* zeigen Übereinstimmungen mit der Hämolyysin III-Superfamilie. Das Hämolyysin III bildet bei *Bacillus cereus* Poren in der Größe von 3,0 bis 3,5 nm. Die Hämolyse wird dort durch ein mehrstufiges Verfahren induziert: (i) die temperaturabhängige Adhäsion des Hämolyisins an die Erythrozytenmembran bei 37 °C, (ii) die temperaturabhängige Bildung transmembraner Poren bei 37 °C und (iii) die temperaturunabhängige Lyse der Erythrozyten (Baida und Kuzmin, 1996). Bei *BHWA1_RS09085* wird zudem vermutet, dass es sich um ein Kanalprotein handelt. Beide Proteine verfügen über jeweils sieben helikale Transmembrandomänen.

2.5.5. Die mutmaßlichen Hämolyisingene *BHWA1_RS02885* („hemolysin activation protein“) und *BHWA1_RS04705*

Beide Hämolyisingene verfügen über je zwei CBS-Domänen. Auch wenn die Funktion der CBS-Proteine noch nicht völlig aufgeklärt ist, geht man davon aus, dass das Protein in der Lage ist Adenosin-Derivate zu binden und somit die Aktivität von Enzymen regulieren kann

2 Schrifttum

oder als Sensor für intrazelluläre Metaboliten fungiert (Scott et al., 2004). Beim Menschen ist bekannt, dass Mutationen in den konservierten Regionen der CBS-Proteine zu Erbkrankheiten, wie der Homocystinurie oder der hypertrophen Kardiomyopathie führen können (Ignoul und Eggermont, 2005). Beide Hämolysine weisen zusätzlich eine Transporter-assoziierte Domäne CorC-HlyC auf, die sich auch in dem oben beschriebenen Hämolysin TlyC wiederfinden lässt. Wahrscheinlich stellt CorC einen Magnesium- und Cobalt-Efflux-Transporter dar, während es sich bei HlyC möglicherweise um ein Hämolysin-aktivierendes Protein handelt (Deckert et al., 1998; Romine, 2011). Im Gegensatz zu den anderen Hämolysingenen scheint es für *BHWA1_RS04705* kein ähnliches Gen bei *B. pilosicoli*-Stamm 95/1000 zu geben. Daher wurde diskutiert, ob dieses Gen für die Ausbildung einer sH verantwortlich sein könnte (Wanchanthuek et al., 2010). Beide Proteine verfügen zusätzlich über drei (*BHWA1_RS02885*) bzw. vier (*BHWA1_RS04705*) helikale Transmembran-Domänen.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Verbrauchsmaterialien, Puffer und Nährmedien

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien, Puffer sowie festen und flüssigen Nährmedien inklusive der Zusätze sind im Anhang (ab Seite 157) gelistet. Alle verwendeten Flüssigkeiten wurden, sofern nicht anders beschrieben, sterilfiltriert (Porendurchmesser 0,2 µm, Fa. Whatman, bezogen über MAGV, Rabenau-Lohndorf) oder autoklaviert.

3.1.2. Bakterienstämme

In der vorliegenden Arbeit wurden Referenz- bzw. Kontrollstämme verschiedener *Brachyspira* spp. sowie 221 *Brachyspira* spp.-Feldstämme verwendet (Tabelle 18). Die Feldstämme stammten überwiegend aus Deutschland mit dem Schwerpunkt Hessen. Ein weiterer Teil kam aus Polen (n = 10), Dänemark (n = 13), Japan (n = 5), Spanien (n = 19) und den Vereinigten Staaten (n = 10). Die Stämme wurden zwischen 1990 und 2016 isoliert und an das IHIT in Gießen gesandt. Vorberichtlich stammten die Stämme aus Betrieben, die im Rahmen des Tiergesundheitsmonitorings routinemäßig beprobt wurden oder aus Kotproben von durchfallkranken Schweinen mit Mukus und Blut in den Fäzes. Zum Teil lagen den Einsendungen keine Vorberichte bei. Von sechs Betrieben wurde eine variable Anzahl von *B. hyodysenteriae*-Stämmen (2 - 11) in der beschriebenen Zeitspanne hinsichtlich Veränderungen des Multilokus-Sequenztyps untersucht (s. Punkt 3.3.4). Die Zeit zwischen den Einsendungen variierte zwischen zwei Wochen und 19 Monaten. Bei allen phänotypischen Studien (s. Punkt 3.4) wurden die Stämme *B. hyodysenteriae* B204, *B. suanatina* AN4859/03, *B. hamptonii* 5364-4x/12, *B. innocens* 2933-2 und *B. hyodysenteriae* G423 verwendet. Tabelle 18 im Anhang informiert über Herkunft und Bezeichnung der Referenz- bzw. Kontrollstämme und über Ergebnisse ihrer serologischen Typisierung bzw. der MLST-Analyse. Die Basis der Identifizierung von Feldstämmen als *B. hyodysenteriae* bildete eine Spezies-spezifische PCR (s. Punkt 3.3.3).

3.1.3. Additive zur Vermehrung der *Brachyspira* spp.

Wie unter Punkt 3.2.1 aufgeführt diente zur Vermehrung der *Brachyspira* spp. in Flüssigkultur die Brain Heart Infusion-Bouillon (BHI) mit 20 % FKS (fetales Kälberserum) in der Endkonzentration (BHIF) sowie ggf. fünf zugesetzte Antibiotika. Zur Untersuchung externer Faktoren auf die mögliche Expression von Zytotoxinen während der Vermehrung von *B. hyodysenteriae* (s.

3 Material und Methoden

Punkt 3.4.10) wurde das Kulturmedium (BHIF) durch Zusatz verschiedener Substanzen verändert. Für diese Fragestellung dienten die nachfolgend aufgeführten Präparationen:

Schweinefäzesextrakt („porcine feces extract“, PFE)

Für die Präparation eines Extraktes aus Schweinekot dienten als Ausgangsstoff 200 g Fäzes einer erwachsenen klinisch unauffälligen Sau des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität in Gießen, welcher nach dem Kotabsatz vom Stallboden gesammelt wurde. Im Rahmen der kulturellen Untersuchung konnten keine Brachyspiren nachgewiesen werden. Die Kotprobe wurde mit 250 ml einer physiologischen NaCl-Lösung (0,9 %) versetzt und für 1 h bei 20 °C geschüttelt. Nach anschließender Zentrifugation für 20 min bei 2710 x g und 20 °C wurden 50 ml eines trüben, flüssigen Überstandes gewonnen. Dieser Extrakt wurde viermal durch eine 8-lagige Gaze, anschließend durch einen Faltenfilter mit der Bezeichnung 520 a ½ (Fa. Whatman, bezogen über MAGV, Rabenau-Lohndorf) und dann zweimal durch sterilen Seesand filtriert. An diese Prozedur schloss sich eine erneute Zentrifugation für 40 min bei 20.000 x g und 4 °C an. Der Überstand wurde nacheinander durch Einmalfilter (Fa. Whatman, bezogen über MAGV, Rabenau-Lohndorf) mit den Porengrößen 1,2 µm; 0,8 µm; 0,45 µm und 0,2 µm filtriert und das Filtrat bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C tiefgefroren.

Kulturfiltrate von *Fusobacterium necrophorum* und *Bacteroides stercoris*

Für die Herstellung der Anaerobierextrakte wurde jeweils ein Vertreter von *F. necrophorum* (IHIT39886, diagnostisches Probenmaterial von der Klaue eines Schafes, 2014) und *Bacteroides stercoris* (IHIT39887, diagnostisches Probenmaterial aus Hundekot 2015) ausgewählt. Beide Stämme wurden einzeln in BHI-Bouillon unter anaeroben Bedingungen (Anaerobierbox AnaeroPack Rectangular, Fa. Biomerieux, Wien, Österreich; AnaeroGen, Fa. Oxoid, Hampshire, England) bei 37 °C auf einem Schüttler (125 rounds/min, Kompaktschüttler KS 15 A, Fa. Edmund Bühler, Hechingen) vermehrt. Zur Kontrolle der anaeroben Bedingungen wurde ein Sauerstoffindikator (Anaerotest, Fa. Merck KGaA, Darmstadt) mitgeführt. Bei einsetzender Trübung (McFarland Standard 5) des Mediums wurden die Bakterien geerntet. Dies trat bei *F. necrophorum* nach 48 h ein, während bei *Bacteroides stercoris* eine 24-stündige Inkubation zur Trübung des Mediums führte. Die Kulturbouillon wurde anschließend für 20 min bei 2000 x g bei 20 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden sterilfiltriert (Porendurchmesser 0,2 µm, Fa. Whatman, bezogen über MAGV, Rabenau-Lohndorf). Bis zur anschließenden Verwendung wurden die Filtrate bei -20 °C gelagert. Die Anaerobierextrakte wurden in einer 1:50-Verdünnung verwendet.

Kulturfiltrate von *Escherichia coli* und *Enterococcus faecalis*

E. coli (IHIT39888 diagnostisches Probenmaterial aus Schweinekot, 2014) und *Enterococcus faecalis* (IHIT39889, diagnostisches Probenmaterial aus Schweinekot, 2014) wurden unter aeroben Bedingungen für 16 h in BHIF-Bouillon vermehrt und erreichten dabei einen McFarland Standard 5. Nach Zentrifugation für 20 min bei 2000 x g bei 20 °C wurden die Überstände sterilfiltriert (Porendurchmesser 0,2 µm, Fa. Whatman, bezogen über MAGV, Rabenau-Lohndorf) und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Antibiotika

Sofern nicht anders erwähnt, enthielten alle festen und flüssigen Nährmedien für die Vermehrung von *Brachyspira* spp. die fünf antimikrobiellen Substanzen Colistin, Vancomycin, Spectinomycin, Spiramycin und Rifampicin (CVSSR). Die Konzentrationen können dem Anhang (ab Seite 157) entnommen werden. Fehlt die Angabe ^{CVSSR} bei der Beschreibung des Nährmediums waren diesem keine Antibiotika zugesetzt.

RNS von Hefen

Zunächst wurden Lösungen mit 0,05 % bzw. 0,01 % Hefe-RNS (Fa. MP Biomedicals, Frankreich) in BHIF^{CVSSR} hergestellt. Durch kräftiges Schütteln wurde die homogene Verteilung der Hefe-RNS in dem Medium sichergestellt. Die Suspensionen wurden anschließend für 30 min bei 60 °C erhitzt. Die Herstellung erfolgte jeweils frisch für die am Tag durchgeführten Versuche.

3.1.4. Verwendete Zellkulturen, Kultivierung und Archivierung der Zellen

Für die Untersuchungen zur biologischen Aktivität der Hämolyse/Zytotoxine wurden CrFK (Crandell-Rees Feline Kidney)-Zellen (Niere, Katze, ATCC-Nr. CCL-94) verwendet.

Als Medium für die Kultivierung der CrFK-Zellen diente das Minimum Essential Medium Eagle (MEM, Fa. Biochrom, Berlin) unter Zusatz von 1 % Penicillin/Streptomycin (Fa. Biochrom, Berlin) und 5 % FKS (Fa. Biochrom, Berlin).

Die Lagerung der Zellen erfolgte in Kryotubes (Cryo.s, Fa. Greiner Bio-One, Frickenhausen) in flüssigem Stickstoff. Als Einfriermedium kam „cryo safe I“ (Fa. C.C.Pro, Oberdorla) zur Anwendung. Zur Reaktivierung der Zellen wurden die Kryotubes im Wasserbad (37 °C) bis zum Auftauen des Inhalts geschwenkt. Alle weiteren Arbeiten fanden unter Reinraumbedingungen statt. Nach Desinfektion der äußeren Oberfläche der Kryotubes mit Ethanol (75 %, Fa. Merck KGaA, Darmstadt), diente eine Einmalpipette (1 ml) zur Überführung der Zellsuspension in ein

3 Material und Methoden

Reaktionsgefäß (50 ml). Unter vorsichtigem Schwenken wurden 10 ml warmes Medium hinzugesetzt und die Zellen abzentrifugiert (200 x g, 20 °C, 7 min). Der Überstand wurde verworfen und nach vorsichtiger Resuspendierung des Zellpellets in 10 ml Medium folgte ein weiterer Waschschrift. Letztlich wurden die, erneut in 10 ml Medium, resuspendierten Zellen in eine Zellkulturflasche (Cellstar, Fa. Greiner Bio-One, Frickenhausen) übertragen. Nach der mikroskopischen Kontrolle hinsichtlich Zellgehalt und -morphologie wurden die Zellen im Brutschrank inkubiert (37 °C, 5 %, CO₂, 90 % Luftfeuchte). Nach mikroskopischer Kontrolle wurde alle zwei Tage das Medium gewechselt. Das Volumen an Medium belief sich auf 10 ml (40 ml-Zellkulturflasche). Für die Versuche wurden die Passagen 97 bis 130 verwendet.

Zur Subkultivierung wurde ein auf 35 - 37 °C vorgewärmter Versen-Trypsin-Puffer (VT-Puffer, Fa. Biochrom, Berlin) verwendet. Nach mikroskopischer Kontrolle der Zellen wurde das Medium dekantiert und der Zellrasen zweimal mit VT-Puffer gewaschen, um Mediumreste vom Zellrasen zu entfernen und so die Wirkung des Trypsins zu optimieren. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Zellen mit 1 ml VT-Puffer für 30 min im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, 90 % Luftfeuchte) bis zur sichtbaren Ablösung der Zellen von der Grundfläche der Kulturgefäße. Im Anschluss wurde der Ansatz mit 20 ml MEM Eagle aufgefüllt und auf zwei Flaschen verteilt.

3.1.5. Antiseren

Die in dieser Arbeit verwendeten Antiseren von Kaninchen und Schweinen sind im Anhang (ab Seite 157) gelistet. Die 32 Schweineseren entstanden im Rahmen von fünf Infektionsversuchen, die 2008 bis 2011 am Friedrich-Loeffler-Institut in Jena durchgeführt wurden. Die dabei verwendeten *B. hyodysenteriae*-Stämme entsprachen unterschiedlichen Serotypen und Genotypen (Tabelle 20). Die 25 Kaninchenseren stammten aus Vakzinierungsversuchen, in denen mit UV-Licht inaktivierten Ganzzelllysaten verschiedener *B. hyodysenteriae*-Stämme (Tabelle 21) gearbeitet wurde (Herbst et al., 2017). Sofern nicht anders angegeben, wurden die Seren der Schweine und Kaninchen in einer 1:2-Verdünnung verwendet.

3.2. Bakteriologische Methoden

3.2.1. Vermehrung von Bakterien

Zur Vermehrung der Brachyspiren wurde ein tiefgefrorenes Kryotube einer zuvor hergestellten Brachyspiren-Suspension mittels Handwärme aufgetaut und im Verhältnis 1:49 [v/v] in BHIF^{CVSSR}-Medium überführt. Die Inkubation der beimpften Nährbouillon fand für drei bis fünf Tage unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C auf einem Schüttler (125 rounds/min) statt (s. Punkt 3.1.3).

3 Material und Methoden

Zur Isolierung von Brachyspiren aus Kotproben oder Kottupfern bzw. zur Kultivierung von Referenz- bzw. Kontrollstämmen auf festen Nährböden dienten TSA^{CVSSR}-Platten mit 5 % Schafblut. Nach Ausstrich erfolgte eine fünf- bis zehntägige Inkubation unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C. Die Überprüfung der Reinheit erfolgte wie unter Punkt 3.2.3 beschrieben.

Reinkulturen (s. Punkt 3.2.3) der *Brachyspira* spp. wurden mit 3 ml BHIF^{CVSSR} von der Agarplatte abgeschwemmt, auf einen McFarland Standard 1 eingestellt und für spätere Untersuchungen in der PCR als 1 ml-Aliquot in einem sterilen Eppendorf-Gefäß bei -20 °C gelagert. Die dauerhafte Aufbewahrung der Brachyspiren-Stämme erfolgte suspendiert in FKS in flüssigem Stickstoff bzw. im BHIF^{CVSSR}-Glycerin-Medium bei -70 °C.

3.2.2. Keimzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Lebendkeimzahl wurde nach jeder Anzucht eine Titration durchgeführt. Dafür wurde eine log₁₀-Verdünnungsreihe über acht Stufen hergestellt. Je Verdünnungsstufe wurden vier 10 µl-Tropfen auf einen TSA^{CVSSR}-Agar aufgebracht. Nach sieben Tagen anaerober Inkubation bei 37 °C erfolgte die Schätzung des Titers anhand der makroskopisch erkennbaren Hämolyseplaques in Wachstums-bildenden Einheiten 50 je ml (WbE₅₀/ml) gemäß Formel 1 nach Spearman et al. (1988) und Kärber (1931).

Formel 1: $WbE_{50} = 10^{[X_0 - d/2 + d/n * \sum x_i]}$

Erläuterungen: X₀ = der positive Exponent der höchsten Verdünnung, bei der alle Testobjekte positiv reagieren; d = der Dosisabstand in Logarithmus zur Basis 10; n = die Anzahl der pro Verdünnung eingesetzten Testobjekte; $\sum x_i$ = die Summe aller auf die Infektion positiv reagierenden Testobjekte, ab und einschließlich der bei X₀.

3.2.3. Reinheitskontrolle

Jeder Brachyspiren-Stamm in Suspension wurde auf seine Reinheit geprüft. Hierzu wurde ein Aliquot aufgetaut und mikroskopisch auf das Vorhandensein von Spirochäten untersucht. Von den auf TSA^{CVSSR}-Platten gewachsenen Brachyspiren wurde mit der Impföse eine kleine Menge Koloniematerial abgenommen und in einem Tropfen (25 µl) 0,9 %-iger NaCl-Lösung auf einem Objektträger suspendiert. Der Reinheitsnachweis erfolgte im Dunkelfeld- bzw. Phasenkontrastmikroskop (Leica DMR HC Mikroskop, Fa. Leitz, Wetzlar). Als Kriterium für eine Reinkultur galten die Abwesenheit von makroskopisch und mikroskopisch erkennbaren Kolonieförmigkeiten, die von denen der Brachyspiren abwichen, sowie der ausschließliche Nachweis schlanker, spiralig geformter Bakterien.

3.3. Molekularbiologische Methoden

3.3.1. Präparation von DNS aus Bakterienkulturen

Zur DNS-Extraktion wurden 200 µl *Brachyspira*-Suspension (10^6 WbE/ml) (s. Punkt 3.2.1) in 1 ml Lysispuffer (6 M Guanidinthiocyanat (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München), 22 mM EDTA (Fa. Merck KGaA, Darmstadt) und 100 mM Tris HCl (Fa. Roth GmbH, Karlsruhe), pH 6,4) gegeben, gut geschüttelt und 1 h bei 20 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (16.000 x g, 20 °C, 1 min) wurde der Überstand in ein steriles Eppendorf-Gefäß mit 50 µl DE-Suspension (20 % [w/v] Kieselgur (SiO₂, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) in 0,17 M HCl) überführt. Darauf folgte eine Inkubation (10 min, 20 °C), Mischen (30 sek, 20 °C) und eine erneute Zentrifugation bei 16.000 x g (20 °C, 1 min). Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet wie folgt gewaschen: 2 x mit 200 µl Waschpuffer (6 M GuSCN, 100 mM Tris HCl, pH 6,4), 2 x mit 200 µl eiskaltem Ethanol (70 %, Fa. Walter Schmidt Chemie GmbH, Berlin) und 1 x mit 200 µl eiskaltem Aceton (Fa. Merck KGaA, Darmstadt). Zwischen den Waschschrritten wurde der Ansatz gut geschüttelt (30 sec) und zentrifugiert (16.000 x g, 20 °C, 1 min). Nach dem letzten Waschschrritt mit Aceton wurde das Pellet getrocknet (56 °C, 15 min), 75 µl Lagerungspuffer (5 mM Tris HCl (pH 8,4), 0,5 mM EDTA) zugegeben und der Ansatz geschüttelt (30 sec) und zentrifugiert (16.000 x g, 20 °C, 1 min). Der Überstand (DNS) wurde in ein neues, steriles Eppendorf-Gefäß überführt und bis zur Durchführung der PCR bei -20 °C gelagert (Jones et al., 1993).

3.3.2. Oligonukleotidprimer

Die Primer zum Nachweis der in dieser Arbeit aufgeführten Gene wurden von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) hergestellt. Die Primer wurden als Stocklösungen (100 µM) und als Gebrauchslösungen (20 µM) bei -20 °C gelagert. Für die Sequenzierungsreaktionen wurden die Primer als 10 µM-Lösungen bei -20 °C gelagert. Weitere Ausführungen zu den Primern und ihren Eigenschaften sind dem Punkt 3.3.3 und der Tabelle 22 zu entnehmen.

3.3.3. Polymerase-Kettenreaktion

Zum Nachweis ausgewählter Virulenz-assoziiierter Faktoren und Fitnessgene bei *Brachyspira* spp. diente die PCR. Zur Beantwortung der Frage, ob bestimmte Hämolysegene bzw. Hämolysegenemuster für die Ausbildung der sH notwendig sein könnten, wurden alle 221 *Brachyspira* spp.-Stämme unabhängig von ihrer hämolytischen Aktivität untersucht. Bei den 221 Stämmen wurden die internen Primer für die Hämolysegene verwendet. Umgreifende Primer

3 Material und Methoden

finden nur bei den Stämmen Anwendung, deren Hämolysingene sequenziert werden sollten oder bei *B. hyodysenteriae*-Stämmen, die mittels interner Hämolysingenprimer kein positives Signal zeigten. Bei 127 stark hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämmen, die hinsichtlich ihres Sequenztyps untersucht wurden, wurde das Virulenzspektrum erweitert. Hier erfolgte zusätzlich die Untersuchung auf Gene, die für äußere Membranproteine kodieren (n = 5) sowie Gene, die im Eisenmetabolismus eine Rolle spielen (n = 2). Auf diese Weise sollten Virulenzmuster vor dem phylogenetischen Hintergrund der Stämme untersucht werden. Bei jedem PCR-Ansatz wurde eine Negativkontrolle (Aqua dest., Fa. Roth, Karlsruhe) sowie eine positive Referenz (nach den Ergebnissen der Genomsequenzierung positive *Brachyspira* spp.) mitgeführt. Alle PCRs erfolgten als Monoplex-PCR. Angaben zu Zielgenen, Primern, deren Lokalisation und die Amplifikatgröße sind der Tabelle 22 im Anhang zu entnehmen. Jeder 30 µl Reaktionsansatz enthielt 1 U PanScript Polymerase (Fa. PAN Systems, Aidenbach), je 0,5 µM der entsprechenden Primer (Tabelle 22), 133 µM je Nukleotid (Fa. Rapidozym GmbH, Berlin), 1 x NH₄ und 2 mM MgCl₂ sowie 3 µl der zu testenden Suspension (= Template). Folgende Temperaturprofile (Tabelle 2) wurden für die Durchführung der PCRs verwendet:

Tabelle 2: Reaktionsbedingungen der in dieser Arbeit durchgeführten PCRs

Nachweis von	Temperaturprofil (° C/Zeit)							PCR-Nr. (Tabelle 22 im Anhang)
	Initiale Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Zyklen	End-elongation	Pause	
<i>B. hyodysenteriae</i>	94 °C/5 min	94 °C/30 sec	60 °C/ 30 sec	72 °C/30 sec	30	72 °C/7 min	10 °C	1
<i>Brachyspira</i> spp.	94 °C/5 min	94 °C/30 sec	59 °C/ 30 sec	72 °C/30 sec	30	72 °C/7 min	10 °C	2a
<i>B. pilosicoli</i>	94 °C/5 min	94 °C/30 sec	59 °C/ 30 sec	72 °C/30 sec	30	72 °C/7 min	10 °C	2b
<i>B. innocens</i>	94 °C/5 min	94 °C/30 sec	59 °C/ 30 sec	72 °C/30 sec	30	72 °C/7 min	10 °C	2c
<i>B. murdochii</i>	94 °C/5 min	94 °C/30 sec	59 °C/ 30 sec	72 °C/30 sec	30	72 °C/7 min	10 °C	2d
<i>B. intermedia</i>	94 °C/5 min	94 °C/30 sec	59 °C/ 30 sec	72 °C/30 sec	30	72 °C/7 min	10 °C	2e
Hämolyisogene	94 °C/5 min	94 °C/40 sec	55-60 °C/ 40 sec	72 °C/60 sec	35	72 °C/7 min	10 °C	3a-h
Promotor <i>hlyA</i>	94 °C/5 min	94 °C/40 sec	50 °C/ 40 sec	72 °C/60 sec	35	72 °C/7 min	10 °C	4
Eisenmetabolisierende Gene/ OMP-Gene	94 °C/5 min	94 °C/30 sec	54-68 °C/ 40 sec	72 °C/60 sec	35	72 °C/7 min	10 °C	5a-b/ 5c-g
16S rRNS	94 °C/5 min	94 °C/40 sec	57 °C/ 40 sec	72 °C/40 sec	30	72 °C/7 min	10 °C	6
<i>gyrB</i>	94 °C/5 min	94 °C/30 sec	60 °C/ 30 sec	72 °C/30 sec	35	72 °C/7 min	10 °C	7

3.3.4. Multilokus-Sequenztypisierung (MLST)

Für die MLST wurden 127 *B. hyodysenteriae*-Feldstämme ausgewählt, die von Schweinen mit Diarrhoe isoliert wurden. Davon stammten 116 Stämme aus Deutschland, zwei aus Japan und neun aus Polen (Tabelle 18). Die stark hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämme aus Deutschland stammten aus 100 Betrieben, die sich hauptsächlich in Hessen und Norddeutschland befanden. Mehrfacheinsendungen von sechs Betrieben wurden in diese Studie einbezogen, um mögliche Änderungen der epidemiologischen Situation in den Betrieben erfassen zu können. Die Stämme aus Polen und Japan wurden in der Analyse mitberücksichtigt, da bislang keine nennenswerten Daten über diese Länder zur Verfügung standen.

Die MLST zielte auf die für diesen Zweck als geeignet beschriebenen Gen-Loci bei der Spezies *B. hyodysenteriae*. Es handelte sich dabei um die konservierten „Housekeeping“-Gene *adh*, *alp*, *est*, *gdh*, *glpK*, *thi* und *pgm*. Die Auswahl der Primer (Tabelle 22, PCR-Nr. 8a-g) und der PCR-Bedingungen folgte den Protokollen von Råsbäck et al. (2007b) und La et al. (2009b). Anhand des resultierenden Allelprofils wurde den Stämmen ein ST zugeordnet.

Zur Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse und zur möglichen Abbildung von phylogenetisch nah verwandten Gruppen innerhalb der Spezies *B. hyodysenteriae* wurde unter Einbeziehung der Sequenztypen von 421 Stämmen aus der öffentlichen Datenbank (<https://pubmlst.org/brachyspira/>) sowie von 198 Stämmen aus verschiedenen Publikationen (Osorio et al., 2012; Mirajkar und Gebhart, 2014; Black et al., 2015; Gasparini et al., 2017) ein Minimum Spanning Tree (MST) mit Hilfe des Programmes BioNumerics Version 6.6 (Fa. Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien) erstellt. Mittels eBURST-Analyse (eBURST Version 3, <http://www.mlst.net/>) sollten Aussagen über die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den nachgewiesenen STs getroffen werden (Råsbäck et al., 2007b). Der Algorithmus des Programmes gruppiert nah verwandte STs zu einem klonalen Komplex (CC). Ein klonaler Komplex ist dadurch gekennzeichnet, dass die darin befindlichen STs in sechs der sieben Gen-Loci übereinstimmen. Zusätzlich wird der potenzielle Gründer des CC bestimmt.

3.3.5. Agarosegelelektrophorese

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden horizontale Flachbettgele mit 1 - 2 % Agarose (Fa. Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf) und 1 x TAE als Elektrophoresepuffer eingesetzt. Der flüssigen Agarosemischung wurden 0,02 µg/ml Ethidiumbromid (Fa. Serva Electrophoresis, Heidelberg) zugesetzt. Der Probenauftrag fand nach Mischung der Einzelprobe mit Ladepuffer im Verhältnis 1:5 [v/v] statt. Ein Molekularmassenstandard in Loading Dye-DNS Ladder Gebrauchsverdünnung wurde mitgeführt (Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder, Fa. Thermo

Fisher Scientific, St. Leon-Rot). Für die Auftrennung der Proben wurde eine Spannung von 120 V für 45 bis 50 min angelegt.

Die Visualisierung und Fotodokumentation erfolgte mittels Bilddokumentationssystem E.A.S.Y. RH (Typ RH-3; Fa. Herolab, Wiesloch) unter UV-Beleuchtung.

3.3.6. Sequenzierung von Hämolysingenen

Die notwendigen NS-Sequenzierungen für die vorliegende Arbeit wurden von der Fa. LGC Genomics (Berlin) durchgeführt. Die Konzentration der für die Sequenzierungsansätze gewonnenen DNS wurde über Messungen im „Nano Drop 2000C“ Spektrophotometer (Fa. Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot) ermittelt. Als Matrize für die Sequenzierungsreaktion dienten die gewonnenen PCR-Amplifikate in einer Konzentration von 100 ng/µl.

Von 32 stark hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämmen aus Deutschland, denen im Rahmen dieser Arbeit ein Multilokus-Sequenztyp zugeordnet werden konnte und die über alle Hämolysingene verfügten, wurden sieben der acht bekannten Hämolysingene unter Verwendung publizierter Primer (Mahu et al., 2016) amplifiziert (Tabelle 22, PCR-Nr. 4 und 9a-f) und sequenziert. Die Auswahl der 32 Stämme erfolgte zufällig entsprechend der Zuordnung zu STs. Bei den Hämolysingenen handelte es sich um *tlyA* (Amplifikat 956 bp), *tlyB* (vier überlappende Amplifikate von 974 bp, 390 bp, 1062 bp und 1082 bp), *tlyC* (Amplifikat 1188 bp), *hlyA* (Amplifikat 533 bp), *BHWA1_RS02195* (*hemolysin III*, *ypIQ*, Amplifikat 1014 bp), *BHWA1_RS02885* (*hemolysin activation protein*, Amplifikat 1570 bp) und *BHWA1_RS09085* (Amplifikat 974 bp) (Bellgard et al., 2009). Das Hämolysingen *BHWA1_RS04705* aus der Publikation von Wanchanthuek et al. (2010) wurde in der vorliegenden Arbeit wie auch bei Mahu et al. (2016) nicht untersucht.

3.3.7. Bestimmung der Transkriptionsaktivität der Hämolysingene

Die Transkriptionsaktivität der Hämolysingene wurde beim stark hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Referenzstamm B204 und vergleichend hierzu beim schwach hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Feldstamm G423 bestimmt. Die drei Gene *adh*, *pgm* und *gdh*, die bei der MLST-Analyse von *B. hyodysenteriae* genutzt werden, wurden mit dem *gyrB*-Gen unter Verwendung der Excel-basierten Software BestKeeper Version 1 (<https://www.gene-quantification.de/bestkeeper.html>) miteinander verglichen, um die zwei Referenzgene zu ermitteln, die am besten geeignet sind (s. Punkt 3.6.6). Während der Vermehrung der Stämme (s. Punkt 3.2.1) wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben zur Bestimmung der Keimzahl (s. Punkt

3 Material und Methoden

3.2.2), zur Ermittlung der hämolytischen Aktivität (s. Punkt 3.4.2) sowie zur Analyse des Gehalts an Boten-RNS (mRNS) entnommen. Nach Analyse der hämolytischen Aktivität wurden von jedem Stamm vier RNS-Proben, die den Zeitraum vor, während und nach der Freisetzung des Hämolysins abdeckten, ausgewählt.

Extraktion und Reinigung der RNS

Die Brachyspirensuspension (500 µl) wurde zum Zweck der Stabilisierung der enthaltenen RNS in 1000 µl „RNAprotect Bacteria Reagent“ (Fa. Qiagen, Hilden) pipettiert. Nach einer Inkubation von 5 min bei 20 °C folgte ein Zentrifugationsschritt (10 min bei 5.000 x g, 20 °C). Der Überstand wurde dekantiert und die RNS bis zur weiteren Bearbeitung bei -70 °C gelagert. Die weitere Aufreinigung der RNS erfolgte mit dem Kit „RNeasy Mini Kit“ (Fa. Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers und beinhaltete einen DNase-Verdau (Fa. Qiagen, Hilden). Um verlässlich die gesamte genomische DNS zu verdauen wurde ein zweiter DNase-Verdau (Fa. Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot) in das Protokoll integriert. Der Verdau der DNS lief in Kürze wie folgt ab: Mit dem beigefügten Lysis-Puffer wurde die mRNS gelöst und nach Zugabe von 99 % Ethanol (Fa. Merck KGaA, Darmstadt) auf eine mit Kieselsäure beschichtete Säule übertragen. Nach dem Waschschrift mit dem beigefügten RW1-Puffer folgte der erste DNase-Verdau auf der Säule. Weitere drei Waschschriffe später wurde die RNS mit RNase-freiem Wasser von der Säule in ein Eppendorf-Gefäß eluiert. Hier erfolgte der zweite DNase-Verdau (5 U ThermoScientific DNase I, 25 min, 37 °C, Inaktivierung des Enzyms bei 65 °C für 10 min). Um den Abbau der RNS zu verhindern, wurde jedem Ansatz insgesamt 3,5 µl RNase Inhibitor (20 U/µl, Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot) beigegefügt. Die Konzentration der RNS wurde mittels Nano Drop 2000C Spektrophotometer (Thermo Fisher, Scientific, St. Leon-Rot) gemessen und die Reinheit der RNS wurde mit Hilfe des A_{260}/A_{280} -Verhältnisses bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die aufgereinigte RNS bei -70 °C gelagert. Mittels PCR wurde die Abwesenheit genomischer DNS, die für die Hämolysingene bzw. die Referenzgene kodiert, verifiziert (s. Punkt 3.3.3).

Reverse Transkription

Die Umschreibung der aufgereinigten RNS erfolgte mittels reverser Transkription in cDNS (42 °C, 42 min). Ein Ansatz für eine Umschreibung bestand aus 10 µl RNS, jeweils 1 µl der entsprechenden Primer (Tabelle 22 , PCR Nr. 3a-h), 5 x Puffer, 0,1 mM DTT (Fa. Roth, Karlsruhe), 50 mM MgCl₂ (Fa. PAN Systems, Aidenbach), 10 mM Nukleotide (Fa. Rapidozym, Berlin), RNase-Inhibitor (Fa. Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot) sowie 0,3 µl „MultiScribe Reverse Transcriptase“ (Fa. Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot), aufgefüllt auf 26 µl mit destilliertem

3 Material und Methoden

Wasser. Eine Negativkontrolle wurde in Form von Aqua dest. mitgeführt. Vor Durchführung der Real-Time qPCR wurde der Erfolg des Umschreibens der mRNA in cDNA mittels konventioneller PCR kontrolliert. Die Bedingungen für die PCR sind unter Punkt 3.3.3 aufgeführt.

Real-Time qPCR

Die Real-Time (RT) qPCR (qPCR Mastermix for SYBR Green I, Fa. Eurogentec, Köln) wurde in einem ABI 7300-Modell (Fa. Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot) durchgeführt. Die jeweiligen Amplifikate wurden mit Hilfe des Fluoreszenz-Farbstoffs SYBR Green I quantifiziert. Die Primer für den Einsatz in der RT qPCR (Tabelle 23) amplifizierten 62 bis 131 bp lange Fragmente der acht Hämolysegene bzw. der zur Normalisierung verwendeten Referenzgene und wurden mit Hilfe der Software Primer Express 3.0 (Fa. Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot) ausgewählt. Ein Ansatz für die Durchführung der RT qPCR umfasste insgesamt 25 µl. Die Primerpaare wurden immer zusammen angesetzt und lagen als Gebrauchslösung von 1 µM vor. Jeder Mix enthielt 12,5 µl 2x Reaktionspuffer, 0,75 µl SYBR Green I, 4,25 µl Wasser sowie 5 µl des Primerpaar-Mixes und 2,5 µl cDNA. Das Programm des RT Cyclers orientierte sich dabei an den Vorgaben des Herstellers. Nach einem initialen UNG (Uracil-N-Glycosylase) -Schritt (2 min, 50 °C), welcher dazu diente, mögliche Kontaminationen zu eliminieren, folgte die Aktivierung der Hotstart-Polymerase (10 min, 95 °C). Insgesamt wurden 40 Zyklen durchlaufen (15 s bei 95 °C gefolgt von 1 min bei 60 °C). Nach einer anschließenden Schmelzkurvenanalyse wurden die Proben auf 50 °C gekühlt.

Die Sensitivität der RT qPCR wurde für jeden verwendeten Primer mit Hilfe einer Verdünnungsreihe überprüft. Auf diese Weise konnte die Effizienz des jeweiligen Primerpaares berechnet werden. Die Untersuchung jedes Zeitpunktes erfolgte im Dreifachansatz, wobei die Ct-Werte („cycle threshold“, Schwellenwert-Zyklus) im Anschluss mit Hilfe des Ausreißer-Testes nach Grubbs (1950) untersucht wurden. Konnte ein Ausreißer festgestellt werden, so wurde dieser aus der Berechnung des Mittelwertes gestrichen. Bei gleicher Effizienz der PCR ließ sich über den Vergleich der Ct-Werte feststellen, in welchem Ausgangsmaterial mehr cDNA vorhanden war.

3.4. Bestimmung phänotypischer Charakteristika der *Brachyspira* spp. Hämolyse

3.4.1. Bestimmung des Hämolysetyps

Die Hämolyse von stark und schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp. führen zu einer Hämolyse, die in der Literatur bei Brachyspiren als β-Hämolyse bezeichnet wird. Schwach

hämolisierende *Brachyspira* spp. lysieren im Gegensatz zu stark hämolysierenden *Brachyspira* spp., bei denen 100 % der Erythrozyten betroffen sind, lediglich ca. 50 % der Erythrozyten. Da die Hämolyse in beiden Fällen bezogen auf den Erythrozyten vollständig ist, wird von starker und schwacher β -Hämolyse gesprochen. In der vorliegenden Arbeit wurde auf den Zusatz „ β “ verzichtet. Bei Vermehrung der schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp. auf bluthaltigem Agar war die wH durch eine Aufhellung des Agars im Bereich der Wachstumszone, die eine Durchsicht nicht ermöglichte, definiert. Bei stark hämolysierenden *Brachyspira* spp. wurde der Blutagar im Bereich der Wachstumszone vollständig klar und ermöglichte eine ungehinderte Durchsicht. Die Prüfung des Hämolysetyps der löslichen Hämolsine erfolgte im Hämolsin-Diffusionstest (s. Punkt 3.4.2). Auch hier entschied der Grad der Aufhellung des Blutagars über den Hämolysetyp.

3.4.2. Quantitative und semiquantitative Bestimmung der Hämolyseaktivität

Je nach Fragestellung erfolgte die Quantifizierung der hämolytischen Aktivität löslicher Hämolsine in Kulturfiltraten von stark und schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp. mit unterschiedlichen Methoden. An diesem Punkt soll darauf hingewiesen werden, dass es sich bei dem Begriff der Hämolsine immer um zellfreie Kulturüberstände mit hämolytischer Aktivität handelt und die Anwesenheit weiterer löslicher Substanzen im Überstand nicht ausgeschlossen werden kann. Bis dato ist unbekannt, ob die hämolytische Aktivität durch ein oder mehrere Hämolsine bedingt ist. In der vorliegenden Arbeit werden die präparierten Hämolsingemische aufgrund der Tatsache, dass es mehrere Hämolsingene gibt als Hämolsine bezeichnet. Standen Fragen zur zeitlichen Freisetzung der Hämolsine oder zur Aktivität bei verschiedenen Temperaturen im Vordergrund fand primär der Hämolsin-Diffusionstest (s. Punkt 3.4.2) Anwendung. Bei Fragen zur Porenbildung kam lediglich der Hämoglobin-Freisetzungstest (s. Punkt 3.4.2) in Frage. Der Hämolsin-Spotttest (s. Punkt 3.4.2) erschien dagegen für den quantitativen Vergleich unterschiedlich Hitze-behandelter Hämolsine auf Grund höherer Präzision bzw. unmittelbarer Durchführbarkeit besonders geeignet.

Hämolsin-Diffusionstest

Das Prinzip dieses Testes beruhte auf der radialen Diffusion der Hämolsine auf TSA^{CVSSR}-Nährböden mit 5 % Schafblut ausgehend von einer runden Vertiefung. Zur Stanzung dieser Vertiefungen diente ein unten scharf angeschliffener Hohlzylinder mit einem inneren Durchmesser von 8 mm. Anschließend wurden die zu untersuchenden Kulturfiltrate in die Stanzlöcher eingefüllt bis die Füllhöhe exakt plan mit der Agarhöhe abschloss. Danach lagerten die Platten für einen Zeitraum von 48 h, je nach Fragestellung bei 37 °C, 20 °C oder 10 °C. Die

semiquantitative Erfassung der hämolytischen Aktivität errechnete sich aus dem Quotienten der Mittelwerte jeweils zweier, im rechten Winkel zueinanderstehender Durchmesser (mm) der Hämolysezonen und der Stanzlöcher. Eine fehlende Hämolyse entsprach einem Wert von 1,0. Je größer die Hämolysezone ausfiel, desto höher lag der Wert über 1,0.

Hämolsin-Spotttest

Mit dem Hämolsin-Spotttest konnte der Hämolsintiter bestimmt werden. Dazu wurde die Entstehung hämolytischer Plaques auf TSA^{CVSSR}-Nährböden mit 5 % Schafblut beurteilt. Die Hämolsine wurden in log₂-Schritten in BHIF^{CVSSR} verdünnt und von jeder Verdünnungsstufe wurde ein Aliquot von 100 µl auf die TSA^{CVSSR}-Blutplatte aufgetragen. Das Ergebnis wurde nach 48-stündiger Lagerung bei 37 °C anhand der Hämolyse im Bereich der aufgetragenen Suspension protokolliert (Abbildung 1). Als Hämolsintiter je ml galt der Kehrwert der letzten Verdünnung, die eine makroskopisch erkennbare Hämolyse aufwies, multipliziert mit 10.

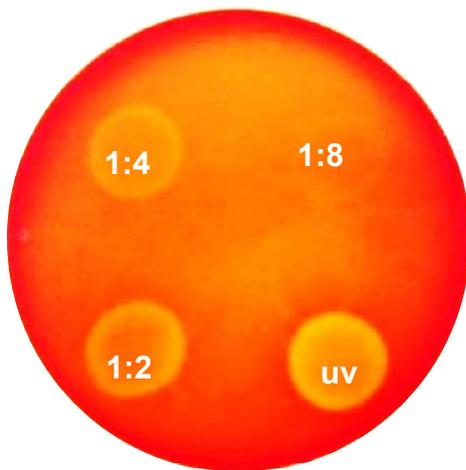


Abbildung 1: Hämolsin-Spotttest

Aufhellungen des Blutagars kennzeichnen die nach 48-stündiger Lagerung bei 37 °C entstandene Hämolyse einer Hämolsin-Verdünnungsreihe. 1:2 bis 1:8 = Verdünnungsstufen, uv = unverdünnt

Hämoglobin-Freisetzungstest

Das Prinzip dieses Testes beruhte auf der photometrischen Bestimmung von Hämoglobin, das durch porenbildende Substanzen (Hämolsine) bei der Kokultivierung mit Erythrozyten freigesetzt wird. In Vorversuchen wurden nach Kokultivierung der Hämolsine und der Erythrozyten Proben nach 0, 60, 90, 120 und 180 min entnommen, abzentrifugiert und die Extinktion photometrisch ermittelt. Die maximale Freisetzung von Hämoglobin war nach 120-minütiger Inkubation erreicht. Initial wurden Erythrozyten verschiedener Tierarten (Schaf, Rind, Pferd und

3 Material und Methoden

Schwein) verwendet. Aus Gründen der Reproduzierbarkeit wurden für alle Versuche Schaferythrozyten gewählt, da diese kommerziell bezogen werden konnten und somit von einer gleichbleibenden Qualität ausgegangen werden konnte. Der Test erfolgte in 96-Wellplatten (U-Boden, Fa. Greiner Bio One, Frickenhausen). In den Reihen B bis H erfolgte die Vorlage von jeweils 100 µl Verdünnungsflüssigkeit (BHIF^{CVSSR} bzw. analog zu den entsprechenden Kulturfiltraten). Reihe A erhielt 200 µl der zu untersuchenden Hämolsine. Ausgehend von Reihe A wurden die Hämolsine unter Verwendung einer Mehrkanalpipette in log₂-Schritten verdünnt. Gearbeitet wurde jeweils im Doppelansatz. Nach Zugabe von 100 µl einer dreifach gewaschenen 5 %-igen Schafblutsuspension (Fa. Fiebig Nährstofftechnik, Idstein) in 0,9 %-iger NaCl-Lösung in jede Vertiefung, wurden die Platten für 2 h bei 37 °C auf dem Kreisschüttler inkubiert (125 rounds/min). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Platten mit 2000 x g für 5 min bei 20 °C zentrifugiert und die Überstände in 96 Wellplatten mit F-Form (Fa. Greiner Bio One, Frickenhausen) überführt. Anschließend wurden die Extinktionswerte der Überstände bei einer optischen Dichte von 540 nm (OD₅₄₀) ermittelt (Multiskan Ascent 354, Fa. Labsystems, Frankfurt am Main). Als Positivkontrolle diente Saponin (10% [w/v], Fa. Merck KGaA, Darmstadt; gelöst in BHIF^{CVSSR}-Medium), das eine 100 %-ige Hämolyse induzierte und als Bezug für die Messwerte diente. Die Negativkontrolle (BHIF^{CVSSR}) diente als sogenannter „blank“, der den Nullwert repräsentierte. Dokumentiert wurde die relative Hämolyse (%). Diese errechnete sich aus dem Quotienten der Extinktion der Hämolsine und der positiven Kontrolle und wurde mit 100 multipliziert.

3.4.3. Hämolsin-Präparation

Für die Durchführung phänotypischer Untersuchungen zur Charakterisierung der Hämolsine von stark und schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp. war es erforderlich eine größere Menge an hämolysierenden Kulturüberständen zu präparieren.

Präparation von Hämolsinen stark hämolysierender *Brachyspira* spp.

Für die Herstellung von Hämolsinen wurden 6 x 392 ml BHIF^{CVSSR} -Medium mit jeweils 8 ml *B. hyodysenteriae* B204-Suspension, die je ml mindestens 10⁶ Zellen enthielten, beimpft und unter anaeroben Bedingungen auf dem Schüttler (125 rounds/min) bei 37 °C inkubiert. Nach 44, 47 und 68-stündiger Inkubation wurden jeweils 2 x 400 ml der Kulturen entnommen und die Lebendkeimzahl bestimmt (s. Punkt 3.2.2). Anschließend wurden die Kulturen für 30 min bei 2800 x g und 20 °C zentrifugiert und die zellfreien Überstände in Dialyseschläuchen (Durchmesser 21 mm, Fa. Serva, Hamburg) abgefüllt und mit Hilfe von Polyethylenglykol

3 Material und Methoden

20.000 (MG) bei 4 °C über 8 h 20-fach konzentriert. Abschließend wurde das Konzentrat gegen 6 L physiologische (0,9 %) NaCl-Lösung über Nacht bei 4 °C equilibriert. Entsprechend den Zeitpunkten der Ernte wurden die Präparationen als H44, H47 oder H68 bezeichnet, wobei das H für Hämolsine steht. Die Präparationen wurden aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Nach dem Auftauen erfolgte zu Kontrollzwecken die Bestimmung der hämolytischen Aktivität unter Verwendung des Hämolsin-Spotttestes (s. Punkt 3.4.2). Analog dazu erfolgte die Präparation der Hämolsine weiterer *B. hyodysenteriae*-Stämme sowie der stark hämolsierenden Stämme *B. hampsonii* 5364-4x/12 und *B. suanatina* AN4859/03 (Tabelle 18 im Anhang).

Präparation von Hämolsinen schwach hämolsierender *Brachyspira* spp.

Die Präparation der Hämolsine von *B. innocens* 2933-2 und *B. hyodysenteriae* G423 erfolgte durch eine Fällung mit Polyethylenglykol (PEG). Eine Menge von 100 ml einer mit *B. innocens* 2933-2 beimpften Kultur, die sich 48 h nach dem Ende der exponentiellen Vermehrung befand, wurde zentrifugiert (2080 x g, 20 min, 20 °C) und der Überstand mit PEG 4000 bis zu einer Endkonzentration von 30 % [w/v] versetzt und das Gemisch für 1 h bei 20 °C gerührt. Nach Zentrifugation für 20 min bei 2000 x g und 20 °C wurde das Pellet in 10 ml PBS resuspendiert und über Nacht gegen 5 L 0,15 M NaCl equilibriert. Die präparierten Hämolsine wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Zusätzlich erfolgte eine Hämolsinpräparation in Anlehnung an Punkt 3.4.3. Hierzu dienten Proben mit einem Volumen von 50 ml, die zu verschiedenen Zeitpunkten der Vermehrung der schwach hämolsierenden *Brachyspira* in BHIF^{CVSSR} entnommen wurden. Nach Bestimmung der Lebendzellzahl wurden die Kulturüberstände zentrifugiert (2080 x g, 20 min, 20 °C) und die zellfreien Überstände entsprechend der Angaben unter Punkt 3.4.3 um den Faktor 4 konzentriert. Anschließend wurden die Präparationen aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

3.4.4. Hämolsinfreisetzung bei Vermehrung diverser *Brachyspira* spp. in Bouillon

Von den bei -70 °C gelagerten Bakteriensuspensionen diente jeweils 1 ml mit einer Mindestkeimzahl von 10⁶ WbE₅₀/ml als Inokulum für 49 ml BHIF^{CVSSR}-Medium in 100 ml Laborglasflaschen mit Drehverschluss. Nach Inokulation wurden die Flaschen unter anaeroben Bedingungen auf dem Kreisschüttler (125 rounds/min) bebrütet. Sofort nach Inokulation (Zeitpunkt 0) und zu verschiedenen Zeiten danach wurden Proben von 1 ml entnommen und die Lebendkeimzahl bestimmt (s. Punkt 3.2.2). Nach anschließender Zentrifugation mit 8.160 x g

für 5 min bei 20 °C (Eppendorf Centrifuge 5415, Fa. Eppendorf, Oldenburg) wurde der Überstand gewonnen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Nach Abschluss des Versuches wurden die gefrorenen Kulturüberstände bei 20 °C aufgetaut, auf dem Vortexer gemischt und anschließend auf das Vorhandensein hämolytischer Aktivität im Hämolysin-Diffusionstest (s. Punkt 3.4.2) untersucht.

3.4.5. Temperaturstabilität der Hämolytine stark und schwach hämolysierender *Brachyspira* spp.

Zur Überprüfung der Temperaturstabilität wurden die Hämolytine im Doppelansatz im Wasserbad auf Temperaturen von 60 °C, 50 °C und 40 °C erwärmt. Nach Erreichen der jeweiligen Temperaturen und zu verschiedenen Zeiten danach (0, 15, 30, 60 und 120 min) wurden Proben entnommen und im Hämolysin-Spotttest (s. Punkt 3.4.2) quantitativ auf hämolytische Aktivität untersucht. Als Kontrolle diente die jeweilige Hämolysinpräparationen, die bei -20 °C gelagert wurde und langsam auf 20 °C erwärmt wurde.

3.4.6. Biologische Aktivität der Hämolytine stark und schwach hämolysierender *Brachyspira* spp. bei verschiedenen Temperaturen

Die präparierten Hämolytine wurden im Hämolysin-Diffusionstest vergleichend bei 37 °C, 20 °C und 10 °C auf ihre hämolytische Aktivität untersucht. Nach Ende einer Inkubationszeit von 48 h wurden die Ergebnisse protokolliert und alle drei Platten für weitere 48 h bei 37 °C inkubiert. Nach Abschluss der zweiten Inkubation wurde das Ausmaß der Hämolysezone erneut protokolliert. Zu Kontrollzwecken wurde jeweils ein weiterer Ansatz für die gesamte Zeitdauer von 96 h bei 10 °C bzw. 20 °C gelagert.

Ein weiterer Versuch zur Temperaturstabilität wurde nur mit der Hämolysinpräparation H44 von *B. hyodysenteriae* B204 durchgeführt und erfolgte in Anlehnung an die Arbeit von Hyatt und Joens (1997). Nach dreimaliger Waschung von Schaferythrozyten (Fa. Fiebig Nährstofftechnik, Idstein) und der Herstellung einer 5 %-igen Erythrozyten-Suspension ([v/v] in PBS) erfolgte eine zweistündige Inkubation der verdünnten Hämolysinpräparation H44 in einer 1:2-Verdünnung bei 4 °C. Die Durchführung erfolgte im Doppelansatz. Nach Ablauf der Zeit wurde ein Aliquot gewaschen und in frisches PBS überführt, während das andere Aliquot ungewaschen blieb. Beide Ansätze wurden bei 37 °C für weitere 2 h inkubiert. Nach Zentrifugation (2080 x g, 20 °C, 5 min) erfolgte die Messung der Extinktion des Überstandes bei einer OD₅₄₀ nm (Multiskan Ascent 354, Fa. Labsystems, Frankfurt am Main).

3.4.7. Porenbildende Aktivität der Hämolyse stark und schwach hämolysierender *Brachyspira* spp.

Um zu überprüfen, ob es sich bei den von *Brachyspira* spp. gewonnenen Hämolyse um Porenbildner handelt, fanden als Osmoprotektoren neben Raffinose (504 g/l) auch PEGs mit unterschiedlichen MGs (PEG 1000, 1500, 4000, 6000 und 8000) Anwendung. In Anlehnung an die Arbeit von Lee et al. (2000) wurden die unterschiedlichen PEGs in einer Konzentration von 30 mM in PBS angesetzt. Ausgeführt wurde der Test im Doppelansatz in einer 96-Wellplatte (Fa. Greiner Bio-One, Frickenhausen). Nachdem die jeweiligen Osmoprotektoren in einer log₂-Verdünnung auf die Platte gegeben wurden, erfolgte die Zugabe von 50 µl einer 5 %-igen Schaferythrozyten-Suspension sowie derselben Menge Hämolyse der zu untersuchenden *Brachyspira* spp.-Stämme. Die Zentrifugation der Platten bei 2080 x g für 5 min bei 20 °C erfolgte nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C auf dem Laborschüttler (125 rounds/min). Anschließend wurden die Extinktionswerte der Überstände bei einer OD_{540 nm} ermittelt.

3.4.8. Untersuchungen zur Ursache der zeitlich begrenzten Hämolysefreisetzung bei stark hämolysierenden *Brachyspira* spp.

Die Kulturüberstände der stark hämolysierenden *Brachyspira* spp. wiesen zu Beginn der exponentiellen Vermehrung hämolytische Aktivität auf (s. Punkt 4.5.3) und waren in der späteren exponentiellen bzw. stationären Phase nicht mehr hämolysierend. Zur Aufklärung dieses Phänomens wurden hämolysierende Kulturfiltrate aus der exponentiellen und nicht hämolysierende Filtrate aus der stationären Vermehrungsphase (im Falle von *B. hyodysenteriae*-Stamm B204 die Hämolysepräparationen H44 und H68) im Verhältnis 1:1 gemischt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch im Hämolyse-Diffusionstest auf seine hämolytische Aktivität geprüft. Als Negativkontrolle (keine Hämolyse) diente BHIF^{CVSSR}. Als Positivkontrolle wurde H44 mitgeführt. Im gleichen Ansatz wurde zur Prüfung der Temperaturstabilität des nicht hämolysierenden Kulturfiltrates H68 eine Behandlung des Filtrates bei 60 °C für 1 h durchgeführt, bevor es mit dem hämolysierenden Kulturfiltrat H44 gemischt und inkubiert wurde.

3.4.9. Nachweis eines CAMP-Phänomens bei stark und schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp.

Unterschiedliche Bakterien, wie beispielsweise *Streptococcus (Scc.) agalactiae*, können mit Hilfe des sogenannten CAMP-Faktors die β-Hämolyse von *S. aureus* verstärken. Es sollte überprüft werden, ob unterschiedliche *Brachyspira* spp. ebenfalls über einen CAMP-ähnlichen

Faktor verfügen. Der Nachweis erfolgte unter Verwendung eines modifizierten CAMP-Testes. Vom Prinzip her handelte es sich hierbei um einen Doppeldiffusionstest, bei dem lösliches β -Hämolyisin von *S. aureus* verwendet wurde. Hierzu wurde das β -Hämolyisin der β -Hämolyisinzone des auf Blutagarplatten vermehrten *S. aureus*-Stammes IHIT27322 (diagnostisches Probenmaterial aus der Vagina einer Sau, 2014) extrahiert. Das lösliche β -Hämolyisin und die präparierten Hämolyisine der *Brachyspiren* diffundierten in einer Blutagarplatte aufeinander zu. Im positiven Fall kam es in der Überschneidung der Diffusionszonen vom β -Hämolyisin und dem potenziellen CAMP-ähnlichen Faktor zu einer Verstärkung der β -Hämolysezone. Hierzu wurde das β -Hämolyisin in eine Vertiefung (Durchmesser 7 mm) auf einem TSA^{CVSSR}-Nährboden mit 5 % Schafblut pipettiert. In einem Abstand von 13 mm wurde ein weiteres Loch mit demselben Durchmesser in die Agarplatte gestanzt. Dieses wurde mit dem zellfreien hämolytischen Überstand unterschiedlicher *Brachyspira* spp. gefüllt. Die Auswertung des Testes erfolgte nach 48-stündiger Inkubation bei 37 °C.

3.4.10. Zytotoxizität von Kulturfiltraten verschiedener *B. hyodysenteriae*-Stämme in Abhängigkeit verschiedener Zusätze zur Nährbouillon

Zur Überprüfung der zytotoxischen Aktivität der während der Vermehrung von *B. hyodysenteriae* gewonnenen Kulturüberstände (s. Punkt 3.4.4) diente die Zelllinie CrFK (Niere, Katze), die in 96 Wellplatten als konfluente Monolayer angezüchtet wurden. Es erfolgte eine Titration als log₂-Verdünnung in eine 96 Wellplatte, die anschließend bei 37 °C und 5 % CO₂ über 5 d inkubiert wurde. Lichtmikroskopische Kontrollen erfolgten mehrmals täglich. Im Zusammenhang mit der Frage nach dem möglichen Einfluss des Milieus auf die Expression eines Zytotoxins wurden BHIF-Chargen mit unterschiedlichen Zusätzen (s. Punkt 3.1.3) hergestellt und untersucht (Tabelle 13 - Tabelle 15). Der Begriff „Zytotoxine“ wird in dieser Untersuchung zur Beschreibung der Gesamtheit des zellkulturfreien Überstandes bezeichnet, der zytotoxische Aktivität aufweist, aber auch weitere wirksame Substanzen beinhalten kann. Denkbar wäre es ebenfalls, dass *B. hyodysenteriae*-Stämme nur über ein Zytotoxin verfügen, dennoch wird in der vorliegenden Arbeit der Plural verwendet. Generell orientierten sich die Probenentnahmen am Trübungsgrad der Bouillon, sodass nicht für jedes Experiment dieselben Zeitpunkte gewählt wurden. Um eine Vergleichbarkeit innerhalb der Versuche zu ermöglichen, wurde bei jedem Versuchsansatz eine Inokulationsdosis von 5,5 - 6 WbE/ml gewählt. Außerdem konnte aufgrund jahrelanger Untersuchungen des Wachstumsverhaltens von *B. hyodysenteriae* angenommen werden, dass alle untersuchten *B. hyodysenteriae*-Stämme einen ähnlichen Wachstumsverlauf aufweisen.

3.5. Serologische Methoden

3.5.1. Nachweis Hämolyisin-inhibierender Antikörper (Hämolyisin-Inhibitions-Test)

Grundlage des Hämolyisin-Inhibitions-Testes (HIT) bildete der unter Punkt 3.4.2 beschriebene Test zur Hämoglobin-Freisetzung. Der HIT beruht auf der Annahme, dass es zu einer Antikörperbildung gegen die Hämolyisine kommt. Folglich sollte sich die Freisetzung von Hämoglobin aus den Erythrozyten durch Zugabe von Antiseren reduzieren oder vollständig inhibieren lassen. Vom Wirkprinzip entspricht dieser Test einem Hämagglutinationshemmtest. Die Hämolyisinpräparation H44 von *B. hyodysenteriae* B204 wurde mit den unterschiedlichen Antiseren (s. Punkt 3.1.5) gemischt. Nach einer bestimmten Reaktionszeit wurde die Reduktion der Hämolyse überprüft. Die jeweiligen Antiseren wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor bzw. nach der Infektion/Vakzination im HIT auf Hämolyisin-inhibierende Antikörper untersucht. Im Detail wurden die im Anhang aufgeführten Kaninchen- und Schweineseren im Doppelansatz in log₂-Schritten in einer Mikrottestplatte (U-Boden, Fa. Greiner Bio-One, Frickenhausen) 1:2 in PBS verdünnt. Nach Zugabe derselben Menge 1:2 verdünnter Hämolyisine (in PBS, entspricht 4 hämolysierenden Einheiten (HE, Hämolyisintiter) in der Endverdünnung) erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37 °C. Nach Ablauf der Zeit wurde die doppelte Menge einer 5 %-igen Suspension von Schaferythrozyten zugegeben und das Gemisch für 2 h bei 37 °C auf einem Schüttler (125 rounds/min) inkubiert. Anschließend wurde die 96-Wellplatte bei 2080 x g für 5 min bei 20 °C zentrifugiert (Sigma 4K15C, Fa. Sigma Laborzentrifugen, Osterode) und der Überstand in eine neue 96-Wellplatte (F-Boden, Fa. Greiner Bio-One, Frickenhausen) überführt. Die Bestimmung des freigesetzten Hämoglobins erfolgte photometrisch bei einer OD₅₄₀ nm. Als Negativkontrolle diente die Hämolyisinpräparation H44 in einem Reaktionsansatz mit PBS, während als Positivkontrollen hitzeinaktivierte Hämolyisinpräparationen, eine Mischung von H44 und H68 sowie H44 mit Osmoprotektoren (s. Punkt 3.4.7) mitgeführt wurden. Von H68 und den Osmoprotektoren war bekannt, dass beide die hämolytische Aktivität reduzieren können. Die ermittelten Extinktionswerte wurden auf die je Mikrotiterplatte mitgeführte Negativkontrolle H44 bezogen und in Prozent ausgedrückt, um eine Vergleichbarkeit innerhalb der Platten zu ermöglichen. Die Differenz des Ergebnisses zu 100 % entspricht der relativen Reduktion der Hämolyse. Alle Schweine- und Kaninchenseren wurden außerdem auf ihre eigenhämolytische Aktivität untersucht, um falsch erhöhte Extinktionswerte ausschließen zu können. Dazu wurde den Seren statt der Hämolyisinpräparation H44 BHIF^{CVSSR}-Medium zugegeben und nach zweistündiger Inkubation auf dem Schüttler die Extinktion photometrisch ermittelt.

3.6. Datenhaltung und Auswertung

3.6.1. Bilddokumentation und Auswertung

Die Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese wurden mit dem Bilddokumentationssystem E.A.S.Y. RH, Typ RH-3 (Fa. Herolab, Wiesloch) unter UV-Beleuchtung fotografisch und digital festgehalten. Die Ergebnisse des Hämolyysin-Diffusionstestes, des Hämolyysin-Spotttestes sowie der Versuche zur Zytotoxizität wurden mit der Digitalkamera Fujifilm FinePix JZ300 (Fa. Fujifilm, Düsseldorf) festgehalten.

3.6.2. Auswertung der DNS-Sequenzdaten

Die Auswertung der Sequenzdaten zur MLST erfolgte mit Hilfe des Programmes Ridom Seqsphere Version 1.0.1 (Ridom GmbH, Münster). Neue STs und Allele wurden zur Zuordnung an den Kurator der Webseite (<https://pubmlst.org/brachyspira/>) gesandt. Die Analyse der sequenzierten Hämolyysingene der 32 ausgewählten *B. hyodysenteriae*-Stämme erfolgte mit der Software Geneious Version 8.1.8 (Fa. Biomatters, Auckland, Neuseeland). Die Sequenzen für die Hämolyysingene wurden in der GenBank unter den Accession-Nummern MF488745 - MF488776 (*hlyA*), MF488777 - MF488802 (*tlyB*), MF488803 - MF488834 (*BHWA1_RS02195*), MF488835 - MF488864 (*tlyA*), MF488865 - MF488893 (*tlyC*), MF488894 - MF488925 (*BHWA1_RS09085*) und MF488926 - MF488952 (*BHWA1_RSRS02885*) hinterlegt.

3.6.3. Überprüfung des Vorhandenseins der Hämolyysingene bei diversen *Brachyspira* spp. und Überprüfung der Primer zum Nachweis der Hämolyysingene

Die Genome von 23 vollständig sequenzierten stark hämolysierenden *Brachyspira* spp. (20 x *B. hyodysenteriae*, 1 x *B. suanatina*, 2 x *B. hampsonii*) sowie acht schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp. (jeweils ein Vertreter für *B. innocens*, *B. intermedia*, *B. alvinipulli* und *B. murdochii* sowie vier Vertreter für *B. pilosicoli*) wurden im Rahmen einer *in silico*-Analyse mit Hilfe der Software Geneious Version 8.1.8 auf das Vorhandensein der acht Hämolyysingene überprüft. Die Ähnlichkeiten der NS- bzw. AS-Sequenzen zum Referenzstamm *B. hyodysenteriae* WA1 wurden ebenfalls mittels Geneious untersucht (Tabelle 24 und Tabelle 25). Zusätzlich dienten die Genome der stark hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämme der Überprüfung und Optimierung von Primern, die in dieser Arbeit zum Nachweis der Hämolyysingene verwendet wurden. Die Überprüfung zeigte, dass die Optimierung des Primerpaares zum Nachweis des *hlyA*-Gens, welches zunächst aus einer Literaturstelle übernommen wurde (Barth et al., 2012), aufgrund schwacher PCR-Signale notwendig war.

3.6.4. Vergleich der Hämolysingensequenzen von *B. hyodysenteriae*-Stämmen

Der Abgleich von Übereinstimmungen und Variationen innerhalb der Hämolysingen- und Proteinsequenzen der 32 *B. hyodysenteriae*-Stämme erfolgte mit dem Programm Geneious Version 8.1.8.

3.6.5. Korrelationen zwischen dem Sequenztyp und den Hämolysingensequenzen von 32 ausgewählten *B. hyodysenteriae*-Stämmen

Zur Beantwortung der Fragestellung, ob eine Korrelation zwischen den für die MLST-Analysen verwendeten „Housekeeping“-Genen und den Hämolysingenen besteht, wurde der Mantel-Test angewendet. Dieser war in der Open-Source Software R Version 3.2.3 enthalten. Der Mantel-Test dient der Berechnung der linearen Korrelation zwischen zwei Matrizen. Das Prinzip des Mantel-Testes ähnelt einem Permutationstest, dazu werden die Reihen und Spalten innerhalb der Matrizen X-mal zufällig permutiert, wobei die Anzahl der Permutationen frei wählbar ist. Zunächst wurden mit Hilfe der Software Geneious Neighbour-Joining-Trees (NJT) erstellt, die auf den jeweiligen NS- oder AS-Sequenzdaten beruhen. Verglichen wurde die konkatenierte (aneinandergereihte) Sequenz der sieben MLST-Gene mit den Sequenzen der Hämolysingene, jeweils auf NS- bzw. AS-Ebene. Ein NJT stellt somit als Datenmatrix die Wahrscheinlichkeit einer Verwandtschaftsbeziehung dar. Prinzipiell werden die NS- bzw. AS-Sequenzen mit der geringsten genetischen Distanz zu einem Ast des Baumes vereinigt („principle of minimum evolution“, Saitou und Nei, 1987).

3.6.6. Transkriptionsaktivität der Hämolysingene stark und schwach hämolysierender *B. hyodysenteriae*-Stämme

Die zur Normierung der Hämolysingen-Transkriptionsaktivität dienenden Referenzgene wurden mit Hilfe der Excel-basierten Software BestKeeper Version 1 (<https://www.gene-quantification.de/bestkeeper.html>) ausgewählt. Die Software berechnet für jedes Referenzgen den arithmetischen sowie geometrischen Mittelwert, die Minimum- und Maximum-Werte, die Standardabweichung (StDv, „standard deviation“) sowie den Korrelationskoeffizienten (CV, „coefficient of variance“). Die Standardabweichung liegt bei stabilen Genen unter 1 und der Korrelationskoeffizient sollte so nah an 1 wie möglich liegen (Pfaffl et al., 2004). Die jeweiligen Transkriptionswerte für die Hämolysin- bzw. Referenzgene aus den Versuchen mit *B. hyodysenteriae* B204 und *B. hyodysenteriae* G423 (s. Punkt 3.3.7) wurden mit Hilfe des Programmes REST 2009 (Fa. Qiagen, Hilden) ausgewertet und miteinander verglichen. Initial erfolgte eine Normierung der Expressionswerte der Hämolysingene gegen die Expressionswerte der Referenzgene. Die relative Expression errechnete sich aus der Division der PCR-Effizienzen und

der Abweichung des Schwellenwertes (Ct-Wert) der beiden Stämme, ausgedrückt im Vergleich mit den Referenzgenen. Die jeweils ermittelten Expressionswerte von G423 wurden von den Expressionswerten für B204 subtrahiert. Anschließend wurden die Transkriptionswerte auf Signifikanzen im Randomisationstest untersucht (Pfaffl et al., 2002). Zur Auswertung der Transkriptionswerte wurden die Zeitpunkte 1 - 4 miteinander verglichen, um zu überprüfen, ob die Transkriptionsaktivität auch an die Lebendkeimzahl gekoppelt ist.

3.6.7. Auswertung der Ergebnisse des Hämolyisin-Inhibitions-Tests

Die statistische Auswertung des HIT zum Nachweis Hämolyisin-inhibierender Antikörper (s. Punkt 3.5.1) erfolgte durch Herrn Dr. Failing und seine Mitarbeiter aus der AG Biomathematik und Datenverarbeitung der Justus-Liebig-Universität in Gießen. Die verwendeten Programme waren die Open-Source Software R Version 3.2.3 sowie die Software BMDP2v (Fa. Statistical Solutions Ltd. Cork, Irland). Die Auswertung erfolgte für jede der vier Verdünnungsstufen (1:2 bis 1:16) getrennt für die Antiseren der Schweine bzw. Kaninchen, die anhand der Versuchsdurchgänge in Gruppen unterteilt wurden. Bezogen auf die Schweineseren wurden in der ersten Auswertung (Software R, partiell hierarchisches linear mixed effects model) nur die Ergebnisse für den Stamm *B. hyodysenteriae* B204 (n = 19) aus den Infektionsversuchen 1 bis 4 berücksichtigt unter Einbeziehung der Störvariable Versuchsdurchgang. Der fünfte Infektionsversuch fand in der statistischen Auswertung keine Berücksichtigung, da der Stamm B204 dort nicht eingesetzt wurde. Die zweite Auswertung, bei der alle verwendeten *B. hyodysenteriae*-Stämme (n = 6) einbezogen wurden, erfolgte mit der Software BMDP2v mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen bezüglich der Zeit.

3.6.8. Statistische Bewertung

Die statistische Signifikanzgrenze für die berechnete Irrtumswahrscheinlichkeit wurde mit $p \leq 0,05$ definiert.

Für die Interpretation der Signifikanz wurden folgende Bezeichnungen verwendet:

n. s. = nicht signifikant ($p \geq 0,05$); wird nicht dargestellt

* = $p \leq 0,05$ (schwach signifikant)

** = $p \leq 0,01$ (signifikant)

*** = $p \leq 0,001$ (hoch signifikant)

4. Ergebnisse

4.1. Molekularbiologische Untersuchungen

4.1.1. Speziesidentifizierung der *Brachyspira* spp.-Stämme

Das Untersuchungsmaterial dieser Arbeit umfasste neben den 18 *Brachyspira* spp.-Referenz- bzw. Kontrollstämmen 221 *Brachyspira* spp.-Feldstämmen aus unterschiedlichen Ländern (Tabelle 18). Insgesamt zeigten 175 Feldstämmen einen stark hämolysierenden Phänotyp, während die weiteren 46 Feldstämmen eine wH induzierten. Von den 221 Feldstämmen wurden 175 Stämme mittels PCR (Tabelle 22, PCR-Nr. 1) als *B. hyodysenteriae* identifiziert. Mit Ausnahme des Stammes G423 wiesen alle *B. hyodysenteriae*-Stämme (n = 174) eine sH auf. Da die partiellen Sequenzen der *nox*- und 16S rRNS-PCR-Gene des schwach hämolysierenden Stammes G423 (Schwein, Deutschland, 2014) jeweils eine 99 %-ige Übereinstimmung mit *B. hyodysenteriae*-Stämmen aufwiesen (Stamm 49, GenBank Accession-Nr. KU215621; Stamm ATCC 27164, GenBank Accession-Nr. CP015910), konnte die Spezieszugehörigkeit bestätigt werden.

Die weitere Differenzierung der 46 *Brachyspira* spp.-Feldstämmen mittels Spezies-spezifischer PCR (Tabelle 22, PCR-Nr. 2a-e) führte zur Identifizierung der Spezies *B. pilosicoli* (n = 11), *B. murdochii* (n = 10), *B. innocens* (n = 11), *B. intermedia* (n = 10) und *B. alvinipulli* (n = 1). Unter den 46 Stämmen befand sich außerdem ein stark hämolysierender Stamm (G288; Schwein, Vereinigte Staaten, 2010), dessen *nox*- und 16S rRNS-Sequenzen eine 99 %-ige bzw. 100 %-ige Übereinstimmung zur Spezies *B. hampsonii* (GenBank Accession-Nr. CP019914.1) aufwies.

Bei zwei schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp.-Stämmen (G270 [Schwein, Spanien, 2010], G460 [Schwein, Deutschland, 2015]) konnte keine eindeutige Spezies-Zuordnung mittels PCR erfolgen. Nach Sequenzierung des 16S rRNS-Genfragmentes bestand bei dem Stamm G460 eine 99 %-ige NS-Sequenzübereinstimmung zu *B. intermedia* (GenBank Acc.-Nr. EF517532.1) sowie zu *B. innocens* (GenBank Acc.-Nr. AB093307.1 und NR_044763.1), während das *nox*-Gen-Fragment eine 94 %-ige Identität zu *B. hyodysenteriae* aufwies (GenBank Acc.-Nr. AF060802.1). Die 16S rRNS-Gen-Analyse des Stammes G270 ergab eine 99 %-ige Übereinstimmung mit *B. innocens* (GenBank Acc.-Nr. NR_044763.1). In der *nox*-Gen-Analyse konnte die Spezies hingegen nicht näher differenziert werden. Es gab lediglich eine Übereinstimmung des *nox*-Gen-Fragmentes mit dem nicht näher charakterisierten *Brachyspira* sp.-Stamm H29 (GenBank Acc.-Nr. JX428805.1).

4.2. Untersuchungen zur Phylogenie von *B. hyodysenteriae* mittels MLST

Von den 175 *B. hyodysenteriae*-Feldstämmen wurden 127 Stämme mittels MLST untersucht. Die Stämme stammten überwiegend aus Deutschland und vereinzelt aus Polen und Japan. Die in Tabelle 22 beschriebenen Primer (PCR-Nr. 8a-g) zur Amplifikation der sieben „Housekeeping“-Gene für die MLST generierten bei allen 127 untersuchten *B. hyodysenteriae*-Stämmen in der PCR Amplifikate im jeweils erwarteten Längenbereich. Die DNS-Fragmente reichten in ihrer Größe von 552 bp (*adh*) bis 1049 bp (*pgm*). Die Abbildung 2 zeigt exemplarisch am Stamm B204 die mittels PCR generierten Amplifikate der sieben Gen-Fragmente. Für die sieben Gene *adh*, *alp*, *est*, *gdh*, *pgm*, *glpK* und *thi* wurde basierend auf den Sequenzdaten eine jeweils unterschiedliche Anzahl an Allelen unter den 127 untersuchten Stämmen ermittelt (Tabelle 3).

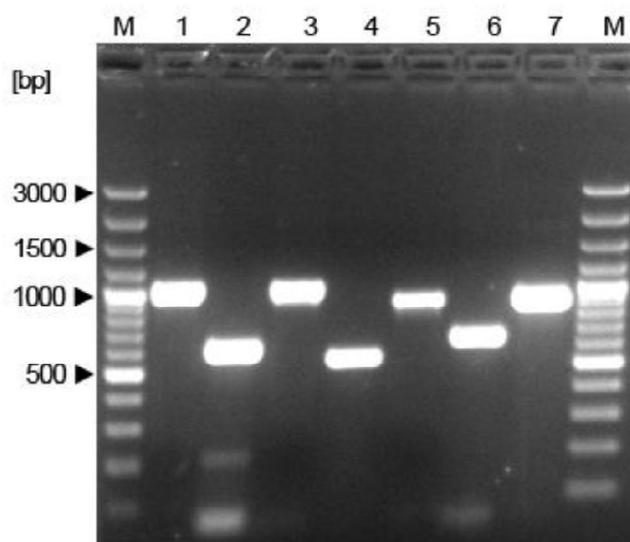


Abbildung 2: Agarosegel (2 %) mit den Amplifikationsprodukten der sieben für die MLST verwendeten „Housekeeping“-Gene von *B. hyodysenteriae* B204 (Ethidiumbromid gefärbt)

1 = *pgm* (1049 bp), 2 = *est* (619 bp), 3 = *glpK* (1035 bp), 4 = *adh* (552 bp), 5 = *alp* (909 bp), 6 = *gdh* (644 bp), 7 = *thi* (917), M = Molekularmassenstandard (Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder), bp = Basenpaare

Tabelle 3: Nachgewiesene MLST-Gen-Allele bei *B. hyodysenteriae*-Feldstämmen

Genlokus	Nachgewiesene Allelnummern
<i>adh</i>	2, 17
<i>alp</i>	2, 7, 8, 11, 13, 20, 22, 32
<i>est</i>	3, 5, 7, 8, 14
<i>gdh</i>	1, 4, 5, 6, 10, 12
<i>glpK</i>	4, 8, 9, 10, 11, 12, 30
<i>pgm</i>	1, 2, 11, 16
<i>thi</i>	3, 7, 10, 11, 14, 17, 26, 27, 28

4.2.1. Ermittelte Sequenztypen im Rahmen der MLST

Bei der Typisierung der 127 *B. hyodysenteriae*-Stämme wurden 18 verschiedene STs identifiziert. Die Verteilung auf die verschiedenen STs kann der Tabelle 4 entnommen werden. Unter den 116 *B. hyodysenteriae*-Stämmen aus Deutschland kamen drei STs gehäuft vor. Dies waren ST52 (41,4 %), ST8 (12,1 %) und der erstmalig nachgewiesene ST112 (25,9 %). Die übrigen Stämme verteilten sich auf zwölf weitere STs (ST113 - ST118, ST120 - ST123, ST131 und ST193), welche ebenfalls erstmalig auftraten und in der MLST-Datenbank (<https://pubmlst.org/brachyspira/>) als neue Typen hinterlegt wurden. Basierend auf dem Allel-Profil der 127 Stämme sowie von 619 Stämmen aus der MLST-Datenbank bzw. aus Publikationen wurde eine eBURST-Analyse durchgeführt (Abbildung 3). Anhand dieser Analyse wurden 17 klonale Komplexe (CCs) unter den 186 STs der insgesamt 746 *B. hyodysenteriae*-Stämme identifiziert. Die Benennung der CCs erfolgte nach dem potenziellen Gründer-ST („founder“) in den MSTs (Abbildung 4). Neue STs aus Deutschland, wie ST116 oder ST131 repräsentierten dabei Einzellocus-Varianten (SLV, „single locus variant“) vom bereits bekannten ST52 (potenzieller Gründer des CC52), während ST193 eine Doppellocus-Variante (DLV, „double locus variant“) von ST52 darstellte. Der erstmals nachgewiesene ST112 war eine DLV des ST120, welcher zuerst in Australien beschrieben wurde und zeigte Variationen in den Allelen *gfpK* und *pgm*. Die Darstellung der 746 *B. hyodysenteriae*-Stämme erfolgte zum einen in Abhängigkeit vom Herkunftsland und zum anderen vom Jahr der Isolation der Stämme (Abbildung 4). Ein Großteil (99,3 %) der Stämme wurde aus Schweinen und nur vereinzelt aus Vögeln (n = 3) oder Mäusen (n = 2) isoliert. Von den drei vorherrschenden STs der vorliegenden Arbeit konnten ST8 und ST52 jeweils einem CC zugeordnet werden. Im Gegensatz dazu war der ST112 keinem CC zugehörig. Während der ST112 nur Stämme aus Deutschland und Belgien umfasste, beinhalteten die beiden übrigen STs auch Stämme aus dem übrigen europäischen Ausland. Für ST52 sind Spanien, Italien, Belgien und Österreich zu nennen, während ST8 bereits in Spanien, dem Vereinigten Königreich, Belgien, Polen und Serbien isoliert wurde. Bis auf ST120, dem bereits Stämme aus Italien zugeordnet wurden, waren die zwölf neuen STs (ST113 - 118, ST120 - 123, ST131 und ST193) geographisch auf Deutschland beschränkt. Auffallend war, dass *B. hyodysenteriae*-Stämme aus Europa, den Vereinigten Staaten und Australien kaum übereinstimmende STs besaßen. Eine Ausnahme bildete der ST104, welcher Stämme aus Deutschland (La et al., 2016b) und den Vereinigten Staaten beinhaltete. Das Auftreten dominanter STs war nicht nur in Deutschland typisch. In Italien konnte die Dominanz von ST75, ST77 und ST76 beobachtet werden (Rugna et al., 2015). Bei der Auswertung der temporären Verteilung der STs wurde ersichtlich, dass ein Großteil der Stämme in den 2010er Jahren isoliert wurde (n = 466), während aus den 1990er Jahren lediglich acht Stämme in die

4 Ergebnisse

Datenbank eingepflegt wurden. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass unterschiedliche STs zu unterschiedlichen Jahren/Jahrzehnten gehäuft auftraten: Stämme, die zu CC36 gehörten, wurden nur von den 1980er Jahren bis zu den 1990er Jahren nachgewiesen. Weiterhin konnten Stämme, die zu CC64 gehörten, nur in den Jahren 2006 und 2007 isoliert werden. Die ST77, ST76 und ST83 wurden 2004 erstmalig in Italien isoliert und konnten bis 2016 (Ende der Untersuchungsperiode dieser Arbeit) regelmäßig nachgewiesen werden. Bezogen auf STs aus Deutschland fiel auf, dass der ST112 nicht vor dem Jahr 2000 nachgewiesen wurde, während ST8 und ST52 in den 1990er Jahren erstmalig isoliert wurden. Auf jedem der sechs Betriebe, die mehrfach Kotproben eingesendet hatten, blieben die nachgewiesenen STs innerhalb der untersuchten Zeitspanne dieselben.

Tabelle 4: Multilokus-Sequenztypen von 127 *B. hyodysenteriae*-Feldstämmen aus unterschiedlichen Herkunftsländern

Sequenztyp (ST)	<i>B. hyodysenteriae</i> -Stämme [n (%)]	Herkunft
ST8	17 (13,39 %)	Deutschland (n = 14), Polen (n = 3)
ST52	49 (38,58 %)	Deutschland (n = 48), Japan (n = 1)
ST112	30 (23,62 %)	Deutschland
ST113	1 (0,79 %)	Deutschland
ST114	8 (6,3 %)	Deutschland
ST115	1 (0,79 %)	Deutschland
ST116	2 (1,57 %)	Deutschland
ST117	3 (2,36 %)	Deutschland
ST118	1 (0,79 %)	Deutschland
ST120	3 (2,36 %)	Deutschland
ST121	1 (0,79 %)	Deutschland
ST122	1 (0,79 %)	Deutschland
ST123	1 (0,79 %)	Deutschland
ST124	1 (0,79 %)	Japan
ST131	1 (0,79 %)	Deutschland
ST193	1 (0,79 %)	Deutschland
ST194	1 (0,79 %)	Polen
ST195	5 (3,94 %)	Polen

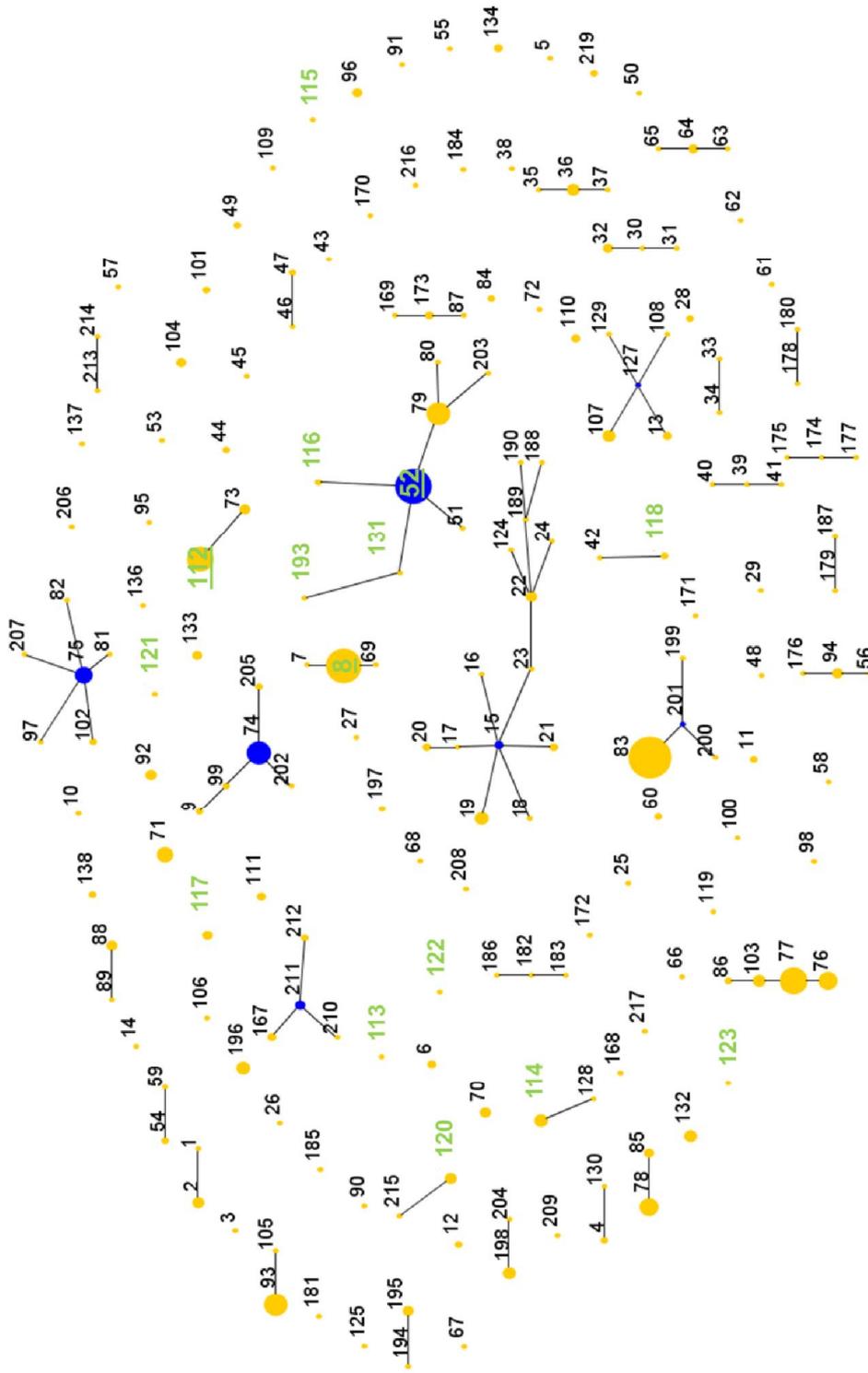


Abbildung 3: eBURST-Analyse basierend auf den Allelprofilen der Sequenztypen von 127 in dieser Arbeit untersuchten und 619 öffentlich zugänglichen globalen *B. hyodysenteriae*-Stämmen

Die beschrifteten Kreise repräsentieren den jeweiligen Sequenztyp (ST) und die Größe der Kreise spiegelt die Anzahl der Stämme innerhalb des jeweiligen ST wider. Durchgezogene Linien zwischen den STs zeigen das Verhältnis von Einzellokus-Varianten untereinander sowie die Zugehörigkeit zum selben klonalen Komplex (CC) an. Blaue Punkte zeigen den möglichen Gründer („founder“) des CC an. Sequenztypen, die in dieser Arbeit erstmalig beschrieben wurden, sind grün markiert und unterstrichen. Die drei Haupt-ST aus dieser Arbeit sind grün markiert und unterstrichen.

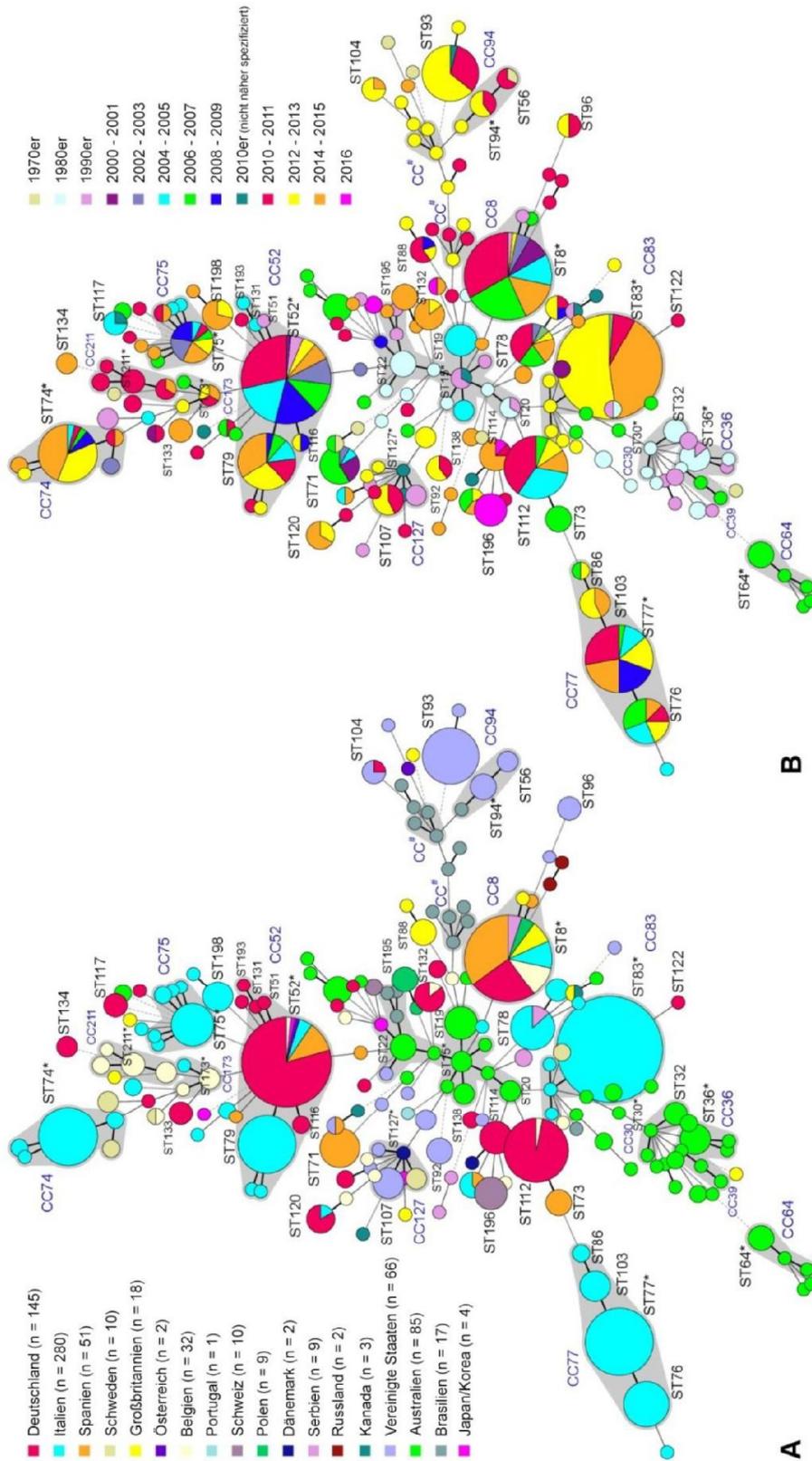


Abbildung 4: Minimum Spanning Trees basierend auf den Allelprofilen von 746 *B. hyodysenteriae*-Stämmen (n = 741 Schwein, n = 5 Mäuse und Vögel) unter Berücksichtigung der geographischen (A) und temporären Verteilung (B)
 Jeder Kreis (n = 186) repräsentiert einen Sequenztyp (ST), die Größe ist proportional der in einem STs vorhandenen Stämme. Klonale Komplexe (CC) sind grau unterlegt. Der potenzielle Gründer („founder“) des CC ist mit einem Stern gekennzeichnet, das Zeichen # symbolisiert CCs mit unklaren Foundern.

4.3. Vergleichende Analyse der Hämolysingene verschiedener *Brachyspira* spp.

4.3.1. Nachweis der acht Hämolysingene bei stark und schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp. mittels PCR

Mittels PCR wurden bei 173 der 174 stark hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Feldstämme inklusive der elf mitgeführten *B. hyodysenteriae*-Referenz- bzw. Kontrollstämme Amplikons für alle acht Hämolysingene mit Hilfe der internen Primer (Tabelle 22, PCR Nr. 3a-3h) im erwarteten Längenbereich generiert. Bei dem aus Dänemark stammenden *B. hyodysenteriae*-Stamm G192 blieb das Signal für das Gen *BHWA1_RS09085* bei Verwendung der internen Primer aus. Hier konnte mit einem, das vollständige Gen, umgreifenden Primerpaar (Mahu et al., 2016) ein kräftiges Signal in der erwarteten Länge von 974 bp nachgewiesen werden. Bei dem schwach hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stamm G423 konnten letztlich auch alle acht Hämolysingene nachgewiesen werden. Mit den internen Primern verlief der Nachweis des Gens *BHWA1_RS02195* bei G423 zunächst negativ, das Vorhandensein dieses Gens konnte mit den umgreifenden Primern (Mahu et al., 2016) jedoch bestätigt werden. Bei *B. suanatina* AN4859/03 konnten mit Hilfe der acht internen Primer (Tabelle 22, PCR Nr. 3a-3h), die initial für *B. hyodysenteriae* entworfen wurden, Signale für vier der acht Hämolysingene nachgewiesen werden (*hlyA*, *tlyB*, *BHWA1_RS02885* sowie *BHWA1_RS09085*). Ein ähnliches Ergebnis wurde bei der Untersuchung der beiden *B. hampsonii*-Stämme (G288 und 5364-4x/12) generiert. Der Nachweis der Hämolysingene ergab für *hlyA*, *BHWA1_RS02885* und *BHWA1_RS09085* positive Signale mit den internen Primern für die beiden *B. hampsonii*-Stämme. Bei *B. hampsonii*-Stamm G288 verlief die Untersuchung auf das Hämolysingen *tlyA* mit den internen Primern zusätzlich positiv. Eine Überprüfung mittels umgreifender Primer, die zur Sequenzierung von *B. hyodysenteriae* kreiert wurden (Mahu et al., 2016), erfolgte für die weiteren stark hämolysierenden Spezies nicht. Aufgrund bereits vorliegender Gesamtgenom-Sequenzierungen von *B. suanatina*- und *B. hampsonii*-Stämmen wurde eine *in silico*-Analyse der Hämolysingene durchgeführt, um Fehlern infolge von Primer-Fehlpaarungen im Rahmen der PCR-Untersuchungen vorzubeugen (s. Punkt 4.3.1.3). Die Abbildung 5 zeigt am Beispiel von *B. hyodysenteriae*-Stamm B204 die mittels PCR generierten und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennten DNS-Fragmente der acht Hämolysingene.

4 Ergebnisse

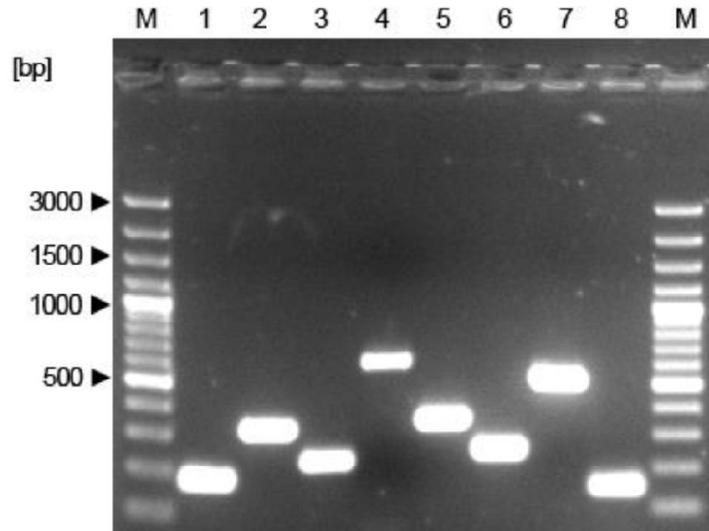


Abbildung 5: Elektrophoretische Darstellung der mittels PCR generierten acht Hämolysefragmente von *B. hyodysenteriae* B204 (2 %-iges Agarosegel, Ethidiumbromid gefärbt)

1 = *BHWA1_RS02885* (177 bp), 2 = *BHWA1_RS09085* (322 bp), 3 = *BHWA1_RS02195* (223 bp), 4 = *tlyB* (613 bp), 5 = *BHWA1_RS04705* (355 bp), 6 = *tlyC* (252 bp), 7 = *tlyA* (527 bp), 8 = *hlyA* (148 bp), M = Molekularmassenstandard (Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder), bp = Basenpaare

Bei der Untersuchung der schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp. ergaben sich unter Verwendung der in Tabelle 22 aufgelisteten Primer geringere Nachweisraten für die acht Hämolysefragmente. Das Gen *BHWA1_RS02195* (*hemolysin III*) ließ sich in keinem der 45 schwach hämolysierenden Feld- bzw. Kontrollstämmen nachweisen. Das Gen *tlyA* war nur in dem schwach hämolysierenden Stamm G270 aus Spanien nachzuweisen. Nur in einem der beiden *B. alvinipulli*-Stämme - dem Referenzstamm C1 - war der Nachweis von *hlyA* erfolgreich. Die restlichen sieben Hämolysefragmente konnten in keinem der beiden *B. alvinipulli*-Stämme amplifiziert werden. Von den schwach hämolysierenden Spezies besaßen Vertreter von *B. innocens* und *B. intermedia* mit maximal sechs von acht Genen die höchste Anzahl nachweisbarer Hämolysefragmente, während in *B. pilosicoli*- und *B. murdochii*-Stämmen maximal drei der acht Hämolysefragmente nachweisbar waren. Die initiale Arbeitshypothese, nach der jede *Brachyspira* spp. ein eigenes Hämolysefragemuster aufweist, wurde nicht bestätigt. Auf eine weitere Untersuchung der Hämolysefragmente bei den schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp.-Stämmen mit umgreifenden Primern (Mahu et al., 2016) wurde verzichtet, da im Rahmen der *in silico*-Analyse eine umfangreiche Analyse bekannter und mutmaßlicher Hämolysefragmente vollständig sequenzierter schwach hämolysierender *Brachyspira* spp. (n = 8) stattfand. Eine Übersicht über das Vorhandensein der Hämolysefragmente bei den stark und schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp. findet sich in Tabelle 5.

Tabelle 5: Hämolysingenmuster bei stark und schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp.

Spezies (Anzahl Feld-/ Kontrollstämmen)	Nachweis der Hämolysingene mittels PCR							
	<i>tlyA</i>	<i>tlyB</i>	<i>tlyC</i>	<i>hlyA</i>	<i>BHWA1_</i> <i>RS02195</i>	<i>BHWA1_</i> <i>RS02885</i>	<i>BHWA1_</i> <i>RS04705</i>	<i>BHWA1_</i> <i>RS09085</i>
<i>B. pilosicoli</i> (n = 11/1)	-	-	±	+	-	-	-	±
<i>B. murdochii</i> (n = 10/1)	-	-	±	-	-	±	-	±
schwache Hämolyse	<i>B. innocens</i> (n = 11/1)	-	±	±	±	-	±	±
	<i>B. intermedia</i> (n = 10/1)	-	±	±	±	-	±	±
	<i>B. alvinipulli</i> (n = 1/1)	-	-	-	±	-	-	-
	<i>Brachyspira</i> sp. G460	-	+	-	-	-	+	-
	<i>Brachyspira</i> sp. G270	+	-	-	+	-	-	+
	<i>B. hyodysenteriae</i> G423	+	+	+	+	+	+	+
	<i>B. hamptonii</i> (n = 1/1)	±	-	-	±	-	±	-
starke Hämolyse	<i>B. suanatina</i> (n = 0/1)	-	+	-	+	-	+	+
	<i>B. hyodysenteriae</i> (n = 174/11)	+	+	+	+	+	+	+

+ = Gen per PCR nachweisbar; - = Gen mittels PCR nicht nachweisbar; ± = der Nachweis des Gens variiert innerhalb der Spezies; * Nachweis des entsprechenden Gens nicht mittels interner Primer (Tabelle 22, PCR-Nr. 3a-3h), sondern mittels umgreifender Primer (Mahu et al., 2016) bei den Stämmen G423 (Gen *BHWA1_RS02195*) und G192 (Gen *BHWA1_RS09085*)

4.3.1.1. Hämolysingensequenzen ausgewählter *B. hyodysenteriae*-Stämme

Aufgrund des regelmäßigen Vorkommens der Hämolysingene innerhalb der 174 untersuchten stark hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämme erfolgte bei 32 Stämmen, die unterschiedliche STs repräsentierten, die vollständige Sequenzierung der Hämolysingene mit bereits publizierten Primern (Mahu et al., 2016). Die dabei nachgewiesenen Variationen innerhalb der NS- bzw. AS-Sequenz sind in der Tabelle 6 dargestellt. Trotz wiederholter PCR-Untersuchungen gelang es nicht bei allen 32 Stämmen die Hämolysingene in vollständiger Länge zu sequenzieren. Daher liegt die Anzahl der Stämme pro Hämolysingen in Tabelle 6 teilweise unter

4 Ergebnisse

der ursprünglich ausgewählten Anzahl von 32 Stämmen. Um eine Vergleichbarkeit der in dieser Arbeit sequenzierten Stämme mit denjenigen aus der Arbeit von Mahu et al. (2016) zu ermöglichen, wurde auf die Sequenzierung des achten Hämoly singsens *BHWA1_RS04705* verzichtet.

Tabelle 6: Mutationen in den Hämoly singenen bzw. Hämoly sinen von 32 *B. hyodysenteriae*-Stämmen im Vergleich zum *B. hyodysenteriae*-Referenzstamm WA1

Hämoly singen	Abweichungen der Hämoly singene von <i>B. hyodysenteriae</i> Feldstämmen (n=32) in Bezug zum Referenzstamm WA1			
	Ausgewertete NS-Sequenzen (n)	100 % NS-Sequenz-identität (n)	Summe NS-Austausche (n)	Summe AS-Austausche (n)
<i>tlyA</i>	30	28	0-1	0-1
<i>tlyB</i>	26	7	0-12	0-1
<i>tlyC</i>	29	23	0-7	0
<i>hlyA</i>	32	32	0	0
<i>BHWA1_RS02195</i>	32	0	2-15	0-5
<i>BHWA1_RS02885</i>	27	7	0-17	0-1
<i>BHWA1_RS09085</i>	32	7	0-1	0-1

NS = Nukleinsäure, AS = Aminosäure

Bei einem Vergleich dieser Sequenzen mit jenen des Referenzstammes *B. hyodysenteriae* WA1 konnten bei den Proteinen TlyC und HlyA bei den in Tabelle 6 aufgeführten Stämmen keine Abweichungen festgestellt werden. TlyA wies einen Austausch in der Position 195 der AS-Sequenz auf. Bei TlyB wurden drei Austausche der AS-Sequenz an den Positionen 44, 120 und 781 festgestellt. Die meisten Austausche innerhalb der AS-Sequenz kamen bei dem Protein BHWA1_RS02195 vor. Dabei handelte es sich um die Positionen 2, 52, 54, 56, 59, 82, 83 und 157. Innerhalb der Sequenz des Proteins BHWA1_RS09085 befand sich ein Austausch an der Position 178. Auch bei dem Protein BHWA1_RS02885 gab es drei Austausche an den Positionen 47, 60 und 95.

4.3.1.2. Analyse der potenziellen Promotorregion des Hämoly singsens *hlyA*

In einer Studie aus dem Jahr 2016 wurde eine Mutation im Promotor des Hämoly singsens *hlyA* als mögliche Ursache für die Ausbildung eines schwach hämoly sierenden Phänotyps diskutiert (La et al., 2016b). Zum Vergleich wurde dieser Bereich bei dem stark hämoly sierenden *B.*

4 Ergebnisse

hyodysenteriae-Stamm B204 und dem schwach hämolysierenden Stamm G423 sequenziert. Bei G423 konnten auf diese Weise mehrere Mutationen im Promotorbereich identifiziert werden. Im Vergleich zum Referenzstamm B204 betrug der intergenische Bereich zwischen *fabG* und *hlyA* bei G423 nur 71 statt 72 Basen. Es waren neben zwei SNPs an der Position 724 (g.724A>G) und 740 (g.740C>T), einer Deletion von sieben Basenpaaren ab der Position 698 (g.698_704delTAAAAAA) auch zwei Insertionen an der Position 741 (g.741insT) und ab Position 745 (g.745_749insAAACA) festzustellen. Die letzte Insertion befand sich in dem Bereich der Pribnow-Box. Die von La et al. (2016b) beschriebene Ribosombindungsstelle wies bei G423 keine Veränderungen auf. Die Sequenzen sind vergleichend zwischen dem Referenzstamm B204 und dem Feldstamm G423 in der Abbildung 6 dargestellt.

```

G423 5' -> 3' TAAATTA-----GTATATAAATGTGTGTTTAAAAACCACCTTTAATAAATAAAATTAATAAAAACAATACAATTTAAAGGAGAAATTAATAAAATG
      |||      |||      |||      |||      |||      |||      |||      |||      |||      |||      |||      |||      |||      |||
B204 5' -> 3' 939 TAAATTATAAAAAAGTATATAAATGTGTGTTTAAAAAACACTTTAATAAATAAAC-AAATA-----TACAATTTAAAGGAGAAATTAATAAAATG 1010
      <          *          #          >

```

Abbildung 6: Nukleinsäuresequenz-, Alignment“ der intergenischen Bereiche zwischen dem *fabG* und dem *hlyA* des Referenzstammes *B. hyodysenteriae* B204 (GenBank Accession-Nr. U94886, Position 939-1010) und des schwach hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Feldstammes G423

Die Pribnow-Box (*) sowie die Bindungsstelle am Ribosom (#) sind unterstrichen. Dargestellt ist die Sequenz beginnend mit dem Stopcodon (<) von *fabG* und endend mit dem Startcodon von *hlyA* (>).

4.3.1.3. *In silico*-Analyse der Genome verschiedener *Brachyspira* spp. auf das Vorhandensein von Hämolysingenen

Die *in silico*-Analyse diente der Verifizierung der PCR-Ergebnisse (s. Punkt 4.3.1) hinsichtlich des Nachweises der acht Hämolysingene. Es wurden 19 *B. hyodysenteriae*-Stämme, ein *B. suanatina*-Stamm, zwei *B. hampsonii*-Stämme, vier *B. pilosicoli*-Stämme sowie jeweils ein Vertreter von *B. murdochii*, *B. innocens* und *B. intermedia* gegen *B. hyodysenteriae* WA1 als Referenzstamm analysiert. Hierbei handelt es sich um alle zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Dissertationsschrift zugänglichen Gesamtgenom-Sequenzen. Die 20 *B. hyodysenteriae*-Stämme wurden zwischen 1970 und 2010 isoliert, stammten aus neun unterschiedlichen Ländern (Deutschland, Japan, Korea, Dänemark, Vereinigte Staaten, Vereinigtes Königreich, Spanien, Kanada und Australien) und repräsentierten 18 verschiedene STs (Black et al., 2015). Dem Stamm ST265 aus Spanien konnte kein ST zugeordnet werden, da das Allel *alp* in diesem Stamm nicht existierte (Black et al., 2015).

In allen Genomen konnten, verglichen mit den acht Hämolysingenen des Referenzstammes WA1, Gene mit einer Ähnlichkeit von 80,06 % (*BHWA1_RS09085* bei *B. innocens* ATCC 29796) bis 100 % (*hlyA*) nachgewiesen werden. Auf Basis der AS-Sequenz wurden Identitäten von 82,99 % (*TlyA* bei *B. innocens* ATCC 29796) bis 100 % (*HlyA*) ermittelt. Bezogen auf die 19 *B. hyodysenteriae*-Stämme wies das Hämolysingen *BHWA1_RS04705* die geringste Ähnlichkeit (97,61 %) auf und beinhaltete bis zu 31 NS-Austausche, die in drei AS-Austauschen resultierten. Die stärkste Abweichung innerhalb der Spezies *B. hyodysenteriae* zum Referenzstamm WA1 befand sich in der AS-Sequenz des Proteins *BHWA1_RS02195*, bei dem bis zu sechs Austausche nachweisbar waren (97,32 %). Innerhalb der Spezies *B. hyodysenteriae* wiesen die acht Hämolysingene stets die gleiche Anzahl an Nukleotiden auf. Bei den Hämolysingenen der beiden anderen stark hämolysierenden Spezies *B. suanatina* und *B. hampsonii* lag keine derartig hohe Übereinstimmung in der Größe der Gene vor. Dies zeigte sich vor allem bei den mutmaßlichen Hämolysingenen sowie bei *tlyC*. Die Zahlen der entsprechenden Nukleotide lagen zum Teil über und zum Teil unter jenen der *B. hyodysenteriae*-Stämme. Sogar innerhalb der Spezies *B. hampsonii* unterschied sich die Genlänge von *tlyC* (*B. hampsonii* 30446 828 Nukleotide, *B. hampsonii* 30599 819 Nukleotide, *B. hyodysenteriae* WA1 807 Nukleotide). Das Hämolysingen *BHWA1_RS02195* von *B. hampsonii*-Stamm 30599 wurde von einer 570 kb langen Sequenz in zwei Abschnitte geteilt. Die unterbrechende Sequenz kodiert für eine Vielzahl anderer Gene. Im Vergleich mit dem Hämolysingen *BHWA1_RS02195* (675 bp) von *B. hampsonii*-Stamm 30446 fehlte im *B. hampsonii*-Stamm 30599 nach der ersten Teilsequenz des Hämolysingens von 428 bp ein Abschnitt von 112 bp. Das Ende des Gens war erhalten (135 bp). Auch bei den schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp. wich die Nukleotidanzahl bei den Hämolysingenen, mit Ausnahme von *hlyA* und *tlyA* von der Länge

4 Ergebnisse

des Referenzstammes *B. hyodysenteriae* WA1 ab. Im Hinblick auf die NS- als auch die AS-Identität besaßen die vier *B. pilosicoli*-Stämme die niedrigsten Übereinstimmungen mit *B. hyodysenteriae* WA1 (Identität auf NS-Ebene maximal 94,09 % *hlyA*). Die Spezies *B. suanatina*, *B. hampsonii* und *B. intermedia* wiesen dagegen die höchste NS- und AS-Identität im Vergleich mit WA1 auf. Bei *B. intermedia* PWS/A reichte die Identität auf NS-Ebene von 89,9 % für *tlyA* bis hin zu 100 % für *hlyA*. In Tabelle 7 bzw. Tabelle 8 sind die jeweiligen Mutationen (absolute Anzahl) innerhalb der NS- bzw. AS-Sequenz bezogen auf *B. hyodysenteriae* WA1 dargestellt. Detaillierte Ergebnisse der *in silico*-Analyse hinsichtlich Ähnlichkeiten in % sowie Abweichungen in der Länge der Gen- bzw. Proteinsequenzen sind im Anhang in Tabelle 24 und Tabelle 25 wiedergegeben.

Tabelle 7: Ergebnisse der *in silico*-Analyse der acht Hämolysegene bei verschiedenen *Brachyspira* spp.

Hämolysegen	Anzahl an Nukleinsäureaustauschen bei stark und schwach hämolysierenden <i>Brachyspira</i> spp. im Vergleich zum Referenzstamm <i>B. hydysenteriae</i> WA1						
	<i>B. hydysenteriae</i> (n = 19)	<i>B. suanatina</i> (n=1)	<i>B. hamptonii</i> (n = 2)	<i>B. pilosicoli</i> (n = 4)	<i>B. intermedia</i> (n=1)	<i>B. murdochii</i> (n=1)	<i>B. innocens</i> (n=1)
<i>tlyA</i> (723 bp)	0	73	64 – 87	131 – 134	73	124	123
<i>tlyB</i> (2487 bp)	0 – 8	119	200 – 218	527 – 530	147	274	286
<i>tlyC</i> (807 bp)	0 – 5	56	82 – 96	178 – 222	50	131	140
<i>hlyA</i> (237 bp)	0	1	1 – 3	14	0	11	12
<i>BHWA1_RS04705</i> (1299 bp)	1 – 31	54	115 – 124	313 – 326	76	220	217
<i>BHWA1_RS09085</i> (672 bp)	0 – 1	40	74 – 83	149 – 155	48	126	134
<i>BHWA1_RS02195</i> (675 bp)	0 – 15	60	73 – 80	191 – 194	69	167	175
<i>BHWA1_RS02885</i> (1389 bp)	0 – 21	121	133	310 – 312	114	198	197

bp = Anzahl der Basenpaare des jeweiligen Gens; n = Anzahl der Stämme

Tabelle 8: Ergebnisse der *in silico*-Analyse der acht Hämolyse bei verschiedenen *Brachyspira* spp.

Protein	Anzahl an Aminosäureaustauschen bei stark und schwach hämolysierenden <i>Brachyspira</i> spp. im Vergleich zum Referenzstamm <i>B. hyodysenteriae</i> WA1							
	<i>B. hyodysenteriae</i> (n = 19)	<i>B. suanatina</i> (n=1)	<i>B. hamptonii</i> (n = 2)	<i>B. pilosicoli</i> (n = 4)	<i>B. intermedia</i> (n=1)	<i>B. murdochii</i> (n=1)	<i>B. innocens</i> (n=1)	
TlyA (240 AS)	0	21	13 – 19	36 – 37	20	34	31	
TlyB (828 AS)	0 – 1	10	21 – 26	161 – 163	14	36	34	
TlyC (268 AS)	0 – 1	7	17 – 24	43 – 60	10	25	25	
HlyA (78 AS)	0	0	0	2	0	1	1	
BHWA1_RS04705 (432 AS)	1 – 4	11	33 – 36	88 – 91	15	54	56	
BHWA1_RS09085 (223 AS)	0 – 1	2	8 – 14	30 – 31	2	28	30	
BHWA1_RS02195 (224 AS)	0 – 6	8	17 – 20	60	10	47	53	
BHWA1_RS02885 (462 AS)	0 – 2	19	21 – 23	100 – 101	13	48	50	

AS = Anzahl der Aminosäuren des jeweiligen Proteins; n = Anzahl der Stämme

4.3.1.4. Bestimmung von Virulenz-assoziierten Genen und putativen Fitnessgenen bei *B. hyodysenteriae* mittels PCR

Bei allen 174 stark hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämmen konnte jeweils das komplette Set der acht Hämolysingene mittels PCR nachgewiesen werden (Tabelle 22; PCR-Nr. 3a-h). Weiterführend stellte sich die Frage, ob und in welcher Häufigkeit sieben weitere Virulenz- und Fitnessgene („virulence life-style genes“, VLSGs) in den stark hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämmen nachweisbar sind. Da diese Daten später mit der phylogenetischen Herkunft der Stämme in Beziehung gesetzt werden sollten, wurden in diese Untersuchungen 116 *B. hyodysenteriae*-Stämme aus Deutschland, denen ein ST zugeordnet werden konnte, einbezogen. Ein Großteil der getesteten Gene war regelmäßig in den untersuchten *B. hyodysenteriae*-Stämmen nachweisbar. Der Nachweis des Eisenspeichergens *ftnA* gelang in allen untersuchten Stämmen, während das Eisenaufnahmegens *bitC* nur in 95,7 % der Stämme nachweisbar war.

Von den Genen, die für äußere Membranproteine kodieren, konnten in keinem der Stämme *bhlp17.6* („small membrane protein“, SmpB) und *bhmp39h* nachgewiesen werden. Das *bhlp29.7* war im Gegensatz dazu in allen Stämmen vorhanden. Das *bhlp16* („small membrane protein“, SmpA) war in 70 von 116 Stämmen nachweisbar (60,3 %), während das Membranproteingen *bhmp39f* in 87,9 % der Stämme detektiert wurde. Je nach Vorhandensein oder Abwesenheit der geprüften Gene ergaben sich sechs verschiedene Virulenzgenmuster (Tabelle 9). Am häufigsten war das Muster 1 vertreten. Dieses wurde durch 62 Stämme repräsentiert, die jeweils 13 der 15 untersuchten Gene besaßen.

Tabelle 9: Verteilungsmuster der Hämolysegene sowie weiterer Virulenz- und putativer Fitnessgene in 116 *B. hyodysenteriae*-Feldstämmen

Virulenz- genmuster (Anzahl Stämme)	Virulenz-assoziierte Gene/Fitnessgene										Sequenztyp (ST)	
	Virulenz- gene		Eisenmeta- bolismus		äußere Membranproteine		Hämolyse- gene*					
	Hämolyse	Virulenz- gene	bitC	hitC	äußere Membranproteine	hitC	hitD	hitE	hitF	hitG		
1 (n = 62)	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	ST8, ST52, ST112, ST113, ST114, ST115, ST117, ST118, ST120, ST123, ST124
2 (n = 36)	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	ST52, ST122, ST131, ST193
3 (n = 4)	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	ST52, ST116
4 (n = 5)	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	ST52, ST116
5 (n = 8)	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	ST8, ST52, ST112, ST114, ST121
6 (n = 1)	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	ST52

* = *tlyA*, *tlyB*, *tlyC*, *hlyA*, *BHWA1_RS02885*, *BHWA1_RS02195*, *BHWA1_RS09085*, *BHWA1_RS04705*; + = Gennachweis positiv, - = Gennachweis negativ

4.3.1.5. Nachweis möglicher Korrelationen zwischen dem Sequenztyp und Virulenzgenen bei *B. hyodysenteriae*-Stämmen

Die Ergebnisse unter Punkt 4.3.1 und 4.3.1.4 haben gezeigt, dass Korrelationen zwischen dem ST und den Hämolysingenen sowie den Genen, die am Eisenmetabolismus beteiligt sind und für die äußeren Membranproteine Bhlp29.7 und Bhmp39f kodieren, nicht bestimmt werden können, da die Gene entweder in allen Stämmen nachweisbar waren (*bhlp29.7*, Hämolysingene, *ftnA*) oder in allen nachweisbaren STs in vergleichbarer Häufigkeit vorkamen (*bhmp39f*, *bitC*). Die Gene, die für die äußeren Membranproteine Bhlp17.6 und Bhmp39h kodieren, konnten in keinem der 116 *B. hyodysenteriae*-Stämme aus Deutschland nachgewiesen werden, wodurch Korrelationen mit einem ST nicht möglich war. Lediglich die Untersuchung des *bhlp16* lieferte Daten, die für die in diesem Kapitel gestellte Frage verwertbar waren. Das Gen *bhlp16* war signifikant seltener ($p < 0,0001$) in Stämmen, die dem klonalen Komplex CC52 zugehörig waren, nachweisbar. Nur 14,6 % der Stämme, die dem ST52 zugeordnet wurden, besaßen dieses Gen. Im Gegensatz dazu verfügte jeder Stamm des ST8 oder ST112 über das Gen *bhlp16*.

4.3.1.6. Korrelationen zwischen dem Sequenztyp und den Hämolysingen-sequenzen verschiedener *B. hyodysenteriae*-Stämme

Basierend auf einem Vergleich der NS-Sequenzen im Mantel-Test war eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$) zwischen drei der sieben untersuchten Hämolysingene (*BHWA1_RS09085*, *BHWA1_RS02885* sowie *BHWA1_RS02195*) zu der konkatenierten NS-Sequenz der sieben MLST-Gene nachweisbar (Tabelle 10). Beim anschließenden Vergleich auf AS-Ebene wies nur das Protein *BHWA1_RS02195* eine signifikante Korrelation ($p < 0,013$) zu den MLST-Genen auf. Die Gene *tlyA*, *tlyB*, *tlyC* und *hlyA* zeigten weder hinsichtlich ihrer NS- noch ihrer AS-Sequenz eine statistisch relevante Korrelation zu der konkatenierten Sequenz der MLST-Gene. Beispielhaft sind in Tabelle 7 und Tabelle 8 als Basis für die Berechnung des Mantel-Testes die Neighbour-Joining-Trees (NJT) der Hämolysingene *BHWA1_RS02885* (negative Korrelation) und *BHWA1_RS02195* (positive Korrelation) zu den konkatenierten MLST-Genen dargestellt. Wie unter 4.3.1.1 beschrieben, war es nicht möglich bei allen ausgewählten 32 *B. hyodysenteriae*-Stämmen für jedes der Hämolysingene eine NS-Sequenz zu generieren, sodass zwischen 26 und 32 Stämme für den Mantel-Test zur Verfügung standen.

4 Ergebnisse

**Tabelle 10: Nachweis einer Korrelation zwischen den MLST-Genen und den Hämoly-
singen im Mantel-Test**

Hämolysingen/Hämolysin	Wahrscheinlichkeit (p) einer Korrelation auf Ebene der	
	Nukleinsäuren	Aminosäuren
<i>tlyA</i> /TlyA	n. s.	n. s.
<i>tlyB</i> /TlyB	n. s.	n. s.
<i>tlyC</i> /TlyC	n. s.	n. s.
<i>hlyA</i> /HlyA	n. s.	n. s.
<i>BHWA1_RS02195</i> / <i>BHWA1_RS02195</i>	0,05	0,01
<i>BHWA1_RS02885</i> / <i>BHWA1_RS02885</i>	6×10^{-5}	n. s.
<i>BHWA1_RS09085</i> / <i>BHWA1_RS09085</i>	0,02	n. s.

n. s. = nicht signifikant

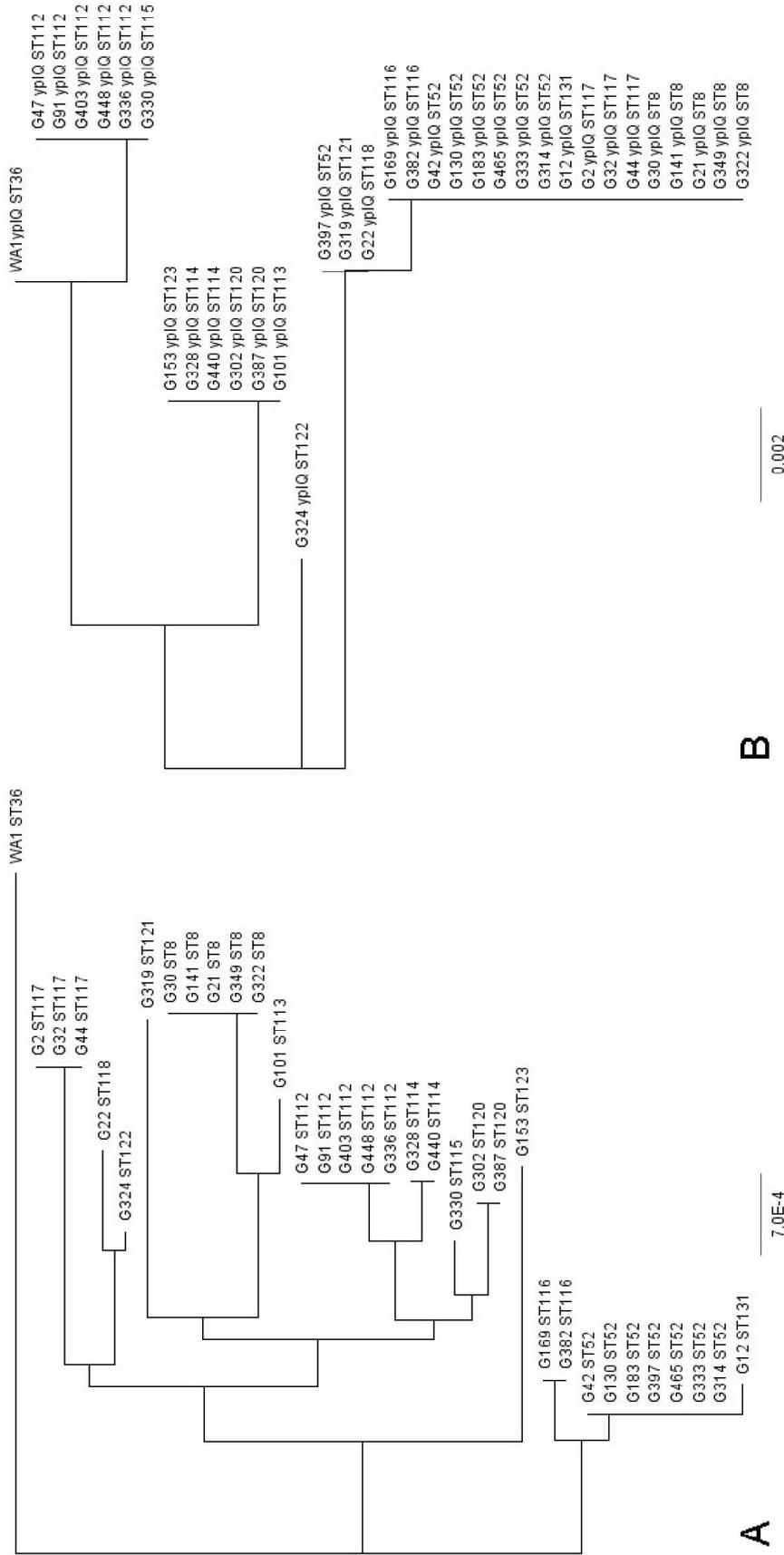


Abbildung 7: Neighbour-Joining Tree (NJT) des Hämolyisings *BHWA1_RS02195 (hemolysin III, ypiQ)* und der concatenierten Nukleinsäuresequenz der sieben MLST-Gene
NJT A repräsentiert die concatenierte NS-Sequenz der MLST-Gene, **NJT B** zeigt die NS-Sequenz des Hämolyisings *BHWA1_RS02195 (ypiQ)* von 34 *B. hyodysenteriae*-Stämmen (32 Feldstämme, Referenzstämme G21 und WA1). Nach dem Prinzip der „minimum evolution“ werden nah verwandte Sequenzen zu einem Ast des Baums vereinigt ($p = 0,013$).

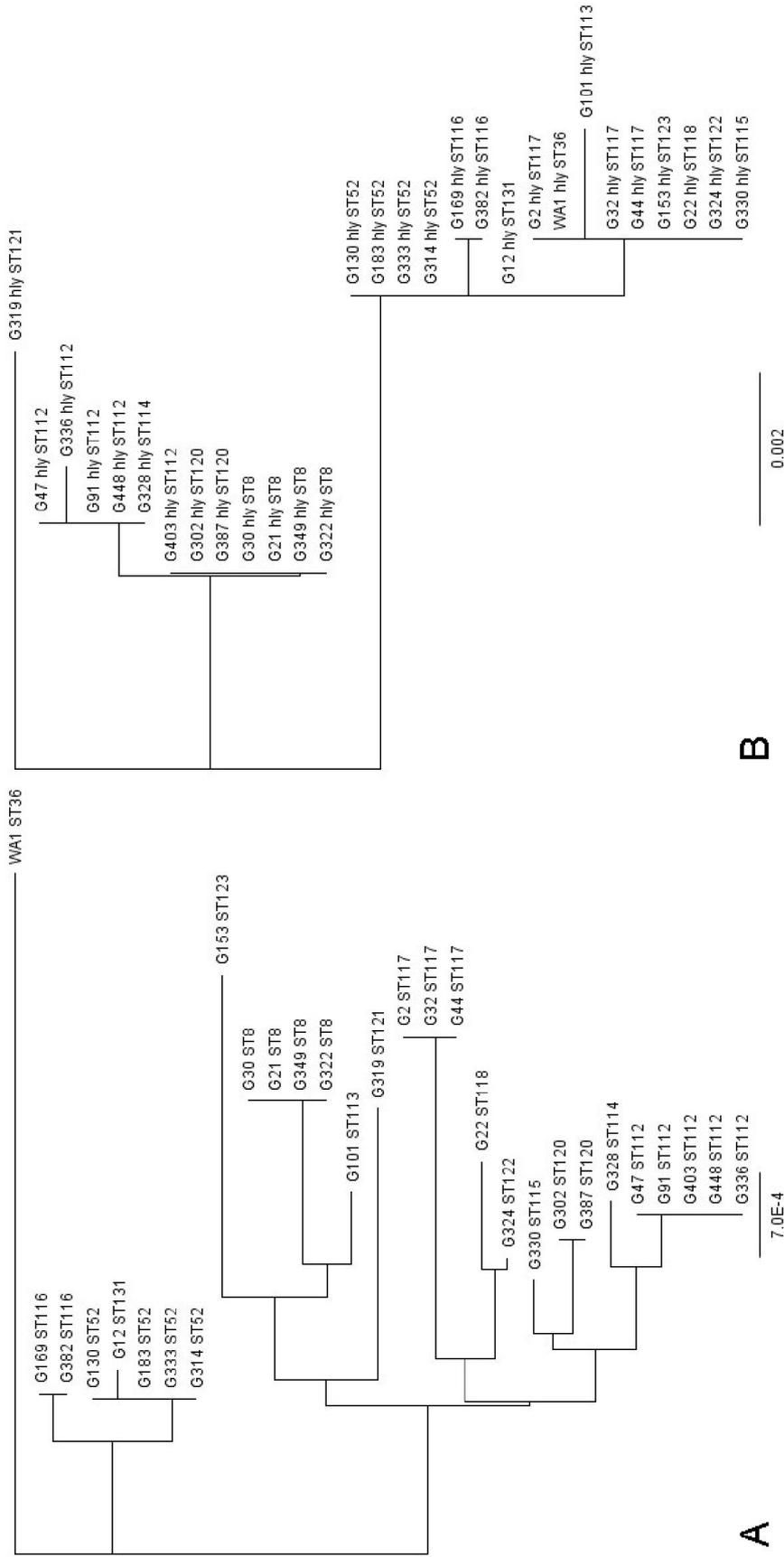


Abbildung 8: Neighbour-Joining Tree (NJT) des Hämolyisings *BHWA1_RS02885 (hly)* und der concatenierten Nukleinsäuresequenz der sieben MLST-Gene
NJT A repräsentiert die concatenierte NS-Sequenz der MLST-Gene, **NJT B** zeigt die NS-Sequenz des Hämolyisings *BHWA1_RS02885 (hly)* von 29 *hyodysenteriae*-Stämmen (27 Feldstämme, Referenzstämme G21 und WA1). Nach dem Prinzip der „minimum evolution“ werden nahe verwandte Sequenzen zu einem Ast des Baums vereinigt ($p > 0,5$).

4.4. Vergleichende Analyse der Hämolyzingen-Transkriptionsaktivitäten eines stark und schwach hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stammes

Dieser Versuch zielte auf den quantitativen Nachweis der Hämolyzingen-spezifischen mRNA zu verschiedenen Zeitpunkten im Rahmen der Vermehrung in Bouillon. Der schwach hämolysierende *B. hyodysenteriae*-Stamm G423 zeigte im Vergleich zum stark hämolysierenden Stamm B204 ein deutlich langsames Wachstum in BHIF-Bouillon. Beide Stämme erreichten eine maximale Lebendkeimzahl von 10^8 WbE₅₀/ml nach 48 h (B204) bzw. 92 h (G423) Inkubation. Hämolytische Aktivität konnte beim stark hämolysierenden Stamm B204 nach 35 h beobachtet werden und trat beim schwach hämolysierenden Stamm G423 nach 87 - 99 h auf. Die hämolytische Aktivität der Zellkulturüberstände wurde im Hämolyisin-Diffusionstest untersucht. Hier ergaben sich beim schwach hämolysierenden Stamm maximale Hämolysezonen von 3 mm, während der stark hämolysierende Stamm Hämolysezonen von bis zu 6 mm aufwies. Die Unterschiede in der Ausprägung des hämolytischen Phänotyps können der Abbildung 13 (s. Punkt 4.5) entnommen werden. Die vier Zeitpunkte zur Determinierung der Hämolyzingen-Transkriptionsaktivitäten umfassten sowohl die hämolysierenden als auch die nicht hämolysierenden Zeitpunkte beider Stämme. Bei Stamm B204 wurden Proben während der Anlaufphase (24 h, nicht hämolysierend), der frühen exponentiellen Phase (35 h, hämolysierend), der späten exponentiellen Phase (40 h, hämolysierend) sowie der Absterbephase (84 h, nicht hämolysierend) untersucht (Abbildung 9). Bei Stamm G423 wurden Untersuchungszeitpunkte in der Anlaufphase (53 h, nicht hämolysierend), der frühen exponentiellen Phase (63 h, nicht hämolysierend), der stationären Phase (111 h, hämolysierend) und der Absterbephase (136 h, hämolysierend) gewählt (Abbildung 10). Für den Stamm G423 war es nicht möglich einen Zeitpunkt nach der Hämolyisinproduktion zu untersuchen, da in der Absterbephase (> 136 h) weiterhin hämolytische Aktivität nachweisbar war und zudem eine zu geringe Lebendkeimzahl vorlag und es nicht mehr zu einer messbaren mRNA-Produktion kam. Die Tabelle 19 im Anhang informiert über die Lebendkeimzahl sowie die hämolytische Aktivität, die in den Überständen beider Stämme gemessen wurde.

4 Ergebnisse

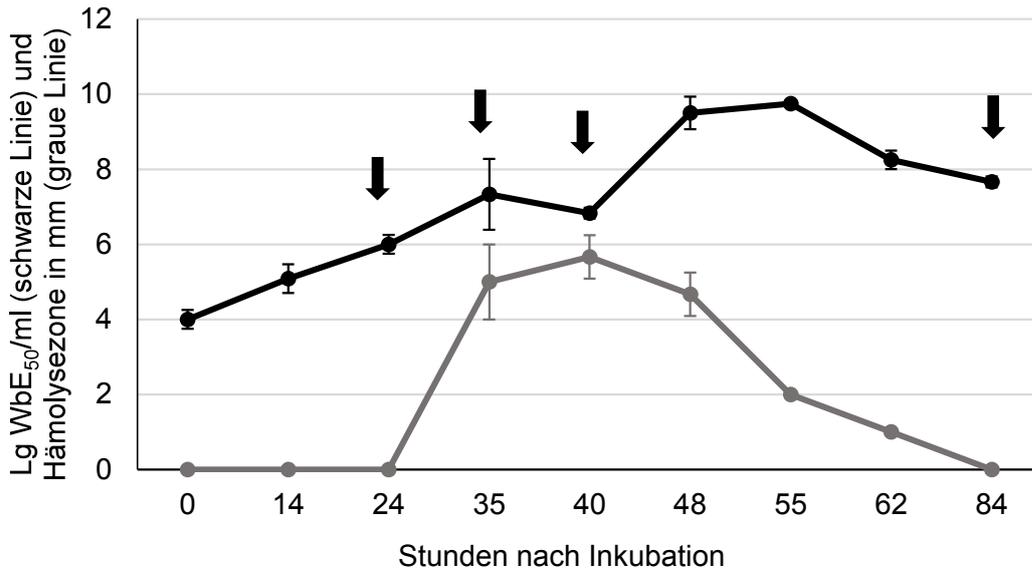


Abbildung 9: Lebendkeimzahl und hämolytische Aktivität der Zellkulturüberstände des stark hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stammes B204 während der Vermehrung in BHIF (Dreifachansatz)

Die Pfeile (schwarz) markieren die Zeitpunkte, die für die Analyse der Transkriptionsaktivität der Hämolysingene ausgewählt wurden. Die schwarze Linie repräsentiert die Wachstumskurve und die graue Linie zeigt den Verlauf der hämolytischen Aktivität an.

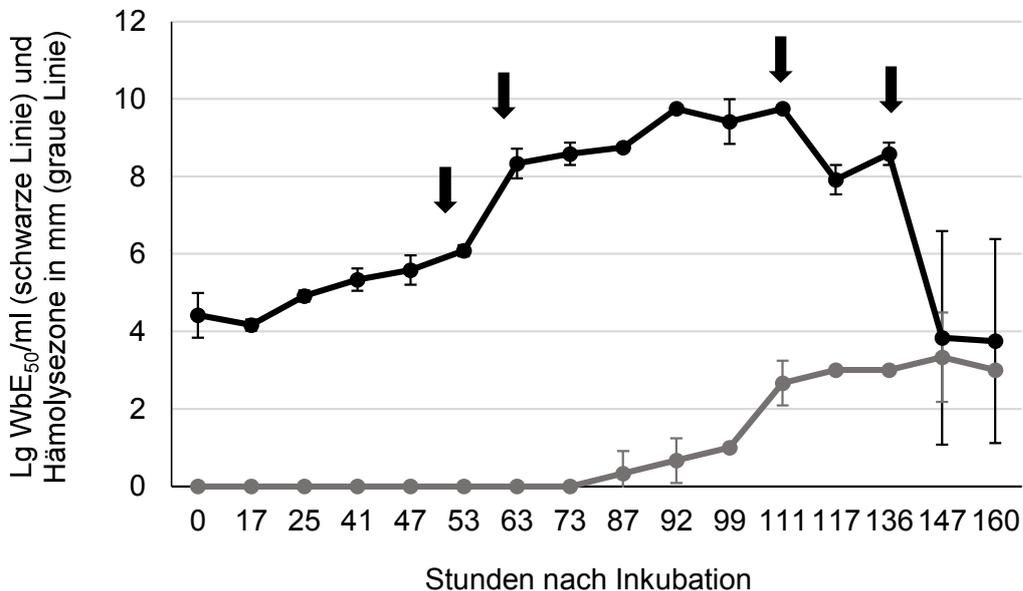


Abbildung 10: Lebendkeimzahl und hämolytische Aktivität der Zellkulturüberstände des schwach hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stammes G423 während der Vermehrung in BHIF (Dreifachansatz)

Die Pfeile (schwarz) markieren die Zeitpunkte, die für die Analyse der Transkriptionsaktivität der Hämolysingene ausgewählt wurden. Die schwarze Linie repräsentiert die Wachstumskurve und die graue Linie zeigt den Verlauf der hämolytischen Aktivität an.

4 Ergebnisse

Basierend auf den Ergebnissen der Software BestKeeper wurden die Referenzgene *adh* (Chung und Ferl, 1999; Brand und Hovav, 2010; He et al., 2017) und *gyrB* (Witchell et al., 2006) für diese Studie ausgewählt. Die maximale Konzentration an totaler RNS schwankte zwischen 1,3 ng/ μ L beim ersten Zeitpunkt (24 h B204, 53 h G423) und 2,1 ng/ μ L während des vierten Untersuchungszeitpunktes (84 h B204, 136 h G423). Das A_{260}/A_{280} - sowie das A_{260}/A_{230} -Reinheitsverhältnis der RNS sowie der cDNS lag jeweils innerhalb der Toleranzgrenze für derartige Bestimmungen (Ogram et al., 1987; Imbeaud et al., 2005). Die Transkriptionsaktivität der acht Hämolysingene der beiden Stämme ist in den Abbildung 11 und 12 dargestellt. Die Abbildungen basieren auf den arithmetischen Mittelwerten der Ct-Werte aus den Dreifachansätzen der beiden Stämme.

Jedes der acht Hämolysingene wurde in unterschiedlichem Ausmaß und in Abhängigkeit von der Hämolysin-Freisetzung in den beiden Stämmen transkribiert. Die Transkriptionsaktivität des Hämolysingens *tlyA* wies während des ersten Untersuchungszeitpunktes (Anlaufphase in beiden Stämmen, keine Hämolyse) keine signifikanten Unterschiede auf. Während des zweiten Zeitpunktes (frühe exponentielle Phase in beiden Stämmen, Hämolyse Stamm B204) zeigte das Gen *tlyA* eine 21-fach stärkere Transkription im stark hämolysierenden Stamm B204 verglichen mit dem schwach hämolysierenden Stamm G423 ($p = 0,004$). Während des dritten (späte exponentielle Phase B204, stationäre Phase G423, beide Stämme hämolysierend) und vierten Untersuchungszeitpunktes (Absterbephase in beiden Stämmen, Hämolyse Stamm G423) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stämmen ($p > 0,05$). Das Hämolysingen *tlyC* zeigte ein ähnliches Transkriptionsmuster wie *tlyA*. Während des zweiten Untersuchungszeitpunktes kam es zu einer 6,8-fach höheren Transkription ($p = 0,04$) im *B. hyodysenteriae*-Stamm B204, welcher zu diesem Zeitpunkt hämolytisch aktiven Überstand aufwies. Während der übrigen Untersuchungszeitpunkte konnten keine nennenswerten Unterschiede zwischen den beiden Stämmen gefunden werden, mit Ausnahme des dritten Zeitpunktes, an dem das *tlyC* im Stamm B204 weniger stark transkribiert wurde als die mitgeführten Referenzgene. Die beiden Gene *tlyB* und *hlyA* wurden in beiden Stämmen zu allen vier Zeitpunkten stärker transkribiert als die mitgeführten Referenzgene. Die Transkriptionsaktivität dieser Gene lag beim Stamm G423 leicht über derjenigen des Stammes B204 und erreichte während des dritten Zeitpunktes für beide Gene ($p < 0,001$) und während des ersten Zeitpunktes für das Gen *tlyB* ($p = 0,003$) die Grenze zur Signifikanz. Für das mutmaßliche Hämolysingen *BHWA1_RS02195* konnte während des ersten Untersuchungszeitpunktes in beiden Stämmen eine erhöhte Transkriptionsaktivität festgestellt werden, die beim stark hämolysierenden Stamm B204 2,8-fach höher lag ($p = 0,041$). Während des zweiten Zeitpunktes konnte im Stamm B204 eine 6,3-fach höhere Transkriptionsaktivität verglichen mit dem schwach hämolysierenden Stamm G423 nachgewiesen werden ($p = 0,004$). Die Untersuchung des dritten Zeitpunktes ergab keine Unterschiede zwischen den beiden Stämmen. Im weiteren

4 Ergebnisse

Verlauf konnte für das Gen *BHWA1_RS02195* eine signifikant niedrigere Transkriptionsaktivität im Stamm B204 festgestellt werden ($p = 0,001$). Im Fall des Gens *BHWA1_RS02885* fand während des ersten Zeitpunktes eine verstärkte Transkription in beiden Stämmen statt ($p > 0,05$). Nachdem während des zweiten Zeitpunktes keine nennenswerten Unterschiede zu verzeichnen waren, wies der Stamm B204 während der letzten beiden Zeitpunkte eine 2-fach erhöhte Transkriptionsaktivität für das Gen *BHWA1_RS02885* auf ($p < 0,05$). Das Hämolysin *BHWA1_RS04705* wies während der Anlaufphase im Stamm B204 eine 22-fach höhere Transkriptionsaktivität verglichen mit dem schwach hämolysierenden Stamm G423 auf ($p < 0,001$). Dies konnte in geringerem Ausmaß (6-fache Erhöhung) auch während des zweiten Zeitpunktes beobachtet werden. Im weiteren Verlauf der Vermehrung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Transkriptionsaktivität des Gens *BHWA1_RS04705* in beiden Stämmen. Letztlich wies das Hämolysin *BHWA1_RS09085* bei beiden Stämmen eine vergleichbare Transkriptionsaktivität auf. Lediglich während des Nachweises hämolytischer Aktivität des Stammes G423 (Zeitpunkt 3) wies dieses Gen bei dem Stamm B204 eine signifikant geringere Transkriptionsaktivität auf ($p = 0,001$). Darauf folgte während des letzten Zeitpunktes eine 1,5-fach erhöhte Transkriptionsaktivität beim Stamm B204.

Zusammenfassend zeigten sich während der Anlaufphase - mit Ausnahme des Gens *BHWA1_RS04705* ($p < 0,001$) - kaum deutliche Unterschiede zwischen den beiden Stämmen. Weitere signifikante Unterschiede zeigten sich während der frühen exponentiellen Phase (Zeitpunkt 2) und betrafen insbesondere die beiden Gene *tlyA* und *tlyC*. Beide wurden im Stamm B204, dessen Überstand zu diesem Zeitpunkt hämolytisch aktiv war, deutlich stärker transkribiert ($p < 0,05$). Auffallend war, dass *tlyA* im Stamm G423 weniger stark als die Referenzgene transkribiert wurde. Signifikant höhere Transkriptionsaktivitäten konnten für die Gene *BHWA1_RS02195* und *BHWA1_RS04705* im Stamm B204 festgestellt werden ($p = 0,004$). Während des dritten Zeitpunktes, der bei beiden Stämmen durch hämolytische Aktivität im Überstand gekennzeichnet war, wurden vier Gene (*tlyB*, *hlyA*, *tlyC* und *BHWA1_RS09085*) im Stamm B204 signifikant geringer transkribiert als im Stamm G423 ($p < 0,05$). Während der Absterbephase beider Stämme zeigten sich signifikante Unterschiede in den mutmaßlichen Hämolysingenen. Während *BHWA1_RS02885* und *BHWA1_RS09085* im Stamm B204 stärker transkribiert wurden ($p < 0,05$), wurde das Gen *BHWA1_RS02195* im Stamm B204 geringer transkribiert verglichen mit dem Stamm G423 ($p = 0,001$).

4 Ergebnisse

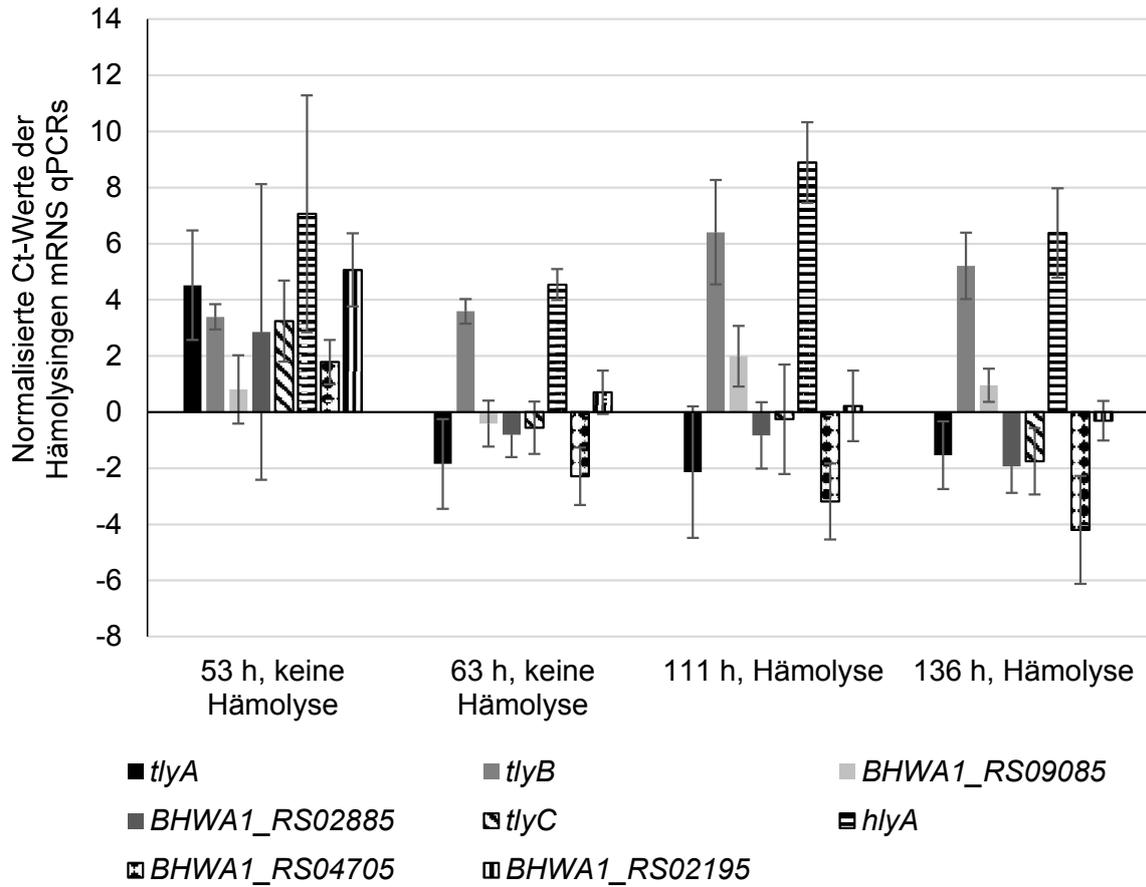


Abbildung 11: Auf die Ergebnisse der Referenzgene normalisierte Ct-Werte (arithmetische Mittelwerte aus drei Versuchen) der Hämolysingen mRNA qPCRs des schwach hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stammes G423 zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Vermehrung in Bouillon

4 Ergebnisse

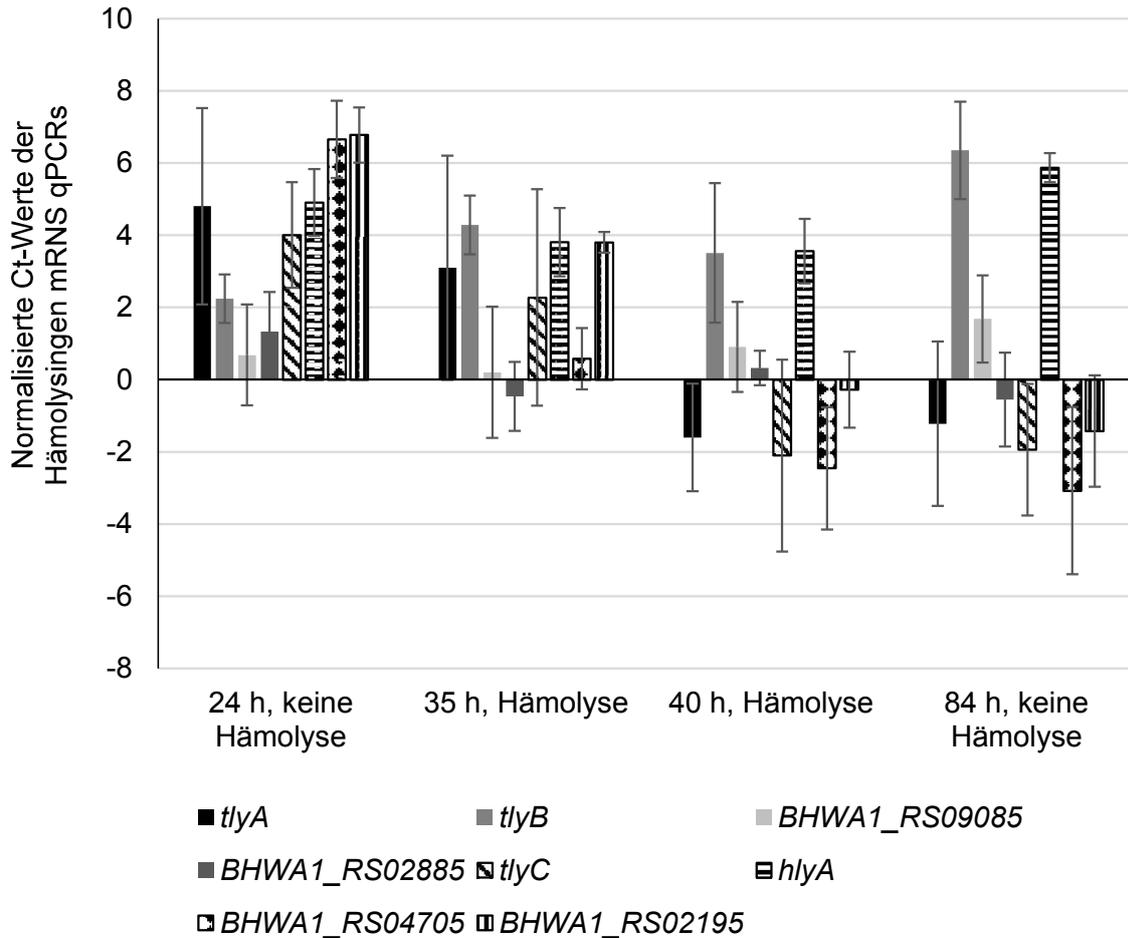


Abbildung 12: Auf die Ergebnisse der Referenzgene normalisierte Ct-Werte (arithmetische Mittelwerte aus drei Versuchen) der Hämolyisingen mRNA qPCRs des stark hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stammes B204 zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Vermehrung in Bouillon

4.5. Vergleichende Analyse des hämolytischen und zytotoxischen Phänotyps der stark und schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp.

Diese Analyse zielte auf die Frage, ob neben dem Parameter des Hämolysetyps (stark oder schwach) weitere Hämolysin-spezifische, phänotypische Kriterien nachweisbar sind, die möglicherweise für die untersuchten Stämme *B. hyodysenteriae* B204 und *B. hyodysenteriae* G423 (stark bzw. schwach hämolysierend), *B. suanatina* AN4859/03 und *B. hamptonii* 5364-4x/12 (beide stark hämolysierend) und *B. innocens* 2933-2 (schwach hämolysierend) typbestimmend sind. Untersuchungen zur Zytotoxizität wurden an zehn stark hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämmen durchgeführt, die unterschiedliche Serotypen repräsentierten. Der Tabelle 18 kann entnommen werden, welche Stämme für welche phänotypischen Untersuchungen Anwendung fanden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben der Titration keine geeignetere Methode zur Standardisierung der Konzentration der Hämolysine gefunden. Versuche, den Hämolysintiter mit Hilfe des Hämolysin-Diffusionstestes und des Hämolyseradius zu ermitteln,

4 Ergebnisse

waren nicht eindeutig, da der Titer nicht konstant mit dem Durchmesser des Radius der hämolytischen Zone korrelierte. Im Rahmen der Hämoglobin-Freisetzung (s. Punkt 4.6) zeigte sich, dass die Extinktionswerte der Hämolsinpräparation in einer 1:2 Verdünnung biologischen Schwankungen unterlagen, sodass hier die Grenze zwischen zwei Titerstufen fließend war. Generell lag der Hämolsintiter der stark hämolyzierenden Stämme bei maximal 32, während schwach hämolyzierende Stämme einen Titer von maximal 4 aufwiesen. Bei der Reproduktion der Hämolsintiter kam es teilweise zu Abweichungen um eine Titerstufe. Sofern nicht anders angegeben betrug der Hämolsintiter der stark hämolyzierenden Stämme 16 - 32 und der schwach hämolyzierenden Stämme 2 - 4. Die Zytotoxizität wurde ebenfalls mittels Titration bestimmt. Der Zytotoxintiter der stark hämolyzierenden Stämme war in der Regel 2, während in Ausnahmefällen Titer bis 128 nachweisbar waren.

Die Objektivierung des Hämolysetyps erfolgte über die Untersuchung der präparierten Hämolsine im Hämolsin-Diffusionstest (s. Punkt 3.4.2). Jedes Stanzloch wurde mit den präparierten unverdünnten Hämolsinen (s. Punkt 3.4.3) so befüllt, dass die Füllhöhe exakt plan mit dem Agar abschloss (ca. 90 µl). Wie aus der Abbildung 13 ersichtlich wird, wurde der bluthaltige Agar aufgrund der zugefügten Hämolsine der stark hämolyzierenden *Brachyspira* im Bereich der Diffusionszone des Hämolsins vollständig durchsichtig. Im Gegensatz dazu kam es bei den Hämolsinen der schwach hämolyzierenden *Brachyspira* spp. lediglich zur Aufhellung des Agars. Die entsprechenden Kriterien dienen der Charakterisierung des Hämolysetyps bei der Kultivierung der *Brachyspira* auf TSA^{CVSSR}-Nährböden mit 5 % Schafblut (Abbildung 14).

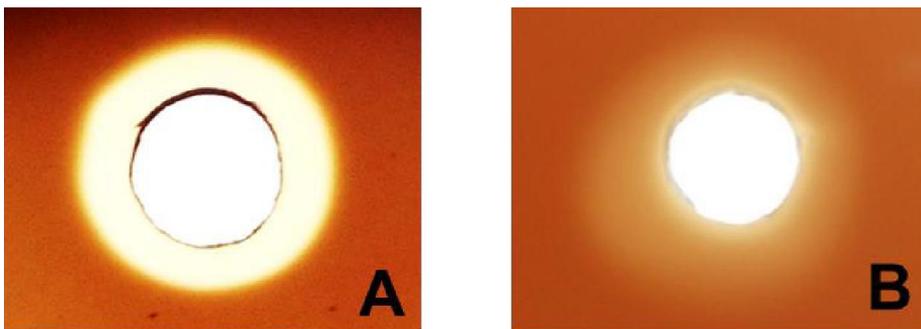


Abbildung 13: Differenzierung des Hämolysetyps mittels Hämolsin-Diffusionstest
A zeigt eine vollständige (starke) Hämolyse durch Hämolsine von stark hämolyzierenden *Brachyspira* spp., während **B** eine unvollständige (schwache) Hämolyse durch Hämolsine von schwach hämolyzierenden *Brachyspira* spp. widerspiegelt.

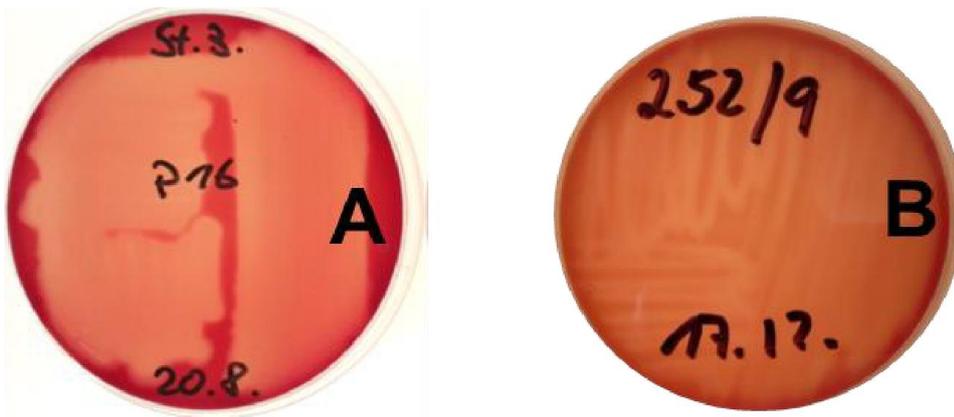


Abbildung 14: Differenzierung des Hämolysetyps von *Brachyspira* spp. während der Vermehrung auf Nährmedien mit 5 % Schafblut

Vollständige (A) und unvollständige (B) Hämolyse während der Kultivierung von stark und schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp. auf TSA^{CVSSR}-Nährböden mit 5 % Schafblut.

4.5.1. Temperaturstabilität der Hämolysine

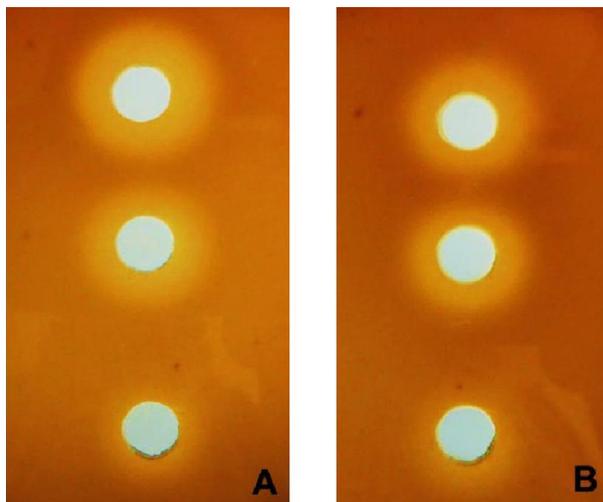
Die präparierten Hämolysine der drei stark hämolysierenden Stämme *B. hyodysenteriae* B204, *B. suanatina* AN4859/03 und *B. hamptonii* 5364-4x/12 wurden bereits bei einer Temperatur von 40 °C innerhalb von 120 min erheblich in ihrer hämolytischen Aktivität gemindert. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 50 °C trat eine vollständige Inaktivierung von allen drei Präparationen auf. Zu dem gleichen Effekt führte in allen drei Fällen eine Inkubation von 15 min bei 60 °C (Tabelle 11).

Die von dem schwach hämolysierenden *B. innocens* 2933-2 präparierten Hämolysine wiesen dagegen bei 20 °C, 40 °C, 50 °C und 60 °C über einen Zeitraum von 2 h eine gleichbleibende Aktivität auf (Tabelle 11, Abbildung 15). Eine den Hämolysinen von *B. innocens* 2933-2 vergleichbare Temperaturstabilität wiesen die Hämolysine des Stammes *B. hyodysenteriae* G423 auf (Tabelle 11). Demnach waren die Hämolysine der stark hämolysierenden Spezies temperaturlabil, da ihre hämolytische Aktivität innerhalb von 15 min bei 60 °C vollständig zerstört wurde. Im Gegensatz dazu erwiesen sich die Hämolysine der schwach hämolysierenden Spezies über einen Zeitraum von 2 h bei 60 °C als temperaturstabil.

Tabelle 11: Temperaturstabilität der präparierten Hämolyse

Spezies Stamm	T [°C]	Hämolytintiter (1./2. Versuch) nach verschiedenen In- kubationszeiten [min]					
		0*	15	30	60	120	
starke Hämolyse	<i>B. hyodysenteriae</i> B204	60	16/16	<1/<1	<1/<1	<1/<1	<1/<1
		50	16/16	4/4	<1/<1	<1/<1	<1/<1
		40	16/16	16/16	16/16	8/8	2/4
		20	16/16	16/16	16/16	16/16	16/16
	<i>B. hampsonii</i> 5364-4x/12	60	16/16	<1/<1	<1/<1	<1/<1	<1/<1
		50	32/16	2/1	<1/<1	<1/<1	<1/<1
		40	32/32	8/4	4/4	1/1	<1/<1
		20	32/16	16/16	16/16	16/16	16/16
	<i>B. suanatina</i> AN4859/03	60	16/16	<1/<1	<1/<1	<1/<1	<1/<1
		50	8/16	1/1	<1/<1	<1/<1	<1/<1
		40	16/16	4/4	4/4	2/4	<1/<1
		20	16/32	16/16	16/16	16/16	16/16
schwache Hämolyse	<i>B. innocens</i> 2933-2	60	2/4	2/4	2/4	2/4	2/4
		50	4/2	4/2	2/2	2/2	2/2
		40	2/4	2/2	2/2	2/2	2/2
		20	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
	<i>B. hyodysenteriae</i> G423	60	2/4	2/4	2/2	2/2	2/2
		50	4/2	4/2	2/2	2/2	2/2
		40	2/4	2/2	2/2	2/2	2/2
		20	2/4	2/2	2/2	2/2	2/2

* = Die Entnahme der 0-Proben erfolgte vor Beginn der Erhitzungsphase; T = Temperatur

Abbildung 15: Temperaturstabilität der Hämolyse von *B. innocens* 2933-2

4 Ergebnisse

Titration der Hämolsinpräparationen (von oben nach unten: unverdünnt, 1:2, 1:4) **A** vor und **B** nach Inkubation für 2 h bei 60 °C.

4.5.2. Hämolytische Aktivität der Hämolsine bei unterschiedlichen Temperaturen

Die Abbildung 16 vermittelt den Einfluss der Temperatur auf die Ausbildung der Hämolyse der präparierten Hämolsine im Hämolsin-Diffusionstest. Wurden die präparierten Hämolsine bei einer Temperatur von 10 °C (Abbildung 16 a) inkubiert, so war innerhalb von 24 h keine Hämolyse sichtbar. Bei 20 °C induzierten die Hämolsinpräparationen der stark hämolysierenden *Brachyspira* spp. einen schmalen Saum unvollständiger Hämolyse. Von den Präparationen der schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp. ging bei dieser Temperatur lediglich eine sehr schwache Aktivität aus (Abbildung 16 b). Bei 37 °C verursachten die Hämolsine der stark hämolysierenden *Brachyspira* spp. einen breiten Ring sH um das Stanzloch herum. Die Stanzlöcher, die mit den Hämolsinen der schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp. befüllt waren, waren umgeben von einem vergleichbar breiten Saum wH. Der bluthaltige Agar war lediglich aufgehellt, aber nicht durchsichtig (Abbildung 16 c). Nach anschließendem Transfer aller Untersuchungsansätze in den Brutschrank und weiterer Inkubation bei 37 °C für 24 h ergab sich folgendes Bild: Die Hämolsine der stark hämolysierenden *Brachyspira* spp., die zuvor bei 10 °C gelagert wurden, induzierten nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C einen doppelt so breiten Saum sH als jene Ansätze, die sofort bei 37 °C inkubiert wurden (Abbildung 16 d). Bei den schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp. konnte dasselbe Phänomen beobachtet werden, bis auf die Tatsache, dass die hämolytische Aktivität geringer war als in den Ansätzen, die sofort bei 37 °C inkubiert wurden (Abbildung 16 d). Ein sehr ähnliches Bild ergab sich bei der Weiterbebrütung der Ansätze der stark hämolysierenden *Brachyspira* spp., die zuvor bei 20 °C gelagert wurden (Abbildung 16 e). Der Randsaum sH nahm um die Stanzlöcher zu. Auch bei den Hämolsinpräparationen der schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp. konnte eine Verstärkung der hämolytischen Aktivität beobachtet werden (Abbildung 16 e). Eine weitere Inkubation der Hämolsine, die initial bei 37 °C gelagert wurden, führte sowohl bei den stark als auch den schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp. nicht zu einer weiteren Ausdehnung der Hämolysezonen (Abbildung 16 f). Die mitgeführten Kontrollplatten, die 96 h bei 10 °C bzw. 20 °C gelagert wurden, wiesen keine Veränderungen auf, d. h. auf den Platten, die bei 10 °C gelagert wurden war weiterhin keine Hämolyse sichtbar. Die Ansätze, die bei 20 °C gelagert wurden wiesen weiterhin nur einen schmalen Saum wH bzw. sH auf. Dieser Saum war bei den Hämolsinen der stark hämolysierenden Spezies weiter nicht vollständig hämolysierend.

Ein weiterer, nur mit *B. hyodysenteriae* B204 durchgeführter Doppelansatz (nicht abgebildet) diente der Beantwortung der Frage, ob die Hämolsine, auch wenn sie bei niedrigen Temperaturen (< 10 °C) keine hämolytische Aktivität aufweisen, dennoch an die Erythrozyten binden

4 Ergebnisse

oder ob dieser Vorgang ebenfalls an das Temperaturoptimum von 37 °C gekoppelt ist. Zwei Aliquots, die aus der Hämolsinpräparation H44 und einer 5 %-igen Schaferythrozyten-Suspension bestanden, zeigten nach 7-stündiger Lagerung bei 8 °C keine Hämolyse. Das Aliquot, welches gewaschen (5 min, 3500 x g, 20 °C) und in frischem PBS resuspendiert wurde, zeigte bei einer nachfolgenden Inkubation von 2 h bei 37 °C auch weiter keine hämolytische Aktivität, während das andere Aliquot, das ohne Waschschrift einen Wechsel der Inkubationstemperatur von 8 °C auf 37 °C erfuhr, nach dem Ende einer zweistündigen Inkubationszeit hämolytisch war. Die Freisetzung von Hämoglobin wurde photometrisch bei einer OD_{540 nm} bestätigt.

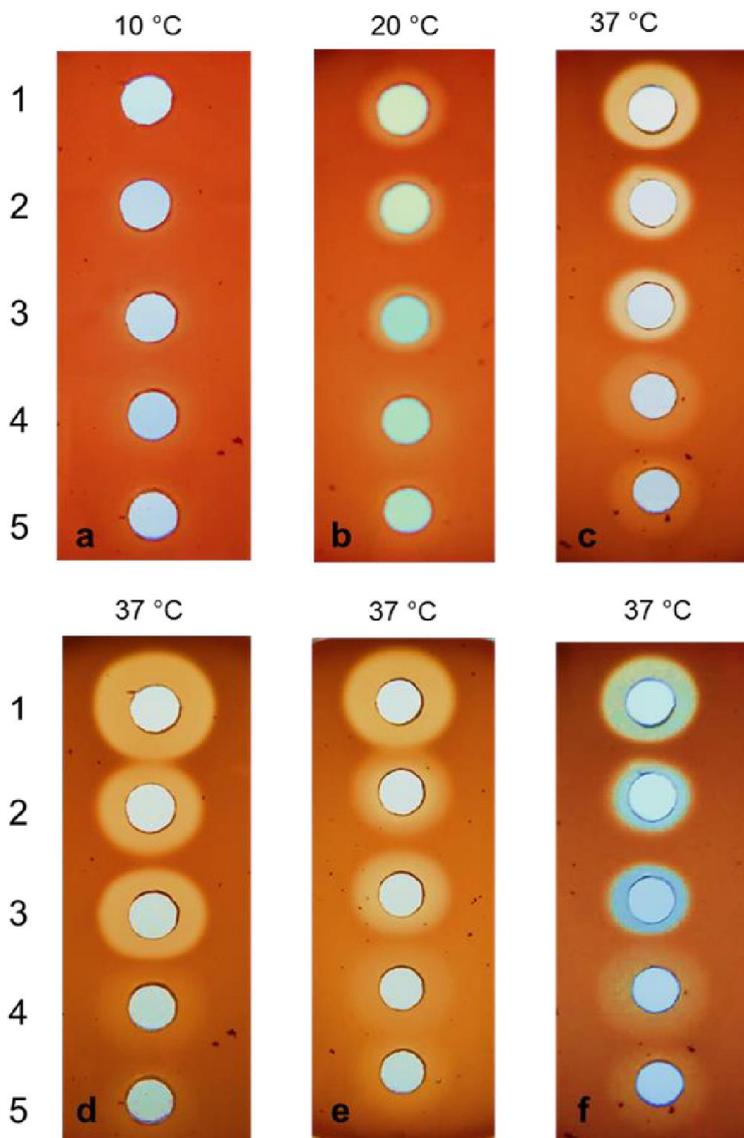


Abbildung 16: Hämolytische Aktivität der Hämolsine stark und schwach hämolsierenden *Brachyspira* spp. bei verschiedenen Temperaturen

16 a-c: Inkubation für 24 h bei 10 °C, 20 °C oder 37 °C. 16 d-f: Nach initialer Inkubation für 24 h weitere Bebrütung für 24 h bei 37 °C 1) *B. hyodysenteriae* B204, 2) *B. hamptonii* 5364-4x/12, 3) *B. suanatina* AN4859/03, 4) *B. innocens* 2933-2, 5) *B. hyodysenteriae* G423.

4.5.3. Freisetzung der Hämolsine und Kinetik der Induktion präparierter Hämolsine

In diesen Versuchen sollte vergleichend untersucht werden, zu welchen Zeitpunkten der Vermehrung stark bzw. schwach hämolysierende *Brachyspira* spp. Hämolsine produzieren, die nachfolgend im Überstand nachgewiesen werden können.

Die Abbildungen 17 – 19 vermitteln die hämolytische Aktivität und die Lebendkeimzahl (WbE_{50}/ml) im Verlauf der Vermehrung der stark hämolysierenden Stämme *B. hyodysenteriae* B204, *B. hampsonii* 5364-4x/12 sowie des schwach hämolysierenden Stammes *B. innocens* 2933-2 in Bouillon. Nachgewiesen wurde die hämolytische Aktivität im Hämolsin-Diffusionstest (s. Punkt 3.4.2). Als Besonderheit konnte bei allen drei stark hämolysierenden Spezies (*B. hyodysenteriae*, *B. hampsonii*, *B. suanatina*) in seltenen Fällen auch schwach hämolysierender Überstand gewonnen werden (Abbildung 19). Im Verlauf der Vermehrung wurden stark hämolysierende Kulturfiltrate nur während der exponentiellen Vermehrungsphase nachgewiesen (Abbildung 17). Zur Bestätigung, dass stark hämolysierende *Brachyspira* spp. ihre Hämolsine immer in der exponentiellen Phase der Vermehrung freisetzen, wurden insgesamt 44 Versuche mit unterschiedlichen *B. hyodysenteriae*-Stämmen durchgeführt. Hämolytische Kulturfiltrate waren dabei ausschließlich zu Beginn bzw. während der exponentiellen Phase der Vermehrung nachweisbar. Bei den schwach hämolysierenden Stämmen *B. innocens* 2933-2 und *B. hyodysenteriae* G423 waren hämolysierende Kulturfiltrate erst in der stationären Phase der Vermehrung nachweisbar (Abbildung 18). Die Skala der X-Achse (Zeitdauer nach Inokulation) in den unten aufgeführten Abbildungen ist dabei durch die zu untersuchende Spezies bestimmt. Schwach hämolysierende Stämme benötigten aufgrund ihres langsamen Wachstums eine längere Beobachtungsdauer. Um zu verifizieren, dass stark hämolysierende Stämme in der stationären Phase keine hämolytisch aktiven Substanzen mehr produzieren, betrug die Beobachtungsdauer bis zu 190 Stunden (Erreichen der Absterbephase).

4 Ergebnisse

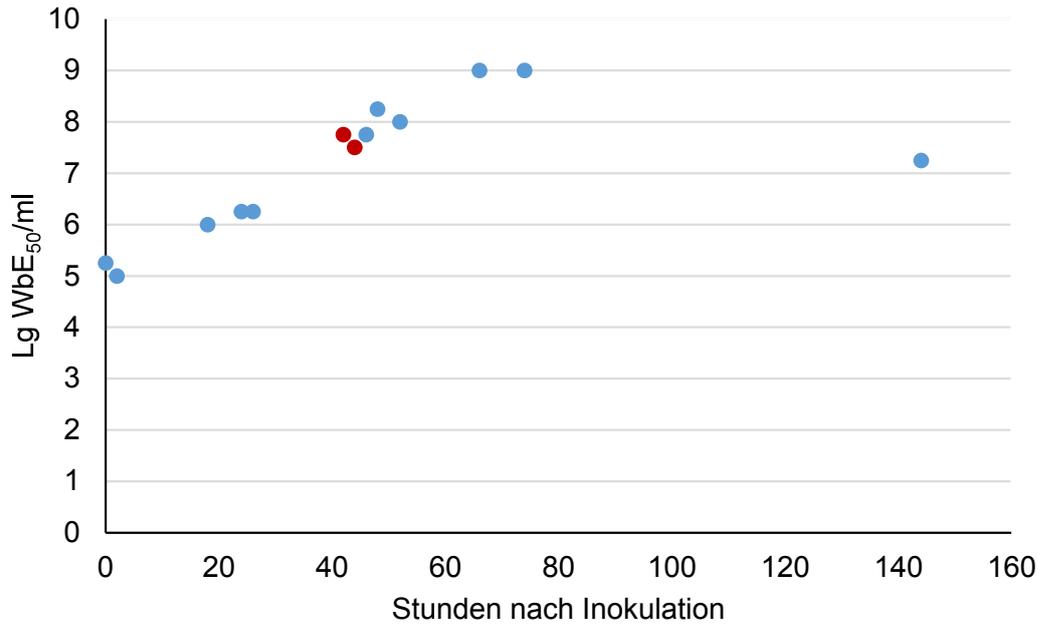


Abbildung 17: Hämolysefreisetzung von *B. hyodysenteriae* B204 im Verhältnis zur Entwicklung der Lebendkeimzahl in Bouillon

Die blauen Punkte markieren die gewählten Zeitpunkte zur Bestimmung der Lebendkeimzahl. Die roten Punkte markieren die Kulturfiltrate, für die im Hämolyse-Diffusionstest eine starke Hämolyse nachgewiesen werden konnte.

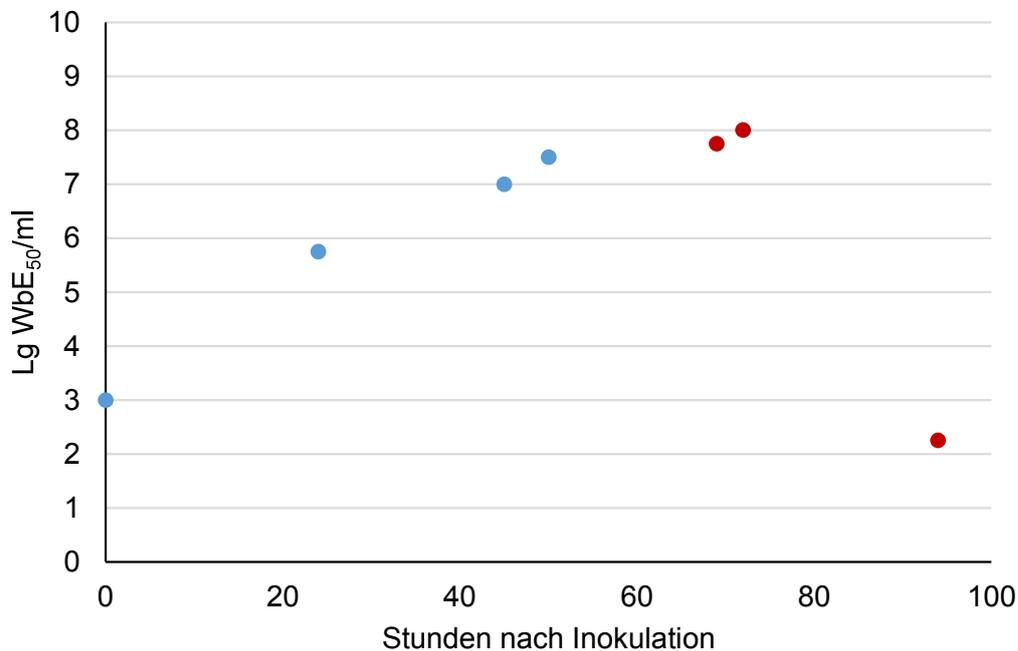


Abbildung 18: Hämolysefreisetzung von *B. innocens* 2933-2 im Verhältnis zur Entwicklung der Lebendkeimzahl in Bouillon

Die blauen Punkte markieren die gewählten Zeitpunkte zur Bestimmung der Lebendkeimzahl. Die roten Punkte markieren die Kulturfiltrate, für die im Hämolyse-Diffusionstest eine schwache Hämolyse nachgewiesen werden konnte.

4 Ergebnisse

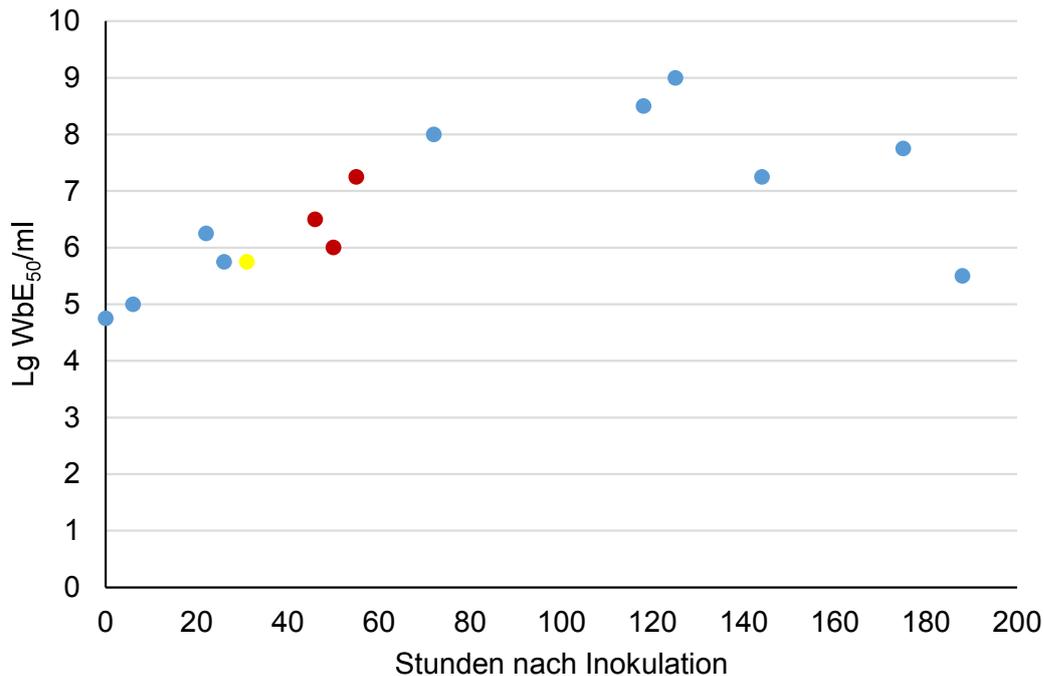


Abbildung 19: Hämolysefreisetzung von *B. hamptonii* 5364-4x/12 im Verhältnis zur Entwicklung der Lebendkeimzahl in Bouillon

Die blauen Punkte markieren die gewählten Zeitpunkte zur Bestimmung der Lebendkeimzahl. Die roten Punkte markieren die Kulturfiltrate, für die im Hämolyse-Diffusionstest eine starke Hämolyse nachgewiesen werden konnte. Der gelbe Punkt steht für eine schwache hämolytische Aktivität im Hämolyse-Diffusionstest.

Wie aus diesem Kapitel hervorgeht, wurden die Hämolsine der schwach hämolyzierenden *Brachyspira* spp. erst während der stationären Vermehrungsphase freigesetzt. Daher sollte geprüft werden, ob hinsichtlich der Ausbildung einer sH bzw. wH ebenfalls der Faktor Zeit eine Rolle spielt. Bei einer entsprechenden Untersuchung im Hämolyse-Diffusionstest waren nach 1 h bei 37 °C sowohl bei den stark als auch den schwach hämolyzierenden *Brachyspira* spp. schmale Zonen einer sH bzw. wH erkennbar (Abbildung 20). Die Hämolysezone belief sich bei den schwach hämolyzierenden Stämmen auf maximal 3,0 mm, während sie bei den stark hämolyzierenden Stämmen bis zu 3,6 mm betrug (Abbildung 20, 2. Bahn von links). Mit zunehmender Zeit (2 bis 7 h) nahmen alle Hämolysezonen im Umfang zu. Bezogen auf die zeitliche Entstehung der Hämolyse konnten zwischen den stark und schwach hämolyzierenden Stämmen keine Unterschiede festgestellt werden. Nach 7 h war die jeweils maximale Ausprägung der Hämolyse entstanden.

4 Ergebnisse

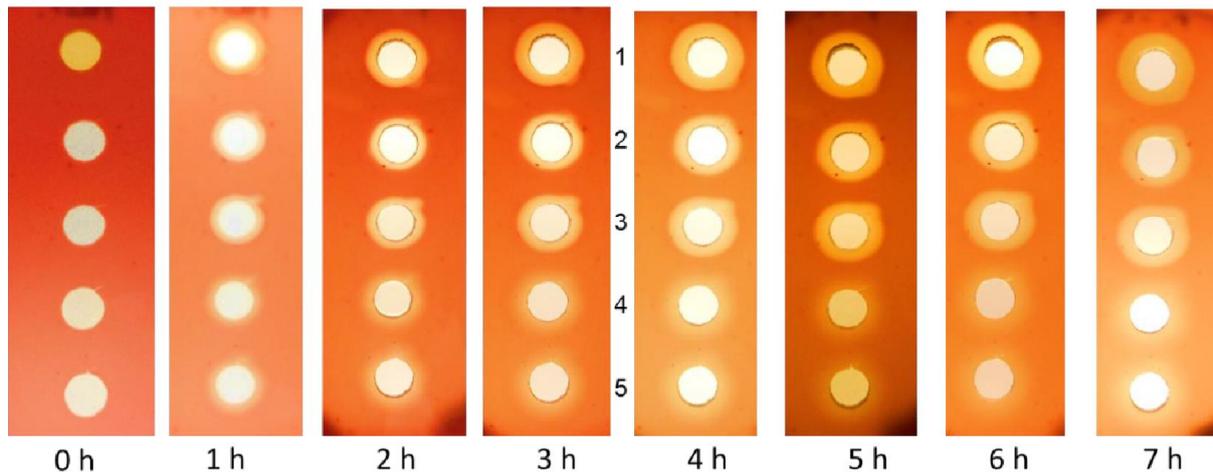


Abbildung 20: Vergleichende Untersuchung zur zeitlichen Entwicklung der starken bzw. schwachen Hämolyse im Hämolsin-Diffusionstest bei 37 °C

Die Entwicklung der Hämolysezone von (1) *B. hyodysenteriae* B204, (2) *B. hampsonii* 5364-4x/12, (3) *B. suanatina* AN 4859/03, (4) *B. innocens* 2933-2 und (5) *B. hyodysenteriae* G423 wurde über einen Zeitraum von sieben Stunden stündlich photographisch dokumentiert.

4.5.4. Hämolytische Aktivität von Kulturfiltraten aus verschiedenen zeitlichen Abschnitten der Vermehrung stark hämolsierender *Brachyspira* spp.

Wie aus Punkt 4.5.3 hervorgeht, setzten die Stämme *B. hyodysenteriae* B204, *B. hampsonii* 5364-4x/12 und *B. suanatina* AN4859/03 nur für einen begrenzten Zeitraum Hämolsine frei (exponentielle Vermehrungsphase). Kulturfiltrate aus der stationären Phase der Vermehrung wiesen keine hämolytische Aktivität auf. Ein derartiges Kulturfiltrat des Stammes B204, bezeichnet als H68, diente der Aufklärung dieses Phänomens. Aus der Abbildung 21 wird ersichtlich, dass bei gemeinsamer Inkubation (1 h, 37 °C) von H68 und den Hämolsinpräparationen der aufgeführten *Brachyspira* spp. die Ausbildung einer Hämolyse vollständig inhibiert werden konnte (Abbildung 21 B).

Diffundierten H68 und die Hämolsine von *B. hyodysenteriae* B204 in Schafblut-haltigen Agarplatten aufeinander zu, entstand das in Abbildung 22 dargestellte Bild. Die ansonsten kreisförmige Diffusionszone der Hämolsine erfuhr auf der dem H68 zugewandten Seite eine geradlinige Unterbrechung. Die dem BHIF^{CVSSR} (Kontrollansatz) zugewandte Diffusionszone der Hämolsine behielt dagegen ihre kreisförmige Gestalt bei.

4 Ergebnisse

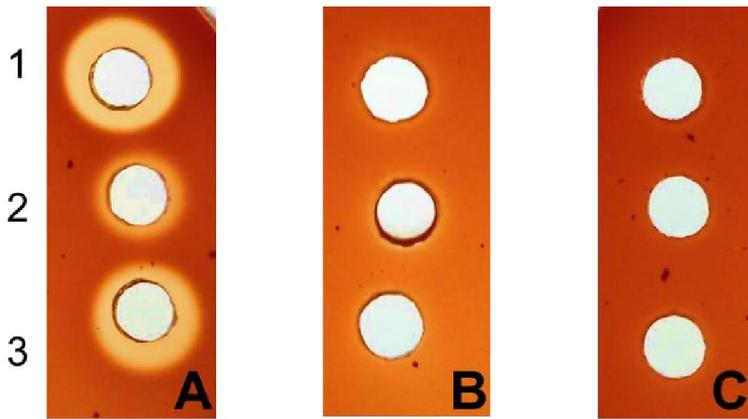


Abbildung 21: Hemmung der Hämolyse stark hämolysierender *Brachyspira* spp. durch das nicht hämolysierende Kulturfiltrat H68 aus der stationären Vermehrungsphase von *B. hyodysenteriae* B204

Hämolysine von (1) *B. hyodysenteriae* B204, (2) *B. hamptonii* 5364-4x/12 und (3) *B. suanatina* AN4859/03. Die Mischungen wurden für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend im Hämolytin-Diffusionstest bei 37 °C für 24 h auf hämolytische Aktivität untersucht. **A** zeigt die hämolytische Aktivität der präparierten Hämolysine, **B** zeigt den Ausfall der Hämolyse nach der Zugabe von H68 zu den jeweiligen Hämolysinpräparationen und **C** zeigt, dass H68 alleine keine hämolytische Aktivität aufweist.

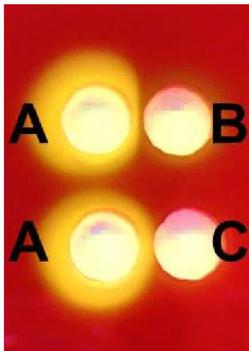


Abbildung 22: Doppeldiffusionstest mit den Hämolysinpräparationen H44 und H68 von *B. hyodysenteriae* B204 und Darstellung der Einschränkung der hämolytischen Zone

Die Hämolysine von (A) *B. hyodysenteriae* B204 verimpft in Nachbarschaft zur Hämolysinpräparation H68 (B) sowie in der unteren Reihe verimpft neben der Kontrolle BHIF^{CVSSR} (C).

4.5.5. Porenbildende Aktivität der Hämolysine

In der Literatur finden sich bereits Hinweise darauf, dass die Hämolysine der Brachyspiren eine porenbildende Wirkung haben. Allerdings weichen die Ergebnisse teilweise voneinander ab, denn wie im Literaturteil (s. Punkt 2.5.1 und 2.5.2) beschrieben, verwendete jede Arbeitsgruppe unterschiedliche Osmoprotektoren zur Testung des Wirkmechanismus der jeweils präparierten Hämolysine. In dieser Arbeit wurden die präparierten Hämolysine mit unterschiedlichen, osmoprotektiv wirksamen Substanzen inkubiert, um die inhibierenden Eigenschaften zu ermitteln. Abweichend vom Hämoglobin-Freisetzungstest musste die Inkubationszeit bei den schwach hämolysierenden Spezies auf 20 Stunden verlängert werden, da es

4 Ergebnisse

erst sehr spät zur Freisetzung von Hämoglobin in den Überstand kam. Als Negativkontrolle (keine Freisetzung von Hämoglobin) wurde physiologische NaCl-Lösung (0,9 %) verwendet. Osmoprotektoren, wie PEG 6000 (30 mM) waren in der Lage, die hämolytische Aktivität der untersuchten Stämme deutlich zu reduzieren. Dieser inhibitorische Effekt konnte im Vergleich zur Negativkontrolle bei den stark hämolysierenden Spezies bereits mit dem bloßen Auge festgestellt werden. Im Gegensatz dazu blieb die Verwendung von Raffinose (504 g/l) ohne inhibitorischen Effekt. Bei dem Stamm *B. hyodysenteriae* B204 wurden weitere Osmoprotektoren mit unterschiedlichen MGs getestet. Hier fiel auf, dass bei der Verwendung von niedermolekularem PEG 1000 (30 mM) oder PEG 1500 (30 mM) keine Inhibition der Hämoglobin-Freisetzung feststellbar war. PEG 4000 (30 mM) bewirkte eine geringgradige Inhibition der Hämoglobin-Freisetzung, welche unter Verwendung von PEG 6000 (30 mM) bzw. PEG 8000 (30 mM) noch weiter zu steigern war. PEG 8000 war sogar in einer 1:2 Verdünnung mit PBS in der Lage die Hämoglobin-Freisetzung aus den Schaferythrozyten zu inhibieren. Die Hämolysepräparationen der schwach hämolysierenden Spezies zeigten ein ähnliches Ansprechen auf die verwendeten Osmoprotektoren, hier war allerdings eine makroskopische Bestätigung im Sinne einer verminderten Rotfärbung des Überstandes nicht möglich. Die Extinktionswerte aus dem Doppelansatz sind in der Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12: Hemmung der Aktivität der Hämolysine verschiedener *Brachyspira* spp. durch Osmoprotektoren nach einer 1-stündigen (stark hämolysierende Spezies) bzw. 20-stündigen (schwach hämolysierende Spezies) Inkubation bei 37 °C

Osmoprotektor	Hämolysine der Spezies [Extinktionswert des jeweiligen Hämolyse-Osmoprotektor-Gemischs bzw. des Hämolyse-NaCl-Gemischs]				
	<i>B. hyodysenteriae</i> B204	<i>B. hamptonii</i> 5364-4x/12	<i>B. suanatina</i> AN 4859/03	<i>B. innocens</i> 2933- 2	<i>B. hyodysenteriae</i> G423
PEG 6000 (30 mM)	0,166/0,101	0,082/0,99	0,072/0,080	0,06/0,070	0,079/0,085
Raffinose (540 g/l)	0,418/0,380	0,177/0,197	0,255/0,265	0,089/0,090	0,099/0,110
NaCl 0,9 %	0,385/0,367	0,303/0,325	0,318/0,323	0,104/0,110	0,097/0,108

Das Gemisch aus Hämolyse und physiologischer NaCl-Lösung (0,9 %) stellt die Negativkontrolle dar.

4.5.6. CAMP-Phänomen präparierter Hämolyse

Für den Nachweis eines Faktors (CAMP-Faktor), der die wH des β -Hämolyse von *S. aureus* verstärken soll, diente der unter Punkt 3.4.9 beschriebene modifizierte CAMP-Test. In diesem Test diffundierten das von *S. aureus* präparierte lösliche β -Hämolyse (Abbildung 23) und die von den stark und schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp. präparierten hämolysierenden Kulturfiltrate im TSA^{CVSSR}-Nährboden mit 5 % Schafblut aufeinander zu.

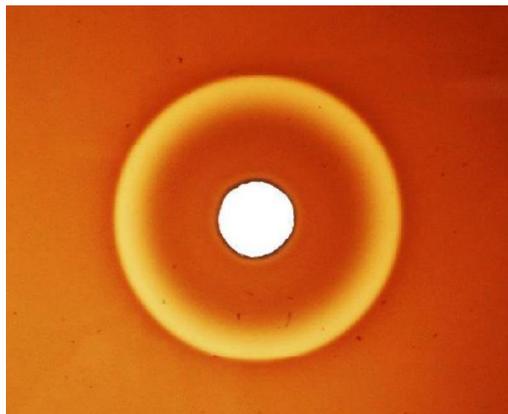


Abbildung 23: Darstellung des von *S. aureus* präparierten β -Hämolyse im Diffusionstest auf einem TSA^{CVSSR}-Nährboden

Das β -Hämolyse wurde in die ausgestanzte Vertiefung pipettiert und diffundiert während einer 72-stündigen Inkubation (37 °C) in den Agar. Auf dem Bild ist die schwache Hämolyse im Bereich der Diffusionszone zu sehen.

Bei der Untersuchung der Hämolyse der stark und schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp. im modifizierten CAMP-Test war bei allen untersuchten Hämolysepräparationen eine Verstärkung der β -Hämolyse von *S. aureus* in unterschiedlicher Ausprägung nachweisbar (Abbildung 24). Alle einbezogenen stark hämolysierenden *Brachyspira*-Stämme (*B. hyodysenteriae* B204, *B. hamptonii* 5364-4x/12, *B. suanatina* AN4859/03) sowie die schwach hämolysierenden Stämme *B. innocens* 2933-2 und *B. hyodysenteriae* G423 sezernierten während ihrer Vermehrung in Bouillon einen CAMP-ähnlichen Faktor. Wie aus der Abbildung 24 ersichtlich wird, lag der Verstärkungsbereich bei den stark hämolysierenden Spezies außerhalb des Diffusionsbereiches der Hämolyse, welches die sH auslöste. Erst mit Abstand zu der Hämolysezone trat die wie ein Diskus geformte Verstärkung des β -Hämolyse auf. Auf die vollständige Hämolysezone der Hämolyse von *B. hamptonii* 5364-4x/12 und *B. suanatina* AN4859/03 folgte eine Zone mit wH. Die Abbildung 24 veranschaulicht, dass der für die Verstärkung der β -Hämolyse verantwortliche Faktor diesem Bereich entspringt. Bei *B. hyodysenteriae* B204 fehlte im Anschluss an die sH dieser Bereich der wH, ein CAMP-Phänomen

4 Ergebnisse

war dennoch vorhanden. Bei der Untersuchung der Hämolsine der schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp. zeigte sich, dass der CAMP-Effekt direkt am Stanzloch (Abbildung 24 B) und somit direkt am Diffusionsursprung der wH begann und sich halbmondförmig auf den gesamten Diffusionsbereich des β -Hämolsins von *S. aureus* erstreckte.

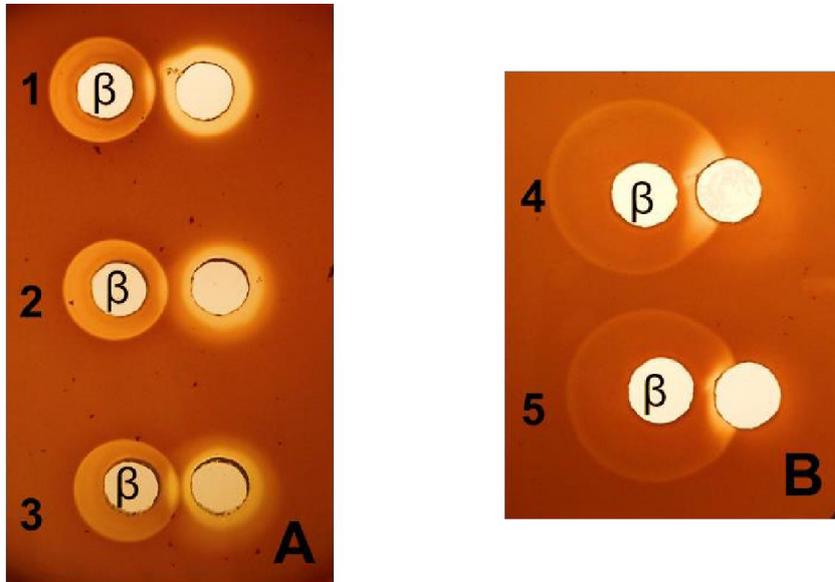


Abbildung 24: Modifizierter CAMP-Test unter Verwendung der Hämolsinpräparationen stark (A) und schwach hämolysierender (B) *Brachyspira* spp. sowie eines löslichen β -Hämolsins (β) von *S. aureus*

Die Stanzlöcher enthalten die präparierten Hämolsine von (1) *B. hyodysenteriae* B204, (2) *B. hamptonii* 5364-4x/12, (3) *B. suanatina* AN4859/03, (4) *B. innocens* 2933-2 und (5) *B. hyodysenteriae* G423 und bewirken alle eine Verstärkung des *S. aureus* β -Hämolsins.

4.5.7. Zytotoxische Aktivität von *B. hyodysenteriae*-Stämmen in CrFK-Zellen

Die in Punkt 4.5.3 dargestellten Ergebnisse belegen eine zeitlich limitierte Freisetzung der Hämolsine während der Vermehrung von *B. hyodysenteriae* in Bouillon. Der Frage nach einer möglichen Freisetzung von Zytotoxinen wurde methodisch mit gleicher Strategie nachgegangen, d. h. zu verschiedenen Zeiten nach Inokulation der Bouillon wurden Proben entnommen und vergleichend auf ihre hämolytische und zytotoxische Aktivität überprüft. Bei den ersten Versuchen zur Bestimmung der Zytotoxizität wurde angenommen, dass die Zytotoxine zeitgleich mit den Hämolsinen auftreten. Erst in weiteren Versuchen erfolgte eine Testung des Überstandes aus der stationären bzw. Absterbephase. Hieraus ergeben sich die in den Tabellen 13 – 15 aufgeführten variablen Untersuchungszeitpunkte.

Wie aus den aufgeführten Ergebnissen (Tabelle 13 - 15) hervorgeht, wurden insgesamt 52 Versuchsansätze mit unterschiedlichen *B. hyodysenteriae*-Stämmen sowie Modifikationen der BHIF-Bouillon durchgeführt. Mit Ausnahme von drei Versuchsansätzen konnten in den übrigen

4 Ergebnisse

49 Versuchsansätzen Hämolyse im Überstand detektiert werden. Zytotoxische Kulturfiltrate waren lediglich in 17 von 52 Versuchsansätzen (32 %) nachweisbar. In der Abbildung 25 ist ein zytotoxischer Effekt sowie eine unbeimpfte Kontrollkultur der Zelllinie CrFK zu sehen. Aus den 52 Versuchsansätzen standen insgesamt 341 Kulturfiltrate aus unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten zur Verfügung. Zwischen den Kulturfiltraten variierte der Zytotoxizitätstiter von 2 bis 128 und in insgesamt 36 Kulturfiltraten (10%) konnte zytotoxische Aktivität nachgewiesen werden. In 26 Fällen lagen Titer von 2 vor, in drei Versuchen ein Titer von 4, in sechs Versuchsansätzen ein Titer von 8 und in einem Fall konnte ein Titer von 128 erzielt werden. Unter Zugrundelegung jener Versuchsansätze, in denen Zytotoxizität auftrat (n = 17), erwiesen sich zehn Kulturfiltrate als gleichzeitig hämolytisch und zytotoxisch. 26 Kulturfiltrate wiesen nur eine zytotoxische Aktivität auf. Letztere stammten nahezu ausschließlich aus der Phase der stationären Vermehrung (> 90 h *p.i.*). In den vorliegenden Versuchen war der Nachweis von Zytotoxinen ebenso an die Passagezahl gekoppelt, sodass der Stamm B204 nach 90 Passagen keine zytotoxische Aktivität aufwies (Tabelle 13).

Werden die in Tabelle 13 aufgeführten Versuche, die mit dem Zusatz von fünf Antibiotika in der Nährbouillon durchgeführt wurden (s. Punkt 3.1.3) jenen gegenübergestellt, die in Antibiotika-freier Nährbouillon erfolgten, wird ersichtlich, dass von 41 Versuchen mit Antibiotika in 13 Versuchsansätzen Kulturfiltrate mit zytotoxischer Eigenschaft nachgewiesen wurden, wohingegen bei elf Versuchsansätzen ohne den Zusatz von Antibiotika fünf Versuchsdurchgänge zytotoxische Zellkulturfiltrate generierten. Letztere entstammten jedoch in überwiegender Zahl aus einem Zeitraum weit nach der hämolytischen Phase der Vermehrung (90 bis 188 h *p.i.*), der in den Versuchen mit Antibiotika nicht erfasst wurde. Mit Ausnahme des Stammes B204 konnte bei keinem anderen *B. hyodysenteriae*-Referenzstamm (Tabelle 18, Serotyp-Referenzstämme, n = 8) während der Vermehrung zytotoxische Aktivität nachgewiesen werden (Tabelle 14). Von den insgesamt 17 Versuchen, bei denen die BHIF^{CVSSR}-Bouillon zur Vermehrung von *B. hyodysenteriae* hinsichtlich der Milieubedingungen oder der Inkubationstemperatur modifiziert wurde, wurden insgesamt zehn Versuchsdurchgänge ermittelt, in denen zytotoxische Kulturfiltrate nachweisbar waren (Tabelle 15). Diese entfielen auf einen Versuch, in dem *B. hyodysenteriae* B204 mit *B. murdochii* 2142-8 und *B. innocens* 2933-2 kokultiviert wurde, beide Versuche mit Zusatz von Hefe-RNS im Medium, beide Versuche mit Zusatz von Schweinefäzesextrakt (PFE), drei Versuche mit Zusatz von Extrakten aus *Bacteroides* sp. und/oder *Fusobacterium* sp. sowie auf zwei von drei Versuchen, die bei 40 °C durchgeführt wurden. In fünf dieser zehn Versuche mit dem Nachweis einer zytotoxischen Aktivität trat diese erst nach 90-stündiger Inkubation auf. Im Rahmen der Vermehrung schwach hämolsierender Stämme konnte kein Zytotoxin nachgewiesen werden.

4 Ergebnisse

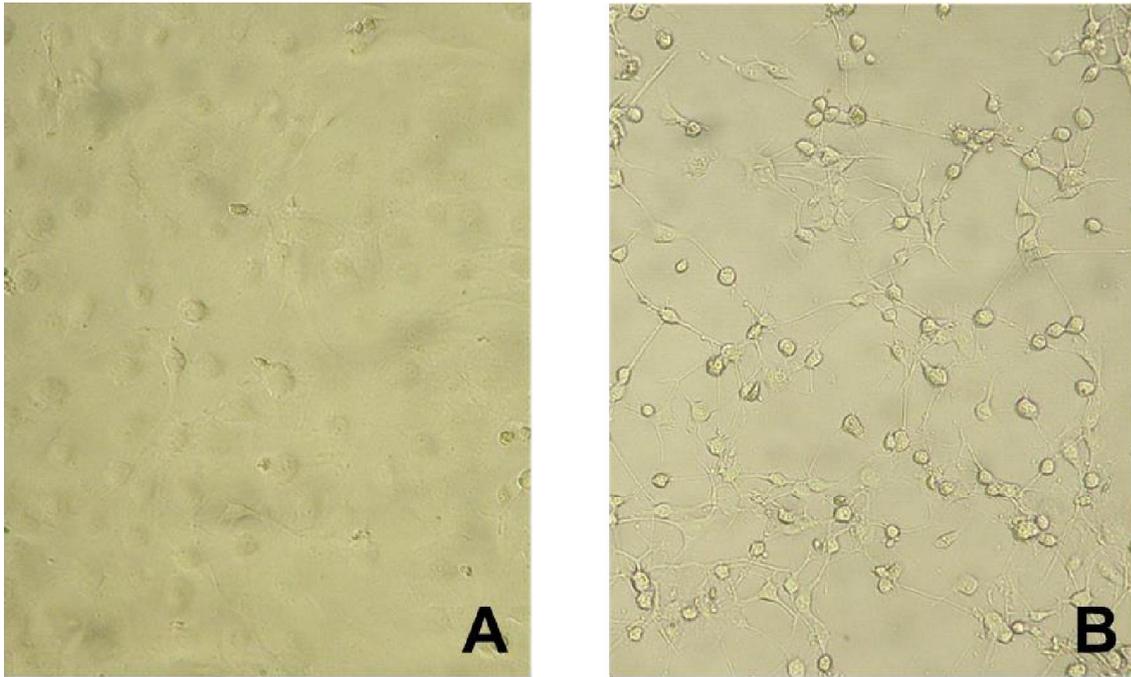


Abbildung 25: Zytotoxischer Effekt in CrFK-Zellen durch zytotoxische Kulturfiltrate von *Brachyspira* spp. (B) im Vergleich zur unbeimpften Kontrollkultur (A)

Tabelle 13: Hämolytische und zytotoxische Aktivität von Kulturfiltraten während der Vermehrung von *B. hyodysenteriae*-Stamm B204 verschiedener Passagen in Bouillon mit und ohne Zusatz von Antibiotika unter Verwendung der Zellkulturlinie CrFK

Passage des <i>B. hyodysenteriae</i> - Stammes B204	Zusatz von Antibiotika	Hämolyse und Zytotoxizität von Kulturfiltraten während der Vermehrung in Bouillon [h]											
		0	2-8	16-22	24-28	31-47	48-55	66-78	90-96	99-125	139-151	165-188	
P8	ja	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H+	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H-/Z-
		H-/Z-	H-/Z-	H+	H+	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-
		H-/Z-	H-/Z-	H+, Z+ T2	H+	H+	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-
P14	ja	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H+, Z+ T8	Z+ T128	Z+ T8	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-
		H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H+	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-
		H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H+	H+	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H-/Z-
		H-/Z-	H+	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H+	H+	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-
		H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H+, Z+ T2	H+, Z+ T2	H+	H+	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-
		H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-
		H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H+	H+	H+	H+	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-
		H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-
		H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-
		H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-
		H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-
		H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-
P90	ja	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H+	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-
		H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H+	H+	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	
		H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H+	H+	H+	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	H+/Z-	
		H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	

Tabelle 14: Hämolytische und zytotoxische Aktivität von Kulturfiltraten während der Vermehrung diverser *B. hyodysenteriae*-Stämme in Bouillon unter Zusatz von Antibiotika und Verwendung der Zellkulturlinie CrFK

<i>B. hyodysenteriae</i> -Stamm und Passage	Hämolyse und Zytotoxizität von Kulturfiltraten während der Vermehrung in Bouillon [h]										
	0	2-8	16-22	24-28	31-47	48-55	66-78	90-96	99-125	139-151	165-188
B8044 P15	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H+	H+	H+	H-/Z-	H+	H+	H+	H-/Z-
B6933 P15	H-/Z-	H+	H+	H+	H+	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-
B169 P21	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H+	H+	H-/Z-	H+	H+	H+	H-/Z-
Ack 300/8 P15	H-/Z-	H+	H+	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-
A1 P25	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H+	H+	H-/Z-	H+	H+	H+	H-/Z-
Vic2 P5	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H+	H+	H-/Z-	H+	H+	H+	H-/Z-
NSW1 P5	H-/Z-	H+	H+	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-
B78 P5	H-/Z-	H+	H+	H+	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-

H+ = hämolytische Aktivität in den Zellkulturfiltraten (Hämolyisin-Diffusionstest), H- = keine hämolytische Aktivität in den Zellkulturfiltraten (Hämolyisin-Diffusionstest), Z = zytotoxische Aktivität in den Zellkulturfiltraten und die Zahl hinter T (Titer) repräsentiert den gemessenen Titer, Z- = keine zytotoxische Aktivität in den Zellkulturfiltraten (Titer < 2), leere Felder = Zeitpunkt wurde nicht untersucht.

Tabelle 15: Hämolytische und zytotoxische Aktivität von Kulturfiltraten während der Vermehrung von *B. hyodysenteriae*-Stamm B204 verschiedener Passagen in Bouillon unter Einfluss verschiedener Milieufaktoren (Modifikationen) und dem Zusatz von Antibiotika und Verwendung der Zellkulturlinie CrFK

Passage des <i>B. hyodysenteriae</i> -Stammes B204	Modifikation des Nährmediums	Hämolyse und Zytotoxizität von Kulturfiltraten während der Vermehrung in Bouillon [h]									
		0	2-8	16-22	24-28	31-47	48-55	66-78	90-96	99-125	
P8	0,25 % Hefe-RNS	H-/Z-	H-/Z-	H+	H+	H+	H+, Z+ T2	Z+ T2	Z+ T2	Z+ T2	
	0,1 % Hefe-RNS	H-/Z-	H+	H+	H+	H+	H+	Z+ T2	H-/Z-		
P14	Kokultur <i>B. innocens</i> und <i>B. murdochii</i>	H-/Z-	H-/Z-	H+	H+, Z+ T2	H+, Z+ T2	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-		
	<i>E. coli</i> -Extrakt	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H+	H+	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-		
	<i>Enterococcus faecalis</i> -Extrakt	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H+	H+	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-		
	1 ml PFE	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H+	H+	Z+ T2	Z+ T2		
	2 ml PFE	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H+	H+	H-/Z-	Z+ T2		
	0,1 ml IPTG	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H+	H+	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-		
0,5 ml IPTG	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-			

Tabelle 15: Hämolytische und zytotoxische Aktivität von Kulturfiltraten während der Vermehrung von *B. hyodysenteriae*-Stamm B204 verschiedener Passagen in Bouillon unter Einfluss verschiedener Milieufaktoren (Modifikationen) und dem Zusatz von Antibiotika und Verwendung der Zellkulturlinie CrFK (Fortsetzung)

Passage des <i>B. hyodysenteriae</i> -Stammes B204	Modifikation des Nährmediums	Hämolyse und Zytotoxizität von Kulturfiltraten während der Vermehrung in Bouillon [h]									
		0	2-8	16-22	24-28	31-47	48-55	66-78	90-96	99-125	
P14	Bacteroides- und Fusobacterium-Extrakt	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H+	Z+ T2			
	Bacteroides-Extrakt	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H+	Z+ T2	Z+ T2		
	Fusobacterium-Extrakt	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H+	Z T2			
	43 °C (Durchgang 1)	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H+	H+				
	43 °C (Durchgang 2)	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H-/Z-	H+	H+				
	40 °C (Durchgang 1)	H-/Z-	H-/Z-	H+	H+	Z+ T2-4	Z+ T2-8				
	40 °C (Durchgang 2)	H-/Z-	H+	H+	Z+ T2	Z+ T2					
	40 °C (Durchgang 3)	H-/Z-	H+	H+	H-/Z-	H-/Z-					

H+ = hämolytische Aktivität in den Zellkulturfiltraten (Hämolyisin-Diffusionstest), H- = keine hämolytische Aktivität in den Zellkulturfiltraten (Hämolyisin-Diffusionstest), Z = zytotoxische Aktivität in den Zellkulturfiltraten und die Zahl hinter T (Titer) repräsentiert den gemessenen Titer, Z- = keine zytotoxische Aktivität in den Zellkulturfiltraten (Titer < 2), leere Felder = Zeitpunkt wurde nicht untersucht.

4.6. Hämolyisin-inhibierende Antikörper in Antiseren *B. hyodysenteriae*-infizierter Schweine und vakzinierter Kaninchen

In einer Voruntersuchung wurde zunächst die eigenhämolytische Aktivität der verwendeten Schweine- bzw. Kaninchenseren ausgeschlossen. Somit konnten alle ausgewählten Seren im Hämolyisin-Inhibitions-Test (s. Punkt 3.5.1) untersucht werden. Die Seren verursachten in dem Test eine Hämoglobin-Freisetzung, die zu einer Extinktion von 0,14 bei OD₅₄₀ nm führte. Dies entsprach dem Wert der Extinktionsmessung nach Inkubation des Hämolyisingemisches von H68 und H44 (gemeinsam nicht hämolysierend) mit den Erythrozyten. Die Herkunft der Antiseren kann Punkt 3.1.5 entnommen werden. Der Versuchsaufbau ist in der Tabelle 16 beschrieben. Alle Extinktionswerte der Schweine- (Tabelle 20) und Kaninchenseren (Tabelle 21) sind im Anhang gelistet.

Bei der Untersuchung der Schweineseren lagen bezogen auf H44 als Positivkontrolle (Hämolyse) die gemessenen relativen Extinktionen in der 1:2-Verdünnung zwischen 60,78 % (Schweineserum Nr. 2, 28 d *p.i.* mit *B. hyodysenteriae* B204) und 139,66 % (Schweineserum Nr. 4, 6 d *prae inf.* mit *B. hyodysenteriae* B204). Von den 32 Schweineseren waren in sieben Seren *p.i.* Hämolyisin-inhibierende Antikörper nachweisbar, die zu einer Reduktion der relativen Extinktion zwischen 22,5 - 36,5 % führten. Die höchste Reduktion von 36,5 % war mit dem Schweineserum Nr. 6 (Tag 28 *p.i.* mit *B. hyodysenteriae* G153) zu erzielen. Im Serum eines weiteren Schweines (Nr. 5), welches auch mit dem Stamm G153 infiziert wurde, konnte an Tag 28 *p.i.* keine reduzierte Hämoglobin-Freisetzung nachgewiesen werden. Von den drei Seren der Schweine, die mit dem *B. hyodysenteriae*-Stamm G21 infiziert wurden, war nur das Serum des Schweines Nr. 23 *p.i.* in der Lage die Hämoglobin-Freisetzung um 23,1 % zu reduzieren. Gegen den Stamm G44 lagen in einem von zwei Schweineseren (Nr. 25) 35 Tage *p.i.* Hämolyisin-inhibierende Antikörper vor, die zu einer Reduktion der Hämoglobin-Freisetzung um 26 % führten. In Seren, die von Schweinen nach Infektion mit den Stämmen G101 (n = 3) oder G189 (n = 3) stammten, fanden sich keine Hämolyisin-inhibierenden Antikörper. Gegen den im HIT als homologes Antigen verwendeten Stamm B204 reagierten vier von 19 Schweineseren (Schweineserum Nr. 2, 4, 18 und 20) mit einer Reduktion der Hämoglobin-Freisetzung von 22,5 - 32,6 %. Es gab auch Fälle, in denen die Seren bereits *prae inf.* eine inhibierende Wirkung auf die Hämolyisinpräparation H44 hatten. Hier sind besonders die Seren der Schweine Nr. 7 und 12 zu nennen, bei denen die Freisetzung von Hämoglobin im Vergleich zu H44 bei unter 70 % lag. Mit den Seren der nicht-infizierten Kontrollschweine (n = 8), war in einem Fall eine Reduktion der Hämoglobin-Freisetzung um 20 % feststellbar. Bei der statistischen Auswertung dieser Untersuchungsergebnisse wurden zunächst nur die Ergebnisse für den Stamm *B. hyodysenteriae* B204 (n = 19) aus den Infektionsversuchen 1 bis 4 berücksichtigt. Die Extinktionswerte lagen *p.i.* in allen vier Verdünnungsstufen unter den Werten *prae inf.*,

4 Ergebnisse

erreichten dabei aber nicht die Grenze zur Signifikanz (p lag zwischen 0,08 und 0,55). In einer zweiten Auswertung wurden alle sechs *B. hyodysenteriae*-Stämme einbezogen. Hier zeigte sich gemittelt über alle Stämme ein schwach signifikanter Effekt ($p = 0,041$) in der ersten Verdünnungsstufe (1:2) bezüglich der Werte *prae inf.* und *p.i.*, d. h., dass *p.i.* eine Reduktion der Hämoglobin-Freisetzung nachvollziehbar war. Dieser Effekt war auch in der zweiten Verdünnungsstufe noch nachweisbar ($p = 0,048$), verlor sich dann aber in den nachfolgenden Verdünnungen. Ein Unterschied in der Virulenz der sechs untersuchten *B. hyodysenteriae*-Stämme konnte mit den vorhandenen Daten nicht nachgewiesen werden ($p > 0,05$). In der Abbildung 26 ist in der Verdünnung 1:2 der Nachweis Hämolyisin-inhibierender Antikörper gemessen an der Reduktion der Hämolyse *prae inf.* und *p.i.* der 32 Schweineseren dargestellt.

Im Testansatz zum Nachweis Hämolyisin-inhibierender Antikörper erreichten die photometrisch bestimmten relativen Hämoglobinkonzentrationen (Extinktionswerte) in der 1:2-Verdünnung der Kaninchenseren Werte von 18,5 % (Kaninchenserum Nr. 13, 0 d *prae. vac.*) bis 98,5 % (Kaninchenserum Nr. 12, 0 d *prae vac.*) in Relation zu der Hämoglobin-Freisetzung durch die Hämolyisinpräparation von *B. hyodysenteriae* B204 (H44). Beim Vergleich der 25 Kaninchen, die mit Ganzzelllysaten von *B. hyodysenteriae* vakziniert wurden, war in sechs Kaninchenseren ein Anstieg der Hämolyisin-inhibierenden Antikörper nachvollziehbar. Im Serum des Kontrolltieres, das mit einem *B. innocens*-Stamm immunisiert wurde, fand keine Antikörperbildung statt. Mit zwei von drei Seren der Kaninchen (Nr. 8 und 12), die mit dem *B. hyodysenteriae*-Stamm NSW1 immunisiert wurden, war *p.vac.* eine Reduktion der Hämoglobin-Freisetzung um knapp 30 % zu erzielen. Eine Immunisierung gegen den *B. hyodysenteriae*-Stamm G38 (Kaninchenserum Nr. 16) führte *p.vac.* zu einer Reduktion von 28,4 %, während nach Immunisierung gegen das Ganzzelllysate des *B. hyodysenteriae*-Feldstammes G98 (Kaninchenserum Nr. 22) eine 42 %-ige Reduktion der Hämoglobin-Freisetzung erzielt wurde. Nach der Immunisierung mit dem *B. hyodysenteriae*-Stamm G64 (Kaninchenserum Nr. 19) erfolgte eine Reduktion um 52,8 %. Nach der Immunisierung mit *B. hyodysenteriae* B204 (Kaninchenserum Nr. 23) konnte eine 60,5 %-ige Reduktion der Extinktion erzielt werden. Mit den Antiseren von Kaninchen, die mit den Stämmen *B. hyodysenteriae* A1 ($n = 2$), B8044 ($n = 2$), B6933 ($n = 2$) oder Ack 300/8 ($n = 2$) vakziniert wurden, konnte keine Reduktion der Hämoglobin-Freisetzung *p.vac.* ermittelt werden. Nach der Vakzination mit Ganzzelllysaten konnte in keiner der vier Verdünnungsstufen der untersuchten Kaninchenseren ein signifikanter Effekt zwischen den Ergebnissen vor und nach der Immunisierung festgestellt werden. In der Abbildung 27 ist in der Verdünnung 1:2 ein Vergleich der Hämolyisin-inhibierenden Antikörper *prae* und *p.vac.* der 25 Kaninchenseren aus den Impfversuchen mit Ganzzelllysaten von *B. hyodysenteriae* dargestellt.

4 Ergebnisse

Tabelle 16: Übersicht über die verwendeten *B. hyodysenteriae*-Stämme bei den Infektions- bzw. Impfversuchen mit Schweinen/Kaninchen

<i>B. hyodysenteriae</i> -Stamm	Versuchsdurchgang (Schwein)	Serotyp	Sequenztyp (MLST)	Anzahl Serumpaare	
Versuche mit Schweinen	B204	1, 2, 3, 4	2	54	19
	G153	1	n. u.	123	2
	G21	4	n. b.	8	3
	G44	5	n. b.	117	2
	G101	5	n. u.	113	3
	G189	5	n. u.	n. u.	3
Versuche mit Kaninchen	A1		4	88	2
	B8044		5	24	3
	B6933		6	26	2
	Ack 300/8		7/5/2	5	2
	NSW1		n. u.	33	3
	Vic2		n. u.	30	1
	G21		n. b.	8	1
	G3		n. b.	112	1
	G38		n. b.	112	1
	G44		n. b.	117	1
	G47		n. u.	112	1
	G64		n. b.	112	1
	G88		n. b.	52	1
	G91		n. b.	112	1
	G98		n. b.	52	1
	B204		2	54	1
	B78		1	56	1
B169		3	59	1	

n. b. = nicht bekannt da keine Reaktion mit den Antiseren gegen die Serotypen 1-7; n. u. = nicht untersucht

4 Ergebnisse

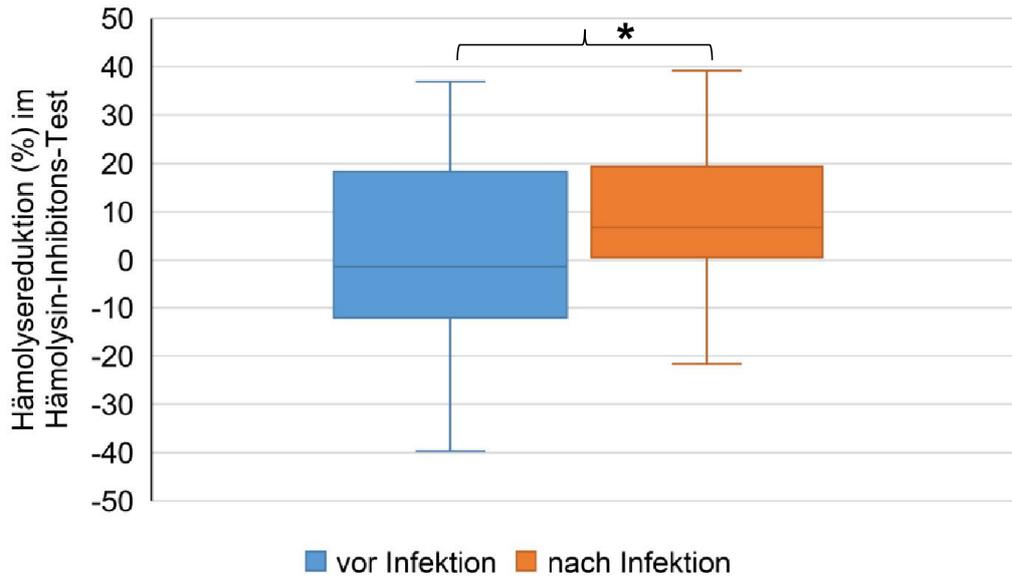


Abbildung 26: Nachweis Hämolysin-inhibierender Antikörper in Schweineseren (n = 32) vor und nach experimenteller Infektion mit stark hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämmen (n = 6) im Hämolysin-Inhibitions-Test (HIT)

Der Gehalt an Antikörpern vor bzw. nach Infektion unterscheidet sich signifikant ($p = 0,041$).

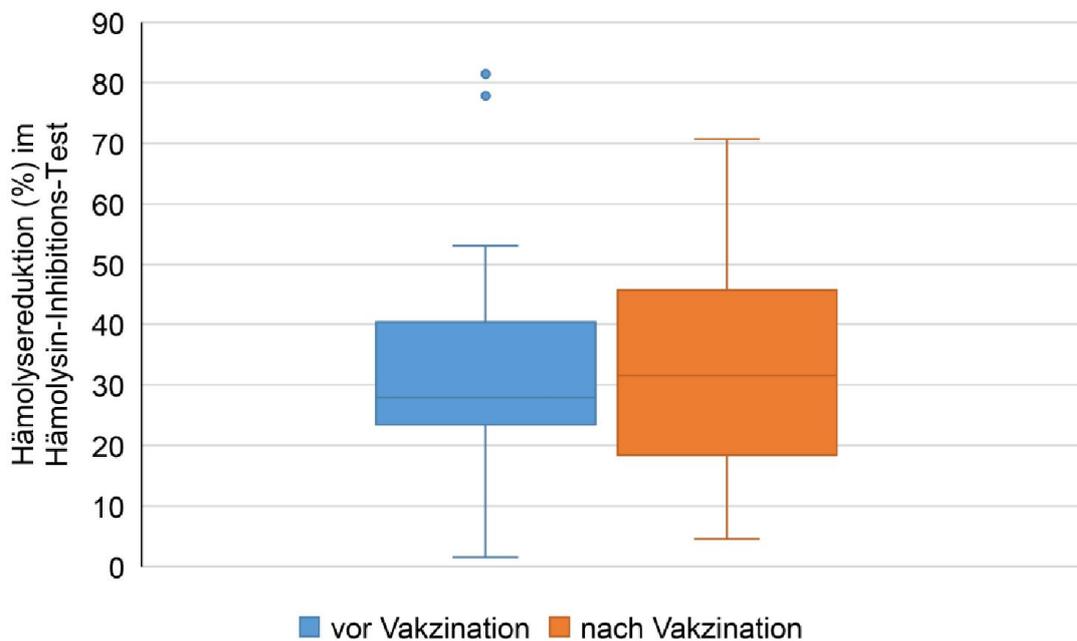


Abbildung 27: Nachweis Hämolysin-inhibierender Antikörper in Kaninchenseren (n = 25) vor und nach Vakzination mit Ganzzelllysaten stark hämolysierender *B. hyodysenteriae*-Stämme (n = 18) im Hämolysin-Inhibitions-Test (HIT)

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration der Antikörper vor bzw. nach Vakzination gefunden werden.

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es zunächst einen Überblick über die Phylogenie des Erregers *B. hyodysenteriae* zu erhalten. Bei *B. hyodysenteriae* handelt es sich um einen Erreger mit wirtschaftlicher Bedeutung (= Erreger der Schweinedysenterie). Zudem existieren weitere *Brachyspira* spp., die schwach hämolysierend sind und ein geringes oder gar kein Virulenzpotential aufweisen, daher sollte zum anderen der Mechanismus der Hämolysen und der Zytotoxizität sowohl molekularbiologisch als auch phänotypisch näher untersucht werden. Mit Hilfe der Multilokus-Sequenztypisierung sollten erstmals *B. hyodysenteriae*-Stämme aus Deutschland, die zwischen 1990 und 2016 isoliert wurden, in den globalen phylogenetischen Kontext der Spezies eingeordnet und mögliche Korrelationen zwischen STs und Virulenzmerkmalen des Erregers aufgezeigt werden. Im Rahmen der Pathogenese der SD haben die für die sH verantwortlichen Hämolsine/Zytotoxine der verursachenden Spirochäten *B. hyodysenteriae*, *B. suanatina* und *B. hamptonii* große Bedeutung. Die Aufklärung der Genese des hämolysischen Phänotyps hat in Relation zu anderen Themen, wie z.B. der molekularbiologischen Charakterisierung der Erreger bis dato jedoch nur geringe wissenschaftliche Beachtung erhalten, ist aber nach wie vor eine wichtige Fragestellung. Der mangelnde Fokus mag u.a. darin liegen, dass die anaerobe Anzucht des Erregers zwischen drei und fünf Tagen dauert, sodass phänotypische Untersuchungen mit einem hohen Zeitaufwand verbunden sind. Zusätzlich sollte die Präparation der Hämolsine zu verschiedenen Zeitpunkten der Vermehrung stattfinden, um in einer nachfolgenden Titration den Zeitpunkt der maximalen Hämolsinkonzentration zu bestimmen. Die nicht vorhersehbare Wachstumskinetik und die unvermeidbare Sauerstoffbelastung bei der Entnahme von Proben bedingen eine biologische Varianz innerhalb der Versuche. Im Rahmen von molekularbiologischen Untersuchungen können deutlich schneller größere, publizierbare Datenmengen generiert werden. In dieser Arbeit sollte unter der Verwendung verschiedener Methoden ein Beitrag zur Aufklärung der beteiligten Hämolsingene an der sH, der Antigenität der Hämolsine und der phänotypischen Besonderheiten der starken Hämolsine geleistet werden. Letztlich sollte nach Generierung aller Daten versucht werden, mögliche Korrelationen zwischen den Sequenztypen und den Virulenzgenen der *B. hyodysenteriae*-Stämme herauszuarbeiten.

5.1. Populationsstruktur von *B. hyodysenteriae*

Populationsstruktur ausgewählter *B. hyodysenteriae*-Stämme

Bei der Untersuchung der Populationsstruktur (s. Punkt 4.2) von *B. hyodysenteriae* mittels MLST konnten die Stämme unterschiedlichen STs zugeordnet werden. Mit Hilfe der generierten STs könnten u.U. Infektionswege aufgedeckt werden und/oder die Ausbreitung des Erregers nachvollzogen werden. Ähnliches wurde bereits von Hampson et al. (2015) für *B. hyodysenteriae* diskutiert. In der Studie ging es um die Möglichkeit, mit Hilfe der MLST Sequenztypen zu diskriminieren, die über eine reduzierte Antibiotika-Empfindlichkeit verfügen, was tatsächlich in verschiedenen nachfolgenden Studien gelang (Rugna et al., 2015; Gasparini et al., 2017; Mahu et al., 2017; Joerling et al., 2018). So galten STs, die sich in den klonalen Komplexen CC2 und CC7 gruppieren, als besonders empfindlich gegenüber den geprüften Pleuromutilin-Antibiotika (Rugna et al., 2015). Von besonderem epidemiologischen Wert ist zudem, dass durch die vorliegende Untersuchung erstmalig eine große Menge an MLST-Daten von *B. hyodysenteriae*-Stämmen aus Deutschland, das im Jahr 2018 der zweitgrößte Schweinproduzent Europas war (https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-datasets/-/apro_mt_lspig), zur Verfügung gestellt werden konnten.

Von den 127 untersuchten *B. hyodysenteriae*-Stämmen war ein Großteil den Sequenztypen ST8, ST52 oder ST112 zuzuordnen. Die Tatsache, dass neben ST112 noch zwölf weitere, bisher in der mit globalen Stämmen gespeisten MLST-Datenbank nicht beschriebene, STs gefunden wurden, spricht für ein primär diverses Bild der Spezies *B. hyodysenteriae*. Bei näherer Analyse der nachgewiesenen STs wurde deutlich, dass das Vorhandensein vieler STs nicht gleichbedeutend mit einer hohen Heterogenität des Erregers ist, sondern, dass es sich vielmehr um eine klonale Spezies handelt, die sich durch das Auftreten neuer Einzellokus-Varianten (SLVs) auszeichnet. Dies trifft für ST116, ST131 und ST193 zu, die dem CC52 zugeordnet wurden. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass es sich beim Auftreten unterschiedlicher STs auf demselben Betrieb zumeist um SLVs, d. h. genetisch nah verwandte STs, die sich lediglich in einem von sieben Allelen unterscheiden, handelt (Rugna et al., 2015). Unter den 15 STs, denen die Stämme aus Deutschland zugeordnet werden konnten, fanden sich sechs „singletons“, d. h. es handelte sich hierbei um STs, die noch keinem klonalen Komplex zugeordnet werden konnten und sich in mehr als einem Allel, z.T. in bis zu sechs Allelen voneinander unterscheiden (ST113, ST115, ST117, ST121, ST122 und ST123). Weitere Typisierungsstudien könnten die Verwandtschaft dieser „singletons“ durch Zuordnung in klonale Komplexe aufzeigen. Im Gegensatz dazu stellten ST112, ST114, ST118 und ST120 STs dar, die jeweils in unterschiedliche CCs eingruppiert wurden.

5 Diskussion

Auffallend war, dass in den unterschiedlichen geographischen Gebieten der Welt auch unterschiedliche STs gefunden werden können. Vor allem Stämme aus europäischen Ländern zeigten hinsichtlich ihrer ST-Zugehörigkeit kaum Überschneidungen mit Stämmen aus nicht-europäischen Ländern. Innerhalb der Sequenztypen ST8 und ST52 befanden sich beispielsweise ausschließlich Stämme aus europäischen Ländern, was dem innergemeinschaftlichen Handel geschuldet zu sein scheint, wie es bereits in der Literatur erwähnt (Osorio et al., 2012; Rugna et al., 2015) und in dieser Studie bestätigt wurde. Ein Großteil der in Deutschland kursierenden STs ist somit nicht geographisch begrenzt, sondern folgt den europäischen Wirtschaftswegen. Der Handel birgt jedoch auch die Gefahr der Verbreitung von Antibiotikaresistenten und/oder stark virulenten Stämmen. Der Nachweis gleicher STs auf unterschiedlichen Betrieben wird in der Literatur oft als Folge einer leichten Übertragbarkeit des Erregers zwischen verschiedenen Betrieben interpretiert (La et al., 2009b; Mirajkar und Gebhart, 2014). Entsprechend haben sich infolge von Handelsbeschränkungen in den verschiedensten Regionen der Welt (Abbildung 4) bestimmte STs herausgebildet, die dort exklusiv auftreten. Ein gutes Beispiel hierfür ist der ST36, der vermutlich aufgrund eines, seit Mitte der 1980er Jahre ausgesprochenen, Importverbotes für Schweine (La et al., 2016a) bislang nur auf Australien beschränkt ist. Ähnliches gilt auch für die in dieser Arbeit neu beschriebenen ST112 und ST120. Beide STs kommen bislang nur in Deutschland und Belgien (ST112) oder Italien (ST120) vor.

In dieser Arbeit konnte eine temporäre Verteilung einiger STs festgestellt werden. So wurden Stämme, die den ST53 (Vereinigte Staaten), ST57 (Vereinigtes Königreich) oder ST59 (Kanada) repräsentieren, nur in den 1970er Jahren gefunden, während Stämme mit dem ST84 (Italien) erstmalig im Jahr 2006 nachgewiesen wurden. Ein Großteil der STs wurde erst ab dem Jahr 2010 nachgewiesen. Dies mag daran liegen, dass ein MLST-Schema für *Brachyspira* spp. erstmals im Jahr 2007 von Råsbäck et al. publiziert wurde und ältere Stämme retrospektiv nicht typisiert wurden. Die temporäre Verteilung der STs kann zum einen als Hinweis für phylogenetische Veränderungen des Erregers gewertet werden. Genauso möglich ist jedoch, dass die temporäre Verteilung der STs durch den Eintrag neuer genetischer Linien oder durch Eradikation einzelner STs bedingt ist. So könnten STs, die nur in einzelnen Jahren nachgewiesen wurden (z.B. ST64 in den Jahren 2006/07) darauf hindeuten, dass bspw. durch die Gabe von Antibiotika eine Selektion durchgeführt wurde. Dass Bakterienstämme, die unterschiedlichen STs zugehören, aufgrund ihrer genetischen Ausstattung unterschiedlich sensibel auf Antibiotika reagieren können, ist aus der Humanmedizin bekannt. Hier zeigten sich mittlerweile 23 % der Meningokokken des ST11-Komplexes als nicht mehr sensibel gegenüber Penicillinen, während nur 5 % der Meningokokken des ST41/44-Komplex eine Resistenz

5 Diskussion

aufwiesen (GERMAP 2015, 2016). Im Rein-Raus-Verfahren könnte ein ST am Ende des Mastdurchgangs durch nachfolgende Reinigung und Desinfektion ebenso aus dem Bestand verdrängt worden sein. Inwiefern Unterschiede in der Tenazität der unterschiedlichen STs von *B. hyodysenteriae* vorliegen ist nicht bekannt, jedoch könnte dies eine weitere Ursache für das zeitlich begrenzte Vorkommen bestimmter STs darstellen. In der Humanmedizin haben Untersuchungen an *Enterococcus faecium* gezeigt, dass die meisten krankenhausassoziierten Stämme dem ST17 (CC17) angehörten und eine höhere Tenazität aufwiesen als non-CC17-Sequenztypen (bspw. ST29, ST32). Als mögliche Ursache für die höhere Tenazität wurde, neben der Vancomycin-Resistenz, das Insertionselement IS16 diskutiert. Dieses Element könnte ein höheres Level genetischer Variabilität ermöglichen, einschließlich dem Erwerb mobiler Elemente, die das Überleben in ökologischen Nischen unterstützen könnten (Werner et al., 2011b). Bezogen auf bestimmte Regionen könnte der scheinbare Wegfall bestimmter STs jedoch schlicht der Tatsache geschuldet sein, dass keine weiteren Typisierungen von *B. hyodysenteriae*-Stämmen erfolgt sind. Letztlich bleibt dies jedoch hypothetisch. Es existieren viele STs, die erst nach der Jahrtausendwende nachgewiesen wurden. Dazu zählen u.a. ST93, der 2010 erstmals erwähnt wurde und bislang geographisch auf die Vereinigten Staaten beschränkt ist. Dasselbe gilt für den ST96, der in den Jahren 2010 - 2013 in den Vereinigten Staaten isoliert werden konnte. Unter den europäischen Ländern fällt Italien mit dem ST74 auf, der seit der Jahrtausendwende bekannt ist. Daneben existieren nur wenige STs, die ausschließlich in den 1970er Jahren nachgewiesen wurden. Dazu zählen ST5, ST10, ST53, ST57, ST58 und ST59. Diese STs wurden überwiegend in Kanada oder Großbritannien nachgewiesen. Für diese beiden Länder existieren derzeit nur sehr wenige Daten, sodass es fraglich ist, ob Stämme mit diesen STs seit den 1980er Jahren tatsächlich nicht mehr vorkommen. Neben dem zeitlich unterschiedlichen Nachweis der STs weist das Auftreten von SLVs daraufhin, dass *B. hyodysenteriae* einer phylogenetischen Änderung unterliegt. Sowohl der Wegfall als auch das Neuauftreten von SLVs, DLVs (Doppellokus-Varianten) oder TLVs (Tripellokus-Varianten) kann eine Anpassungsreaktion des Erregers an sich ändernde Umweltbedingungen darstellen. Nennenswert ist hier bspw. der fehlende Nachweis von Stämmen, die dem CC64 (Australien, nur im Jahr 2007 nachgewiesen) zugeordnet werden können. Ausgehend vom ST52, der erstmals in den 1990er Jahren nachgewiesen wurde, entstanden sieben weitere STs (ST51, ST79, ST80, ST116, ST131, ST193, ST203), die jeweils SLVs (ST51, ST79, ST116, ST131) oder DLVs (ST80, ST193, ST203) des ST52 darstellen. Zeitlich betrachtet konnten alle Varianten, bis auf ST51 in den 1990er Jahren, erst nach 2004 isoliert werden. Neuere Studien belegen, dass mit dem Auftreten weiterer SLVs zu rechnen ist. In der Studie von Gasparrini et al. (2017) stellten neun der zwölf neuen STs Lokus-Varianten bereits bekannter STs dar.

5 Diskussion

In diese Studie wurden insgesamt 100 Betriebe eingeschlossen, von denen sechs Betriebe wiederholt Kotproben zur Untersuchung auf *B. hyodysenteriae* einsendeten. Bei der Typisierung dieser Stämme konnte in einem Untersuchungszeitraum von maximal 19 Monaten auf den sechs Betrieben jeweils derselbe ST nachgewiesen werden. Die Ursachen hierfür können vielfältig sein. Zum einen ist eine erhöhte Tenazität von Stämmen diesen STs möglich. Genauso wahrscheinlich ist ein erneuter Eintrag durch Zukauf aus Betrieben mit kolonisierten Tieren oder über Schädner/Wildvögel. In einer Studie aus Finnland, die sich mit dem Vorkommen von *Campylobacter jejuni* auf finnischen Geflügelbetrieben beschäftigte, wurden zwischen 2004 und 2012 378 Stämme mittels MLST oder PFGE typisiert. Hier konnte gezeigt werden, dass 46 von durchschnittlich 135 Betrieben (nicht jeder Betrieb schlachtete jedes Jahr) über mehrere Jahre *Campylobacter jejuni*-positives Geflügelfleisch erzeugten. Bei näherer Untersuchung konnte in 34 Betrieben derselbe ST nachgewiesen werden, jedoch änderte sich fast immer das PFGE-Profil, weshalb eine persistente (Eintrags-)Quelle (z.B. Mitarbeiter, Insekten oder Schädner) ausgeschlossen wurde (Llarena et al., 2015). Eine nähere Betriebsanamnese der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Schweinehaltenden Betriebe erfolgte nicht, sodass keine Informationen über Quarantänemaßnahmen, Zukäufe, einem Rein-Raus-Verfahren bzw. dem Einsatz von Antibiotika vorlagen. Weiterführend wäre zu untersuchen, ob es sich bei jedem mehrfach nachgewiesenen ST auch um denselben Stamm handelt (PFGE oder WGS). Dann wäre tatsächlich von einer Persistenz auszugehen. Parallel konnte auf den sechs Betrieben festgestellt werden, dass es auf zwei Farmen mit gleichbleibendem ST zum Anstieg der Antibiotika-Resistenz gegenüber Pleuromutilinen kam (Joerling et al., 2018).

Mit Hilfe der MLST konnte nachgewiesen werden, dass neben einer klonalen Ausbreitungstendenz auch Hinweise auf eine Mikroevolution des Erregers *B. hyodysenteriae* vorliegen. Dies zeigt sich in dem Auftreten neuer „singletons“ und den STs, die klonalen Komplexen zugeordnet werden können, aber Locus-Varianten des Gründer-STs darstellen. Unterschiedliche STs sind z.T. auf einzelne geographische Lokalisationen beschränkt. Infolge des ständigen Selektionsdrucks ist mit dem Auftreten neuer STs zu rechnen. Um eindeutig von einer klonalen Spezies reden zu können, müsste ein größeres Stammkollektiv untersucht werden. Für andere typische bakterielle Erreger beim Schwein, wie bspw. *Actinobacillus pleuropneumoniae* oder *Mycoplasma (M.) suis* finden sich in der MLST-Datenbank (<https://pubmlst.org/databases/>) keine Einträge, sodass eine Vergleichbarkeit der Klonalität bakterieller Erreger beim Schwein nicht möglich ist. Es existieren Bestrebungen des Imperial College London ein MLST-Schema für *Actinobacillus pleuropneumoniae* zu generieren. Bei den Spezies *M. hyorhinis* und *M. hyopneumoniae* existieren zu wenig Daten (< 300 Stämme), sodass auch hier nur Hypothesen zur Klonalität vorliegen. Bei *M. hyorhinis* handelt es sich laut einer Studie aus Frankreich, in

der 28 Feldstämme aus unterschiedlichen Regionen Frankreichs untersucht wurden, um eine schwach klonale Spezies (Tocqueville et al., 2014).

Durch den vermehrten Nachweis von schwach hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämmen konnte eine internationale Arbeitsgruppe erstmals nachweisen, dass die schwach hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämme eine phylogenetische Untergruppe innerhalb der Spezies *B. hyodysenteriae* darstellen (Card et al., 2019). Diese Gruppierung sei möglicherweise die Folge des erhöhten Selektionsdrucks aufgrund strenger Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen, des Rein-Raus-Verfahrens und/oder der Anwendung von Antibiotika. Da die schwach hämolysierenden Stämme bislang nicht aus Schweinen mit SD isoliert wurden, wird ihnen eine reduzierte Virulenz nachgesagt. Daraus resultierend könne es zu einer erhöhten Persistenz im Schweinebestand kommen und nachfolgend zu einer Vermehrung und Ausscheidung über den Wirt (Card et al., 2019). Der schwach hämolysierende Stamm G423 aus der vorliegenden Arbeit konnte keinem ST zugeordnet werden, da das im MLST-Schema inkludierte *thi*-Fragment nicht amplifiziert werden konnte. Mittels WGS könnte verifiziert werden, ob das *thi*-Gen in diesem Stamm tatsächlich fehlt oder ob es aufgrund von Primer-Fehlpaarungen zu einem falsch-negativen Ergebnis kam.

5.2. Molekularbiologischer Nachweis der acht Hämolysingene

Entsprechend einer früheren Studie handelt es sich bei den Hämolysingenen um konservierte Gene innerhalb der Spezies *B. hyodysenteriae* (Black et al., 2015). Die acht Hämolysingene (*tlyA*, *tlyB*, *tlyC*, *hlyA*, *BHWA1_RS02195*, *BHWA1_RS02885*, *BHWA1_RS04705* und *BHWA1_RS09085*) der in der genannten Studie untersuchten Stämme, die überwiegend aus den Vereinigten Staaten und Australien stammten, kamen in allen untersuchten Stämmen vor und wiesen Ähnlichkeiten in ihrer NS-Sequenz von 97,6 bis 100 % auf. Dies wurde durch eine Studie aus Belgien belegt, die bei der Untersuchung von stark hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämmen (n = 8) neben dem regelmäßigen Vorkommen der Hämolysingene keine Abweichungen in der AS-Sequenz der Hämolysine TlyA-C, HlyA und BHWA1_RS02885 feststellen konnte (Mahu et al., 2016). In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob das regelmäßige Vorkommen auch für Stämme, die vornehmlich aus Deutschland stammten, gilt. Eine weitere Frage zielte darauf ab, ob anhand der NS-Sequenzen der Hämolysingene Unterschiede herausgearbeitet werden können, die sich für Korrelationsversuche zwischen den Hämolysingenen und dem Genotyp eignen. Mit Hilfe des Mantel-Testes sollte die Frage einer möglichen Koevolution der Hämolysingene mit den „Housekeeping“-Genen, die als Bestandteil des Kerngenoms gelten, untersucht werden. Aus den Ergebnissen könnte abgeleitet

werden, ob die Hämolysingene fest im Genom verankert sind oder ob eine Übertragung zwischen den Stämmen möglich sein könnte. Abschließend erfolgte die Analyse der Transkription der Hämolysingene vergleichend in einem stark bzw. schwach hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stamm.

Hämolysingenmuster bei stark und schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp.

Tatsächlich verfügten alle 175 in dieser Arbeit mittels PCR untersuchten *B. hyodysenteriae*-Stämme über das gesamte Set von acht Hämolysingenen (s. Punkt 4.3.1). Auch die serielle Subkultivierung verschiedener *B. hyodysenteriae*-Stämme über 150 Passagen führte weder zum Verlust der acht Hämolysingene noch zu einer Reduktion des hämolytischen Phänotyps (W. Herbst, persönliche Mitteilung). Dies unterscheidet *B. hyodysenteriae* bspw. von *S. aureus*. Letzterer zeigte nach einer sechswöchigen Passagierung (Anzahl der Passagen nicht bekannt) im Vergleich zum Wildtypstamm (α -Toxin-Titer 2500 U/ml) einen fünffach geringeren α -Toxin-Titer (Somerville et al., 2002). Bei *B. suanatina*, *B. hampsonii* sowie den schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp. waren nicht alle acht Hämolysingene unter Verwendung der anhand der NS-Sequenzen der Hämolysingene von *B. hyodysenteriae* konzipierten Primer mittels PCR nachweisbar. Zumindest hinsichtlich der stark hämolysierenden *Brachyspira* spp. bestand zu Beginn dieser Arbeit die Hypothese, dass dieselben Hämolysingenmuster wie bei *B. hyodysenteriae* zu finden seien. Tatsächlich zeigte sich im Rahmen der nachfolgenden *in silico*-Analyse an Genomen verschiedener *Brachyspira* spp., dass alle stark und schwach hämolysierenden Stämme über das gesamte Spektrum der acht Hämolysingene verfügten und der fehlende Nachweis auf die mangelnde Sensitivität einzelner PCRs zurückzuführen war.

Nukleinsäuresequenzen der Hämolysingene ausgewählter *B. hyodysenteriae* Stämme

Unter den *B. hyodysenteriae*-Stämmen aus Deutschland, die in dieser Arbeit untersucht wurden, konnten Ähnlichkeiten der NS-Sequenzen zwischen 97,77 % und 100 % ermittelt werden (s. Punkt 4.3.1.1, Tabelle 6). Dies untermauert die Ergebnisse aus früheren Untersuchungen (Mahu et al., 2016). Zudem bestätigen diese hohen Ähnlichkeiten die Studie von Black et al. (2015), nach der die Hämolysingene zu den stark konservierten Genen bei *B. hyodysenteriae* zählen. Die eigenen Sequenzierungen der Hämolysingene von 32 *B. hyodysenteriae*-Stämmen deckten bei einem Stamm (ST121) einen AS-Austausch im Protein TlyA an der Position 195 auf, der bislang noch nicht beschrieben wurde und sich nach Modellvorhersagen in einem α -Helix-Bereich befindet (<https://swissmodel.expasy.org/>). Einschränkend ist hier zu beachten, dass die Vorhersage auf einem ähnlichen Protein beruht und keine 100%-ige Übereinstimmung mit der AS-Sequenz des TlyA von *B. hyodysenteriae* vorlag. Bei den Proteinen HlyA und

5 Diskussion

TlyC konnten in den untersuchten Stämmen keine Abweichungen zum Referenzstamm *B. hyodysenteriae* WA1 festgestellt werden. Bei TlyB konnten drei bislang nicht beschriebene Austauschungen in der AS-Sequenz an den Positionen 44, 120 und 781 festgestellt werden. Im Rahmen der Sequenzierungen der Hämolysingene wurde auch der schwach hämolysierende Stamm G423 mit einbezogen. Hier war das Hämolysin TlyB an der AS-Position 441 (Glutaminsäure → Alanin) sowohl in dem schwach hämolysierenden Stamm G423 als auch in einem anderen stark hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stamm mutiert, sodass es unwahrscheinlich ist, dass diese Mutation die Funktionalität des TlyB verändert. Da von der Spezies *B. hyodysenteriae* zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit erst wenige Gesamtgenom-Sequenzen vorlagen ($n = 20$, Black et al., 2015), war die Entdeckung neuer Mutationen als wahrscheinlich anzusehen und kann auch im Rahmen der Sequenzanalysen weiterer Stämme aus unterschiedlichen Ländern erwartet werden. Ein Vergleich umfangreicher Sequenzdaten stark und schwach hämolysierender *B. hyodysenteriae*-Stämme könnte mglw. relevante Mutationen, je nach Lokalisation mit Auswirkung auf die Funktionalität eingrenzen.

Die vorliegenden Ergebnisse haben gezeigt, dass der Nachweis von Mutationen, sei es auf NS- oder AS-Ebene, zumindest bei den 32 untersuchten stark hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämmen keine Auswirkung auf die Ausprägung der sH hat. Obwohl trotz der zufälligen Auswahl der Stämme eine mögliche Beeinflussung des Ergebnisses erwogen werden muss, ist davon auszugehen, dass eine andere zufällige Auswahl von Stämmen zu demselben Resultat geführt hätte. Allerdings erfolgte diesbezüglich keine statistische Absicherung.

Beim Vergleich der in der NCBI Datenbank verfügbaren NS-Sequenzen der Hämolysingene fiel auf, dass innerhalb der Spezies *B. hyodysenteriae* hohe Ähnlichkeiten ($\geq 97,6\%$) zwischen den Hämolysingenen bestanden (Tabelle 7 und Tabelle 24). Vergleiche zu den schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp. ergaben dagegen weit niedrigere Ähnlichkeiten in ihren NS-Sequenzen ($\geq 80,1\%$). An dieser Stelle muss darauf hingewiesen werden, dass die Hämolysingene anderer Spezies als *B. hyodysenteriae* über eine variable Länge verfügten, was Auswirkungen auf die Funktionalität haben könnte. Neben der Länge des Proteins ist für dessen Funktionalität die Struktur bedeutend. Derzeit existieren keine Strukturdaten zu den genannten Hämolysinen, sodass keine Vorhersagen über den Einfluss der Mutationen auf die Aktivität der Proteine getroffen werden können (Card et al., 2019). Untersuchungen zur Tertiär- und Quartärstruktur könnten Aufschluss darüber geben, welche Strukturelemente essenziell für die Funktion des jeweiligen Hämolysins sind. Auf Ebene der Primärstruktur ist bekannt, dass Proteine in verschiedenen Isoformen vorkommen (z.B. fünf Isoenzyme der L-Laktatdehydrogenase im menschlichen Körper), sodass Abweichungen in der AS-Sequenz nicht mit einem Funktionsverlust gleichgesetzt werden müssen. Hingegen können Änderungen der Raumstruktur zu erheblichen Funktionsausfällen führen. Aus der Humanmedizin ist ein bekanntes

5 Diskussion

Beispiel für eine Proteinfehlfaltung mit nachfolgendem Funktionsverlust die Phenylketonurie. Diese Erkrankung des AS-Stoffwechsels ist die Folge einer Fehlfaltung des Enzyms Phenylalaninhydroxylase infolge einer Punktmutation (Gersting et al., 2008). Von den in dieser Arbeit untersuchten Hämolysingenen wiesen *tlyA* und *hlyA* bei allen untersuchten *Brachyspira* spp. dieselbe Länge auf. Eine spezieübergreifende Funktion ist somit möglich. Beispielsweise ergab die *in silico*-Analyse, dass das *hlyA* bei der schwach hämolysierenden Spezies *B. pilosicoli* über maximal zwei AS-Austausche verfügte (Position 52 Asparaginsäure → Glutaminsäure und Position 59 Glutaminsäure → Asparaginsäure). Inwieweit diese Mutationen eine Beeinflussung der Funktion nach sich ziehen ist zum aktuellen Zeitpunkt nicht geklärt. Ebenso wenig konnte anhand der Sequenzdaten bestätigt werden, ob es sich bei *hlyA* um den Vermittler der sH handelt, wie es bislang vermutet wurde (Hsu et al., 2001). Die Ähnlichkeit bei den stark hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämmen sowie dem schwach hämolysierenden *B. intermedia*-Stamm PWS/A bezüglich des *hlyA*-Gens lag bei 100 %, obwohl beide Spezies einen unterschiedlichen Hämolysetyp aufwiesen. Auch der schwach hämolysierende *B. hyodysenteriae*-Stamm D28 aus Belgien (Mahu et al., 2016) besaß keinerlei Mutationen im *hlyA*, dennoch fehlte die phänotypisch charakteristische sH. Was die anderen Hämolysingene betraf, lagen unterschiedliche Ähnlichkeiten der entsprechenden NS-Sequenzen zwischen den untersuchten *Brachyspira* spp. und dem Referenzstamm *B. hyodysenteriae* WA1 vor. Auffallend war zum einen, dass die Ähnlichkeiten - den Erwartungen entsprechend - von den stark hämolysierenden zu den schwach hämolysierenden Spezies abnahmen, wobei die Spezies *B. intermedia* eine Ausnahme bildete. Eine Verwandtschaftsanalyse, basierend auf dem Vergleich von 16S rRNS-Gen-Sequenzen, bestätigte die enge Beziehung zwischen *B. hyodysenteriae*- und *B. intermedia*-Stämmen, da beide Spezies derselben Gruppe zugeordnet wurden (Pettersson et al., 1996). Da kürzlich auch über *B. hyodysenteriae*-Stämme berichtet wurde, die eine wH ausbilden, existiert auf phänotypischer Basis keine Unterscheidungsmöglichkeit zwischen *B. hyodysenteriae* und *B. intermedia*, sodass molekularbiologische Methoden eingesetzt werden müssen. In Bezug auf die Ähnlichkeiten der NS- und der AS-Sequenzen der Hämolysingene bzw. Hämolysine von *B. intermedia* und *B. hyodysenteriae* WA1 lagen jedoch je nach Gen bzw. Protein z.T. erhebliche Unterschiede vor. So betrug die höchste Identität innerhalb der AS-Sequenz bei den Hämolysinen BHWA1_RS09085 99,1 % und 100 % bei HlyA, während die Übereinstimmung zum TlyA nur bei 91,7 % lag. Es ist nicht auszuschließen, dass durch den damit verbundenen Austausch von 20 AS eine Beeinträchtigung der Funktion des Proteins TlyA als Hämolysin resultieren könnte. *B. pilosicoli* wies sowohl bei den Gen- als auch bei den Proteinsequenzen jeweils die geringste Ähnlichkeit zum Referenzstamm *B. hyodysenteriae* WA1 auf. Ein möglicher Erklärungsansatz könnte sein, dass nach DNS-DNS Hybridisierungsexperimenten *B. pilosicoli* nur eine 25%-ige Übereinstimmung mit *B. hyodysenteriae* B78 aufwies (Trott et al., 1996b).

5 Diskussion

Neuere Untersuchungen von Keith et al. (2016) haben gezeigt, dass der *B. hampsonii*-Stamm 30599 eine Spaltung sowie eine Deletion von 112 bp im Hämolysingen *BHWA1_RS02195* aufweist. Unter der Voraussetzung, dass die sH bei allen stark hämolysierenden *Brachyspira* spp. nach dem gleichen Mechanismus abläuft, kann aufgrund der Unterbrechung des Gens durch 570.925 bp davon ausgegangen werden, dass dieses Gen im Rahmen der sH keine entscheidende Rolle spielen kann. Des Weiteren ist nicht bekannt, wie sich der fehlende Sequenzbereich (112 bp) auf die Quartärstruktur des möglichen Proteins auswirkt. Keith et al. (2016) diskutieren das Hämolysin TlyA als Auslöser der sH. Hierzu passt, dass sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in der internationalen Literatur (Mahu et al., 2016; La et al., 2016b) die meisten Abweichungen in der NS-Sequenz unter den *B. hyodysenteriae*-Stämmen in den sogenannten putativen Hämolysingen zu finden waren und nicht im *tlyA*. Die putativen Hämolysingene wurden durch den Vergleich von NS-Sequenzen als Hämolysingene identifiziert und haben noch keine phänotypische Bestätigung erfahren. Lediglich das Hämolysin *BHWA1_RS09085* wies in der *in silico*-Analyse eine sehr einheitliche AS-Sequenz auf und variierte innerhalb der 19 untersuchten *B. hyodysenteriae*-Stämme nur einmal an der AS-Position 120 (Alanin → Threonin).

In einer aktuellen Studie, die sich vornehmlich mit Mutationen in den Hämolysinen schwach hämolysierender *B. hyodysenteriae*-Stämme beschäftigt hat, konnte bislang auch keine Antwort auf die Frage, welches Hämolysin für die Ausprägung der sH verantwortlich ist, gefunden werden (Card et al., 2019). Im Zuge der Genom-Analyse von 34 schwach hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämmen konnten insgesamt 41 Mutationen in den AS-Sequenzen der acht Hämolysine aufgedeckt werden, die in den Genomen von 81 stark hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämmen nicht nachweisbar waren. Die Mehrheit der 34 schwach hämolysierenden Stämme wies Mutationen in mindestens einem der putativen Hämolysine auf. Die höchste Variabilität wies jedoch das Hämolysin TlyB auf. Hier konnten insgesamt 16 unterschiedliche AS-Austausche identifiziert werden. Allerdings handelt es sich bei TlyB auch um das mit Abstand längste Hämolysin (828 AS). Insgesamt wiesen sieben der 34 Stämme Mutationen im Hämolysin TlyB auf. Im Gegensatz dazu fanden sich bei den Hämolysinen HlyA, TlyA, TlyC und *BHWA1_RS04705* maximal eine (TlyA, HlyA, TlyC) bzw. drei Mutationsstellen (*BHWA1_RS04705*). Innerhalb der Hämolysine *BHWA1_RS02195*, *BHWA1_RS02885* und *BHWA1_RS09085* konnten insgesamt acht (*BHWA1_RS02195*), sieben (*BHWA1_RS02885*) oder vier (*BHWA1_RS09085*) Mutationsstellen ausgemacht werden. Dennoch konnte keine Mutation nachgewiesen werden, die in allen 34 schwach hämolysierenden Stämmen gleichermaßen vorkam und somit mit dem Ausfall der starken Hämolyse hätte assoziiert werden können (Card et al., 2019).

5 Diskussion

Es bleibt festzuhalten, dass die Interpretation der Unterschiede im Bereich der NS- und AS-Sequenzen der Hämolysingene bzw. der Genprodukte zwischen stark und schwach hämolysierenden Brachyspiren äußerst schwierig ist. Zur Änderung der Funktionalität des Proteins kann schon ein AS-Austausch reichen, wenn sich dieser bspw. im aktiven Zentrum befindet. Die z.T. niedrige Ähnlichkeit der AS-Sequenz der Hämolysine von *B. hampsonii* und *B. suanatina* zu *B. hyodysenteriae* WA1 sowie die variable Länge der Proteine lassen jedoch vermuten, dass es Lokalisationen in den Hämolysingenen gibt, die von Mutationen betroffen sein können, jedoch zu keiner Einschränkung der Funktion des Proteins führen. Um die hämolytische Aktivität der unterschiedlich langen Hämolysingene zu verifizieren, könnten nicht hämolysierende *E. coli* durch Transformationsversuche auf die Entstehung hämolytischer Aktivität untersucht werden. Die gezielte Herstellung von „knock-out“-Mutanten könnte bei der Suche nach den für die sH notwendigen Genen weiterhelfen. Diese Technik gilt jedoch bei Brachyspiren als große methodische Herausforderung (Hyatt et al., 1994; Stanton et al., 1999), weshalb sie bisher kaum Anwendung gefunden hat. Weiterführende Untersuchungen, die bei der Aufklärung der beteiligten Gene an der sH hilfreich sein könnten, sind u.a. Transkriptionsstudien. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Expression aller acht Hämolysingene (*tlyA*, *tlyB*, *tlyC*, *hlyA*, *BHWA1_RS02195*, *BHWA1_RS02885*, *BHWA1_RS04705* und *BHWA1_RS09085*) je eines schwach und eines stark hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stammes miteinander verglichen. Außerhalb dieser Arbeit muss anhand von Proteomstudien verifiziert werden, ob die transkribierten Gene auch tatsächlich in funktionstüchtige Proteine translatiert werden. Zum aktuellen Zeitpunkt erscheint es nicht ausgeschlossen, dass entweder a) ein weiteres Hämolysingen existieren könnte oder b) insbesondere die mutmaßlichen Hämolysingene *BHWA1_RS02195*, *BHWA1_RS02885*, *BHWA1_RS04705* und *BHWA1_RS09085* nicht als Hämolysine fungieren. Neben der Suche nach Mutationen in den Hämolysingenen sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass eine fehlende Hämolyse durch übergeordnete Regulationszentren möglich ist. Dies ist bspw. für *S. aureus* belegt. Die Regulation des α - sowie δ -Toxins erfolgt durch die *agr*-Region („*accessory gene regulator*“) (Dinges et al., 2000). Die Arbeitsgruppe um Schwan et al. (2003) sequenzierte nicht hämolysierende *S. aureus*-Stämme und konnte dabei zeigen, dass die fehlende Hämolyse durch Mutationen im *agrC*-Gen oder in der Region zwischen *agrC* und *agrA* begründet war. Mutationen in den Genen, die direkt für die Hämolysine kodieren wurden dabei nicht gefunden.

Insgesamt können aus den in diesem Abschnitt besprochenen Untersuchungen keine Beweise für die Beteiligung einer oder mehrerer Hämolysingene an der sH entnommen werden. Es ist lediglich eine Beteiligung der Gene *tlyA* und *hlyA* an diesem Geschehen zu vermuten.

Korrelationen zwischen Hämolysingenen und dem Sequenztyp

Da alle acht Hämolysingene in allen untersuchten *B. hyodysenteriae*-Stämmen nachgewiesen werden konnten, war eine Korrelation mit den unterschiedlichen Genotypen nicht möglich. Auch nach Ermittlung der Hämolysingensequenzen war es nicht möglich die einzelnen Mutationen innerhalb der Hämolysingene den unterschiedlichen STs zuzuordnen. Dies lässt sich insbesondere am Beispiel von *tlyB* und dem ST52 gut erläutern: Bei einer 100%-igen Identität zum Referenzstamm WA1 auf AS-Ebene, zeigten sich in der NS-Sequenz Abweichungen von 0 - 5 Basenpaaren. Einschränkend ist zu sagen, dass nur fünf Stämme mit dem ST52 untersucht wurden, sodass weiterführende Analysen notwendig sind, um zu verifizieren, dass keine Korrelation mit dem ST vorliegt. Auch der Vergleich der Mutationen im Hämolysingen *BHWA1_RS02195* macht deutlich, dass diese nicht mit bestimmten STs assoziiert sind. Bei Stämmen, die entweder dem ST8 oder ST52 zugeordnet werden konnten, waren jeweils 15 NS-Austausche zu beobachten, die zu fünf AS-Austauschen führten. Innerhalb der STs, die als „singletons“ identifiziert wurden, müssten weitere Stämme untersucht werden, um Aussagen über eine mögliche Zuordnung treffen zu können.

Weiterführend wurden die Hämolysingene hinsichtlich einer möglichen Koevolution mit dem Kerngenom (repräsentiert durch die sieben MLST-Gene) im Mantel-Test untersucht. Diese Untersuchung macht insbesondere bei regelmäßig vorkommenden Genen Sinn, um Aussagen über die Evolution der Gene zu treffen. Basierend auf ihrer NS-Sequenz konnte bei den putativen Hämolysingenen *BHWA1_RS02885*, *BHWA1_RS09085* sowie *BHWA1_RS02195* eine signifikante Korrelation ($p < 0,05$) zur konkatenierten NS-Sequenz der sieben MLST-Gene gefunden werden. Auf AS-Ebene wies jedoch nur das mutmaßliche Hämolysin *BHWA1_RS02195* eine signifikante Korrelation ($p < 0,001267$) auf. Die statistisch signifikante Korrelation belegt die Möglichkeit einer Koevolution zwischen den Hämolysingenen und den „Housekeeping“-Genen. Da davon auszugehen ist, dass das Kerngenom einem geringen selektiven Druck ausgesetzt ist, kann dies auch für *BHWA1_RS02195* angenommen werden. Im Gegensatz dazu kann die nicht vorhandene Signifikanz bei den Hämolysingenen *tlyA*, *tlyB*, *tlyC* und *hlyA* als Hinweis für eine unabhängige Evolution dieser Gene gewertet werden. Gene, die sich unabhängig vom Kerngenom bzw. den „Housekeeping“-Genen entwickeln, können sich vermutlich leichter an wechselnde Umwelteinflüsse anpassen, was für Virulenzgene einen deutlichen Selektionsvorteil darstellt. Bei der Spezies *Vibrio cholerae* wurden neben 25 Virulenzgenen, die mit dem Kerngenom assoziiert waren, auch weitere Virulenzgene gefunden, die mglw. durch horizontalen Gentransfer erworben wurden, nicht dem Kerngenom zuzuordnen waren und dem Bakterien die Möglichkeit bieten auf bestimmte Umweltbedingungen flexibel zu reagieren (Li et al., 2019).

Die Hämolyzingene sind beim Referenzstamm *B. hyodysenteriae* WA1 chromosomal (Black et al., 2015) kodiert. Zwischen den acht Hämolyzingenen liegen 200 bis 800 kb, sodass eine Übertragung mehrerer Gene im Rahmen eines horizontalen Gentransfers (HGT) unwahrscheinlich ist. Kürzlich wurde ein Transposon-assoziiertes Lincosamid-Resistenzgen in einem *B. hyodysenteriae*-Stamm identifiziert. Das Lincosamid-Nukleotidyltransferasegen *Inu(C)* ist auf dem Transposon MTnSag1 lokalisiert, welches zuerst in der Spezies *Streptococcus agalactiae* identifiziert wurde. Eine weitere Untersuchung mittels BLAST ergab, dass sich dieses Transposon sowohl im Stamm *B. pilosicoli* 95/1000 als auch in anderen Mikroorganismen befindet, was auf die Möglichkeit eines HGT bei *Brachyspira* spp. hindeutet (Luca et al., 2018). Weitere transposable Elemente, insbesondere in der Nähe der Hämolyzingene, sind nicht beschrieben. Bisher wurde angenommen, dass ein genetischer Austausch von Virulenzgenen innerhalb der Spezies *B. hyodysenteriae* durch den Prophagen VSH-1 („virus of *Serpulina hyodysenteriae*“) stattfinden kann (Humphrey et al., 1997; Stanton et al., 2001; Motro et al., 2009). Bislang existiert keine Studie, in der nachgewiesen werden konnte, dass es *in vivo* zur Übertragung von Virulenzgenen zwischen verschiedenen *B. hyodysenteriae*-Stämmen kam. Eine Induktion dieses Prophagen, der zufällig ausgewählte 7,5 kb große DNS-Fragmente überträgt, kann in Flüssigkulturen (Brain-Heart-Infusion Broth; BHI) durch Zugabe von Mitomycin C, Carbadox oder Metronidazol erzielt werden (Humphrey et al., 1995; Stanton et al., 2003; Stanton et al., 2008). Gentransfermechanismen konnten auch bei den schwach hämolysierenden Stämmen *B. intermedia* HB60 und *B. pilosicoli* 95/1000 nachgewiesen werden (Motro et al., 2009). Als Hinweis für einen HGT gilt, dass viele Proteine von *B. hyodysenteriae*, insbesondere im Bereich des Metabolismus (Transport und Metabolisierung von Aminosäuren, Kohlenhydraten, Co-Enzymen, Fetten sowie Nukleotiden), eine größere Ähnlichkeit mit Proteinen von *E. coli* bzw. *Clostridium* spp. als mit anderen Spirochäten haben (Bellgard et al., 2009; Håfström et al., 2011). Über einen möglichen HGT von Hämolyzingenen liegen derzeit keine Daten vor. Da der G+C-Gehalt des Gesamtgenoms des *B. hyodysenteriae*-Stammes B204 (27 %) von dem seiner Hämolyzingene (26,8 - 31,8 %) nicht wesentlich abweicht, liegt jedoch kein Hinweis dafür vor.

Transkriptionsaktivität der acht Hämolyzingene während der Vermehrung von *B. hyodysenteriae* in Bouillon

In der vorliegenden Arbeit konnte in zahlreichen Versuchen bestätigt werden, dass stark hämolysierende *Brachyspira* spp. nur während ihrer exponentiellen Vermehrungsphase Hämolyse freisetzen. Im Unterschied hierzu fand dies bei den schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp., inklusive dem schwach hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stamm G423, in der stationären Vermehrungsphase statt. Die Transkriptionsaktivität der Hämolyzingene vor,

5 Diskussion

während und nach der Hämolysefreisetzung sollte klären, welche Gene aktiv und damit mutmaßlich verantwortlich für die sH sind.

Die einzige bekannte Genexpressionsstudie bei Brachyspiren widmete sich einer ähnlichen Fragestellung: Von acht paralogenen Genen (*bhmp39a-h*), die für ein Membranprotein kodieren, war nicht bekannt, welches tatsächlich aktiv war. Es konnte gezeigt werden, dass die Gene *bhmp39f* und *bhmp39h* im Stamm *B. hyodysenteriae* B204 zu einem nicht exakt beschriebenen Zeitpunkt der Vermehrung (Zellzahl 5×10^7 Zellen/ml) am stärksten transkribiert wurden (Witchell et al., 2006). Die vorliegende Studie (s. Punkt 4.4), die mit vergleichbarer Methodik auf die Hämolysegene zielte, war komplexer (Verwendung von zwei Stämmen, Untersuchung zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Rahmen der Vermehrung) und verschiedene Aspekte (z.B. Wachstumsverlauf) erforderten eine besonders sorgfältige Analyse und Bewertung. Ein wichtiger Aspekt war die Reproduzierbarkeit. Die durchgeführten Versuche waren nicht 100 %-ig reproduzierbar. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass bei der Wiederholung eines Experiments mit drei biologischen (Probenansatz) und drei technischen (Messwiederholung) Replikaten nicht immer exakt die gleichen Zeitpunkte im Rahmen der Vermehrung des Erregers anzutreffen sind. Weiterhin scheinen die Expression sowie die Lebendkeimzahl von methodisch notwendigen Maßnahmen, wie z.B. der vorübergehenden Sauerstoffzufuhr oder geringen Temperaturschwankungen (37 °C, Raumtemperatur), beeinflussbar zu sein. Temporäre Sauerstoffzufuhr kann bei den anaerob wachsenden Brachyspiren zu deutlichen Einbrüchen in der Wachstumskurve und somit zu einer reduzierten Transkriptionsaktivität führen. Was den schwach hämolysierenden Stamm G423 betraf, war die Freisetzung der Hämolyse in den vorliegenden Experimenten weitaus geringer als nach Voruntersuchungen zu erwarten war. Dennoch ergab die Analyse der Kulturfiltrate im Hämolyse-Diffusionstest ein ausreichend starkes Signal, um mit Sicherheit zu objektivieren, dass die Hämolysefreisetzung in der stationären Phase erfolgte.

Da zur Normalisierung der Ct-Werte mindestens zwei Referenzgene vorausgesetzt werden (Vandesompele et al., 2002), fand in dieser Arbeit neben dem in der Transkriptionsstudie von Witchell et al. (2006) verwendeten *gyrB*-Gen als zweites Referenzgen das *adh* Anwendung. Idealerweise sollten die Referenzgene zu unterschiedlichen funktionellen Klassen gehören, um eine mögliche Co-Regulation der Gene auszuschließen (Vandesompele et al., 2002). Innerhalb der sieben Enzymklassen gehört *gyrB* zur Klasse der Isomerasen und *adh* zur Klasse der Oxidoreduktasen. Transkriptionsstudien basieren auf der quantitativen Messung von mRNA. Diese ist sehr kurzlebig und besitzt stark schwankende Halbwertszeiten, was unter Umständen die Ergebnisse beeinflussen kann. Im Verlauf der Vermehrung werden die jeweiligen Gene u.a. in Abhängigkeit von der Lebendkeimzahl unterschiedlich stark transkribiert, sodass in dieser Arbeit mehrere Untersuchungszeitpunkte ausgewählt wurden. Es ist jedoch

nicht auszuschließen, dass mit den gewählten Zeitpunkten eine unbeabsichtigte Einflussnahme einherging. Abschließend ist hinsichtlich der Beurteilung des Phänotyps zu berücksichtigen, dass nicht jede Transkription zwangsläufig zur Translation führt (Borbolis und Syntichaki, 2015).

Um die Signifikanz der generierten Daten zu überprüfen, wurde die Software REST® verwendet, die basierend auf Randomisierung und „Bootstrapping“ die Auf- und Abregulation der zu untersuchenden Gene berechnet. Die Software erstellt zur Visualisierung der Transkriptionsraten Whisker-Boxplots und ermittelt, ob statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Transkriptionsraten der Hämolysingene des stark bzw. schwach hämolysierenden Stammes existieren. Das Hämolysingen *tlyA* scheint eine wichtige Rolle im Rahmen der sH zu spielen, da es im Vergleich der hämolytischen Zeitpunkte beider Stämme die höchsten Transkriptionswerte erzielte (> 20-fache Hochregulation). Passend dazu wurden während der Absterbephase keine Hämolysine mehr im Überstand gefunden und der Gehalt an mRNA befand sich auf einem ähnlichen Niveau wie die Referenzgene. *TlyA* wurde bereits als wichtiges Gen im Rahmen der sH betrachtet, da *B. hyodysenteriae-tlyA*-Deletionsmutanten eine reduzierte hämolytische Aktivität aufwiesen (ter Huurne et al., 1992; Hyatt et al., 1994). Die Transkriptionsaktivität von *tlyC* deutet darauf hin, dass dieses Gen möglicherweise als Hämolysin oder als Regulatorprotein wirkt, da es auf einem vergleichbar hohen Level wie das *tlyA* transkribiert wurde (> 20-fache Hochregulation). Es ist bemerkenswert, dass sowohl *tlyA* als auch *tlyC* nur während der ersten Phase der hämolytischen Aktivität des Stammes B204 (Zeitpunkt 2) stärker transkribiert wurden, wohingegen die putativen Hämolysingene auch während der nicht hämolytischen Zeitpunkte erhöhte Transkriptionsaktivitäten aufwiesen. Im Rahmen von Klonierungsversuchen erwies sich das rekombinant hergestellte Hämolysin *TlyC* aus einem *B. hamptonii*-Stamm bei der Übertragung in *E. coli* als nicht hämolysierend (Keith et al., 2016). Dies steht in Übereinstimmung mit einer anderen Studie, nach der die rekombinant hergestellten Hämolysine *TlyB* und *TlyC* bei *Leptospira* spp. keine hämolytische Aktivität besaßen (Carvalho et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde das Hämolysingen *tlyB* während der Zeitpunkte 1 und 3 im stark hämolysierenden Stamm B204 auf einem signifikant niedrigeren Level transkribiert als im Stamm G423. Dies könnte bedeuten, dass dieses Gen im Rahmen der wH eine essenzielle Funktion haben könnte. Interessanterweise wurde das *hlyA* während aller untersuchten Zeitpunkte im Stamm B204 geringer transkribiert als im Stamm G423, erreichte zu den Zeitpunkten 1, 2 und 4 jedoch nicht die Grenze zur Signifikanz. Dies ist ebenfalls als Hinweis darauf zu werten, dass *hlyA* möglicherweise eine Rolle im Rahmen der wH spielen könnte. Möglicherweise werden die Gene *tlyB* und *hlyA* deshalb während der gesamten Vermehrung des Stammes G423 transkribiert, weil sie zunächst im Überstand akkumulieren müssen, um ihre biologische Aktivität zu entfalten. Dies wäre ein möglicher Erklärungsansatz

5 Diskussion

dafür, dass die wH erst in der stationären Phase der Vermehrung nachweisbar ist. Dies muss jedoch zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch als Hypothese angesehen werden. Die Gene könnten im Stamm B204 ebenfalls transkribiert werden, weil die stark hämolysierenden Stämme über Hämolysine mit unterschiedlicher Aktivität verfügen. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit im Rahmen des modifizierten CAMP-Testes (s. Punkt 4.5.6) sowie bei der Vermehrung stark hämolysierender *Brachyspira* spp. nachgewiesen werden (s. Punkt 4.5.3). Im Rahmen von Proteomanalysen stark hämolysierender *B. hyodysenteriae*-Stämme konnte gezeigt werden, dass das TlyB das am häufigsten vorkommende Hämolysin darstellt (Casas et al., 2016). Einschränkend muss gesagt werden, dass in der genannten Proteomstudie lediglich ein Zeitpunkt im Wachstum von *B. hyodysenteriae* untersucht wurde (nach sieben Tagen anaerober Inkubation bei 42 °C) und Angaben zur Lebendkeimzahl oder der hämolytischen Aktivität fehlen. Um die Rolle von *tlyB* endgültig zu klären, könnten Untersuchungen an anderen *Brachyspira* spp. hilfreich sein. Von den mutmaßlichen Hämolysingenen könnte das *BHWA1_RS04705* an der Entstehung des stark hämolytischen Phänotyps beteiligt sein. Während des ersten nicht hämolytischen Zeitpunktes des Stammes B204 wurde es > 20-fach stärker transkribiert. Möglicherweise fungiert dieses Gen als Verstärker/Regulator der Hämolysine TlyA bzw. TlyC. Allerdings wurde im Rahmen dieser Transkriptionsstudie ein tatsächlicher Zusammenhang nicht gezeigt, sodass TlyA und TlyC auch autonome Hämolysine darstellen können. Im weiteren Verlauf des Wachstums ließ sich auch während des ersten hämolytischen Zeitpunktes (Zeitpunkt 2) eine erhöhte Transkriptionsaktivität von *BHWA1_RS04705* beim Stamm B204 feststellen. Das Hämolysingen *BHWA1_RS02195* verhielt sich mit einer initial höheren Transkriptionsaktivität während der ersten beiden Zeitpunkte ähnlich. Es scheint jedoch unwahrscheinlich, dass es sich bei *BHWA1_RS02195* um ein Hämolysin handelt, da es bei dem stark hämolysierenden Stamm *B. hampsonii* 30599 durch eine 570.925 bp lange Sequenz unterbrochen ist und daher nach Meinung der Autoren in seiner Funktion eingeschränkt sein muss (Keith et al., 2016). Zusätzlich bestärkt die Deletion von 112 bp innerhalb des Hämolysingens *BHWA1_RS02195* diesen Verdacht. Ein ähnliches Phänomen fand sich unter den 20 (öffentlich zugängliche Genome während der Erstellung dieser Arbeit, Black et al., 2015) Gesamtgenom-sequenzierten *B. hyodysenteriae*-Stämmen nicht. Das putative Hämolysingen *BHWA1_RS02885* zeigte während des zweiten hämolytischen Zeitpunktes und des darauffolgenden nicht mehr hämolytischen Zeitpunktes (Zeitpunkt 3 und 4) von B204 eine erhöhte Transkriptionsaktivität. Aufgrund dieser Ergebnisse scheint es eher unwahrscheinlich, dass es sich bei *BHWA1_RS02885* tatsächlich um ein Hämolysingen handelt, da es zu Beginn der Hämolysen nicht nachweisbar war. Das putative Hämolysingen *BHWA1_RS09085* zeigte schließlich ein anderes Transkriptionsmuster. Hier kam es während des hämolytischen Zeitpunktes beider Stämme (Zeitpunkt 3) zu einer signifikant niedrigeren Transkription im Stamm

5 Diskussion

B204, jedoch stieg die Transkriptionsaktivität während des letzten nicht hämolysischen Zeitpunktes (Zeitpunkt 4) von B204 an. Möglicherweise sind die Gene *BHWA1_RS02885* und *BHWA1_RS09085* an der Inaktivierung oder Hemmung der Hämolysine beteiligt. Dies könnte erklären, warum die hämolysische Aktivität während der Vermehrung der stark hämolysierenden *Brachyspira* spp. verschwindet. Tatsächlich verloren Kulturfiltrate von B204 ihre hämolysische Aktivität, wenn sie für eine Stunde bei 37 °C mit nicht hämolysierenden Kulturfiltraten aus der stationären Phase der Vermehrung inkubiert wurden (Herbst et al., 2016). Diese schnelle Inaktivierung der Hämolysine ist aus Sicht des Bakteriums möglicherweise von großer Bedeutung. Es könnte spekuliert werden, dass mit der gewollten Kurzlebigkeit dieses Proteins eine verringerte Expositionsdauer gegenüber dem Immunsystem und damit eine verzögerte oder herabgesetzte Immunantwort beabsichtigt ist. Tatsächlich wird über den Nachweis von Antikörpern gegen die Hämolysine äußerst selten berichtet (Muir et al., 1992; Joerling et al., 2016). Entgegen früherer Hypothesen, nach denen das Hämolysin *hlyA* eine entscheidende Rolle im Rahmen der sH einnehmen soll (Hsu et al., 2001; Mahu et al., 2016), sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dafür, dass es sich bei *hlyA* eher um den Vermittler der wH handelt. Kürzlich wurde die Mutation im Promotorbereich des *hlyA* bei drei schwach hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämmen für die wH verantwortlich gemacht (La et al., 2016b). Die Sequenzanalyse der Promotorregion des Stammes G423 zeigte ähnliche Mutationen, die jedoch keine Auswirkungen auf die Transkription des Gens hatten. Dass diese Mutationen jedoch einen Einfluss auf die posttranskriptionale Modifikation von HlyA haben kann nicht ausgeschlossen werden. Eine weitere Studie konnte Unterschiede in den mutmaßlichen Promotorregionen der Gene *tlyB*, *BHWA1_RS02195* und *BHWA1_RS02885* bei schwach hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämmen zeigen (Card et al., 2019). Ob diese Mutationen auch in dem Laborstamm G423 des IHIT vorliegen, kann nicht mit Sicherheit bestätigt oder ausgeschlossen werden, da keine Untersuchung dieser Promotorbereiche erfolgte. Eine Beeinflussung der Transkriptionsaktivität der aufgeführten Hämolysingene wurde jedoch nicht festgestellt. Weitere Studien, die sich neben der Aufklärung funktioneller Mutationen auch der Bestätigung der Promotorregionen der Hämolysingene des Genus *Brachyspira* widmen, sind notwendig, um diese Fragen endgültig zu klären.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die Transkriptionsaktivitäten zwischen *B. hyodysenteriae*-Stämmen mit unterschiedlicher Hämolyse variieren und dass insbesondere *tlyA* für die sH bzw. *hlyA* für die wH verantwortlich zu sein scheinen. Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen könnten weitere Studien unter Verwendung der weiteren stark hämolysierenden Spezies *B. hamptonii* und *B. suanatina* durchgeführt werden, um zu bestätigen, dass die sH unabhängig von der Spezies durch das Zusammenspiel derselben Gene ausgelöst wird. Inwieweit eine Translation der Hämolysine erfolgt, kann nicht vorhergesagt werden. Es ist zu

bedenken, dass bspw. bei *S. aureus* bekannt ist, dass die meisten Stämme die Genanlagen für mehrere Toxine/Hämolsine aufweisen, es phänotypisch jedoch oft nur zur Ausprägung eines Hämolsins kommt (Moraveji et al., 2014; Aarestrup et al., 1999).

5.3. Vorkommen weiterer Virulenzgene und Korrelation von Virulenzgenen mit dem Sequenztyp von *B. hyodysenteriae*

Die Untersuchung zahlreicher *B. hyodysenteriae*-Stämme ergab keine durch An- bzw. Abwesenheit einzelner Hämolsingene charakterisierbare Hämolsingenmuster bei dieser Spezies. Alle *B. hyodysenteriae*-Stämme besaßen jeweils die acht Hämolsingene (s. Punkt 5.2), die auf dem Chromosom lokalisiert sind (Bellgard et al., 2009). Des Weiteren sollte untersucht werden, welche vorab ausgewählten Virulenzgene in den *B. hyodysenteriae*-Stämmen aus Deutschland nachzuweisen sind und inwieweit auch hier Korrelationen mit dem Genotyp möglich sind.

Vorkommen von Virulenz-assoziierten Genen und Fitnessgenen bei *B. hyodysenteriae*

Neben den Hämolsingenen scheinen nach Untersuchung der 116 Feldstämme auch die zwei in dieser Arbeit untersuchten Gene (*ftnA*, *bitC*) für den Eisenmetabolismus bei Brachyspiren regelmäßig vorzukommen, was auf eine essenzielle Rolle dieser Gene hinweist. Das Gen *ftnA* (Eisenspeicherung) kam in allen untersuchten Stämmen vor. Dass es vereinzelt keine Signale für das Gen *bitC* gab (4,3 % Ausfälle), ist am ehesten auf Primer-Fehlpaarungen zurückzuführen, da im Rahmen der *in silico*-Analyse der 20 vollständig sequenzierten *B. hyodysenteriae*-Stämme das regelmäßige Vorkommen dieses Gens nachgewiesen werden konnte. Die Komponenten *bitA-C* des Bit-Systems („brachyspira iron transport“, 6-teiliges periplasmatisches ABC-Eisenimport-System) konnten in Southern Blot-Untersuchungen nur bei Vertretern der Spezies *B. hyodysenteriae* nachgewiesen werden. BitC stellt ein Lipoprotein dar, das gemeinsam mit BitB an der Eisenbindung beteiligt sein soll. Inwieweit das Bit-System einen Einfluss auf die Pathogenität der stark hämolysierenden Spezies hat, ist bislang nicht geklärt (Dugourd et al., 1999). Da *bitC* in der Mitte des *bit*-Lokus liegt, wurde dieses Gen als Indikator für die Präsenz des Eisenimportsystems analog zur Studie von Barth et al. (2012) ausgewählt. Allerdings wurde in der genannten Studie dem *bitC* kein diagnostischer Wert zugesprochen, da es nur in 44,6 % der 74 *B. hyodysenteriae*-Stämme nachgewiesen werden konnte. Da in einer neueren Studie aus Australien die Komponenten *bitA-C* hinsichtlich ihres Vorkommens und ihrer Ähnlichkeit in schwach bzw. stark hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Feldstämmen wieder in den Fokus rückten (La et al., 2016b), wurde das *bitC* in die vorliegende Arbeit aufgenommen. Nach Proteomanalysen scheinen die Komponenten des Bit-Systems bei *B. hyodysenteriae* jedoch in unterschiedlicher Häufigkeit translatiert zu werden (Casas et al.,

2016). Möglicherweise existieren zwei Promotorbereiche, sodass die Genexpression der Komponenten BitA-C unabhängig von BitD-F stattfinden kann (Dugourd et al., 1999). Für das achteilige äußere Membranprotein Bhmp39a-h gilt ähnliches. Das *bhmp39h* war in keinem der 116 untersuchten Stämme nachweisbar, während *bhmp39f* bei allen vorkam. In der Transkriptionsstudie von Witchell et al. (2006) konnte gezeigt werden, dass die acht Genkomponenten als monocistronische Transkripte exprimiert werden, obwohl sie auf demselben Locus lokalisiert sind. Da Bhmp39A-H an der Oberflächenvariation beteiligt sind, erscheint eine individuelle Regulierung der Einzelgene wahrscheinlich. Das regelmäßige Vorkommen des äußeren Membranproteins Bhlp29.7 steht in Übereinstimmung mit einer australischen Studie und lässt den Vorschlag, dieses Protein als mögliches Antigen für die serologische Diagnostik der SD zu verwenden, plausibel erscheinen (La et al., 2009a). Die Analyse des Vorkommens der zwei bislang bekannten „small membrane proteins“ warf die Frage auf, warum es sowohl in dieser Arbeit als auch in der Studie von La et al. (2016b) Stämme gibt, die weder über *bhlp16* (*smpA*) noch über *bhlp17.6* (*smpB*) verfügten. Beide Gene befinden sich auf demselben genetischen Locus, weshalb das gemeinsame Vorkommen beider Gene ausgeschlossen werden kann (Holden et al., 2006). Holden und Kollegen konnten mit Hilfe von umgreifenden Primern, die die Sequenzen „up-“ bzw. „downstream“ der Smp-kodierenden Region umfassten, feststellen, dass PCR-Produkte mit zwei unterschiedlichen Größen generiert werden konnten (*smpA* 750 bp, *smpB* 780 bp). In der vorliegenden Arbeit fehlten bei 46 von 116 *B. hyodysenteriae*-Stämmen aus Deutschland beide Gene. Auch nach der Verwendung umgreifender Primer konnte bei den in dieser Arbeit untersuchten Stämmen kein Signal generiert werden. Somit muss davon ausgegangen werden, dass diese Stämme entweder über kein „small membrane protein“ verfügen oder dass die umgreifenden Sequenzen sich in diesen Stämmen unterscheiden. Möglicherweise existieren auch weitere, bislang nicht beschriebene „small membrane proteins“. Um zunächst zu überprüfen, ob es ein drittes „small membrane protein“ gibt, müssten die betroffenen Stämme vollständig sequenziert werden. Bislang ist die Funktion der „small membrane proteins“ nicht bekannt, Sequenzanalysen ergaben, dass *smpA* und *smpB* über dieselbe Signalsequenz verfügen und die darauffolgenden zehn Aminosäuren identisch sind. Danach zeigt sich zwischen beiden Proteinen eine hohe Divergenz (Holden et al., 2006).

Mögliche Korrelationen zwischen VAGs, Fitnessgenen und dem Sequenztyp

Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnten die untersuchten Gene in zwei Kategorien unterteilt werden. In jene, die in allen untersuchten Stämmen vorkamen und solche, die lediglich in einer variablen Anzahl der Stämme nachweisbar waren. Die Möglichkeit der Korrelation zu unterschiedlichen STs war für jene Gene, die fast regelmäßig in den *B. hyodysenteriae*-Stämmen vorkamen, stark eingeschränkt und führte zu keinem Ergebnis. Dies galt neben den bereits beschriebenen acht Hämolysegenen auch für die zwei Eisen-metabolisierenden Gene.

Von den fünf Genen, die für äußere Membranproteine kodieren, konnte einzig das „small membrane protein“ *bhlp16* (*smpA*), das in 60,3 % der 116 untersuchten Stämme nachgewiesen wurde, im Rahmen der Untersuchung bestimmten STs zugeordnet werden. Es war auffallend, dass nur wenige Stämme des klonalen Komplexes CC52 (ST52, ST116, ST131 und ST193) das Gen *bhlp16* aufwiesen (14,6 %). Im Gegensatz dazu war das Gen *bhlp16* in allen Stämmen, die dem ST8 oder ST112 zugeordnet wurden, nachweisbar. Möglicherweise verfügen die Stämme, die dem CC52 zugehörig sind, über andere bis dato unbekannte OMPs, wie das weiter oben spekulierte dritte „small membrane protein“.

Stämme, die demselben ST angehörten, wiesen nach den vorliegenden Untersuchungen nicht zwangsläufig auch dasselbe Muster an Virulenz-assoziierten Genen und Fitnessgenen auf. So war der dominante ST52 in allen sechs Virulenzgenmustern vertreten. Trotz Überprüfung der Primer-Bindungsstellen anhand der 20 vollständig sequenzierten *B. hyodysenteriae*-Stämme stehen die Befunde dieser Arbeit damit im Widerspruch zu einer anderen Veröffentlichung, die eine gute Konkordanz zwischen den mittels WGS untersuchten Genen und dem ST belegt (La et al., 2016b). La und Kollegen haben gezeigt, dass *B. hyodysenteriae*-Stämme aus dem Betrieb A vor (1 Stamm) und nach (5 Stämme) einem nicht erfolgreichen Eradikationsprogramm sowohl denselben ST als auch dasselbe Virulenzgenmuster aufwiesen. Allerdings könnte diese Kongruenz auf die geringe Anzahl an Stämmen zurückzuführen sein.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Gene *bhlp29.7* und *ftnA* aufgrund ihres regelmäßigen und vom ST-unabhängigen Vorkommens vermutlich eine essenzielle Funktion im Rahmen der Virulenz bzw. Vitalität des Erregers spielen.

5.4. Kriterien zur Unterscheidung der Hämolyse/Zytotoxine stark und schwach hämolysierender *Brachyspira* spp. und serologische Untersuchungen zur Antigenität

Die letzten zwei Jahrzehnte der Forschung über *Brachyspiren* widmeten sich überwiegend molekularbiologischen Fragestellungen. Der Phänotyp als Forschungsobjekt, insbesondere der hämolytische Phänotyp, trat - vermutlich aufgrund des hohen Zeitaufwands und der nicht 100 %-igen Reproduzierbarkeit - eher in den Hintergrund. Auch nach der Beschreibung neuer, stark hämolysierender *Brachyspira*-Spezies (*B. suanatina*, *B. hampsonii*) und schwach hämolysierender Varianten von *B. hyodysenteriae* (beispielsweise G423) gab es keine neuen Studien über die Charakterisierung der Hämolyse. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, phänotypische Unterscheidungsmerkmale für die Hämolyse der stark bzw. schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp. zu benennen.

Eigenschaften der Hämolsine stark und schwach hämolysierender *Brachyspira* spp.

Die präparierten Hämolsine von *B. hyodysenteriae*, *B. suanatina* und *B. hampsonii* waren im Hämolsin-Diffusionstest, bei dem die Hämolsine in ein auf einer Blutagarplatte ausgestanztes Loch pipettiert werden und nach Diffusion in den Agar zur Hämolyse führen, nicht voneinander unterscheidbar. Bei allen Spezies war die Hämolysezone scharf begrenzt und durch eine vollständige Transparenz des Agars gekennzeichnet. Hinsichtlich ihrer Qualität (Hämolysetyp) scheinen die Hämolsine von *B. suanatina* und *B. hampsonii* somit identisch mit denen von *B. hyodysenteriae* zu sein. Im Gegensatz hierzu führten die von *B. hyodysenteriae* G423 und *B. innocens* 2933-2 präparierten Hämolsine lediglich zu einer Aufhellung des Blutagars mit einer sehr unscharf begrenzten Hämolysezone (s. Punkt 4.5).

Aus der Literatur ist bekannt, dass das präparierte Hämolsin(-gemisch) von *B. hyodysenteriae* temperaturempfindlich ist (Saheb et al., 1980; Lemcke und Burrows, 1982). Vergleichende Untersuchungen an den präparierten Hämolsinen der neuen stark hämolysierenden Spezies in dieser Arbeit belegten erstmalig, dass dies auch für die Hämolsine von *B. hampsonii* und *B. suanatina* zutreffend ist. Auf der anderen Seite erwiesen sich die präparierten Hämolsine von *B. innocens* 2933-2 und *B. hyodysenteriae* G423 als temperaturstabil. Dies steht im Widerspruch zu einer früheren Studie, in der gezeigt werden konnte, dass sowohl die Hämolsine von *B. hyodysenteriae* als auch die von *B. innocens* bei 45 °C temperaturlabil sind (Saheb et al., 1980). Bei anderen stark und schwach hämolysierenden Bakterien-Spezies sind keine Untersuchungen bezüglich der Temperaturstabilität der Hämolsine bekannt. Vielmehr weiß man, dass bei *Listeria* (*L.*) spp. nicht das hitzelabile (> 50 °C) Listeriolysin über die hämolytische Aktivität entscheidet (Mengaud et al., 1988; Domann und Chakraborty, 1989), sondern eine vorgeschaltete Region, die sogenannte *prfA*-Region („positive regulatory factor of listeriolysin“) (Leimeister-Wächter et al., 1989). Diese Region ist für den hämolysierenden Phänotyp essenziell und hat zudem Einfluss auf die Virulenz des Erregers (Leimeister-Wächter et al., 1990). Bei der Übertragung eines Plasmids auf *L. innocua*, das entweder das Listeriolysin-Gen oder das *prfA*-Gen enthielt, fiel die hämolytische Aktivität bei Übertragung des *prfA*-Gens deutlich höher aus.

Bezogen auf die Gattung *Brachyspira* kann die Prüfung der Temperaturstabilität als Kriterium zur Differenzierung der Hämolsine herangezogen werden. Interessant wäre es zu wissen, ob diese auch *in vivo* existiert. Dies könnte Auswirkungen auf die Erreger-Wirtsbeziehung haben. Die Hämolsine von *B. hampsonii* und *B. suanatina* zeigten nach 60 min bei 40 °C eine deutliche Titerreduktion. Wenn die Temperaturlabilität auch *in vivo* stattfinden sollte, stünden die Hämolsine dem Immunsystem nur kurz zur Verfügung und eine Antikörper-Bildung wäre unwahrscheinlicher. Eine Annäherung an die *in vivo*-Verhältnisse ließe sich durch tierexperimentelle Untersuchungen erzielen. Beispielsweise könnte durch das Auslösen von Fieber beim

5 Diskussion

Schwein verifiziert werden, ob dies tatsächlich mit dem Verlust der hämolytischen Aktivität kolonisierender *Brachyspira* spp. einhergeht. In der pathologisch-anatomischen Untersuchung könnten zum einen die Läsionen im Dickdarm geringer ausfallen und im Darmlumen dürfte kein biologisch aktives Hämolsin mehr nachweisbar sein. Da es sich nach Untersuchungen an gnotobiotischen Ferkeln bei der SD um eine multifaktorielle Erkrankung handelt, müssen mögliche Einflüsse des Futters, der intestinalen Mikrobiota sowie des Immunsystems des Wirts berücksichtigt werden.

Im Hinblick auf ihre hämolytische Aktivität bei verschiedenen Temperaturen verhielten sich die hämolysierenden Kulturfiltrate gleich. Eine hämolytische Aktivität war bei 10 °C nicht nachweisbar, mittelgradig ausgeprägt bei 20 °C und stark ausgeprägt bei 37 °C. Wenn sich das Temperaturoptimum der Hämolsine *in vivo* ähnlich verhalten sollte, so korreliert es gut mit der Körpertemperatur des Schweins von 39 °C. Zudem bestätigen die vorliegenden Ergebnisse frühere Versuche mit einem Hämolsin von *B. hyodysenteriae*, nach denen die hämolytische Aktivität bei Temperaturen unter 15 - 20 °C stark eingeschränkt war (Saheb und Lafleur, 1980). Im Gegensatz zum β -Toxin von *S. aureus*, bei dem es sich um ein „hot-cold“-Toxin handelt (Huseby et al., 2007; Glenn und Stevens, 1935), könnten die Hämolsine der *Brachyspira* spp. „cold-hot“-Toxine darstellen. Diese temperaturabhängige Wirksamkeit lässt vermuten, dass der Hämolyse ein enzymatischer Prozess zu Grunde liegt. Dabei unterscheidet sich die Entstehung der starken nicht von der schwachen Hämolyse. Die nach Wechsel der Inkubationstemperaturen erzielten Ergebnisse lassen ferner darauf schließen, dass die Hämolsine, bevor sie ihre hämolytische Aktivität entfalten können, möglicherweise an einen Rezeptor in der Erythrozytenmembran binden. Zur Bestätigung könnte eine potenzielle Rezeptorregion in der Membran mit Fluoreszenz-Farbstoffen markiert werden. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass es nach der Bindung der Hämolsine zu einer Konformationsänderung des Rezeptors kommt. Da sich dadurch auch die Ausrichtung der Aminosäuren ändert, kann anhand der Fluoreszenz die Konformationsänderung bestätigt werden und so auf eine erfolgreiche Ligandenbindung geschlossen werden. Alternativ kann eine Markierung der Hämolsine erfolgen, um eine Fluoreszenz auszulösen, wenn die Hämolsine an einen Rezeptor gebunden haben. Sofern eine Bindung erfolgt, scheint diese jedoch nur sehr schwach zu sein, da nach Waschung der mit Hämolsinen inkubierten Erythrozyten (8 °C) mit PBS keine Hämolyse bei 37 °C mehr auftrat. Die vorliegende Arbeit bestätigt somit ein schon früh beschriebenes Phänomen (Saheb und Lafleur, 1980). Trotz der möglicherweise nur schwachen Rezeptor-Bindung war erkennbar, dass der Vorgang der Hämolyse bei den Hämolsinen, die entweder eine starke oder schwache Hämolyse bedingen, temperaturabhängig war.

In dieser Studie wurden die Hämolsine im Rahmen der Vermehrung von *B. hyodysenteriae* in Nährbouillon nur im Zuge der exponentiellen Vermehrung freigesetzt und nicht während der

5 Diskussion

stationären Wachstumsphase. Dies steht im Widerspruch zu einer früheren Publikation, nach der die maximalen Hämolytintiter bei *B. hyodysenteriae*-Stamm P18A erst während der stationären Phase der Vermehrung nachgewiesen werden konnten (Lemcke und Burrows, 1982). In einer weiteren Publikation wurde der maximale Hämolytintiter bereits nach zwei bis vier Stunden Inkubation (frühe logarithmische Wachstumsphase) erreicht und nach 14-stündiger Inkubation war bereits ein Abfall der hämolytischen Aktivität zu verzeichnen (Knoop, 1981). Es ist anzunehmen, dass diese Ergebnisse auf der Freisetzung von Hämolytinen aus dem Inokulum beruhen. Bei sehr hohen Inokulationstitern tritt die Phase der exponentiellen Vermehrung zeitlich gesehen früher auf, da die lag-Phase entsprechend verkürzt wird. Entgegen der Verhältnisse bei den stark hämolytischen Spezies wurden die Hämolytine der schwach hämolytischen Spezies sehr viel später im Verlauf der Vermehrung, nämlich in der stationären Phase freigesetzt, was sie eindeutig von den Erstgenannten abgrenzt. Hier gibt es in der Literatur nur eine Studie, in der die Hämolytinfreisetzung bei dem schwach hämolytischen *B. pilosicoli*-Stamm PWS/B beschrieben wurde. Entgegen der vorliegenden Ergebnisse konnte hier Hämolytin bereits in der frühen exponentiellen Phase geerntet werden (Lemcke und Burrows, 1982). Interessanterweise induzierten die in der vorliegenden Arbeit verwendeten stark hämolytischen Spezies während der Vermehrung ebenfalls eine wH. Dies könnte bedeuten, dass die stark hämolytischen Spezies sowohl Hämolytine für eine sH als auch Hämolytine für eine wH bilden können. Hierzu liegen in der Literatur keine vergleichbaren Ergebnisse vor. Auch auf die Frage, warum der Hämolytinnachweis in Kulturfiltraten der stark hämolytischen Spezies nur während der exponentiellen Phase der Vermehrung möglich war, fehlen Antworten in der Literatur. Die eigenen Untersuchungen zu dieser Beobachtung ergaben, dass ein Hämolytingemisch, bestehend aus hämolytischen und nicht hämolytischen Kulturfiltraten nach einstündiger Inkubation bei 37 °C seine hämolytische Aktivität verlor. Daraus wurde geschlossen, dass für die zeitlich limitierte Hämolytinfreisetzung möglicherweise eine in der stationären Phase freigesetzte bzw. entstandene Substanz verantwortlich ist. Da die Hämolytin-Inhibition mit längerer Einwirkung dieser Substanz ausgeprägter wurde, könnte ein enzymatischer Abbau der Hämolytine für diese Beobachtung verantwortlich sein. Ob dieses Phänomen auch *in vivo* vorkommt bleibt spekulativ. Aus Sicht des Erregers könnte der Abbau der Hämolytine vorteilhaft für eine erfolgreiche Kolonisierung im Schwein sein. Unterstützung findet diese Annahme darin, dass TlyA-spezifische Antikörper in Seren rekonvaleszenter Schweine mittels Western Blot nicht nachzuweisen waren (Muir et al., 1992). Auch im Rahmen des Hämolytin-Inhibitions-Testes (s. Punkt 4.6) konnte gezeigt werden, dass von 32 Schweineseren, die vier Wochen nach einer Infektion mit *B. hyodysenteriae*-Stämmen (Sattler, 2010) gewonnen wurden, nur neun Seren (28,1 %) eine Serokonversion gegenüber der Hämolytinpräparation H44 von *B. hyodysenteriae* B204 aufwiesen. Ursächlich für das geringe Ausmaß der Serokonversion könnte die geringe antigenetische Wirkung der Hämolytine sein

5 Diskussion

oder wie bereits oben beschrieben die fehlende Stimulierung des Immunsystems. Ein weiterer Kritikpunkt könnte die 4-wöchige Versuchsdauer sein, da nicht auszuschließen ist, dass die Bildung von Antikörpern nur langsam erfolgt. Eine weitere Forschungsgruppe vermutet, dass die Hämolsine für die starke bzw. schwache Hämolyse möglicherweise über unterschiedliche Sekretionswege sezerniert werden (Card et al., 2019). Dies könnte das zeitlich unterschiedliche Auftreten der Hämolyse bei stark bzw. schwach hämolysierenden Spezies erklären, bedarf zum aktuellen Zeitpunkt jedoch weiterer Untersuchungen.

In Bezug auf die zeitliche Limitierung der Freisetzung der Hämolsine stellt sich die Frage, ob dieser Zeitraum ausreichend ist für die Entfaltung der hämolytischen Aktivität. Die Ergebnisse der hierzu durchgeführten Versuche zur Bestimmung der Kinetik der hämolytischen Aktivität geben auf diese Frage eine eindeutige Antwort. Die Entstehung einer nicht mehr steigerungsfähigen hämolytischen Aktivität war bei allen Hämolsinen innerhalb eines Zeitraums von vier bis sechs Stunden erreicht. Vor Ablauf dieser Zeitspanne ist mit dem Freiwerden Hämolsin-inhibierender Substanzen nicht zu rechnen, so dass auch *in vivo* mit einer biologischen Wirksamkeit zu rechnen ist. Dennoch können die *in vitro* Versuche nicht die wirtsinternen Faktoren (Körpertemperatur, Futteraufnahme, Stoffwechsel, Immunstatus, etc.) berücksichtigen, so dass eine 1:1-Übertragung auf die Verhältnisse *in vivo* nicht möglich ist.

Das Wirkprinzip der Hämolsine von *B. hyodysenteriae* schien nach Versuchen mit Zuckern unterschiedlicher MGs auf einer Porenbildung in der Membran der Erythrozyten (Verwendung fanden Kaninchen- bzw. Schafererythrozyten) zu beruhen (Saheb und Lafleur, 1980; Hyatt und Joens, 1997). Der Bildung einer Pore geht möglicherweise eine temperaturabhängige Bindung der Hämolsine an die Erythrozytenmembran voraus. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche an den hämolytischen Kulturfiltraten unterschiedlicher *Brachyspira* spp. bestätigten diese Annahme. In entsprechenden Untersuchungen gelang die Inhibition der Hämolyse mit höhermolekularen PEG (4000, 6000, 8000). Bezogen auf *B. hyodysenteriae* B204 wurde die beste Wirkung mit PEG 8000 erzielt. Dies entsprach einem hydrodynamischen Radius von 3,78 nm und stimmt mit den Angaben aus der Literatur für TlyB und TlyC überein. Diese Hämolsine sollen Poren von mehr als 3,5 nm Durchmesser induzieren (ter Huurne et al., 1994). Auch mit den Hämolsinen der weiteren stark hämolysierenden *Brachyspira* spp. konnten in den durchgeführten Inhibitionsversuchen mit hoch- und niedermolekularen Zuckern die gleichen Ergebnisse wie in den Untersuchungen mit den präparierten Hämolsinen von *B. hyodysenteriae* B204 erzielt werden. Demzufolge wirken die Hämolsine der stark hämolysierenden Spezies *B. hampsonii* und *B. suanatina* auch als Porenbildner, wodurch der Wirkmechanismus der sH unter den verschiedenen *Brachyspira* spp. identisch wäre. Eine weitere Möglichkeit der Inhibition der hämolytischen Aktivität stark hämolysierender *Brachyspira* spp. mittels Kulturfiltraten aus der stationären Vermehrungsphase wurde bereits oben beschrieben. Dieser Befund

5 Diskussion

weist auf eine hohe funktionelle Ähnlichkeit der Hämolsine der drei stark hämolysierenden *Brachyspira* spp. hin.

Die Interpretation der Versuche mit den hämolytischen Kulturfiltraten schwach hämolysierender *Brachyspira* spp. wurde wegen der sehr geringen Hämoglobin-Freisetzung aus den mit Hämolsinen exponierten Erythrozyten erschwert. Obwohl die hämolytische Aktivität trotz einer 20-stündigen Inkubation nur etwa 15 % der Aktivität der Hämolsine stark hämolysierender Spezies ausmachte, war dennoch eine leichte Inhibition durch PEG 6000 auszumachen. Demnach dürfte es sich bei den Hämolsinen der schwach hämolysierenden Spezies auch um porenbildende Substanzen handeln. Dies ist nach dem derzeitigen Stand der internationalen Literatur der erste Bericht über den möglichen Mechanismus der hämolytischen Aktivität schwach hämolysierender Brachyspiren.

Es ist bekannt, dass sowohl *B. hyodysenteriae* als auch *B. innocens* in Anwesenheit verschiedener *S. aureus*- bzw. *S. intermedius*-Stämme das sogenannte CAMP-Phänomen auslösen können (Beckmann, 1992). Der CAMP-Faktor bewirkt eine Zerstörung von Erythrozyten, nachdem diese durch Inkubation mit einer Sphingomyelinase desensibilisiert wurden (Christie et al., 1944). Die eigenen Untersuchungen bestätigten diesen Befund. Alle geprüften stark hämolysierenden (*B. hyodysenteriae*, *B. hamptonii*, *B. suanatina*) sowie schwach hämolysierenden Spezies (*B. pilosicoli*, *B. intermedia*, *B. innocens*, *B. murdochii*, *B. alvinipulli* und der Stamm *B. hyodysenteriae* G423) induzierten im klassischen CAMP-Test eine Verstärkung des β -Hämolsins von *S. aureus* (Daten nicht gezeigt). Interessant war die Frage, was dieses CAMP-Phänomen vermittelt und ob Unterschiede zwischen den stark und schwach hämolysierenden Spezies vorliegen. Zur näheren Analyse wurde ein modifizierter CAMP-Test entwickelt, mit dem die präparierten Hämolsine unter Verwendung eines aus *S. aureus* präparierten löslichen β -Hämolsins im Doppeldiffusionstest auf das Vorhandensein eines CAMP-ähnlichen Faktors untersucht werden konnten. Auch in diesem Test zeigten die präparierten Hämolsine der stark sowie schwach hämolysierenden Spezies ein CAMP-ähnliches Phänomen. Die Ausprägung der Hämolysezonen zeigte, dass ein CAMP-verstärkender Faktor bei den schwach hämolysierenden Spezies direkt in der Zone der wH aktiv war. Hier kam es direkt um das Stanzloch des Hämolsins der schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp. zu einer Verstärkung des β -Hämolsins von *S. aureus*. Bei den stark hämolysierenden Spezies folgte auf die Zone der sH ein Saum wH, in der es dann zur Verstärkung des CAMP-Phänomens kam. Dies lässt vermuten, dass die stark hämolysierenden Spezies über Hämolsine mit unterschiedlicher hämolytischer Aktivität verfügen. Davon führt das Hämolsin, welches eine wH hervorruft im modifizierten CAMP-Test zur Verstärkung des β -Hämolsins von *S. aureus*. Hinweise auf das Vorkommen unterschiedlich wirkender Hämolsine (sH bzw. wH) bei den stark hämolysierenden Spezies ergaben sich bei der Untersuchung der hämolytischen Aktivität

5 Diskussion

bei unterschiedlichen Temperaturen (s. Punkt 4.5.2). Bei 20 °C induzierten die Hämolsine der stark hämolysierenden Spezies einen schmalen Saum unvollständiger Hämolyse, die sich bei 37 °C zu einer vollständigen Hämolyse umwandelte. Mit Blick auf die Transkriptionsstudie könnte es sich bei den Hämolsinen, die die wH induzieren und gleichzeitig den CAMP-ähnlichen Faktor darstellen könnten, um das HlyA handeln. Die Hämolsine, die für die sH verantwortlich sind und möglicherweise lediglich die hämolytische Aktivität von HlyA erhöhen, könnten durch das TlyA verkörpert werden. Dies sind Hypothesen, deren Aufklärung mit Genmanipulationsverfahren nachgegangen werden könnte, zumal der CAMP-Faktor bei Streptokokken der Gruppe B (u.a. *Stc. agalactiae*) oder *Propionibacterium acnes* als Virulenzmerkmal diskutiert wird (Skalka und Smola, 1981; Litwin und Johnson, 2005; Lo et al., 2011; Kurosawa et al., 2016). Bis dato bleibt die abschließende Bedeutung des CAMP-Faktors im Rahmen der Virulenz und des bakteriellen Wachstums bei *Brachyspira* spp. jedoch ungeklärt (Hynes und Sloan, 2016).

In der Frage der biologischen Bedeutung der Hämolsine der stark hämolysierenden Brachyspiren besteht noch enormer Forschungsbedarf. Sicherlich sind für die sich in der Muzinschicht des Kolons befindlichen Brachyspiren nicht die Erythrozyten das primäre Ziel der produzierten Hämolsine, sofern dieser Vorgang tatsächlich auch *in vivo* stattfindet (Hutto, 1997), sondern eher die nächst gelegenen Epithelzellen. Mit Blick auf die durch pathologisch-histologische Untersuchungen demonstrierten Schäden an der Epithelzellschicht des Kolons von an SD erkrankten Schweinen war naheliegend, den Hämolsinen zytotoxische Wirkung zuzuweisen (Lysons et al., 1991). Entsprechend führten Versuche mit gereinigten Hämolsinen von *B. hyodysenteriae*, welche in präparierte Darmschlingen von Schweinen und Mäusen injiziert wurden, zu vergleichbaren Schäden wie bei der SD (Lysons et al., 1991; Hutto und Wannemuehler, 1999). Darüber hinaus waren die Hämolsine für eine große Anzahl verschiedener Zellkulturen, u.a. CHO, MDCK, HeLa als auch für porcine Enterozyten des Ileums und Colons zytotoxisch (Lysons et al., 1991; Muir et al., 1992; ter Huurne et al., 1994; Bland et al., 1995). Nach diesen Befunden werden bis zum heutigen Zeitpunkt die Hämolsine als Zytotoxine angesehen (Hutto und Wannemuehler, 1999), da nach 1999 keine Studien existieren, in denen etwas Gegenteiliges nachgewiesen wurde. Dem zu Folge sollten die während der Vermehrung der stark hämolysierenden Brachyspiren in Bouillon gewonnenen hämolytischen Kulturfiltrate aus dieser Arbeit auch zytotoxische Eigenschaften aufweisen, die als mikroskopisch erkennbare Abrundung der Zellen in zahlreichen Epithelzelllinien beschrieben wurden (Muir et al., 1992). Dennoch lässt das Fehlen einer erkennbaren Abrundung der Zellen nicht den Schluss zu, dass das Hämolsin kein Zytotoxin darstellt. Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen (s. Punkt 4.5.7) zum Nachweis eines Zytotoxins konnten jedoch nur zum Teil bestätigen, dass das Hämolsin auch eine zytotoxische Eigenschaft hat. Von den zahlreichen durchgeführten

5 Diskussion

Untersuchungen konnte nur in einigen Fällen Zytotoxizität, zumeist auch nur mit geringem Titer detektiert werden. Da in der Literatur zytotoxische Effekte auf einer Vielzahl von Zellen nachgewiesen wurden, wurden die bereits hausintern verwendeten und daher vom „Handling“ bekannten CrFK-Zellen verwendet (s. Punkt 4.5.7). Da eine große Zahl verschiedener Epithelzelllinien für Effekte des Zytotoxins empfänglich sein soll, kann weitestgehend ausgeschlossen werden, dass der fehlende, regelmäßige Nachweis des Zytotoxins auf eine Unempfindlichkeit der verwendeten Zellkulturen zurückzuführen ist. Ein weiteres Problem des Zytotoxin-Assays war, dass keine exakte Quantifizierung des Zytotoxins, sondern lediglich eine Titerbestimmung möglich war. Dennoch ist davon auszugehen, dass die Sensitivität der Zellkulturen in etwa mit der Sensitivität *in vivo* übereinstimmen sollte. Somit wäre es möglich, dass geringe Zytotoxin-Titer < 1:2 keine biologischen Zellveränderungen nach sich ziehen. Diese Hypothese bedarf jedoch weiterer Prüfung. Die Inokulation der Stämme erfolgte mit einer festgelegten Dosis von 5 - 6 WbE/ml. Jedoch kann die Wachstumskurve nicht eindeutig vorausgesagt werden, sodass die verwendeten Kulturfiltrate jeweils unterschiedlichen Punkten auf der Wachstumskurve entsprachen. Diese biologische Varianz schließt eine 100%-ige Vergleichbarkeit zwischen den Versuchen aus. Der Nachweis der Hämolyse ging nur in wenigen Fällen mit dem Nachweis einer Zytotoxizität einher. Da in einigen Fällen Kulturfiltrate ohne hämolytische Aktivität trotzdem eine zytotoxische Aktivität aufwiesen, scheint es sich bei den Hämolysinen und den Zytotoxinen nicht um identische Substanzen zu handeln. Bei den zytotoxischen Kulturfiltraten handelte es sich fast ausnahmslos um Kulturfiltrate aus der stationären Vermehrungsphase der Brachyspiren, die zeitlich auf die Freisetzung der Hämolysine aus der exponentiellen Phase folgte. Dies führte zu der Frage, ob für die Expression des Zytotoxins u.U. bestimmte Expressionsfaktoren erforderlich sind. Die hierzu durchgeführten Experimente unter Verwendung von diversen Bakterienextrakten, Antibiotika, Hefe-RNS sowie unterschiedlichen Inkubationstemperaturen führten nicht zur gewünschten Induktion einer zytotoxischen Aktivität. Da es somit auch nicht möglich war, Zytotoxin in größeren Mengen herzustellen, waren Untersuchungen zum Nachweis Zytotoxin-inhibierender Antikörper in Seren experimentell infizierter Schweine und immunisierter Kaninchen nicht durchführbar. Dennoch lieferte dieser Teil der Untersuchungen Belege für die Hypothese, dass es sich bei den Hämolysinen und den Zytotoxinen um zwei unterschiedliche Genprodukte handelt. Während die hämolytische Aktivität in nahezu allen Versuchsdurchgängen (49/52) nachgewiesen werden konnte, scheint die zytotoxische Aktivität unter der Kontrolle bislang unbekannter Expressionsfaktoren zu stehen. Bei anderen Bakterien ist bekannt, dass die hämolytische Aktivität mit der Synthese anderer Virulenzfaktoren verknüpft und zudem durch verschiedene Umweltfaktoren induzierbar bzw. unterdrückbar ist. Bei der Klonierung von Hämolysinen von *Bacteroides gingivalis* in *E. coli*-Stämmen stieg die hämolytische Aktivität in Abhängigkeit von Glutathion im Medium (Karunakaran und Holt, 1993). Bei *Bordetella pertussis* wird die Regulation der Genexpression

vom Sauerstoff-Level sowie dem Redoxpotential beeinflusst (Bannan et al., 1993). Bei *S. aureus* führte eine steigende Glucosekonzentration im Medium zu einer verringerten Expression des Regulatorgenes *agr* (Regassa et al., 1992). Weitere phänotypische Untersuchungen unter Verwendung verschiedener Zusätze im Medium könnten daher bei der Gattung *Brachyspira* zukünftig hilfreich sein, um das Zytotoxin nachzuweisen. Es konnte gezeigt werden, dass der Phänotyp stark und schwach hämolysierender Brachyspiren sich nicht nur durch das Vorliegen einer starken bzw. schwachen Hämolyse unterscheidet, sondern auch durch weitere Kriterien, wie z.B. der Temperaturstabilität oder der Freisetzung von Hämolsinen in Abhängigkeit von der Vermehrungsphase. Auf der anderen Seite gibt es aber auch Gemeinsamkeiten zwischen den Hämolsinen, wie die Ausprägung eines CAMP-ähnlichen Faktors oder die porenbildende Eigenschaft.

Hämolsin-inhibierende Antikörper in Seren *B. hyodysenteriae*-infizierter Schweine und -vakzinierter Kaninchen

Sollte TlyA den entscheidenden Wegbereiter für den stark hämolysierenden Phänotyp darstellen, dürfte in Anbetracht der nach den *in vitro*-Versuchen anzunehmenden massiven Freisetzung der Hämolsine auch eine Antikörperantwort zu erwarten sein. Aus früheren Versuchen standen Antiseren von experimentell mit *B. hyodysenteriae* infizierten Schweinen und Seren von Kaninchen, die gegen Ganzzelllysate von *B. hyodysenteriae* geimpft wurden, zur Verfügung (Tabelle 20 und 21). Zum Nachweis Hämolsin-spezifischer Antikörper (s. Punkt 4.6) wurde ein „Bioassay“ entwickelt, der eine Hemmung der hämolytischen Aktivität anhand einer reduzierten Hämoglobin-Freisetzung im Gemisch aus Serum, der Hämolsinpräparation H44 und Erythrozyten nachweisbar machte. Der Nachteil dieses „Bioassays“ lag in der hohen biologischen Variabilität der Ergebnisse und die damit limitierte Reproduzierbarkeit. Bezogen auf den Mittelwert aus beiden Versuchsansätzen (Erstversuch und Wiederholung) kam es zur Abweichung von bis zu 48 Prozentpunkten. Im Mittel war eine Abweichung von 20 Prozentpunkten zu verzeichnen. Messwiederholungen fanden auch bei den Kontrollschweinen statt. Hier ergab sich eine Abweichung von 15 Prozentpunkten. Um der biologischen Variabilität entgegen zu wirken erfolgte die Präparation einer großen Menge Hämolsinen (H44, *B. hyodysenteriae* B204, Serotyp 2, Serogruppe B), sodass von Seiten des Antigens keine Variation zu erwarten war. Alle Versuche wurden mit einem Hämolsintiter von 4 durchgeführt. Auch die Zusammensetzung der Seren blieb zwischen den Wiederholungsversuchen gleich. Einen möglichen Einfluss auf die Hämoglobin-Freisetzung könnten die Erythrozyten-Suspensionen haben. Die Erythrozyten unterlagen einer zeitabhängigen Degradation, sodass unterschiedlich gealterte Erythrozyten zur Verfügung standen. Es erscheint wahrscheinlich, dass im Rahmen des Alterungsprozesses der Erythrozyten eine Hämolyse leichter von vorstattengehen könnte. Außerdem kamen unterschiedliche Chargen der Erythrozyten-Suspensionen zur Anwendung.

5 Diskussion

Bezogen auf die verwendeten Seren war eine Standardisierung nicht möglich, d. h. der Gehalt an Antikörpern vor bzw. nach der Infektion/Immunisierung konnte nicht anderweitig kontrolliert werden. Eine annäherungsweise Bestimmung wäre über die Messung des Gesamtproteins möglich gewesen. Zusätzlich erfolgten die Infektionsversuche der Schweine unterschiedlich lange, z.B. verstarben einige Schweine im Rahmen der Infektion, wodurch eine Antikörper-Bildung ggf. nicht möglich war. Bei den Immunisierungsversuchen der Kaninchen ist zu bedenken, dass jedes Kaninchen unterschiedlich auf die Impfung angesprochen haben kann, was sich auf die Höhe des Antikörper-Titers auswirkt. Auffallend waren zudem einige Kaninchenserum, in denen vor der Vakzinierung ein höherer Antikörper-Spiegel als nach der Vakzinierung nachweisbar war. Dies mag an Fütterungseinflüssen oder sonstigen Bestandteilen des Serums liegen, die an der Erythrozyten-Oberfläche adhärieren könnten und somit eine Porenbildung der Hämolsine verhindern könnten.

Statistische Auswertungen innerhalb der Versuche, d. h. ein Vergleich der Hämoglobin-Freisetzung vor und nach der Infektion bzw. Immunisierung waren dennoch möglich. So ergab die Untersuchung der vor und nach der experimentellen Infektion gewonnenen Schweineseren mit serologisch (basierend auf dem LOS) und genetisch (ST) unterschiedlichen *B. hyodysenteriae*-Stämmen einen signifikanten Anstieg der Hämolsin-inhibierenden Antikörper, die sich im Test als eine reduzierte Freisetzung von Hämoglobin zeigte. Von den 19 Schweinen, die mit dem Stamm B204 infiziert wurden, war bei vier Tieren eine entsprechende Reduktion der Hämoglobin-Freisetzung zu erkennen, diese ist gleichbedeutend mit dem Vorhandensein Hämolsin-inhibierender Antikörper. Hierbei ist zu bedenken, dass die Untersuchung der Schweine bereits vier Wochen nach Infektion (Ende des Versuchs) erfolgte, was möglicherweise zur Ausbildung einer Immunantwort gegenüber den Hämolsinen, welche erst später im Verlauf der Infektion freigesetzt werden, zu kurz war. Dennoch belegen diese Ergebnisse, dass eine Infektion mit *B. hyodysenteriae* tatsächlich zur Bildung Hämolsin-inhibierender Antikörper führt, was den Hämolsinen eine potenzielle immunologische Bedeutung verleiht. Dies ließ erwarten, dass die Untersuchung der Kaninchenserum zu ähnlichen Ergebnissen führen müsse. Bei den mit Ganzzelllysaten verschiedener Serotypen von *B. hyodysenteriae* geimpften Kaninchen zeigte sich im Serum jenes Kaninchens, das gegen das Ganzzelllysate von *B. hyodysenteriae* B204 (Serotyp 2/Serogruppe B) immunisiert wurde (Kaninchenserum Nr. 23), die stärkste Reduktion der Hämoglobin-Freisetzung. Da auch die im HIT verwendete Hämolsinpräparation (H44) vom Stamm B204 hergestellt wurde, könnte die Immunantwort gegenüber den Hämolsinen vom Serotyp beeinflussbar sein. Der Schutz nach Impfung mit Ganzzellvakzinen ist bekannterweise serotypspezifisch (Joens et al., 1985). Auch bei diesen Überlegungen ist einzuschränken, dass für die Impfversuche mit verschiedenen Serotypen von *B. hyodysenteriae* jeweils nur ein bis zwei Kaninchen zur Verfügung standen.

5 Diskussion

Um zu verifizieren, dass die Hämolsine immunogenen Charakter besitzen bestünde die Möglichkeit SPF-Ferkel mit den präparierten Hämolsinen (z.B. H44) zu vakzinieren, um in einem nachfolgenden Infektionsversuch die Reduktion der Läsionen im Dickdarm im Vergleich zu einer Kontrollgruppe zu evaluieren. Weitere serologische Ansätze könnten darin bestehen den HIT mit einer größeren Anzahl an Schweinen, die gegen die einzelnen Hämolsine vakziniert wurden zu wiederholen. Möglicherweise könnte man nach der Inkubation von Antiseren gegen eines der Hämolsine und eines *B. hyodysenteriae*-Stammes eine reduzierte hämolytische Aktivität auf der Agarplatte wahrnehmen. Somit könnte bestätigt werden, ob TlyA an der sH beteiligt ist, wie es bereits von ter Huurne et al. (1992) gemutmaßt wurde. Dieselben Versuche könnten dann mit den übrigen Hämolsinen unternommen werden, woraus sich möglicherweise ein Bild der beteiligten Hämolsine an der sH ergeben könnte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Nachweis von Hämolsin-inhibierenden Antikörpern nicht regelmäßig stattfand, was zum einen auf die Versuchsdauer (28 - 35 Tage) zurückzuführen sein könnte, die nicht ausreichend war, um bei allen infizierten Schweinen eine Antikörper-Bildung zu erreichen. Andererseits könnte die geringe Antikörperbildung auch dem vorzeitigen Abbau der Hämolsine (durch freigesetzte Substanzen aus der stationären Phase der Vermehrung, s. Punkt 4.5.4) geschuldet sein, sodass das wirtseigene Immunsystem keine Zeit für die Bildung von Antikörpern hatte. Bezogen auf die geringen Antikörper-Nachweise bei den Kaninchenseren könnte eine mögliche Ursache in den unterschiedlichen verwendeten Serotypen liegen.

6. Zusammenfassung

Brachyspira (B.) hyodysenteriae und andere stark hämolysierende *Brachyspira* spp., wie *B. suanatina* und *B. hampsonii*, verursachen die Schweinedysenterie (SD), eine mukohämorrhagische Diarrhoe bei Mastschweinen, die von enormer wirtschaftlicher Bedeutung ist. Der Phänotyp der starken Hämolyse dieser *Brachyspira* spp. scheint hierbei von entscheidender pathogenetischer Bedeutung zu sein. Vier Hämolysingene (*tlyA*, *tlyB*, *tlyC*, and *hlyA*) sowie vier putative Hämolysingene (*BHWA1_RS02195*, *BHWA1_RS02885*, *BHWA1_RS04705*, *BHWA1_RS09085*) sind derzeit bekannt. Inwieweit die einzelnen Gene den stark hämolysierenden Phänotyp bedingen, ist jedoch nicht geklärt. Auch Untersuchungen zur Diversität von *B. hyodysenteriae*, insbesondere von Isolaten aus Deutschland, liegen nicht in einem Umfang vor, der eine phylogenetische Einordnung in den Kontext internationaler Stämme erlauben würde.

Der erste Teil dieser Arbeit umfasste Untersuchungen zur Populationsstruktur von *B. hyodysenteriae*. Dazu wurden von 174 in dieser Arbeit inkludierten stark hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämmen von Schweinen 127 Stämme aus unterschiedlichen Jahren (1990 bis 2016) und Ländern, insbesondere aus Deutschland (n=116) mittels Multilokus-Sequenztypisierung (MLST) analysiert. Unter den 116 Stämmen aus Deutschland kamen die drei Sequenztypen (STs) ST52 (41,4 %), ST8 (12,1 %) und der erstmalig nachgewiesene ST112 (25,9 %) gehäuft vor. Die übrigen Stämme verteilten sich auf zwölf weitere, ebenfalls neue STs (ST113 - ST118, ST120 - ST123, ST131 und ST193). Bei einem Vergleich veröffentlichter STs von 619 internationalen *B. hyodysenteriae*-Stämmen und den in dieser Arbeit untersuchten Stämmen zeigten sich Häufungen bestimmter STs in einzelnen europäischen Ländern, die vermutlich auf den EU-Binnenhandel mit Schweinen zurückgehen. So war der ST52 sowohl in Deutschland als auch in Italien, Spanien, Belgien und Österreich vertreten. Die übrigen STs waren überwiegend auf ein Land beschränkt, wie bspw. der ST83, der bislang nur in Italien zu finden ist. Ein ähnliches Bild zeigte sich außerhalb von Europa, wo bspw. der ST64 und der ST36 nur in Australien zu finden waren. Die insgesamt 186 STs konnten auf der Basis von Einzel- und Mehrfachlokus-Varianten in wenige dominante klonale Komplexe eingeordnet werden. Somit zeigte sich neben einer stetigen Mikroevolution der Stämme die Verbreitung dominanter, z.T. länderspezifischer Cluster. Neben diesen geographischen Besonderheiten konnten auch im zeitlichen Verlauf unterschiedliche Verteilungsmuster der STs gefunden werden. Unter den STs der Stämme aus Deutschland konnte der ST112 erst nach der Jahrtausendwende isoliert werden, während der ST8 und ST52 bereits in den 1990er Jahren nachgewiesen wurden.

6 Zusammenfassung

In einem weiteren Teil der Arbeit sollten der genetische Hintergrund der starken Hämolyse und das Virulenzspektrum von *B. hyodysenteriae* untersucht werden. Mittels PCR konnten die acht Hämolysingene bei allen 175 *B. hyodysenteriae*-Stämmen (inkl. ein schwach hämolysierender Stamm) nachgewiesen werden. Mittels einer *in silico*-Analyse von Ganzgenomsequenzen konnten die acht Hämolysingene auch bei schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp.-Stämmen mit einer Nukleinsäureähnlichkeit von 80,06 % - 100 % verglichen mit dem Referenzstamm *B. hyodysenteriae* WA1 nachgewiesen werden. Die Nukleinsäureähnlichkeiten der Hämolysingene bei 32 stark hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämmen aus dieser Arbeit, die unterschiedliche STs aus Deutschland repräsentierten, lagen zwischen 97,8 und 100 %. Aufgrund fehlender Quartärstruktur-Modelle für *Brachyspira* spp.-Hämolysine, sind die Auswirkungen der Mutationen auf den Phänotyp nicht vorhersagbar. Die Ergebnisse bestätigen eine bisherige Hypothese, nach der die Hämolysingene unter allen *Brachyspira* spp. regelmäßig vorkommen und gleichzeitig hoch konserviert bei der Spezies *B. hyodysenteriae* sind. Basierend auf einem Vergleich konkatenierter Sequenzen der „Housekeeping“-Gene und der Hämolysingene konnte, mit Ausnahme des putativen Hämolysingens *BHWA1_RS02195*, keine signifikante Korrelation zwischen Hämolysingensequenz und ST gezeigt werden. Bis auf *BHWA1_RS02195* scheinen sich die Hämolysingene also unabhängig von den sieben „Housekeeping“-Genen, die einen Teil des Kerngenoms von *B. hyodysenteriae* repräsentieren, zu entwickeln. Dies könnte auf die Fähigkeit des Erregers hindeuten, sich an Umwelt-/Wirtseinflüsse optimal anzupassen.

Von den weiteren Virulenzgenen waren auch die Membranprotein-kodierenden Gene *bhlp29.7*, *bhmp39f* sowie die Eisenmetabolismus-Gene *ftnA* und *bitC* regelmäßig bei allen 174 stark hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämmen nachweisbar (87,9 - 100 %). Eine Korrelation zum Genotyp konnte lediglich für das Membranprotein-kodierende Gen *bhlp16* ermittelt werden, da es in den Stämmen des Sequenztypkomplexes STC52 signifikant seltener vorkam (14,6 %).

Weitere Untersuchungen zum hämolysierenden Phänotyp von *B. hyodysenteriae* erfolgten durch einen Vergleich der Transkriptionsaktivitäten der acht Hämolysingene bei einem stark und einem schwach hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stamm mittels quantitativer Real-Time PCR. Vor dem Beginn der hämolytischen Phase des stark hämolysierenden Stammes B204 konnte ein Anstieg der Transkription des Gens *BHWA1_RS04705* festgestellt werden. Während der hämolytischen Phase wurden *tlyA* und *tlyC* im Stamm B204 stärker transkribiert. Der schwach hämolysierende Stamm G423 hingegen transkribierte die Hämolysingene *tlyB* und *hlyA* stärker als B204. Die Hämolysingene *BHWA1_RS02885*, *BHWA1_RS09085* und *BHWA1_RS02915* zeigten kein eindeutiges Muster, sodass kein eindeutiger Hinweis auf de-

6 Zusammenfassung

ren Beteiligung an der Hämolyse vorliegt. Die in der Literatur beschriebene Mutation im Promotorbereich von *hlyA* bei schwach hämolysierenden *B. hyodysenteriae*-Stämmen konnte auch im vorliegenden Stamm G423 nachgewiesen werden. Jedoch beeinflusste diese Mutation nicht die Transkription des Gens. Nach den vorliegenden Daten könnte BHWA1_RS04705 die Transkription von *tlyA* triggern und so den stark hämolysierenden Phänotyp hervorrufen. TlyB und/oder HlyA könnten am schwach hämolysierenden Phänotyp beteiligt sein.

Untersuchungen mit präpariertem Hämolsin von stark und schwach hämolysierenden *Brachyspira* spp. führten zu folgenden Ergebnissen: beide Hämolsinpräparationen scheinen als Porenbildner zu fungieren, da in beiden Fällen die hämolytische Aktivität in Anwesenheit von Osmoprotektoren (Polyethylenglykol 6000) reduziert werden konnte. Als weitere Gemeinsamkeit war die maximale hämolytische Aktivität bei einer Temperatur von 37 °C zu verzeichnen. Beide Hämolsine scheinen zudem einen CAMP-ähnlichen Faktor darzustellen. Die Ergebnisse des modifizierten CAMP-Testes geben Hinweise, dass stark hämolysierende Spezies zwei Arten von Hämolsinen (stark und schwach) und schwach hämolysierende Spezies nur eine Art von Hämolsinen (schwach) besitzen. Im Gegensatz dazu unterscheidet sich die Temperaturstabilität. Während die Hämolsine der stark hämolysierenden Spezies bei einer Temperatur von 60 °C nach 15 Minuten inaktiviert wurden, behielten die Hämolsine der schwach hämolysierenden Spezies auch nach zwei Stunden ihre Aktivität. Auch der Zeitpunkt der Hämolsinfreisetzung während der Vermehrung in flüssigem Nährmedium unterschied sich bei den stark hämolysierenden (exponentielle Phase) und den schwach hämolysierenden (stationäre Phase) Spezies. Während bei Vermehrung in Bouillon regelmäßig eine hämolytische Aktivität nachgewiesen werden konnte, erfolgte dies nur selten hinsichtlich der zytotoxischen Aktivität. Von 53 Versuchsansätzen, in denen *B. hyodysenteriae*-Stämme unterschiedlicher Sero- und Sequenztypen bei verschiedenen Wachstumsbedingungen [Zusatz von Antibiotika (Colistin, Vancomycin, Spectinomycin, Spiramycin, Rifampicin) zum Nährmedium, Zusatz von Schweinefäzesextrakt, Zusatz von Anaerobierextrakten (*Fusobacterium necrophorum*, *Bacteroides stercoris*), Zusatz von RNS von Hefen, unterschiedliche Inkubationstemperaturen] untersucht wurden, konnten in 17 Ansätzen zytotoxische Effekte festgestellt werden. Diese traten ausschließlich bei dem *B. hyodysenteriae*-Stamm B204 und unabhängig von den unterschiedlichen Wachstumsbedingungen auf. Von 341 Zellkulturfiltraten aus 52 Ansätzen waren nur zehn Filtrate aus acht Ansätzen zeitgleich hämolytisch und zytotoxisch. Möglicherweise entfalten die Zytotoxine erst unter Einwirkung bestimmter, bis dato unbekannter Transkriptionsfaktoren ihre vollständige Aktivität. Zunächst muss daher die Existenz separater Zytotoxine bei *B. hyodysenteriae* angenommen werden.

6 Zusammenfassung

Abschließende serologische Untersuchungen fokussierten sich auf das immunologische Potential der Hämolsine. Dazu wurden 32 Seren von Schweinen, die in früheren Studien experimentell mit *B. hyodysenteriae* infiziert bzw. 25 Seren von Kaninchen, die mit Ganzzelllysaten von *B. hyodysenteriae* vakziniert wurden hinsichtlich des Auftretens Hämolysin-inhibierender Antikörper mittels Hämolysin-Inhibitions-Test untersucht. Sieben Schweine- und sechs Kaninchenserum wiesen Hämolysin-inhibierende Antikörper auf. Dies lässt vermuten, dass die Hämolsine zwar immunogen sind, aber möglicherweise zu kurzzeitig und/oder in zu geringen Mengen freigesetzt, bzw. zu schnell abgebaut werden, um als Antigen ausreichend wirksam zu sein. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass die präparierten Hämolsine eine Mischung aller acht Hämolsine darstellen, sodass weitere Untersuchungen notwendig sind, um die Antigenität der einzelnen Hämolsine zu bestimmen.

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass *B. hyodysenteriae* nach bisherigem Kenntnisstand eine schwach klonale Spezies darstellt. Die regionale Häufung bestimmter klonaler Linien bzw. das ausnahmslose Vorkommen einzelner Genotypen in bestimmten Ländern und Kontinenten erlaubt erste Rückschlüsse auf den Einfluss des Tierhandels auf die epidemiologische Verbreitung von *B. hyodysenteriae*. Es konnten Hinweise gefunden werden, dass TlyA, TlyC und/oder BHWA1_RS04705 eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der starken Hämolyse bei *B. hyodysenteriae* einnehmen, während TlyB und HlyA vermutlich die schwache Hämolyse verursachen. Auch phänotypisch konnten Kriterien gefunden werden, um die Hämolsine der unterschiedlich stark hämolysierenden Spezies voneinander abzugrenzen. Der gelegentliche Nachweis Hämolysin-inhibierender Antikörper nach experimenteller Infektion bzw. Vakzination von Schweinen und/oder Kaninchen bestätigte die Antigenität der Hämolsine, jedoch müssen weitere Untersuchungen den Anteil einzelner Hämolsine an dieser Eigenschaft klären.

7. Summary

Brachyspira (*B.*) *hyodysenteriae* and other strongly hemolytic *Brachyspira* spp., such as *B. suanatina* and *B. hampsonii*, cause swine dysentery (SD), a muco-hemorrhagic diarrhea of significant economic importance in fattening pigs. The phenotype of the strong hemolysis of these *Brachyspira* spp. seems to be crucial for the pathogenesis of SD. Currently, four hemolysin genes (*tlyA*, *tlyB*, *tlyC*, and *hlyA*) and four putative hemolysin genes (*BHWA1_RS02195*, *BHWA1_RS02885*, *BHWA1_RS04705*, *BHWA1_RS09085*) are known. How individual genes determine the strong hemolytic phenotype, however, has not been clarified. Also, studies on the diversity of *B. hyodysenteriae*, especially of isolates from Germany, are not available to a level that would allow for a phylogenetic classification of strains in an international context.

The first part of this work included studies on the population structure of *B. hyodysenteriae*. For this purpose, 127 strains of 174 strongly hemolytic *B. hyodysenteriae* strains of pigs from different years (1990 to 2016) and countries, especially from Germany (n=116), were analyzed using multilocus sequence typing (MLST). Among the 116 strains from Germany, the three sequence types (STs) ST52 (41.4 %), ST8 (12.1 %) and ST112 (25.9 %), which was detected for the first time, were predominant. The remaining strains were distributed among twelve further, also novel STs (ST113 - ST118, ST120 - ST123, ST131 and ST193). A comparison of published STs of 619 international *B. hyodysenteriae* strains and the strains examined in this study showed an accumulation of certain STs in individual European countries, which may refer to the EU internal trade in pigs. ST52 was found in Germany as well as in Italy, Spain, Belgium and Austria. The remaining STs were predominantly restricted to one country, such as ST83, which has only been found in Italy so far. A similar picture was observed outside Europe. Here, the ST64 and ST36 were only found in Australia. Overall, 186 STs could be classified into a few dominant clonal complexes based on single and multiple locus variants. Thus, in addition to an ongoing microevolution of the strains, the distribution of dominant, partly country-specific clusters became apparent. In addition to these geographical features, different patterns of STs were also found over time. Of the STs of the strains from Germany, ST112 could only be isolated after the turn of the millennium, while ST8 and ST52 were already detected in the 1990s.

In another part of this study, the genetic background of the strong hemolysis and the virulence gene spectrum of *B. hyodysenteriae* should be analyzed. Using PCR, the eight hemolysin genes could be detected in all 175 *B. hyodysenteriae* strains (including one weakly hemolytic strain). By means of an *in silico*-analysis of whole genome sequences, the eight hemolysin genes could also be detected in weakly hemolytic *Brachyspira* spp. strains with a nucleic acid similarity of 80.06 % - 100 % compared to the reference strain *B. hyodysenteriae* WA1. The

7 Summary

nucleic acid similarities of the hemolysins of 32 strongly hemolytic *B. hyodysenteriae* strains from this study, which represented different STs from Germany, were between 97.8 and 100 %. Due to the lack of quaternary structure models for *Brachyspira* spp. hemolysins, the effects of the mutations on the phenotype cannot be predicted. The results confirm a previous hypothesis that implies, that the hemolysin genes regularly occur among all *Brachyspira* spp. and that they are highly conserved in the species *B. hyodysenteriae*. Based on a comparison of concatenated sequences of housekeeping genes and hemolysin genes, a significant correlation between hemolysin gene sequences and STs could not be determined, except for the putative hemolysin gene *BHWA1_RS02195*. Thus, most hemolysin genes seem to develop independently of the seven housekeeping-genes which represent a part of the core genome of *B. hyodysenteriae*. This could indicate the ability of the pathogen to adapt perfectly to environmental/host factors.

Of the other virulence genes, the membrane protein-coding genes *bhlp29.7*, *bhmp39f* and the iron metabolism genes *ftnA* and *bitC* were also frequently detected (87.9 - 100 %) in all 174 strongly hemolytic *B. hyodysenteriae* strains. A correlation to the genotype could only be determined for the membrane protein-coding gene *bhlp16*, as it was significantly less abundant (14.6%) in strains belonging to the sequence type complex STC52.

Further studies on the hemolytic phenotype of *B. hyodysenteriae* were performed by comparing the transcriptional activities of the eight hemolysin genes in a strongly and a weakly hemolytic *B. hyodysenteriae* strain by means of quantitative real-time PCR. Prior to the start of the hemolytic phase of the strongly hemolytic strain B204, an increase in the transcription of the gene *BHWA1_RS04705* was observed. During the hemolytic phase, *tlyA* and *tlyC* were more effectively transcribed in strain B204. In contrast, the weakly hemolytic strain G423 showed higher transcription of the hemolysin genes *tlyB* and *hlyA* compared to B204. As the hemolysin genes *BHWA1_RS02885*, *BHWA1_RS09085* and *BHWA1_RS02915* did not show a clear pattern, clear evidence for their involvement in hemolysis could not be shown. The mutation in the *hlyA* promoter region of weakly hemolytic *B. hyodysenteriae* strains, as described in the literature, could also be identified in strain G423. However, this mutation did not alter the transcription of the gene. According to the available data, *BHWA1_RS04705* could trigger the transcription of *tlyA* and thus cause the strongly hemolytic phenotype. *TlyB* and/or *HlyA* could be involved in the weakly hemolytic phenotype.

Studies with prepared hemolysin of strongly and weakly hemolytic *Brachyspira* spp. led to the following results: both hemolysin preparations seem to act as pore formers, since the hemolytic activity could be reduced in the presence of osmoprotectors (polyethylene glycol 6000) in both cases. Another common feature was the maximum hemolytic activity at a temperature of 37 °C. Both hemolysins also seem to represent a CAMP-like factor. The results of the modified

7 Summary

CAMP test indicate that strongly hemolytic species might have two types of hemolysins (strong and weak), while weakly hemolytic species have only one type of hemolysin (weak). In contrast, differences were observed in the temperature stability. While the hemolysins of the strongly hemolytic species were inactivated after 15 min at a temperature of 60 °C, hemolysins of the weakly hemolytic species maintained their activity over two hours. During growth in liquid culture medium the time of hemolysin release also differed between the strongly hemolytic (exponential phase) and the weakly hemolytic (stationary phase) species. While hemolytic activity was regularly detected during growth in broth, this was only rarely the case for the cytotoxic activity. Of 53 experimental approaches, in which *B. hyodysenteriae* strains of different sero- and sequence types under different growth conditions [addition of antibiotics (colistin, vancomycin, spectinomycin, spiramycin, rifampicin) to the nutrient medium, addition of pig feces extract, addition of anaerobic extracts (*Fusobacterium necrophorum*, *Bacteroides stercoris*), addition of RNA from yeasts, different incubation temperatures] cytotoxic effects were identified in 17 approaches. These effects were exclusively identified in *B. hyodysenteriae* strain B204 and were independent from different growth conditions. Of 341 cell culture filtrates from 52 approaches, only ten filtrates from eight approaches were at the same time hemolytic and cytotoxic. It may be possible that the cytotoxins develop their full activity only under the influence of certain, hitherto unknown transcription factors. So far, the existence of separate cytotoxins in *B. hyodysenteriae* can only be assumed.

Final serological investigations focused on the immunological potential of the hemolysins. For this purpose, 32 sera from pigs, which were previously infected experimentally with *B. hyodysenteriae*, and 25 sera from rabbits, which were vaccinated with whole cell lysates of *B. hyodysenteriae*, were analyzed for the presence of hemolysin-inhibiting antibodies by means of a hemolysin inhibition test. Seven pig and six rabbit sera revealed hemolysin-inhibiting antibodies. This suggests that hemolysins could be immunogenic but may be either released for a too short time, in too small amounts or that they may be rapidly degraded, by that impairing their effectivity as an antigen. It must be noted that the prepared hemolysins represent a mixture of all eight hemolysins. Thus, further investigations are necessary to determine the antigenicity of individual hemolysins.

The data of the present study show that, according to current knowledge, *B. hyodysenteriae* is a weakly clonal species. Regional accumulation of certain clonal complexes or the exclusive occurrence of individual genotypes in certain countries and continents allows for initial conclusions with regard to the impact of animal trade on the epidemiological distribution of *B. hyodysenteriae* strains. Furthermore, evidence was found for TlyA, TlyC and/or BHWA1_RS04705 playing an important role in the development of strong hemolysis in *B. hyodysenteriae*, while

7 Summary

TlyB and HlyA may cause weak hemolysis. Phenotypic criteria could also be identified to distinguish the hemolysins of different hemolytic species. The occasional detection of hemolysin-inhibiting antibodies after experimental infection or vaccination of pigs and/or rabbits confirmed the antigenicity of the hemolysins. The role of each individual hemolysin in this respect, however, must be clarified in further studies.

8. Literaturverzeichnis

- Aarestrup, F.M., Larsen, H.D., Eriksen, N.H., Elsberg, C.S., Jensen, N.E. (1999): Frequency of alpha- and beta-haemolysin in *Staphylococcus aureus* of bovine and human origin. A comparison between pheno- and genotype and variation in phenotypic expression. *APMIS* 107 (4):425–430.
- Achacha, M., Messier, S., Mittal, K.R. (1996): Development of an experimental model allowing discrimination between virulent and avirulent isolates of *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae*. *Can J Vet Res* 60 (1):45–49.
- Alvarez-Ordóñez, A., Martínez-Lobo, F.J., Arguello, H., Carvajal, A., Rubio, P. (2013): Swine dysentery: aetiology, pathogenicity, determinants of transmission and the fight against the disease. *Int J Environ Res Public Health* 10 (5):1927–1947.
- Argenzio, R.A., Whipp, S.C., Glock, R.D. (1980): Pathophysiology of swine dysentery: colonic transport and permeability studies. *J Infect Dis* 142 (5):676–684.
- Atyeo, R.F., Oxberry, S.L., Hampson, D.J. (1996): Pulsed-field gel electrophoresis for sub-specific differentiation of *Serpulina pilosicoli* (formerly '*Anguillina coli*'). *FEMS Microbiol Lett* 141 (1):77–81.
- Atyeo, R.F., Oxberry, S.L., Hampson, D.J. (1999): Analysis of *Serpulina hyodysenteriae* strain variation and its molecular epidemiology using pulsed-field gel electrophoresis. *Epidemiol Infect* 123 (1):133–138.
- Backhans, A., Jansson, D.S., Aspán, A., Fellström, C. (2011): Typing of *Brachyspira* spp. from rodents, pigs and chickens on Swedish farms. *Vet Microbiol* 153 (1-2):156–162.
- Baida, G.E., Kuzmin, N.P. (1996): Mechanism of action of hemolysin III from *Bacillus cereus*. *Biochim Biophys Acta* 1284 (2):122–124.
- Bannan, J.D., Moran, M.J., MacInnes, J.I., Soltes, G.A., Friedman, R.L. (1993): Cloning and characterization of *btr*, a *Bordetella pertussis* gene encoding an FNR-like transcriptional regulator. *J Bacteriol* 175 (22):7228–7235.
- Bano, L., Merialdi, G., Bonilauri, P., Dall'Anese, G., Capello, K., Comin, D. et al. (2008): Prevalence, disease associations and risk factors for colonization with intestinal spirochaetes (*Brachyspira* spp.) in flocks of laying hens in north-eastern Italy. *Avian Pathol* 37 (3):281–286.
- Barth, S., Gömmel, M., Baljer, G., Herbst, W. (2012): Demonstration of genes encoding virulence and virulence life-style factors in *Brachyspira* spp. isolates from pigs. *Vet Microbiol* 155 (2-4):438–443.
- Baum, D.H., Joens, L.A. (1979a): Serotypes of beta-hemolytic *Treponema hyodysenteriae*. *Infect Immun* 25 (3):792–796.
- Beckmann, G. (1992): A CAMP-like phenomenon in *Serpulina (Treponema) spp.* *Zentralbl Bakteriol* 277 (3):296–299.
- Bellgard, M.I., Wanchanthuek, P., La, T., Ryan, K., Moolhuijzen, P., Albertyn, Z. et al. (2009): Genome sequence of the pathogenic intestinal spirochete *Brachyspira hyodysenteriae* reveals adaptations to its lifestyle in the porcine large intestine. *PLoS ONE* 4 (3):e4641.
- Binek, M., Szykiewicz, Z.M. (1984): Physiological properties and classification of strains of *Treponema* sp. isolated from pigs in Poland. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 7 (3-4):141–148.

- Black, M., Moolhuijzen, P., Barrero, R., La, T., Phillips, N., Hampson, D. et al. (2015): Analysis of multiple *Brachyspira hyodysenteriae* genomes confirms that the species is relatively conserved but has potentially important strain variation. *PLoS ONE* 10 (6):e0131050.
- Bland, A.P., Frost, A.J., Lysons, R.J. (1995): Susceptibility of porcine ileal enterocytes to the cytotoxin of *Serpulina hyodysenteriae* and the resolution of the epithelial lesions: an electron microscopic study. *Vet Pathol* 32 (1):24–35.
- Borboldis, F., Syntichaki, P. (2015): Cytoplasmic mRNA turnover and ageing. *Mech Ageing Dev* 152:32–42.
- Boye, M., Baloda, S.B., Leser, T.D., Møller, K. (2001): Survival of *Brachyspira hyodysenteriae* and *B. pilosicoli* in terrestrial microcosms. *Vet Microbiol* 81 (1):33–40.
- Brand, Y., Hovav, R. (2010): Identification of Suitable Internal Control Genes for Quantitative Real-Time PCR Expression Analyses in Peanut (*Arachis hypogaea*). *Peanut Sci* 37 (1):12–19.
- Brandenburg, A.C., Miniats, O.P., Geissinger, H.D., Ewert, E. (1977): Swine dysentery: inoculation of gnotobiotic pigs with *Treponema hyodysenteriae* and *Vibrio coli* and a *Peptostreptococcus*. *Can J Comp Med* 41 (3):294–301.
- Brooke, C.J., Hampson, D.J., Riley, T.V. (2003): In vitro antimicrobial susceptibility of *Brachyspira pilosicoli* isolates from humans. *Antimicrob Agents Chemother* 47 (7):2354–2357.
- Burrough, E.R., Strait, E.L., Kinyon, J.M., Bower, L.P., Madson, D.M., Wilberts, B.L. et al. (2012): Comparative virulence of clinical *Brachyspira* spp. isolates in inoculated pigs. *J Vet Diagn Invest* 24 (6):1025–1034.
- Card, R.M., La, T., Burrough, E.R., Ellis, R.J., Nunez-Garcia, J., Thomson, J.R. et al. (2019): Weakly haemolytic variants of *Brachyspira hyodysenteriae* newly emerged in Europe belong to a distinct subclade with unique genetic properties. *Vet Res* 50 (1):21.
- Carvalho, E., Barbosa, A.S., Gómez, R.M., Cianciarullo, A.M., Hauk, P., Abreu, P.A. et al. (2009): Leptospiral TlyC is an extracellular matrix-binding protein and does not present hemolysin activity. *FEBS Lett* 583 (8):1381–1385.
- Casas, V., Vadillo, S., San Juan, C., Carrascal, M., Abian, J. (2016): The exposed proteomes of *Brachyspira hyodysenteriae* and *B. pilosicoli*. *Front Microbiol* 7:1103.
- Chander, Y., Primus, A., Oliveira, S., Gebhart, C.J. (2012): Phenotypic and molecular characterization of a novel strongly hemolytic *Brachyspira* species, provisionally designated "*Brachyspira hampsonii*". *J Vet Diagn Invest* 24 (5):903–910.
- Chia, S.P., Taylor, D.J. (1978): Factors affecting the survival of *Treponema hyodysenteriae* in dysenteric pig faeces. *Vet Rec* 103 (4):68–70.
- Christie, K., Atkins, N.E., Munch-Petersen, E. (1944): A note on a lytic phenomenon shown by group B *Streptococci*. *Aust J Exp Biol Med Sci* 22 (3):197–200.
- Chung, H.J., Ferl, R.J. (1999): Arabidopsis alcohol dehydrogenase expression in both shoots and roots is conditioned by root growth environment. *Plant Physiol* 121 (2):429–436.
- Costa, M.O., Hill, J.E., Fernando, C., Lemieux, H.D., Detmer, S.E., Rubin, J.E., Harding, J.C.S. (2014): Confirmation that "*Brachyspira hampsonii*" clade I (Canadian strain 30599) causes mucohemorrhagic diarrhea and colitis in experimentally infected pigs. *BMC Vet Res* 10:129.
- Davis, A.J., Smith, S.C., Moore, R.J. (2005): The *Brachyspira hyodysenteriae* *ftnA* gene: DNA vaccination and real-time PCR quantification of bacteria in a mouse model of disease. *Curr Microbiol* 50 (6):285–291.

- Deckert, G., Warren, P.V., Gaasterland, T., Young, W.G., Lenox, A.L., Graham, D.E. et al. (1998): The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature* 392 (6674):353–358.
- del Castillo, F.J., Leal, S.C., Moreno, F., del Castillo, I. (1997): The *Escherichia coli* K-12 *sheA* gene encodes a 34-kDa secreted haemolysin. *Mol Microbiol* 25 (1):107–115.
- Dinges, M.M., Orwin, P.M., Schlievert, P.M. (2000): Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 13 (1):16.
- Domann, E., Chakraborty, T. (1989): Nucleotide sequence of the listeriolysin gene from a *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a strain. *Nucleic Acids Res* 17 (15):6406.
- Dugourd, D., Martin, C., Rioux, C.R., Jacques, M., Harel, J. (1999): Characterization of a periplasmic ATP-binding cassette iron import system of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*. *J Bacteriol* 181 (22):6948–6957.
- Fellström, C., Gunnarsson, A. (1995): Phenotypical characterisation of intestinal spirochaetes isolated from pigs. *Res Vet Sci* 59 (1):1–4.
- Fellström, C., Karlsson, M., Pettersson, B., Zimmerman, U., Gunnarsson, A., Aspan, A. (1999): Emended descriptions of indole negative and indole positive isolates of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*. *Vet Microbiol* 70 (3-4):225–238.
- Fellström, C., Pettersson, B., Zimmerman, U., Gunnarsson, A., Feinstein, R. (2001a): Classification of *Brachyspira* spp. isolated from Swedish dogs. *Anim Health Res Rev* 2 (1):75–82.
- Fellström, C., Råsbäck, T., Johansson, K.-E., Olofsson, T., Aspán, A. (2008): Identification and genetic fingerprinting of *Brachyspira* species. *J Microbiol Methods* 72 (2):133–140.
- Fellström, C., Zimmerman, U., Aspan, A., Gunnarsson, A. (2001b): The use of culture, pooled samples and PCR for identification of herds infected with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Anim Health Res Rev* 2 (1):37–43.
- Fox, G.E., Wisotzkey, J.D., Jurtshuk, P. (1992): How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int J Syst Bacteriol* 42 (1):166–170.
- Gasparri, S., Alborali, G.L., Pitozzi, A., Guarneri, F., Giacomini, E., Baldo, V. et al. (2017): Characterization of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from Italy by multilocus sequence typing and multiple locus variable number tandem repeat analysis. *J Appl Microbiol*.
- GERMAP 2015. Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch; Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland (2016). Rheinbach: Antiinfectives Intelligence.
- Gersting, S.W., Kemter, K.F., Staudigl, M., Messing, D.D., Danecka, M.K., Lagler, F.B. et al. (2008): Loss of function in phenylketonuria is caused by impaired molecular motions and conformational instability. *Am J Hum Genet* 83 (1):5–17.
- Girard, C., Lemarchand, T., Higgins, R. (1995): Porcine colonic spirochetosis: a retrospective study of eleven cases. *Can Vet J* 36 (5):291–294.
- Glenny, A.T., Stevens, M.F. (1935): *Staphylococcus* toxins and antitoxins. *J Pathol* 40 (2):201–210.
- Goris, J., Konstantinidis, K.T., Klappenbach, J.A., Coenye, T., Vandamme, P., Tiedje, J.M. (2007): DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol* 57 (Pt 1):81–91.
- Greer, J.M., Wannemuehler, M.J. (1989a): Comparison of the biological responses induced by lipopolysaccharide and endotoxin of *Treponema hyodysenteriae* and *Treponema innocens*. *Infect Immun* 57 (3):717–723.

- Greer, J.M., Wannemuehler, M.J. (1989b): Pathogenesis of *Treponema hyodysenteriae*: induction of interleukin-1 and tumor necrosis factor by a treponemal butanol/water extract (endotoxin). *Microb Pathog* 7 (4):279–288.
- Griffiths, I.B., Hunt, B.W., Lister, S.A., Lamont, M.H. (1987): Retarded growth rate and delayed onset of egg production associated with spirochaete infection in pullets. *Vet Rec* 121 (2):35–37.
- Grubbs, F.E. (1950): Sample criteria for testing outlying observations. *Ann Math Statist* 21 (1):27–58.
- Håfström, T., Jansson, D.S., Segerman, B. (2011): Complete genome sequence of *Brachyspira intermedia* reveals unique genomic features in *Brachyspira* species and phage-mediated horizontal gene transfer. *BMC Genomics* 12:395.
- Hampson, D.J., Atyeo, R., Combs, B.G. (1997): Swine dysentery. In: D. J. Hampson und T.B Stanton (Hg.): Intestinal spirochaetes in domestic animals and humans. Wallingford: CAB International:175–209.
- Hampson, D.J., La, T., Phillips, N.D. (2015): Emergence of *Brachyspira* species and strains reinforcing the need for surveillance. *Porcine Health Manag* 1 (1):61.
- Hampson, D.J., Lester, G.D., Phillips, N.D., La, T. (2006a): Isolation of *Brachyspira pilosicoli* from weanling horses with chronic diarrhoea. *Vet Rec* 158 (19):661–662.
- Hampson, D.J., Lugsomya, K., La, T., Phillips, N.D., Trott, D.J., Abraham, S. (2019): Antimicrobial resistance in *Brachyspira* - An increasing problem for disease control. *Vet Microbiol* 229:59–71.
- Hampson, D.J., Oxberry, S.L., La, T. (2006b): Potential for zoonotic transmission of *Brachyspira pilosicoli*. *Emerging Infect Dis* 12 (5):869–870.
- Hampson, D.J., Robertson, I.D., Oxberry, S.L. (1999): Isolation of *Serpulina murdochii* from the joint fluid of a lame pig. *Aust Vet J* 77 (1):48.
- Hampson, D.J., Trott, D.J. (1999): Spirochetal diarrhea/Porcine intestinal Spirochetosis. In: Barbara E. Straw (Hg.): Diseases of swine. 8th ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press:553–562.
- Harris, D.L., Alexander, T.J., Whipp, S.C., Robinson, I.M., Glock, R.D., Matthews, P.J. (1978): Swine dysentery: studies of gnotobiotic pigs inoculated with *Treponema hyodysenteriae*, *Bacteroides vulgatus*, and *Fusobacterium necrophorum*. *J Am Vet Med Assoc* 172 (4):468–471.
- Harris, D.L., Hampson, D.J., Glock, R.D. (1999): Swine dysentery. In: Barbara E. Straw (Hg.): Diseases of swine. 8th ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press:579–600.
- Harris, D.L., Kinyon, J.M., Mullin, M.T., Glock, R.D. (1972): Isolation and propagation of spirochetes from the colon of swine dysentery affected pigs. *Can J Comp Med* 36 (1):74–76.
- He, M., Cui, S., Yang, X., Mu, G., Chen, H., Liu, L. (2017): Selection of suitable reference genes for abiotic stress-responsive gene expression studies in peanut by real-time quantitative PCR. *J Biotechnol* 28:76–86.
- Heinritzi, K. (2006): Dysenterie. In: Karl Heinritzi, Hans R. Gindele, Gerald Reiner und Ute Schnurrbusch (Hg.): Schweinekrankheiten. Stuttgart: Ulmer (UTB Veterinärmedizin Erkrankungen der Haustiere, 8325):158–160.
- Herbst, W., Joerling, J., Reiher, A.L., Barth, S.A., Ewers, C. (2016): Genetic and phenotypic studies on the hemolysin of different *Brachyspira* spp. Proceedings of the 7th International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans. Hannover, 2016.

- Herbst, W., Schneider, S., Baljer, G., Barth, S.A. (2017): An update of *Brachyspira hyodysenteriae* serotyping. *Res Vet Sci* 111:135–139.
- Hidalgo, A., Carvajal, A., Pringle, M., Rubio, P., Fellström, C. (2010): Characterization and epidemiological relationships of Spanish *Brachyspira hyodysenteriae* field isolates. *Epidemiol Infect* 138 (1):76–85.
- Holden, J., Moutafis, G., Istivan, T., Coloe, P.J., Smooker, P.M. (2006): SmpB, a novel outer membrane protein present in some *Brachyspira hyodysenteriae* strains. *Vet Microbiol* 113 (1-2):109–116.
- Hsu, T., Hutto, D.L., Minion, F.C., Zuerner, R.L., Wannemuehler, M.J. (2001): Cloning of a beta-hemolysin gene of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae* and its expression in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 69 (2):706–711.
- Hudson, M.J., Alexander, T.J., Lysons, R.J. (1976): Diagnosis of swine dysentery: spirochaetes which may be confused with *Treponema hyodysenteriae*. *Vet Rec* 99 (25-26):498–500.
- Humphrey, S.B., Stanton, T.B., Jensen, N., Zuerner, R.L. (1997): Purification and characterization of VSH-1, a generalized transducing bacteriophage of *Serpulina hyodysenteriae*. *J Bacteriol* 179 (2):323–329.
- Humphrey, S.B., Stanton, T.B., Jensen, N.S. (1995): Mitomycin C induction of bacteriophages from *Serpulina hyodysenteriae* and *Serpulina innocens*. *FEMS Microbiol Lett* 134 (1):97–101.
- Huseby, M., Shi, K., Brown, C.K., Digre, J., Mengistu, F., Seo, K.S. et al. (2007): Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 189 (23):8719–8726.
- Hutto, D.L. (1997): [beta]-hemolysin and the pathogenesis of *Serpulina hyodysenteriae* infection. Retrospective Theses and Dissertations, Iowa. Online verfügbar unter <https://lib.dr.iastate.edu/rtd/11467/>.
- Hutto, D.L., Wannemuehler, M.J. (1999): A comparison of the morphologic effects of *Serpulina hyodysenteriae* or its beta-hemolysin on the murine cecal mucosa. *Vet Pathol* 36 (5):412–422.
- Hyatt, D.R., Joens, L.A. (1997): Analysis of the lytic activity of the *Serpulina hyodysenteriae* hemolysin. *Infect Immun* 65 (11):4877–4879.
- Hyatt, D.R., ter Huurne, A.A., van der Zeijst, B A, Joens, L.A. (1994): Reduced virulence of *Serpulina hyodysenteriae* hemolysin-negative mutants in pigs and their potential to protect pigs against challenge with a virulent strain. *Infect Immun* 62 (6):2244–2248.
- Hynes, W., Sloan, M. (2016): *Streptococcus pyogenes* : Basic Biology to Clinical Manifestations. Secreted Extracellular Virulence Factors. Hg. v. Joseph J. Ferretti, Dennis L. Stevens und Vincent A. Fischetti. Oklahoma City (OK).
- Ignoul, S., Eggermont, J. (2005): CBS domains: structure, function, and pathology in human proteins. *Am J Physiol, Cell Physiol* 289 (6):78.
- Imbeaud, S., Graudens, E., Boulanger, V., Barlet, X., Zaborski, P., Eveno, E. et al. (2005): Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res* 33 (6):e56.
- Issartel, J.P., Koronakis, V., Hughes, C. (1991): Activation of *Escherichia coli* prohaemolysin to the mature toxin by acyl carrier protein-dependent fatty acylation. *Nature* 351 (6329):759–761.
- Javadi, M.B., Katzenmeier, G. (2016): The forgotten virulence factor: the 'non-conventional' hemolysin TlyA and its role in *Helicobacter pylori* infection. *Curr Microbiol* 73 (6):930–937.

- Jensen, T.K., Boye, M. (2005): Application of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization for the detection of the porcine large intestinal agents *Lawsonia intracellularis*, Porcine Circo Virus type 2, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli*, *Brachypira innocens*, *Brachyspira murdochii* and *Brachyspira intermedia*. *3rd Int. Conf. Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, Parma, Italy 2005, Proc.*:64–65.
- Jensen, T.K., Boye, M. (2006): Pathology of naturally acquired colonic *Brachyspira murdochii* infection in pigs studied by fluorescent in situ hybridisation. *Proceedings of the Int Pig Vet Soc Congr*:86.
- Joens, L.A., DeYoung, D.W., Glock, R.D., Mapother, M.E., Cramer, J.D., Wilcox, H.E. (1985): Passive protection of segmented swine colonic loops against swine dysentery. *Am J Vet Res* 46 (11):2369–2371.
- Joens, L.A., Harris, D.L., Baum, D.H. (1979a): Immunity to swine dysentery in recovered pigs. *Am J Vet Res* 40 (10):1352–1354.
- Joens, L.A., Kinyon, J.M. (1982): Isolation of *Treponema hyodysenteriae* from wild rodents. *J Clin Microbiol* 15 (6):994–997.
- Joens, L.A., Robinson, I.M., Glock, R.D., Matthews, P.J. (1981): Production of lesions in gnotobiotic mice by inoculation with *Treponema hyodysenteriae*. *Infect Immun* 31 (1):504–506.
- Joens, L.A., Whipp, S.C., Glock, R.D., Neussen, M.E. (1983): Serotype-specific protection against *Treponema hyodysenteriae* infection in ligated colonic loops of pigs recovered from swine dysentery. *Infect Immun* 39 (1):460–462.
- Joerling, J., Barth, S.A., Schlez, K., Willems, H., Herbst, W., Ewers, C. (2018): Phylogenetic diversity, antimicrobial susceptibility and virulence gene profiles of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from pigs in Germany. *PLoS ONE* 13 (1):e0190928.
- Joerling, J., Reiher, A.L., Barth, S.A., Ewers, C., Herbst, W. (2016): Use of a hemolysin inhibition test to demonstrate antibodies to *Brachyspira hyodysenteriae* hemolysin. Tagung der DVG-Fachgruppe "Bakteriologie und Mykologie". Jena, 31.08.2016.
- Jolley, K.A., Chan, M.-S., Maiden, M.C.J. (2004): mlstdbNet - distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC Bioinformatics* 5:86.
- Jones, G.F., Ward, G.E., Murtaugh, M.P., Lin, G., Gebhart, C.J. (1993): Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, ileal symbiont intracellularis, in feces by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 31 (10):2611–2615.
- Kärber, G. (1931): Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Archiv f experiment Pathol u Pharmakol* 162 (4):480–483.
- Karunakaran, T., Holt, S.C. (1993): Cloning of two distinct hemolysin genes from *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* in *Escherichia coli*. *Microb Pathog* 15 (1):37–49.
- Käsbohrer, A., Gelderblom, H.R., Arasteh, K., Heise, W., Grosse, G., L'age, M. et al. (1990): Intestinale Spirochätose bei HIV-Infektion. Vorkommen, Isolierung und Morphologie der Spirochäten. *Dtsch Med Wochenschr* 115 (40):1499–1506.
- Keith, B.A., Harding, J., Loewen, M.E. (2016): Characterization of *tlyA* and *tlyC* from "*Brachyspira hamptonii*". Proceedings of the 7th International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans. Hannover, 2016.
- Kennedy, M.J., Rosey, E.L., Yancey, R.J. (1997): Characterization of *flaA*- and *flaB*- mutants of *Serpulina hyodysenteriae*: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility and intestinal colonization. *FEMS Microbiol Lett* 153 (1):119–128.
- Kennedy, M.J., Rosnick, D.K., Ulrich, R.G., Yancey, R.J. (1988): Association of *Treponema hyodysenteriae* with porcine intestinal mucosa. *J Gen Microbiol* 134 (6):1565–1576.

- Kent, K.A., Lemcke, R.M., Lysons, R.J. (1988): Production, purification and molecular weight determination of the haemolysin of *Treponema hyodysenteriae*. *J Med Microbiol* 27 (3):215–224.
- Kinyon, J.M., Harris, D.L. (1979): *Treponema innocens*, a new species of intestinal bacteria, and emended description of the type strain of *Treponema hyodysenteriae* Harris et al. *Int J Syst Bacteriol* 29 (2):102–109.
- Kinyon, J.M., Harris, D.L., Glock, R.D. (1977): Enteropathogenicity of various isolates of *Treponema hyodysenteriae*. *Infect Immun* 15 (2):638–646.
- Knoop, F.C. (1981): Investigation of a hemolysin produced by enteropathogenic *Treponema hyodysenteriae*. *Infect Immun* 31 (1):193–198.
- Komarek, V., Maderner, A., Spergser, J., Weissenböck, H. (2009): Infections with weakly haemolytic *Brachyspira* species in pigs with miscellaneous chronic diseases. *Vet Microbiol* 134 (3-4):311–317.
- Kurosawa, M., Oda, M., Domon, H., Saitoh, I., Hayasaki, H., Terao, Y. (2016): *Streptococcus pyogenes* CAMP factor attenuates phagocytic activity of RAW 264.7 cells. *Microbes Infect* 18 (2):118–127.
- La, T., Phillips, N.D., Coiacetto, F., Hampson, D.J. (2019): An atypical weakly haemolytic strain of *Brachyspira hyodysenteriae* is avirulent and can be used to protect pigs from developing swine dysentery. *Vet Res* 50 (1):47.
- La, T., Phillips, N.D., Hampson, D.J. (2009a): Evaluation of recombinant Bhlp29.7 as an ELISA antigen for detecting pig herds with swine dysentery. *Vet Microbiol* 133 (1-2):98–104.
- La, T., Phillips, N.D., Hampson, D.J. (2016a): An investigation into the etiological agents of swine dysentery in Australian pig herds. *PLoS ONE* 11 (12):e0167424.
- La, T., Phillips, N.D., Harland, B.L., Wanchanthuek, P., Bellgard, M.I., Hampson, D.J. (2009b): Multilocus sequence typing as a tool for studying the molecular epidemiology and population structure of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Vet Microbiol* 138 (3-4):330–338.
- La, T., Phillips, N.D., Reichel, M.P., Hampson, D.J. (2004): Protection of pigs from swine dysentery by vaccination with recombinant BmpB, a 29.7 kDa outer-membrane lipoprotein of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Vet Microbiol* 102 (1-2):97–109.
- La, T., Phillips, N.D., Thomson, J.R., Hampson, D.J. (2014): Absence of a set of plasmid-encoded genes is predictive of reduced pathogenic potential in *Brachyspira hyodysenteriae*. *Vet Res* 45:131.
- La, T., Phillips, N.D., Wanchanthuek, P., Bellgard, M.I., O'Hara, A.J., Hampson, D.J. (2011): Evidence that the 36 kb plasmid of *Brachyspira hyodysenteriae* contributes to virulence. *Vet Microbiol* 153 (1-2):150–155.
- La, T., Rohde, J., Phillips, N.D., Hampson, D.J. (2016b): Comparison of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates recovered from pigs in apparently healthy multiplier herds with isolates from herds with swine dysentery. *PLoS ONE* 11 (8):e0160362.
- Law, C.L., Grierson, J.M., Stevens, S.M. (1994): Rectal spirochaetosis in homosexual men: the association with sexual practices, HIV infection and enteric flora. *Genitourin Med* 70 (1):26–29.
- Lee, J.I., Hampson, D.J., Lymbery, A.J., Harders, S.J. (1993): The porcine intestinal spirochaetes: identification of new genetic groups. *Vet Microbiol* 34 (3):273–285.
- Lee, S.H., Kim, K.A., Park, Y.G., Seong, I.W., Kim, M.J., Lee, Y.J. (2000): Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar *lai*. *Gene* 254 (1-2):19–28.

8 Literaturverzeichnis

- Leimeister-Wächter, M., Goebel, W., Chakraborty, T. (1989): Mutations affecting hemolysin production in *Listeria monocytogenes* located outside the listeriolysin gene. *FEMS Microbiol Lett* 53 (1-2):23–29.
- Leimeister-Wächter, M., Haffner, C., Domann, E., Goebel, W., Chakraborty, T. (1990): Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *Listeria monocytogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 (21):8336–8340.
- Lemcke, R.M., Burrows, M.R. (1982): Studies on a haemolysin produced by *Treponema hyodysenteriae*. *J Med Microbiol* 15 (2):205–214.
- Li, Z., Jensen, N.S., Bélanger, M., L'Espérance, M.C., Jacques, M. (1992): Molecular characterization of *Serpulina (Treponema) hyodysenteriae* isolates representing serotypes 8 and 9. *J Clin Microbiol* 30 (11):2941–2947.
- Li, Z., Pang, B., Wang, D., Li, J., Xu, J., Fang, Y. et al. (2019): Expanding dynamics of the virulence-related gene variations in the toxigenic *Vibrio cholerae* serogroup O1. *BMC Genomics* 20 (1):360.
- Litwin, C.M., Johnson, J.M. (2005): Identification, cloning, and expression of the CAMP-like factor autotransporter gene (*cfa*) of *Bartonella henselae*. *Infect Immun* 73 (7):4205–4213.
- Llarena, A.-K., Huneau, A., Hakkinen, M., Hänninen, M.-L. (2015): Predominant *Campylobacter jejuni* sequence types persist in Finnish chicken production. *PLoS ONE* 10 (2):e0116585.
- Lo, C.-W., Lai, Y.-K., Liu, Y.-T., Gallo, R.L., Huang, C.-M. (2011): *Staphylococcus aureus* hijacks a skin commensal to intensify its virulence: immunization targeting β -hemolysin and CAMP factor. *J Invest Dermatol* 131 (2):401–409.
- Luca, S. de, Nicholson, P., Magistrali, C.F., García-Martín, A.B., Rychener, L., Zeeh, F. et al. (2018): Transposon-associated lincosamide resistance *Inu(C)* gene identified in *Brachyspira hyodysenteriae* ST83. *Vet Microbiol* 214:51–55.
- Ludwig, A., Jarchau, T., Benz, R., Goebel, W. (1988): The repeat domain of *Escherichia coli* haemolysin (HlyA) is responsible for its Ca²⁺-dependent binding to erythrocytes. *Mol Gen Genet* 214 (3):553–561.
- Ludwig, W., Klenk, H.-P. (2001): Overview: A phylogenetic backbone and taxonomic framework for procaryotic systematics. In: David R. Boone, Don J. Brenner, Richard W. Castenholz, P. de Vos, George M. Garrity, Noel R. Krieg und M. Goodfellow (Hg.): *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. New York: Springer:49–65.
- , R.J., Kent, K.A., Bland, A.P., Sellwood, R., Robinson, W.F., Frost, A.J. (1991): A cytotoxic haemolysin from *Treponema hyodysenteriae*-a probable virulence determinant in swine dysentery. *J Med Microbiol* 34 (2):97–102.
- Mahu, M., Boyen, F., Pauw, N. de, Maele, L.V., Martel, A., Haesebrouck, F., Pasmans, F. (2016b): Administration of an avirulent strain of *B. hyodysenteriae* partially protects pigs against challenge with a virulent *B. hyodysenteriae* strain. *7th Int. Conf. Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, Hannover, Germany 2016, Proc.*:36–37.
- Mahu, M., Pasmans, F., Vranckx, K., Pauw, N. de, Vande Maele, L., Vyt, P. et al. (2017): Presence and mechanisms of acquired antimicrobial resistance in Belgian *Brachyspira hyodysenteriae* isolates belonging to different clonal complexes. *Vet Microbiol* 207:125–132.
- Mahu, M., Pauw, N. de, Vande Maele, L., Verlinden, M., Boyen, F., Ducatelle, R. et al. (2016): Variation in hemolytic activity of *Brachyspira hyodysenteriae* strains from pigs. *Vet Res* 47 (1):66.

- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R. et al. (1998): Multi-locus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (6):3140–3145.
- Mappley, L.J., La Ragione, R.M., Woodward, M.J. (2014): *Brachyspira* and its role in avian intestinal spirochaetosis. *Vet Microbiol* 168 (2-4):245–260.
- Margawani, K.R., Robertson, I.D., Brooke, C.J., Hampson, D.J. (2004): Prevalence, risk factors and molecular epidemiology of *Brachyspira pilosicoli* in humans on the island of Bali, Indonesia. *J Med Microbiol* 53 (Pt 4):325–332.
- McCaman, M.T., Auer, K., Foley, W., Gabe, J.D. (2003): *Brachyspira hyodysenteriae* contains eight linked gene copies related to an expressed 39-kDa surface protein. *Microbes Infect* 5 (1):1–6.
- McLaren, A.J., Trott, D.J., Swayne, D.E., Oxberry, S.L., Hampson, D.J. (1997): Genetic and phenotypic characterization of intestinal spirochetes colonizing chickens and allocation of known pathogenic isolates to three distinct genetic groups. *J Clin Microbiol* 35 (2):412–417.
- Mengaud, J., Vicente, M.F., Chenevert, J., Pereira, J.M., Geoffroy, C., Gicquel-Sanzey, B. et al. (1988): Expression in *Escherichia coli* and sequence analysis of the listeriolysin O determinant of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 56 (4):766–772.
- Miao, R.M., Fieldsteel, A.H., Harris, D.L. (1978): Genetics of *Treponema*: characterization of *Treponema hyodysenteriae* and its relationship to *Treponema pallidum*. *Infect Immun* 22 (3):736–739.
- Milner, J.A., Sellwood, R. (1994): Chemotactic response to mucin by *Serpulina hyodysenteriae* and other porcine spirochetes: potential role in intestinal colonization. *Infect Immun* 62 (9):4095–4099.
- Mirajkar, N.S., Bekele, A.Z., Chander, Y.Y., Gebhart, C.J. (2015): Molecular epidemiology of novel pathogen "*Brachyspira hampsonii*" reveals relationships between diverse genetic groups, regions, host species and other pathogenic and commensal *Brachyspira*. *J Clin Microbiol*:2908–2918.
- Mirajkar, N.S., Gebhart, C.J. (2014): Understanding the molecular epidemiology and global relationships of *Brachyspira hyodysenteriae* from swine herds in the United States: a multi-locus sequence typing approach. *PLoS ONE* 9 (9):e107176.
- Mirajkar, N.S., Phillips, N.D., La, T., Hampson, D.J., Gebhart, C.J. (2016): Characterization and recognition of *Brachyspira hampsonii* sp. nov., a novel intestinal spirochete that is pathogenic to pigs. *J Clin Microbiol*.
- Monshupanee, T. (2013): Increased bacterial hemolytic activity is conferred by expression of TlyA methyltransferase but not by its 2'-O-methylation of the ribosome. *Curr Microbiol* 67 (1):61–68.
- Moraveji, Z., Tabatabaei, M., Shirzad Aski, H., Khoshbakht, R. (2014): Characterization of hemolysins of *Staphylococcus* strains isolated from human and bovine, southern Iran. *Iran J Vet Res* 15 (4):326–330.
- Mosavi, L.K., Cammett, T.J., Desrosiers, D.C., Peng, Z.-Y. (2004): The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci* 13 (6):1435–1448.
- Motro, Y., La, T., Bellgard, M.I., Dunn, D.S., Phillips, N.D., Hampson, D.J. (2009): Identification of genes associated with prophage-like gene transfer agents in the pathogenic intestinal spirochaetes *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* and *Brachyspira intermedia*. *Vet Microbiol* 134 (3-4):340–345.

- Muir, S., Koopman, M.B., Libby, S.J., Joens, L.A., Heffron, F., Kusters, J.G. (1992): Cloning and expression of a *Serpula (Treponema) hyodysenteriae* hemolysin gene. *Infect Immun* 60 (2):529–535.
- Mushtaq, M., Zubair, S., Råsbäck, T., Bongcam-Rudloff, E., Jansson, D.S. (2015): *Brachyspira suanatina* sp. nov., an enteropathogenic intestinal spirochaete isolated from pigs and mallards: genomic and phenotypic characteristics. *BMC Microbiol* 15 (1):208.
- Neef, N.A., Lysons, R.J., Trott, D.J., Hampson, D.J., Jones, P.W., Morgan, J.H. (1994): Pathogenicity of porcine intestinal spirochetes in gnotobiotic pigs. *Infect Immun* 62 (6):2395–2403.
- Neo, E., La, T., Phillips, N.D., Alikani, M.Y., Hampson, D.J. (2013): The pathogenic intestinal spirochaete *Brachyspira pilosicoli* forms a diverse recombinant species demonstrating some local clustering of related strains and potential for zoonotic spread. *Gut Pathog* 5 (1):24.
- Nuessen, M.E., Joens, L.A., Glock, R.D. (1983): Involvement of lipopolysaccharide in the pathogenicity of *Treponema hyodysenteriae*. *J Immunol* 131 (2):997–999.
- Ogram, A., Sayler, G.S., Barkay, T. (1987): The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J Microbiol Methods* 7 (2-3):57–66.
- Olson, L.D., Dayalu, K.I., Schlink, G.T. (1994): Exacerbated onset of dysentery in swine vaccinated with inactivated adjuvanted *Serpulina hyodysenteriae*. *Am J Vet Res* 55 (1):67–71.
- On, S.L.W., Miller, W.G., Houf, K., Fox, J.G., Vandamme, P. (2017): Minimal standards for describing new species belonging to the families Campylobacteraceae and Helicobacteraceae: Campylobacter, Arcobacter, Helicobacter and Wolinella spp. *Int J Syst Evol Microbiol* 67 (12):5296–5311.
- Osorio, J., Carvajal, A., Naharro, G., La, T., Phillips, N.D., Rubio, P., Hampson, D.J. (2012): Dissemination of clonal groups of *Brachyspira hyodysenteriae* amongst pig farms in Spain, and their relationships to isolates from other countries. *PLoS ONE* 7 (6):e39082.
- Oxberry, S.L., Hampson, D.J. (2003): Epidemiological studies of *Brachyspira pilosicoli* in two Australian piggeries. *Vet Microbiol* 93 (2):109–120.
- Palzer, A., Ritzmann, M. (2008): Enteritis bei Mastschweinen. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* (4):257–265.
- Paster, B.J., Dewhirst, F.E. (2000): Phylogenetic foundation of spirochetes. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2 (4):341–344.
- Pettersson, B., Fellström, C., Andersson, A., Uhlén, M., Gunnarsson, A., Johansson, K.E. (1996): The phylogeny of intestinal porcine spirochetes (*Serpulina* species) based on sequence analysis of the 16S rRNA gene. *J Bacteriol* 178 (14):4189–4199.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L. (2002): Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30 (9):e36.
- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T.P. (2004): Determination of stable house-keeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26 (6):509–515.
- Price, A.C., Choi, K.H., Heath, R.J., Li, Z., White, S.W., Rock, C.O. (2001): Inhibition of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthases by thiolactomycin and cerulenin. Structure and mechanism. *J Biol Chem* 276 (9):6551–6559.
- Råsbäck, T., Fellström, C., Gunnarsson, A., Aspán, A. (2006): Comparison of culture and biochemical tests with PCR for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli*. *J Microbiol Methods* 66 (2):347–353.

8 Literaturverzeichnis

- Råsbäck, T., Jansson, D.S., Johansson, K.-E., Fellström, C. (2007a): A novel enteropathogenic, strongly haemolytic spirochaete isolated from pig and mallard, provisionally designated '*Brachyspira suanatina*' sp. nov. *Environ Microbiol* 9 (4):983–991.
- Råsbäck, T., Johansson, K.-E., Jansson, D.S., Fellström, C., Alikhani, M.Y., La, T. et al. (2007b): Development of a multilocus sequence typing scheme for intestinal spirochaetes within the genus *Brachyspira*. *Microbiol* 153 (Pt 12):4074–4087.
- Rayment, S.J., Barrett, S.P., Livesley, M.A. (1997): Sub-specific differentiation of intestinal spirochaete isolates by macrorestriction fragment profiling. *Microbiol* 143 (Pt 9):2923–2929.
- Regassa, L.B., Novick, R.P., Betley, M.J. (1992): Glucose and nonmaintained pH decrease expression of the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 60 (8):3381–3388.
- Reiher, A.L. (2012): Gentechnische Herstellung und Charakterisierung der Hämolytine von *Brachyspira hyodysenteriae*. Vet. Med. Diss., Gießen.
- Richter, M. (2009): Untersuchungen zur Immunogenität verschiedener äußerer Membranproteine von *Brachyspira hyodysenteriae* im Zellkultur-Adhärenz-Modell. Vet. Med. Diss, Gießen.
- Robinson, I.M., Whipp, S.C., Bucklin, J.A., Allison, M.J. (1984): Characterization of predominant bacteria from the colons of normal and dysenteric pigs. *Appl Environ Microbiol* 48 (5):964–969.
- Rohde, J., Majzoub-Altweck, M., Falkenau, A., Hermanns, W., Burrough, E.R., Ritzmann, M., Stadler, J. (2018): Occurrence of dysentery-like diarrhoea associated with *Brachyspira suanatina* infection in a German fattening pig farm. *Vet Rec*.
- Romine, M.F. (2011): Genome-wide protein localization prediction strategies for gram negative bacteria. *BMC Genomics* 12 Suppl 1:S1.
- Rosey, E.L., Kennedy, M.J., Petrella, D.K., Ulrich, R.G., Yancey, R.J. (1995): Inactivation of *Serpulina hyodysenteriae* *flaA1* and *flaB1* periplasmic flagellar genes by electroporation-mediated allelic exchange. *J Bacteriol* 177 (20):5959–5970.
- Rothkamp, A., Rohde, J., Verspohl, J. (2005): *Brachyspira* spp. isolated from pig herds in Northern Germany in 2002-2004. *3rd Int. Conf. Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, Parma, Italy 2005, Proc.*:28–29.
- Rubin, J.E., Costa, M.O., Hill, J.E., Kittrell, H.E., Fernando, C., Huang, Y. et al. (2013): Reproduction of mucohaemorrhagic diarrhea and colitis indistinguishable from swine dysentery following experimental inoculation with "*Brachyspira hampsonii*" strain 30446. *PLoS ONE* 8 (2):e57146.
- Rugna, G., Bonilauri, P., Carra, E., Bergamini, F., Luppi, A., Gherpelli, Y. et al. (2015): Sequence types and pleuromutilin susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from Italian pigs with swine dysentery: 2003-2012. *Vet J* 203 (1):115–119.
- Saheb, S.A., Daigneault-Sylvestre, N., Picard, B. (1981): Comparative study of the hemolysins of *Treponema hyodysenteriae* and *Treponema innocens*. *Curr Microbiol* 5:87–90.
- Saheb, S.A., Lafleur, L. (1980): Characteristics of the interaction of a treponemal hemolysin with rabbit erythrocytes. *Biochim* 62 (11-12):787–793.
- Saheb, S.A., Massicotte, L., Picard, B. (1980): Purification and characterization of *Treponema hyodysenteriae* hemolysin. *Biochim* 62 (11-12):779–785.
- Saitou, N., Nei, M. (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4 (4):406–425.

8 Literaturverzeichnis

- Salipante, S.J., SenGupta, D.J., Cummings, L.A., Land, T.A., Hoogestraat, D.R., Cookson, B.T. (2015): Application of whole-genome sequencing for bacterial strain typing in molecular epidemiology. *J Clin Microbiol* 53 (4):1072–1079.
- Sattler, S. (2010): Untersuchungen zur Klinik, Pathologie und Pathogenese der experimentellen *Brachyspira-hydysenteriae*-Infektion beim Schwein. Vet. Med. Diss. Tierärztliche Hochschule, Hannover.
- Schlez, K. (2011): Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit bei *Brachyspira* spp.-Stämmen von deutschen Mastschweinen aus den Jahren 2003 - 2005. Vet. Med. Diss., Gießen.
- Schneider, S. (2014): Zuordnung von *Brachyspira hydysenteriae*-Feldisolaten aus deutschen und ausländischen Schweinebeständen zu Serotypen und Serogruppen. Vet. Med. Diss., Gießen.
- Schwan, W.R., Langhorne, M.H., Ritchie, H.D., Stover, C.K. (2003): Loss of hemolysin expression in *Staphylococcus aureus agr* mutants correlates with selective survival during mixed infections in murine abscesses and wounds. *FEMS Immunol Med Microbiol* 38 (1):23–28.
- Scott, J.W., Hawley, S.A., Green, K.A., Anis, M., Stewart, G., Scullion, G.A. et al. (2004): CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J Clin Invest* 113 (2):274–284.
- Sieverding, E. (2010): Eradikation und Sanierung. 1.2 Dysenterie. In: Wilfried Brede und Thomas Blaha (Hg.): Tiergesundheit Schwein. Professionelles Tiergesundheitsmanagement in der modernen Schweinehaltung ; [mit zahlreichen Checklisten]. Frankfurt am Main: DLG-Verl.:293–297.
- Skalka, B., Smola, J. (1981): Lethal effect of CAMP-factor and UBERIS-factor-a new finding about diffusible exosubstances of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus uberis*. *Zentralbl Bakteriol* 249 (2):190–194.
- Somerville, G.A., Beres, S.B., Fitzgerald, J.R., DeLeo, F.R., Cole, R.L., Hoff, J.S., Musser, J.M. (2002): In vitro serial passage of *Staphylococcus aureus*: changes in physiology, virulence factor production, and *agr* nucleotide sequence. *J Bacteriol* 184 (5):1430–1437.
- Song, Y., La, T., Phillips, N.D., Bellgard, M.I., Hampson, D.J. (2009): A reverse vaccinology approach to swine dysentery vaccine development. *Vet Microbiol* 137 (1-2):111–119.
- Spearman, J.G., Nayar, G., Sheridan, M., Sheridan, Health, H.S. (1988): Colitis associated with *Treponema innocens* in pigs. *Can Vet J* 29 (9):747.
- Squires, C., Squires, C.L. (1992): The Clp proteins: proteolysis regulators or molecular chaperones? *J Bacteriol* 174 (4):1081–1085.
- Stanton, T.B. (2006): The genus *Brachyspira*. In: Martin Dworkin, Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl Heinz Schleifer und Erko Stackebrandt (Hg.): The prokaryotes. New York: Springer New York:330–356.
- Stanton, T.B., Cornell, C.P. (1987): Erythrocytes as a source of essential lipids for *Treponema hydysenteriae*. *Infect Immun* 55 (2):304–308.
- Stanton, T.B., Fournié-Amazouz, E., Postic, D., Trott, D.J., Grimont, P.A., Baranton, G. et al. (1997): Recognition of two new species of intestinal spirochetes: *Serpulina intermedia* sp. nov. and *Serpulina murdochii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 47 (4):1007–1012.
- Stanton, T.B., Humphrey, S.B., Sharma, V.K., Zuerner, R.L. (2008): Collateral effects of antibiotics: carbadox and metronidazole induce VSH-1 and facilitate gene transfer among *Brachyspira hydysenteriae* strains. *Appl Environ Microbiol* 74 (10):2950–2956.
- Stanton, T.B., Jensen, N. (1993): Purification and characterization of NADH oxidase from *Serpulina (Treponema) hydysenteriae*. *J Bacteriol* 175 (10):2980–2987.

8 Literaturverzeichnis

- Stanton, T.B., Matson, E.G., Humphrey, S.B. (2001): *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae gyrB* mutants and interstrain transfer of coumermycin A(1) resistance. *Appl Environ Microbiol* 67 (5):2037–2043.
- Stanton, T.B., Rosey, E.L., Kennedy, M.J., Jensen, N.S., Bosworth, B.T. (1999): Isolation, oxygen sensitivity, and virulence of NADH oxidase mutants of the anaerobic spirochete *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*, etiologic agent of swine dysentery. *Appl Environ Microbiol* 65 (11):5028–5034.
- Stanton, T.B., Thompson, M., Humphrey, S.B., Zuerner, R.L. (2003): Detection of bacteriophage VSH-1 *svp38* gene in *Brachyspira* spirochetes. *FEMS Microbiol Lett* 224 (2):225–229.
- Stanton, T.B., Trott, D.J., Lee, J.I., McLaren, A.J., Hampson, D.J., Paster, B.J., Jensen, N.S. (1996): Differentiation of intestinal spirochaetes by multilocus enzyme electrophoresis analysis and 16S rRNA sequence comparisons. *FEMS Microbiol Lett* 136 (2):181–186.
- Stephens, C.P., Hampson, D.J. (2002): Experimental infection of broiler breeder hens with the intestinal spirochaete *Brachyspira (Serpulina) pilosicoli* causes reduced egg production. *Avian Pathol* 31 (2):169–175.
- Stephens, C.P., Oxberry, S.L., Phillips, N.D., La, T., Hampson, D.J. (2005): The use of multilocus enzyme electrophoresis to characterise intestinal spirochaetes (*Brachyspira* spp.) colonising hens in commercial flocks. *Vet Microbiol* 107 (1-2):149–157.
- Taylor, D.J., Simmons, J.R., Laird, H.M. (1980): Production of diarrhoea and dysentery in pigs by feeding pure cultures of a spirochaete differing from *Treponema hyodysenteriae*. *Vet Rec* 106 (15):326–332.
- ter Huurne, A.A., Muir, S., van Houten, M., van der Zeijst, B A, Gaastra, W., Kusters, J.G. (1994): Characterization of three putative *Serpulina hyodysenteriae* hemolysins. *Microb Pathog* 16 (4):269–282.
- ter Huurne, A.A., van Houten, M., Muir, S., Kusters, J.G., van der Zeijst, B A, Gaastra, W. (1992): Inactivation of a *Serpula (Treponema) hyodysenteriae* hemolysin gene by homologous recombination: importance of this hemolysin in pathogenesis in mice. *FEMS Microbiol Lett* 71 (1):109–113.
- Thomson, J.R., Smith, W.J., Murray, B.P., McOrist, S. (1997): Pathogenicity of three strains of *Serpulina pilosicoli* in pigs with a naturally acquired intestinal flora. *Infect Immun* 65 (9):3693–3700.
- Tocqueville, V., Ferré, S., Nguyen, N.H.P., Kempf, I., Marois-Créhan, C. (2014): Multilocus sequence typing of *Mycoplasma hyorhinis* strains identified by a real-time TaqMan PCR assay. *J Clin Microbiol* 52 (5):1664–1671.
- Trivett-Moore, N.L., Gilbert, G.L., Law, C.L., Trott, D.J., Hampson, D.J. (1998): Isolation of *Serpulina pilosicoli* from rectal biopsy specimens showing evidence of intestinal spirochetosis. *J Clin Microbiol* 36 (1):261–265.
- Trott, D.J., Hampson, D.J. (1998): Evaluation of day-old specific pathogen-free chicks as an experimental model for pathogenicity testing of intestinal spirochaete species. *J Comp Pathol* 118 (4):365–381.
- Trott, D.J., Huxtable, C.R., Hampson, D.J. (1996a): Experimental infection of newly weaned pigs with human and porcine strains of *Serpulina pilosicoli*. *Infect Immun* 64 (11):4648–4654.
- Trott, D.J., Mikosza, A.S., Combs, B.G., Oxberry, S.L., Hampson, D.J. (1998): Population genetic analysis of *Serpulina pilosicoli* and its molecular epidemiology in villages in the eastern Highlands of Papua New Guinea. *Int J Syst Bacteriol* 48 Pt 3:659–668.

8 Literaturverzeichnis

- Trott, D.J., Stanton, T.B., Jensen, N.S., Duhamel, G.E., Johnson, J.L., Hampson, D.J. (1996b): *Serpulina pilosicoli* sp. nov., the agent of porcine intestinal spirochetosis. *Int J Syst Bacteriol* 46 (1):206–215.
- Trott, D.J., Stanton, T.B., Jensen, N.S., Hampson, D.J. (1996c): Phenotypic characteristics of *Serpulina pilosicoli* the agent of intestinal spirochaetosis. *FEMS Microbiol Lett* 142 (2-3):209–214.
- Ursing, J.B., Lior, H., Owen, R.J. (1994): Proposal of minimal standards for describing new species of the family Campylobacteraceae. *Int J Syst Bacteriol* 44 (4):842–845.
- van Houten, B., Snowden, A. (1993): Mechanism of action of the *Escherichia coli* UvrABC nuclease: clues to the damage recognition problem. *Bioessays* 15 (1):51–59.
- Vandesompele, J., Preter, K. de, Pattyn, F., Poppe, B., van Roy, N., Paepe, A. de, Speleman, F. (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3 (7):research0034.1-research0034.11.
- Verspohl, J., Feltrup, J., Thiede, S., Amtsberg, G. (2001): Zur Diagnostik von Schweinedysenterie und Spirochätendiarrhoe. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 108 (2):41–80.
- Vögely, V. (2015): Prävalenz und Pathogenität schwach hämolysierender Brachyspiren bei Mastschweinen in Nordhessen. Vet. Med. Diss., Gießen.
- Waldmann, K.-H., Lindemann, E.G. (1991): Untersuchungen zum Flüssigkeits- und Elektrolyt-haushalt bei dysenterikranken Mastschweinen. *Prakt Tierarzt*:50–54.
- Waldmann, K.-H., Plonait, H. (2004): Dysentery (Swine dysentery). In: Karl-Heinz Waldmann und Michael Wendt (Hg.): Lehrbuch der Schweinekrankheiten. 4. Aufl. Stuttgart: Parey:350–355.
- Wanchanthuek, P., Bellgard, M.I., La, T., Ryan, K., Moolhuijzen, P., Chapman, B. et al. (2010): The complete genome sequence of the pathogenic intestinal spirochete *Brachyspira pilosicoli* and comparison with other *Brachyspira* genomes. *PLoS ONE* 5 (7):e11455.
- Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I. et al. (1987): Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Int J Syst Evol Microbiol* 37 (4):463–464.
- Weissenböck, H., Maderner, A., Herzog, A.M., Lussy, H., Nowotny, N. (2005): Amplification and sequencing of *Brachyspira* spp. specific portions of nox using paraffin-embedded tissue samples from clinical colitis in Austrian pigs shows frequent solitary presence of *Brachyspira murdochii*. *Vet Microbiol* 111 (1-2):67–75.
- Wendt, M., Schulze Johann, R., Verspohl, J. (2006): Epidemiologische Untersuchungen zum Vorkommen von *Lawsonia intracellularis*-Infektionen in Schweinebeständen. *Tierärztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 34:230–239.
- Werner, C., Sundrum, A., Göbel, A., Eisenberg, T., Zschöck, M. (2011a): Vergleich des Erregerspektrums bei an Durchfall erkrankten und klinisch gesunden Absetzferkeln auf ökologisch wirtschaftenden Ferkelerzeugerbetrieben. *Tagungsband der 11. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau Gießen, Germany*:120–123.
- Werner, G., Fleige, C., Geringer, U., van Schaik, W., Klare, I., Witte, W. (2011b): IS element IS16 as a molecular screening tool to identify hospital-associated strains of *Enterococcus faecium*. *BMC Infect Dis* 11:80.
- Whipp, S.C., Pohlenz, J., Harris, D.L., Robinson, I.M., Glock, R.D., Kunkle, R. (1982): Pathogenicity of *Treponema hyodysenteriae* in uncontaminated gnotobiotic pigs. *Proceedings of the Int Pig Vet Soc Congr*:31.

8 Literaturverzeichnis

- Whipp, S.C., Robinson, I.M., Harris, D.L., Glock, R.D., Matthews, P.J., Alexander, T.J. (1979): Pathogenic synergism between *Treponema hyodysenteriae* and other selected anaerobes in gnotobiotic pigs. *Infect Immun* 26 (3):1042–1047.
- Wilcock, B.P., Olander, H.J. (1979a): Studies on the pathogenesis of swine dysentery. I. Characterization of the lesions in colons and colonic segments inoculated with pure cultures or colonic content containing *Treponema hyodysenteriae*. *Vet Pathol* 16 (4):450–465.
- Witchell, T.D., Coutts, S.A.J., Bulach, D.M., Adler, B. (2006): Differential expression of the Bhmp39 major outer membrane proteins of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Infect Immun* 74 (6):3271–3276.
- Woese, C.R. (1987): Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51 (2):221–271.
- Wood, E.J., Seviour, R.J., Siddique, A.-B.M., Glaisher, R.W., Webb, R.I., Trott, D.J. (2006): Spherical body formation in the spirochaete *Brachyspira hyodysenteriae*. *FEMS Microbiol Lett* 259 (1):14–19.
- Wu, H.-J., Wang, A.H.-J., Jennings, M.P. (2008): Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Curr Opin Chem Biol* 12 (1):93–101.
- Zeeh, F., Klausmann, S., Masserey, Y., Nathues, H., Perreten, V., Rohde, J. (2018): Isolation of *Brachyspira hyodysenteriae* from a crow (*Corvus corone*) in close proximity to commercial pigs. *Vet J* 236:111–112.
- Zuerner, R.L., Stanton, T.B., Minion, F.C., Li, C., Charon, N.W., Trott, D.J., Hampson, D.J. (2004): Genetic variation in *Brachyspira*: chromosomal rearrangements and sequence drift distinguish *B. pilosicoli* from *B. hyodysenteriae*. *Anaerobe* 10 (4):229–237.

9. Anhang

Tabelle 17: Verwendete Puffer, Medien und Gebrauchslösungen

5 x RT-Puffer	
Tris (750 mM) pH 8,3	300 µl
KCl (500 mM)	300 µl
RNase freies Wasser	900 µl
BHI-Nährbouillon	
Fa. Oxoid, Wesel, Kat.-Nr. CM1136	37 g
Aqua dest.	ad 1000 ml
BHIF^{CVSSR}-Nährbouillon	
Fa. Oxoid, Wesel, Kat.-Nr. CM1136	37 g
Colistin	6,23 mg
Vancomycin	6 mg
Spectinomycin	200 mg
Spiramycin	15,25 mg
Rifampicin	12,5 mg
Aqua dest.	ad 1000 ml
FKS (Fetales Kälberserum, immer frisch zugesetzt)	20%
Elektrophoresepuffer-Stammlösung (50 x TAE)	
Tris	242 g
Eisessig	57,10 g
Na-EDTA x 2 H ₂ O (0,5 M, pH 8,0)	100 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml
Ladepuffer	
Bromphenolblau	25 mg
Ficoll	1,5 g
Aqua dest.	9,5 ml

Tabelle 17: Verwendete Puffer, Medien und Gebrauchslösungen (Fortsetzung)

Loading Dye-DNS Ladder Gebrauchsverdünnung	
GeneRuler 100 bp Plus DNS Ladder (Fa. Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Kat.-Nr. SM0321)	0,01 ml
6 x DNS Loading Dye (Fa. Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Kat.-Nr. R0611)	0,03 ml
Aqua dest.	0,12 ml
PBS (pH 7,4)	
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0,115 g
Aqua dest.	ad 1000 ml
TSA^{CVSSR}-Agar (mit 5 % Schafblut)	
Fa. Merck KGaA, Darmstadt, Kat.-Nr.: 1.05458.0500	40 g
defibriniertes Schafblut	50 ml
Colistin	6,23 mg
Vancomycin	6 mg
Spectinomycin	200 mg
Spiramycin	15,25 mg
Rifampicin	12,5 mg
Aqua dest.	ad 1000 ml

Tabelle 18: Charakteristika der in dieser Arbeit verwendeten *Brachyspira* spp. Kontroll- (n=18) und Feldstämme (n = 221) vom Schwein*

Stamm	Isolierungs-jahr	Spezies	Herkunft, Farm-Nummer ¹	ST ²	Eigenschaften (Serologie ³ , Hämolyse ⁴ , Phänotyp ⁵)	Zusätzliche Informationen (WGS ⁶)
B78	1970er	sh <i>B. hyo.</i>	US	56	1/A, Phänotyp 1, 2, 8	Kontrollstamm, WGS
B204	1970er	sh <i>B. hyo.</i>	US	54	2/B, Phänotyp 1-8	Kontrollstamm, WGS
B169	1970er	sh <i>B. hyo.</i>	CAN	59	3/C, Phänotyp 1, 2, 8	Kontrollstamm
A1	2000er	sh <i>B. hyo.</i>	GB	88	4/D, Phänotyp 1, 2, 8	Kontrollstamm
B8044	1980er	sh <i>B. hyo.</i>	US	24	5/B, Phänotyp 1, 2, 8	Kontrollstamm, WGS
B6933	1980er	sh <i>B. hyo.</i>	US	26	6/A, Phänotyp 1, 2, 8	Kontrollstamm, WGS
Ack 300/8	1970er	sh <i>B. hyo.</i>	US	5	7,5,2/B, Phänotyp 1, 2, 8	Kontrollstamm
Vic2	1980er	sh <i>B. hyo.</i>	AUS	30	n.u./H, Phänotyp 1, 2, 8	Kontrollstamm, WGS
NSW1	1990er	sh <i>B. hyo.</i>	AUS	33	n.u./I, Phänotyp 1, 2, 8	Kontrollstamm
WA1	1980er	sh <i>B. hyo.</i>	AUS	36	n.u./B; n. u.	Kontrollstamm, WGS
2943-1	n. b.	sh <i>B. hyo.</i>	D	4	n. u.	Kontrollstamm
G327	1990	sh <i>B. hyo.</i>	D, 1	8	n. u.	Feldstamm
G325	1991	sh <i>B. hyo.</i>	D, 2	8	n. u.	Feldstamm
G326	1991	sh <i>B. hyo.</i>	D, 3	8	n. u.	Feldstamm
G322	1994	sh <i>B. hyo.</i>	D, 4	8	Hämolyse	Feldstamm
G323	1994	sh <i>B. hyo.</i>	D, 5	8	n. u.	Feldstamm
G321	1997	sh <i>B. hyo.</i>	D, 6	8	n. u.	Feldstamm
G318	2000	sh <i>B. hyo.</i>	D, 7	8	n. u.	Feldstamm
G048	2003	sh <i>B. hyo.</i>	D, 8	8	n. u.	Feldstamm
G021	2004	sh <i>B. hyo.</i>	D, 9	8	n. u.	Feldstamm, WGS
G030	2004	sh <i>B. hyo.</i>	D, 10	8	Hämolyse	Feldstamm
G061	2004	sh <i>B. hyo.</i>	D, 11	8	n. u.	Feldstamm
G134	2006	sh <i>B. hyo.</i>	D, 12	8	n. u.	Feldstamm
G141	2006	sh <i>B. hyo.</i>	D, 13	8	Hämolyse	Feldstamm
G349	2011	sh <i>B. hyo.</i>	D, 14	8	Hämolyse	Feldstamm
G474	2015	sh <i>B. hyo.</i>	PL.	8	n. u.	Feldstamm
G475	2015	sh <i>B. hyo.</i>	PL	8	n. u.	Feldstamm
G476	2015	sh <i>B. hyo.</i>	PL	8	n. u.	Feldstamm

Tabelle 18: Charakteristika der in dieser Arbeit verwendeten *Brachyspira* spp. Kontroll- (n=18) und Feldstämme (n = 221) vom Schwein* (Fortsetzung)

Stamm	Isolierungs-jahr	Spezies	Herkunft, Farm-Nummer ¹	ST ²	Eigenschaften (Serologie ³ , Hämolysin ⁴ , Phänotyp ⁵)	Zusätzliche Informationen (WGS ⁶)
G316	1999	sh <i>B. hyo.</i>	D, 16	52	n. u.	Feldstamm
G317	1999	sh <i>B. hyo.</i>	D, 17	52	n. u.	Feldstamm
G332	2000	sh <i>B. hyo.</i>	D, 18	52	n. u.	Feldstamm
G314	2001	sh <i>B. hyo.</i>	D, 19	52	Hämolysin	Feldstamm
G315	2001	sh <i>B. hyo.</i>	D, 20	52	n. u.	Feldstamm
G307	2002	sh <i>B. hyo.</i>	D, 21	52	n. u.	Feldstamm
G334	2002	sh <i>B. hyo.</i>	D, 22	52	n. u.	Feldstamm
G337	2002	sh <i>B. hyo.</i>	D, 23	52	n. u.	Feldstamm
G338	2002	sh <i>B. hyo.</i>	D, 24	52	n. u.	Feldstamm
G007	2003	sh <i>B. hyo.</i>	D, 25	52	n. u.	Feldstamm
G088	2003	sh <i>B. hyo.</i>	D, 26	52	n. u.	Feldstamm
G098	2003	sh <i>B. hyo.</i>	D, 27	52	n. u.	Feldstamm
G016	2004	sh <i>B. hyo.</i>	D, 28	52	n. u.	Feldstamm
G042	2004	sh <i>B. hyo.</i>	D, 29	52	Hämolysin	Feldstamm
G046	2004	sh <i>B. hyo.</i>	D, 30	52	n. u.	Feldstamm
G049	2004	sh <i>B. hyo.</i>	D, 31	52	n. u.	Feldstamm
G110	2004	sh <i>B. hyo.</i>	D, 31	52	n. u.	Feldstamm
G043	2005	sh <i>B. hyo.</i>	D, 31	52	n. u.	Feldstamm
G050	2004	sh <i>B. hyo.</i>	D, 32	52	n. u.	Feldstamm
G057	2005	sh <i>B. hyo.</i>	D, 33	52	n. u.	Feldstamm
G076	2005	sh <i>B. hyo.</i>	D, 34	52	n. u.	Feldstamm
G130	2006	sh <i>B. hyo.</i>	D, 35	52	Hämolysin	Feldstamm
G136	2007	sh <i>B. hyo.</i>	D, 36	52	n. u.	Feldstamm
G147	2007	sh <i>B. hyo.</i>	D, 37	52	n. u.	Feldstamm
G155	2007	sh <i>B. hyo.</i>	D, 38	52	n. u.	Feldstamm
G172	2008	sh <i>B. hyo.</i>	D, 39	52	n. u.	Feldstamm
G181	2009	sh <i>B. hyo.</i>	D, 40	52	n. u.	Feldstamm
G182	2009	sh <i>B. hyo.</i>	D, 40	52	n. u.	Feldstamm
G183	2009	sh <i>B. hyo.</i>	D, 40	52	Hämolysin	Feldstamm
G184	2009	sh <i>B. hyo.</i>	D, 40	52	n. u.	Feldstamm
G201	2009	sh <i>B. hyo.</i>	D, 40	52	n. u.	Feldstamm
G202	2009	sh <i>B. hyo.</i>	D, 40	52	n. u.	Feldstamm

Tabelle 18: Charakteristika der in dieser Arbeit verwendeten *Brachyspira* spp. Kontroll- (n=18) und Feldstämme (n = 221) vom Schwein* (Fortsetzung)

Stamm	Isolierungs-jahr	Spezies	Herkunft, Farm-Nummer ¹	ST ²	Eigenschaften (Serologie ³ , Hämolyisin ⁴ , Phänotyp ⁵)	Zusätzliche Informationen (WGS ⁶)
G203	2009	sh <i>B. hyo.</i>	D, 40	52	n. u.	Feldstamm
G207	2009	sh <i>B. hyo.</i>	D, 40	52	n. u.	Feldstamm
G277	2010	sh <i>B. hyo.</i>	D, 41	52	n. u.	Feldstamm
G329	2010	sh <i>B. hyo.</i>	D, 42	52	n. u.	Feldstamm
G339	2010	sh <i>B. hyo.</i>	D, 43	52	n. u.	Feldstamm
G367	2010	sh <i>B. hyo.</i>	D, 43	52	n. u.	Feldstamm
G347	2011	sh <i>B. hyo.</i>	D, 44	52	n. u.	Feldstamm
G376	2011	sh <i>B. hyo.</i>	D, 40	52	n. u.	Feldstamm
G377	2011	sh <i>B. hyo.</i>	D, 40	52	n. u.	Feldstamm
G379	2011	sh <i>B. hyo.</i>	D, 40	52	n. u.	Feldstamm
G390	2013	sh <i>B. hyo.</i>	D, 45	52	n. u.	Feldstamm
G397	2013	sh <i>B. hyo.</i>	D, 46	52	Hämolyisin	Feldstamm
G433	2014	sh <i>B. hyo.</i>	D, 47	52	n. u.	Feldstamm
G465	2015	sh <i>B. hyo.</i>	D, 48	52	Hämolyisin	Feldstamm
G487	2015	sh <i>B. hyo.</i>	D, 49	52	n. u.	Feldstamm
G209	2009	sh <i>B. hyo.</i>	J	52	n. u.	Feldstamm
G003	2004	sh <i>B. hyo.</i>	D, 50	112	n. u.	Feldstamm
G062	2004	sh <i>B. hyo.</i>	D, 50	112	n. u.	Feldstamm
G320	2000	sh <i>B. hyo.</i>	D, 51	112	n. u.	Feldstamm
G331	2000	sh <i>B. hyo.</i>	D, 52	112	n. u.	Feldstamm
G306	2002	sh <i>B. hyo.</i>	D, 53	112	n. u.	Feldstamm
G308	2002	sh <i>B. hyo.</i>	D, 54	112	n. u.	Feldstamm
G309	2002	sh <i>B. hyo.</i>	D, 55	112	n. u.	Feldstamm
G310	2002	sh <i>B. hyo.</i>	D, 56	112	n. u.	Feldstamm
G311	2002	sh <i>B. hyo.</i>	D, 57	112	n. u.	Feldstamm
G312	2002	sh <i>B. hyo.</i>	D, 58	112	n. u.	Feldstamm
G335	2002	sh <i>B. hyo.</i>	D, 59	112	n. u.	Feldstamm
G336	2002	sh <i>B. hyo.</i>	D, 60	112	Hämolyisin	Feldstamm
G015	2004	sh <i>B. hyo.</i>	D, 61	112	n. u.	Feldstamm
G024	2004	sh <i>B. hyo.</i>	D, 62	112	n. u.	Feldstamm
G047	2004	sh <i>B. hyo.</i>	D, 63	112	Hämolyisin	Feldstamm
G064	2004	sh <i>B. hyo.</i>	D, 64	112	n. u.	Feldstamm

Tabelle 18: Charakteristika der in dieser Arbeit verwendeten *Brachyspira* spp. Kontroll- (n=18) und Feldstämme (n = 221) vom Schwein* (Fortsetzung)

Stamm	Isolierungs-jahr	Spezies	Herkunft, Betriebs-Nummer ¹	ST ²	Eigenschaften (Serologie ³ , Hämolyisin ⁴ , Phänotyp ⁵)	Zusätzliche Informationen (WGS ⁶)
G017	2005	sh <i>B. hyo.</i>	D, 65	112	n. u.	Feldstamm
G036	2005	sh <i>B. hyo.</i>	D, 66	112	n. u.	Feldstamm
G038	2005	sh <i>B. hyo.</i>	D, 67	112	n. u.	Feldstamm
G078	2005	sh <i>B. hyo.</i>	D, 68	112	n. u.	Feldstamm
G091	2006	sh <i>B. hyo.</i>	D, 69	112	Hämolyisin	Feldstamm
G139	2007	sh <i>B. hyo.</i>	D, 70	112	n. u.	Feldstamm
G274	2010	sh <i>B. hyo.</i>	D, 71	112	n. u.	Feldstamm
G296	2011	sh <i>B. hyo.</i>	D, 72	112	n. u.	Feldstamm
G381	2013	sh <i>B. hyo.</i>	D, 73	112	n. u.	Feldstamm
G385	2013	sh <i>B. hyo.</i>	D, 74	112	n. u.	Feldstamm
G403	2013	sh <i>B. hyo.</i>	D, 75	112	Hämolyisin	Feldstamm
G420	2014	sh <i>B. hyo.</i>	D, 76	112	n. u.	Feldstamm
G448	2015	sh <i>B. hyo.</i>	D, 77	112	Hämolyisin	Feldstamm
G449	2015	sh <i>B. hyo.</i>	D, 78	112	n. u.	Feldstamm
G101	2004	sh <i>B. hyo.</i>	D, 79	113	Hämolyisin	Feldstamm
G328	1990	sh <i>B. hyo.</i>	D, 80	114	Hämolyisin	Feldstamm
G440	2014	sh <i>B. hyo.</i>	D, 81	114	Hämolyisin	Feldstamm
G483	2015	sh <i>B. hyo.</i>	D, 82	114	n. u.	Feldstamm
G488	2015	sh <i>B. hyo.</i>	D, 83	114	n. u.	Feldstamm
G490	2015	sh <i>B. hyo.</i>	D, 84	114	n. u.	Feldstamm
G493	2015	sh <i>B. hyo.</i>	D, 81	114	n. u.	Feldstamm
G504	2015	sh <i>B. hyo.</i>	D, 85	114	n. u.	Feldstamm
G502	2016	sh <i>B. hyo.</i>	D, 86	114	n. u.	Feldstamm
G330	2010	sh <i>B. hyo.</i>	D, 87	115	Hämolyisin	Feldstamm
G169	2008	sh <i>B. hyo.</i>	D, 88	116	Hämolyisin	Feldstamm
G382	2013	sh <i>B. hyo.</i>	D, 89	116	Hämolyisin	Feldstamm
G002	2004	sh <i>B. hyo.</i>	D, 90	117	Hämolyisin	Feldstamm
G032	2004	sh <i>B. hyo.</i>	D, 91	117	Hämolyisin	Feldstamm
G044	2004	sh <i>B. hyo.</i>	D, 92	117	Hämolyisin, Phänotyp 1, 2, 8	Feldstamm, WGS
G022	2004	sh <i>B. hyo.</i>	D, 93	118	Hämolyisin	Feldstamm
G302	2012	sh <i>B. hyo.</i>	D, 94	120	Hämolyisin	Feldstamm

Tabelle 18: Charakteristika der in dieser Arbeit verwendeten *Brachyspira* spp. Kontroll- (n=18) und Feldstämme (n = 221) vom Schwein* (Fortsetzung)

Stamm	Isolierungs-jahr	Spezies	Herkunft, Farm-Nummer ¹	ST ²	Eigenschaften (Serologie ³ , Hämolyisin ⁴ , Phänotyp ⁵)	Zusätzliche Informationen (WGS ⁶)
G387	2013	sh <i>B. hyo.</i>	D, 95	120	Hämolyisin	Feldstamm
G485	2015	sh <i>B. hyo.</i>	D, 95	120	n. u.	Feldstamm
G319	2000	sh <i>B. hyo.</i>	D, 96	121	Hämolyisin	Feldstamm
G324	1992	sh <i>B. hyo.</i>	D, 97	122	Hämolyisin	Feldstamm
G153	2007	sh <i>B. hyo.</i>	D, 98	123	Hämolyisin	Feldstamm
G208	2009	sh <i>B. hyo.</i>	J	124	n. u.	Feldstamm
G012	2004	sh <i>B. hyo.</i>	D, 99	131	Hämolyisin	Feldstamm
G009	2005	sh <i>B. hyo.</i>	D, 100	193	n. u.	Feldstamm
G472	2015	sh <i>B. hyo.</i>	PL	194	n. u.	Feldstamm
G473	2015	sh <i>B. hyo.</i>	PL	195	n. u.	Feldstamm
G477	2015	sh <i>B. hyo.</i>	PL	195	n. u.	Feldstamm
G478	2015	sh <i>B. hyo.</i>	PL	195	n. u.	Feldstamm
G479	2015	sh <i>B. hyo.</i>	PL	195	n. u.	Feldstamm
G480	2015	sh <i>B. hyo.</i>	PL	195	n. u.	Feldstamm
G482	2015	sh <i>B. hyo.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G491	2015	sh <i>B. hyo.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G510	2016	sh <i>B. hyo.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G511	2016	sh <i>B. hyo.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G518	2016	sh <i>B. hyo.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G210	2009	sh <i>B. hyo.</i>	J		n. u.	Feldstamm
G211	2009	sh <i>B. hyo.</i>	J		n. u.	Feldstamm
G212	2009	sh <i>B. hyo.</i>	J		n. u.	Feldstamm
G254	2010	sh <i>B. hyo.</i>	E		n. u.	Feldstamm
G255	2010	sh <i>B. hyo.</i>	E		n. u.	Feldstamm
G256	2010	sh <i>B. hyo.</i>	E		n. u.	Feldstamm
G257	2010	sh <i>B. hyo.</i>	E		n. u.	Feldstamm
G258	2010	sh <i>B. hyo.</i>	E		n. u.	Feldstamm
G259	2010	sh <i>B. hyo.</i>	E		n. u.	Feldstamm
G260	2010	sh <i>B. hyo.</i>	E		n. u.	Feldstamm
G261	2010	sh <i>B. hyo.</i>	E		n. u.	Feldstamm
G262	2010	sh <i>B. hyo.</i>	E		n. u.	Feldstamm
G263	2010	sh <i>B. hyo.</i>	E		n. u.	Feldstamm

Tabelle 18: Charakteristika der in dieser Arbeit verwendeten *Brachyspira* spp. Kontroll- (n=18) und Feldstämme (n = 221) vom Schwein* (Fortsetzung)

Stamm	Isolierungs-jahr	Spezies	Herkunft, Farm-Nummer ¹	ST ²	Eigenschaften (Serologie ³ , Hämolysin ⁴ , Phänotyp ⁵)	Zusätzliche Informationen (WGS ⁶)
G264	2010	sh <i>B. hyo.</i>	E		n. u.	Feldstamm
G265	2010	sh <i>B. hyo.</i>	E		n. u.	Feldstamm
G266	2010	sh <i>B. hyo.</i>	E		n. u.	Feldstamm
G267	2010	sh <i>B. hyo.</i>	E		n. u.	Feldstamm
G268	2010	sh <i>B. hyo.</i>	E		n. u.	Feldstamm
G269	2010	sh <i>B. hyo.</i>	E		n. u.	Feldstamm
G271	2010	sh <i>B. hyo.</i>	E		n. u.	Feldstamm
G272	2010	sh <i>B. hyo.</i>	E		n. u.	Feldstamm
G188	2003	sh <i>B. hyo.</i>	DK		n. u.	Feldstamm
G189	2004	sh <i>B. hyo.</i>	DK		n. u.	Feldstamm
G190	2004	sh <i>B. hyo.</i>	DK		n. u.	Feldstamm
G191	2004	sh <i>B. hyo.</i>	DK		n. u.	Feldstamm
G192	2004	sh <i>B. hyo.</i>	DK		n. u.	Feldstamm
G193	2005	sh <i>B. hyo.</i>	DK		n. u.	Feldstamm
G194	2005	sh <i>B. hyo.</i>	DK		n. u.	Feldstamm
G195	2005	sh <i>B. hyo.</i>	DK		n. u.	Feldstamm
G197	2006	sh <i>B. hyo.</i>	DK		n. u.	Feldstamm
G198	2006	sh <i>B. hyo.</i>	DK		n. u.	Feldstamm
G199	2007	sh <i>B. hyo.</i>	DK		n. u.	Feldstamm
G200	2007	sh <i>B. hyo.</i>	DK		n. u.	Feldstamm
G283	2010	sh <i>B. hyo.</i>	US		n. u.	Feldstamm
G284	2010	sh <i>B. hyo.</i>	US		n. u.	Feldstamm
G285	2010	sh <i>B. hyo.</i>	US		n. u.	Feldstamm
G286	2010	sh <i>B. hyo.</i>	US		n. u.	Feldstamm
G287	2010	sh <i>B. hyo.</i>	US		n. u.	Feldstamm
G289	2010	sh <i>B. hyo.</i>	US		n. u.	Feldstamm
G290	2010	sh <i>B. hyo.</i>	US		n. u.	Feldstamm
G291	2010	sh <i>B. hyo.</i>	US		n. u.	Feldstamm
G292	2010	sh <i>B. hyo.</i>	US		n. u.	Feldstamm
865	2010er	sh <i>B. hyo.</i>	COR	125	n. u.	WGS
FMV89.3323	1989	sh <i>B. hyo.</i>	CDN	4	n. u.	WGS
NX	2010er	sh <i>B. hyo.</i>	GB	4	n. u.	WGS

Tabelle 18: Charakteristika der in dieser Arbeit verwendeten *Brachyspira* spp. Kontroll- (n=18) und Feldstämme (n = 221) vom Schwein* (Fortsetzung)

Stamm	Isolierungs-jahr	Spezies	Herkunft, Farm-Nummer ¹	ST ²	Eigenschaften (Serologie ³ , Hämolyisin ⁴ , Phänotyp ⁵)	Zusätzliche Informationen (WGS ⁶)
FM88.9	1990	sh <i>B. hyo.</i>	CDN	55	n. u.	WGS
NSW15	2010er	sh <i>B. hyo.</i>	AUS	15	n. u.	WGS
NSW5	n. b.	sh <i>B. hyo.</i>	AUS	11	n. u.	WGS
Q17	1990er	sh <i>B. hyo.</i>	AUS	35	n. u.	WGS
ST190	2010er	sh <i>B. hyo.</i>	DK	127	n. u.	WGS
ST195	2010er	sh <i>B. hyo.</i>	DK	128	n. u.	WGS
ST210	2010er	sh <i>B. hyo.</i>	J	129	n. u.	WGS
ST265	2010er	sh <i>B. hyo.</i>	E		n. u.	WGS
WA100	2010er	sh <i>B. hyo.</i>	AUS	130	n. u.	WGS
AN 4859/03	2003	sh <i>B. suan.</i>	S		Phänotyp 1-7	Kontrollstamm WGS
5364-4x/12	n. b.	sh <i>B. hamps.</i>	D		Phänotyp 1-7	Kontrollstamm
2981-4	n. b.	wh <i>B. pilos.</i>	D		n. u.	Kontrollstamm
2334-4	n. b.	wh <i>B. interm.</i>	D		n. u.	Kontrollstamm
2933-2	n. b.	wh <i>B. innoc.</i>	D		Phänotyp 1-5, 7	Kontrollstamm
2142-8	n. b.	wh <i>B. murdo.</i>	D		n. u.	Kontrollstamm
30446	2009	sh <i>B. hamps.</i>	CAN		n. u.	WGS
30599	2011	sh <i>B. hamps.</i>	CAN		n. u.	WGS
ATCC 29796	n. b.	wh <i>B. innoc.</i>	n. b.		n. u.	WGS
PWS/A	1970er	wh <i>B. interm.</i>	GB		n. u.	WGS
DSM 12563	n. b.	wh <i>B. murdo.</i>	CAN		n. u.	WGS
WesB*	1990er	wh <i>B. pilos.</i>	AUS		n. u.	WGS
95/1000	1990er	wh <i>B. pilos.</i>	AUS		n. u.	WGS
B2904*	n. b.	wh <i>B. pilos.</i>	GB		n. u.	WGS
P43/6/78	1970er	wh <i>B. pilos.</i>	GB		n. u.	WGS
ATCC 51933 (C1)*	n. b.	wh <i>B. alvinip.</i>	US		n. u.	Kontrollstamm WGS (partiell)
G484	2015	wh <i>B. innoc.</i>	PL		n. u.	Feldstamm
G270	2010	wh <i>Brachyspira</i> sp.	E		n. u.	Feldstamm
G288	2010	sh <i>B. hamps.</i>	US		n. u.	Feldstamm
G196	2006	wh <i>B. pilos.</i>	DK		n. u.	Feldstamm
G423	2014	wh <i>B. hyo.</i>	D		Phänotyp 1-5, 7	Feldstamm
G460	2015	wh <i>Brachyspira</i> sp.	D		n. u.	Feldstamm

Tabelle 18: Charakteristika der in dieser Arbeit verwendeten *Brachyspira* spp. Kontroll- (n=18) und Feldstämme (n = 221) vom Schwein* (Fortsetzung)

Stamm	Isolierungs-jahr	Spezies	Herkunft, Farm-Nummer ¹	ST ²	Eigenschaften (Serologie ³ , Hämolyisin ⁴ , Phänotyp ⁵)	Zusätzliche Informationen (WGS ⁶)
G408*	2013	wh <i>B. alvinip.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G001	2004	wh <i>B. pilos.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G070	2004	wh <i>B. pilos.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G162	2008	wh <i>B. pilos.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G278	2010	wh <i>B. pilos.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G388	2013	wh <i>B. pilos.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G399	2013	wh <i>B. pilos.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G401	2013	wh <i>B. pilos.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G413	2013	wh <i>B. pilos.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G426	2014	wh <i>B. pilos.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G441	2014	wh <i>B. pilos.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G369	2010	wh <i>B. murdo.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G400	2013	wh <i>B. murdo.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G060	2005	wh <i>B. murdo.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G293	2010	wh <i>B. murdo.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G402	2013	wh <i>B. murdo.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G406	2013	wh <i>B. murdo.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G411	2013	wh <i>B. murdo.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G414	2014	wh <i>B. murdo.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G451	2015	wh <i>B. murdo.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G486	2015	wh <i>B. murdo.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G340	2010	wh <i>B. innoc.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G031	2004	wh <i>B. innoc.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G059	2005	wh <i>B. innoc.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G073	2004	wh <i>B. innoc.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G077	2005	wh <i>B. innoc.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G096	2004	wh <i>B. innoc.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G166	2008	wh <i>B. innoc.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G405	2013	wh <i>B. innoc.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G427	2014	wh <i>B. innoc.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G481	2015	wh <i>B. innoc.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G168	2008	wh <i>B. interm.</i>	D		n. u.	Feldstamm

Tabelle 18: Charakteristika der in dieser Arbeit verwendeten *Brachyspira* spp. Kontroll- (n=18) und Feldstämme (n = 221) vom Schwein* (Fortsetzung)

Stamm	Isolierungs-jahr	Spezies	Herkunft, Farm-Nummer ¹	ST ²	Eigenschaften (Serologie ³ , Hämolyse ⁴ , Phänotyp ⁵)	Zusätzliche Informationen (WGS ⁶)
G273	2010	wh <i>B. interm.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G275	2010	wh <i>B. interm.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G303	2012	wh <i>B. interm.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G404	2013	wh <i>B. interm.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G407	2013	wh <i>B. interm.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G410	2013	wh <i>B. interm.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G429	2014	wh <i>B. interm.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G447	2015	wh <i>B. interm.</i>	D		n. u.	Feldstamm
G492	2015	wh <i>B. interm.</i>	D		n. u.	Feldstamm

* = die Spezies *B. alvinipulli* wurde aus Geflügel isoliert, *B. pilosicoli*-Stamm WesB stammt vom Menschen und *B. pilosicoli*-Stamm B2904 vom Geflügel;

sh = stark hämolysierend („strongly hemolytic“); wh = schwach hämolysierend („weakly hemolytic“); n. b. = nicht bekannt; n. u. = nicht untersucht; *B. hyo.* = *B. hyodysenteriae*; *B. suan.* = *B. suanatina*; *B. hamps.* = *B. hampsonii*; *B. pilos.* = *B. pilosicoli*; *B. interm.* = *B. intermedia*; *B. innoc.* = *B. innocens*; *B. murdo.* = *B. murdochii*; *B. alvinip.* = *B. alvinipulli*;

D = Deutschland; J = Japan; GB = Großbritannien; COR = Korea; CDN = Kanada; US = Vereinigte Staaten; E = Spanien; PL = Polen; DK = Dänemark; AUS = Australien;

¹ Betriebs-Nummer nur bei *B. hyodysenteriae*-Stämmen aus Deutschland für die MLST-Analyse;

² Sequenztyp (ST) nur für 127 ausgewählte *B. hyodysenteriae*-Stämme untersucht;

³ Serologie 1/A bedeutet Serotyp 1 und Serogruppe A;

⁴ *B. hyodysenteriae*-Stämme, bei denen die Hämolysingene sequenziert wurden (s. Punkt 4.3.1.1);

⁵ Phänotypische Untersuchungen 1) Hämolysepräparation (s. Punkt 3.4.3), 2) Studien zur Hämolysefreisetzung (s. Punkt 4.5.3), 3) Überprüfung der Temperaturstabilität (s. Punkt 4.5.1), 4) Überprüfung des Temperaturoptimums (s. Punkt 4.5.2), 5) Porenbildung (s. Punkt 4.5.5), 6) zeitliche Freisetzung und Inhibition der Hämolyse (s. Punkt 4.5.4), 7) CAMP-ähnliches Phänomen (s. Punkt 4.5.6), 8) Untersuchung zur Zytotoxizität (s. Punkt 4.5.7);

⁶ Die Hämolysingensequenzen der Gesamtgenom-sequenzierten Stämme wurden für die *in silico*-Analyse der Hämolysingene (s. Punkt 4.3.1.3) sowie zur Überprüfung der Hämolysingenprimer verwendet

Tabelle 19: Lebendkeimzahl und hämolytische Aktivität der während der Vermehrung von *B. hyodysenteriae* B204 und G423 in Bouillon entnommenen Proben zur Bestimmung der Hämolytischen-Transkriptionsaktivität

<i>B. hyodysenteriae</i> Stamm	Stunden nach Inoku- lation	Hämolytintiter (mm) bei der Vermehrung in BHIF			Lebendkeimzahlen [WbE ₅₀ /ml]			Bestimmung Trans- kriptionsaktivität
		Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	
B204 stark hämolytisch	0	0	0	0	3,75	4,25	4	-
	14	0	0	0	5	5,5	4,75	-
	24	0	0	0	6	6,25	5,75	+
	35	5	6	4	8	6,25	7,75	+
	40	6	6	5	7	6,75	6,75	+
	48	5	4	5	9,75	9,75	9	-
	55	2	2	2	9,75	9,75	9,75	-
	62	1	1	1	8,25	8,5	8	-
	84	0	0	0	7,75	7,75	7,5	+
	G423 schwach hämoly- tisch	0	0	0	0	3,75	4,75	4,75
17		0	0	0	4	4,25	4,25	-
25		0	0	0	5	4,75	5	-
41		0	0	0	5,5	5	5,5	-
47		0	0	0	5,25	6	5,5	-
53		0	0	0	6,25	6	6	+
63		0	0	0	8,25	8,5	8	+
73		0	0	0	8,5	8,25	8,5	-
87		0	0	1	8,5	8,5	8,5	-
92		0	1	1	9,5	9,5	9,5	-
99	1	1	1	9,5	8,75	9,5	-	

Tabelle 19: Lebendkeimzahl und hämolytische Aktivität der während der Vermehrung von *B. hyodysenteriae* B204 und G423 in Bouillon entnommenen Proben zur Bestimmung der Hämolytischen-Transkriptionsaktivität (Fortsetzung)

<i>B. hyodysenteriae</i> Stamm	Stunden nach Inokulation	Hämolytintiter (mm)			Lebendkeimzahlen [WbE ₅₀ /ml]			Bestimmung Transkriptionsaktivität
		bei der Vermehrung in BHIF			bei der Vermehrung in BHIF			
		Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	
G423 schwach hämolytisch	110	3	2	3	9,5	9,5	9,5	+
	117	3	3	3	7,5	8	8,25	-
	136	3	3	3	8,5	8,5	8,25	+
	147	4	2	4	4	6,5	1	-
	160	3	3	3	4	6,25	1	-

+ = Bestimmung der Transkriptionsaktivität, - = keine Bestimmung der Transkriptionsaktivität

Tabelle 20: Hämolyisin-inhibierende Antikörper in Schweineseren vor und nach experimenteller Infektion mit *B. hyodysenteriae* im Hämolyisin-Inhibitionstest

Immunantwort von Schweinen vor und nach experimenteller Infektion mit <i>B. hyodysenteriae</i>							
Ver- suchs- Nr. ¹	Schwein- Nr.	Brachy- spira- Stamm ²	Zeitpunkt ³	Relative Hämolyse verschiedener Serumverdünnungen im HI-Test			
				1:2	1:4	1:8	1:16
1	1	1	1 (6 d <i>prae inf.</i>)	94,15	108,18	122,34	123,37
1	1	1	2 (28 d <i>p.i.</i>)	92,59	118,51	126,66	127,28
1	2	1	1 (6 d <i>prae inf.</i>)	80,2	122,09	143,66	140,16
1	2	1	2 (28 d <i>p.i.</i>)	60,78	94,69	103,41	105,84
1	3	1	1 (6 d <i>prae inf.</i>)	107,57	131,19	125,11	126,74
1	3	1	2 (28 d <i>p.i.</i>)	112,92	121,1	123,08	119,38
1	4	1	1 (6 Tage <i>prae inf.</i>)	139,66	141,89	140,36	127,15
1	4	1	2 (28 d <i>p.i.</i>)	99,58	110,57	111,6	109,75
1	5	2	1 (6 d <i>prae inf.</i>)	121,68	127,77	114,64	121,64
1	5	2	2 (28 d <i>p.i.</i>)	118,35	124,6	120,2	114,11
1	6	2	1 (6 d <i>prae inf.</i>)	126	126,29	119,99	110,78
1	6	2	2 (28 d <i>p.i.</i>)	80,07	96,3	91,98	109,68
1	1554	K	1 (6 d <i>prae inf.</i>)	91,88	101,89	90,54	113,2
1	1554	K	2 (28 d <i>p.i.</i>)	88,87	103,79	92,99	114,3
1	1555	K	1 (6 d <i>prae inf.</i>)	86,83	94,46	88,47	112,43
1	1555	K	2 (28 d <i>p.i.</i>)	86,69	99,28	89,67	110,59
2	7	1	1 (6 d <i>prae inf.</i>)	67,52	87,23	89,71	121,93
2	7	1	2 (28 d <i>p.i.</i>)	93,78	96,6	97,03	119,62
2	782-2	K	1 (6 d <i>prae inf.</i>)	82,68	88,87	87,26	116,11
2	782-2	K	2 (28 d <i>p.i.</i>)	86,06	92,18	91,88	121,69
2	8	1	1 (6 d <i>prae inf.</i>)	99,98	95,93	93,39	119,15
2	8	1	2 (28 d <i>p.i.</i>)	95,73	95,56	93,72	117,34
2	9	1	1 (6 d <i>prae inf.</i>)	86,07	109,04	103,06	97,95
2	9	1	2 (28 d <i>p.i.</i>)	90,51	119,2	104,37	92,94
2	10	1	1 (6 d <i>prae inf.</i>)	97,35	110,72	109,97	96,75
2	10	1	2 (28 d <i>p.i.</i>)	82,22	120,1	106,09	97,8
2	11	1	1 (6 d <i>prae inf.</i>)	83,23	117,93	104,71	98,32
2	11	1	2 (28 d <i>p.i.</i>)	79,01	103,06	110,76	102,8
2	12	1	1 (6 d <i>prae inf.</i>)	67,09	107,32	105	98,28
2	12	1	2 (28 d <i>p.i.</i>)	94,99	118,79	113	105,53
2	800	K	1 (6 d <i>prae inf.</i>)	51,27	85,38	97,88	101,73
2	800	K	2 (28 d <i>p.i.</i>)	97,01	110,01	105,42	103,85
2	13	1	1 (6 d <i>prae inf.</i>)	74,6	97,09	99,33	95,29
2	13	1	2 (28 d <i>p.i.</i>)	88,7	112,39	82,19	113,5

Tabelle 20: Hämolyisin-inhibierende Antikörper in Schweineseren vor und nach experimenteller Infektion mit *B. hyodysenteriae* im Hämolyisin-Inhibitionstest (Fortsetzung)

Immunantwort von Schweinen vor und nach experimenteller Infektion mit <i>B. hyodysenteriae</i>							
Versuchs-Nr. ¹	Schwein-Nr.	Brachy-spira-Stamm ²	Zeitpunkt ³	Relative Hämolyse verschiedener Serumverdünnungen im HI-Test			
				1:2	1:4	1:8	1:16
3	1459	K	1 (7 d <i>prae inf.</i>)	93,89	115,76	114,27	115,91
3	1459	K	2 (30 d <i>p.i.</i>)	103,34	119,55	114,53	120,89
3	1460	K	1 (7 d <i>prae inf.</i>)	102,56	119,77	116,61	119,51
3	1460	K	2 (30 d <i>p.i.</i>)	100,81	113,56	111,44	114,31
3	14	1	1 (7 d <i>prae inf.</i>)	113,64	119,29	113,75	117,8
3	14	1	2 (29 d <i>p.i.</i>)	110,14	116,28	103,3	112,56
3	15	1	1 (7 d <i>prae inf.</i>)	100,77	113,08	109,4	112,45
3	15	1	2 (29 d <i>p.i.</i>)	121,67	112,63	101,96	106,8
3	16	1	1 (7 d <i>prae inf.</i>)	112,71	109,25	103,23	106,09
3	16	1	2 (29 d <i>p.i.</i>)	98,95	103,08	95,19	103,6
3	17	1	1 (7 d <i>prae inf.</i>)	112,75	122,69	126,98	127,64
3	17	1	2 (29 d <i>p.i.</i>)	117,16	121,62	121,95	116,17
4	18	1	1 (7 d <i>prae inf.</i>)	125,09	133,38	134,74	130,57
4	18	1	2 (28 d <i>p.i.</i>)	96,91	110,07	116,34	105,37
4	19	1	1 (7 d <i>prae inf.</i>)	109,41	112,67	109,86	116,13
4	19	1	2 (28 d <i>p.i.</i>)	118,86	127,15	119,89	117,41
4	20	1	1 (7 d <i>prae inf.</i>)	122,82	125,99	130,24	118,98
4	20	1	2 (28 d <i>p.i.</i>)	82,76	101,32	102,93	104,09
4	21	1	1 (7 d <i>prae inf.</i>)	102,68	104,87	96,37	91,3
4	21	1	2 (28 d <i>p.i.</i>)	108,13	119,76	108,5	96
4	766	K	1 (7 d <i>prae inf.</i>)	100,08	113,74	111,51	98,81
4	766	K	2 (28 d <i>p.i.</i>)	87,85	97,94	95,72	98,52
4	769	K	1 (7 d <i>prae inf.</i>)	92,97	103,38	108,67	109,73
4	769	K	2 (28 d <i>p.i.</i>)	59,2	79,18	88,64	93,18
4	22	3	1 (7 d <i>prae inf.</i>)	106,34	106,66	109,94	106,56
4	22	3	2 (28 d <i>p.i.</i>)	86,68	99,74	97,04	99,74
4	23	3	1 (7 d <i>prae inf.</i>)	101,9	114,96	114,48	116,33
4	23	3	2 (28 d <i>p.i.</i>)	78,38	92,02	91,7	92,23
4	24	3	1 (7 d <i>prae inf.</i>)	106,19	108,35	108,67	106,19
4	24	3	2 (28 d <i>p.i.</i>)	97,1	137,9	129,92	127,86
5	25	4	1 (26 d <i>prae inf.</i>)	106,19	165,75	145,51	142,18
5	25	4	2 (35 d <i>p.i.</i>)	78,6	94,77	90,33	88,69
5	26	4	1 (26 d <i>prae inf.</i>)	63,11	81,53	96,56	98,55
5	26	4	2 (35 d <i>p.i.</i>)	70,63	87,93	92,73	100,29
5	27	5	1 (26 d <i>prae inf.</i>)	78,53	104,03	106,89	110,09
5	27	5	2 (36 d <i>p.i.</i>)	75,14	90,12	94,57	101,31

Tabelle 20: Hämolyisin-inhibierende Antikörper in Schweineseren vor und nach experimenteller Infektion mit *B. hyodysenteriae* im Hämolyisin-Inhibitionstest (Fortsetzung)

Immunantwort von Schweinen vor und nach experimenteller Infektion mit <i>B. hyodysenteriae</i>							
Versuchs-Nr. ¹	Schwein-Nr.	Brachyspira-Stamm ²	Zeitpunkt ³	Relative Hämolyse verschiedener Serumverdünnungen im HI-Test			
				1:2	1:4	1:8	1:16
5	27	5	2 (36 d <i>p.i.</i>)	75,14	90,12	94,57	101,31
5	28	5	1 (26 d <i>prae inf.</i>)	82,26	97,19	96,22	96,61
5	28	5	2 (36 d <i>p.i.</i>)	96,37	103,64	104,66	104,85
5	29	5	1 (26 d <i>prae inf.</i>)	110,28	108,49	102,91	106,79
5	29	5	2 (36 d <i>p.i.</i>)	95,98	98,7	102,82	102,96
5	30	6	1 (26 d <i>prae inf.</i>)	77,08	86,04	78	73,73
5	30	6	2 (37 d <i>p.i.</i>)	72,04	95,14	98,89	97,27
5	31	6	1 (26 d <i>prae inf.</i>)	84,93	94,87	88,52	79,6
5	31	6	2 (37 d <i>p.i.</i>)	82,54	97,54	118,56	129,16
5	32	6	1 (26 d <i>prae inf.</i>)	81,43	106,52	111,25	112,73
5	32	6	2 (37 d <i>p.i.</i>)	83,91	94,72	96,76	96,85

¹Versuchs-Nr. = Nummer des Tierversuches am FLI Jena; ²Brachyspiren-Stamm 1 = *B. hyodysenteriae* B204, 2 = *B. hyodysenteriae* G153, 3 = *B. hyodysenteriae* G21, 4 = *B. hyodysenteriae* G44, 5 = *B. hyodysenteriae* G101, 6 = *B. hyodysenteriae* G189, K = Kontrolltiere; ³Zeitpunkt 1 = Serum vor der Infektion, Zeitpunkt 2 = Serum nach der Infektion; d = Tage; *p.i.* = *post infectionem*; *prae inf.* = *prae infectionem*

Tabelle 21: Hämolysin-inhibierende Antikörper in Kaninchenseren vor und nach Vakzination mit Ganzzelllysaten von *B. hyodysenteriae* im Hämolysin-Inhibitionstest

Immunantwort von Kaninchen vor und nach Vakzination mit <i>B. hyodysenteriae</i> -Antigen						
Kaninchen- Nr.	Vakzination gegen	Zeitpunkt ¹	Relative Hämolyse verschiedener Serumverdünnungen im HI-Test			
			1:2	1:4	1:8	1:16
1	BH A1	1 (0 d <i>prae vac.</i>)	69,51	87,13	88,65	91,77
1	BH A1	2 (48 d, 5. Vak.)	86,23	109,7	111,34	108,18
2	BH B8044 (1)	1 (0 d <i>prae vac.</i>)	59,73	79,41	92,75	95,01
2	BH B8044 (1)	2 (48 d, 5. Vak.)	54,22	66,33	83,01	79,4
3	BH B8044 (2)	1 (0 d <i>prae vac.</i>)	54	75,21	84,78	87,66
3	BH B8044 (2)	2 (48 d, 5. Vak.)	80,7	91,46	98,34	96,61
4	BH B6933 (1)	1 (0 d <i>prae vac.</i>)	59,57	73,82	74,21	66,52
4	BH B6933 (1)	2 (48 d, 5. Vak.)	54,51	83,3	95,48	102
5	BH B6933 (2)	1 (0 d <i>prae vac.</i>)	46,89	71,38	84,49	87,87
5	BH B6933 (2)	2 (28 d, 3. Vak.)	76,83	97	102,16	101,78
6	BH Ack 300/8 (1)	1 (0 d <i>prae vac.</i>)	67,99	99,5	101,78	104,32
6	BH Ack 300/8 (1)	2 (41 d, 4. Vak.)	55,15	83,83	91,7	94,08
7	BH Ack 300/8 (2)	1 (0 d <i>prae vac.</i>)	76,3	89,88	91,79	99,66
7	BH Ack 300/8 (2)	2 (48 d, 5. Vak.)	82,53	92,7	101,43	98,84
8	BH NSW1	1 (0 d <i>prae vac.</i>)	72,15	90,66	95,77	96,11
8	BH NSW1	2 (62 d, 6. Vak.)	49,01	81,32	84,26	88,24
9	BH A1	1 (0 d <i>prae vac.</i>)	61,64	99,04	120,66	124,72
9	BH A1	2 (99 d, 8. Vak.)	79,55	99,24	107,93	107,17
10	BH B8044	1 (0 d <i>prae vac.</i>)	54,27	80,23	104,13	114,12
10	BH B8044	2 (54 d, 5. Vak.)	61,11	99,95	104,44	102,68
11	BH Vic2	1 (0 d <i>prae vac.</i>)	73,74	94,8	101,67	98,33
11	BH Vic2	2 (99 d, 8. Vak.)	92,19	119,15	130,51	134,37
12	BH NSW1 (1)	1 (0 d <i>prae vac.</i>)	98,5	114,16	114	116,34
12	BH NSW1 (1)	2 (99 d, 8. Vak.)	69,47	85,03	91,95	87,14
13	BH NSW1 (2)	1 (0 d <i>prae vac.</i>)	18,53	62,12	107,99	120,45
13	BH NSW1 (2)	2 (21 d, 2. Vak.)	90,68	124,1	125,36	125,42
14	BH G21	1 (0 d <i>prae vac.</i>)	68,12	101,03	112,6	110,93
14	BH G21	2 (62 d, 5. Vak.)	95,5	98,56	105,29	102,07
15	BH G3	1 (0 d <i>prae vac.</i>)	79,63	96,77	100,51	105,4
15	BH G3	2 (70 d, 5. Vak.)	64,12	98,69	111,36	117,29
16	BH G38	1 (0 d <i>prae vac.</i>)	76,35	98,73	100	94,88
16	BH G38	2 (70 d, 5. Vak.)	54,68	73,52	84,44	88,74
17	BH G44	1 (0 d <i>prae vac.</i>)	76,8	103,28	110	108,39
17	BH G44	2 (70 d, 5. Vak.)	64,05	73,81	94,78	94,6
18	BH G47	1 (0 d <i>prae vac.</i>)	22,11	91,4	101,72	105,1
18	BH G47	2 (70 d, 5. Vak.)	53,35	73,71	92,9	95,61

Tabelle 21: Hämolyisin-inhibierende Antikörper in Kaninchenseren vor und nach Vakzination mit Ganzzelllysaten von *B. hyodysenteriae* im Hämolyisin-Inhibitionstest (Fortsetzung)

Immunantwort von Kaninchen vor und nach Vakzination mit <i>B. hyodysenteriae</i> -Antigen						
Kaninchen-Nr.	Vakzination gegen	Zeitpunkt ¹	Relative Hämolyse verschiedener Serumverdünnungen im HI-Test			
			1:2	1:4	1:8	1:16
19	BH G64	1 (0 d <i>prae vac.</i>)	62,04	72,35	80,18	88,46
19	BH G64	2 (70 d, 5. Vak.)	29,27	101,17	106,75	111,29
20	BH G88	1 (0 d <i>prae vac.</i>)	74,84	93,49	104,71	106,97
20	BH G88	2 (70 d, 5. Vak.)	83,98	99,14	107,11	106,79
21	BH G91	1 (0 d <i>prae vac.</i>)	75,96	90,41	93,36	94,98
21	BH G91	2 (70 d, 5. Vak.)	68,48	84,85	92,2	97,22
22	BH G98	1 (0 d <i>prae vac.</i>)	89,16	98,51	105,24	107,52
22	BH G98	2 (70 d, 5. Vak.)	51,75	87,84	90,5	92,1
23	BH B204	1 (0 d <i>prae vac.</i>)	79,67	98,26	96,43	96,73
23	BH B204	2 (48 d, 5. Vak.)	31,44	59,69	67,29	73,95
24	BH B78	1 (0 d <i>prae vac.</i>)	72,67	95,41	96,22	98,98
24	BH B78	2 (48 d, 5. Vak.)	68,86	88,32	96,89	103,64
25	BH B169	1 (0 d <i>prae vac.</i>)	78,75	103,02	104,46	109,24
25	BH B169	2 (48 d, 5. Vak.)	68,93	93,46	90,17	97,98
26	<i>B. innocens</i>	1 (0 d <i>prae vac.</i>)	77,74	104,57	95,77	93,32
26	<i>B. innocens</i>	2 (48 d, 5. Vak.)	79,26	97,48	95,07	89,66

¹Zeitpunkt 1 = Serum vor der Immunisierung, Zeitpunkt 2 = Serum nach der letzten Immunisierung; BH = *B. hyodysenteriae*; d = Tage; *prae vac.* = *prae vaccinationem*; Vak. = Vakzination

Tabelle 22: Primer und Reaktionsbedingungen für die konventionelle PCR

Nr. der PCR	Primername	Primer-Sequenz (5' -> 3')	Zielgen	Primer-Position im Genom ¹	Genbank-Acc.-Nr.	Annealing-Temperatur	Amplikon (bp)	Referenz ²
1	Bra1	GCTAGTCCTGAAAGTTTGAGAGG	<i>nox</i>	407-429	U19610	60 °C	435	1
1	Bra2	AGCTTCATCAGTGATTTCTTTATCA		817-841				
2a	BnoxR	TAGCYTGCGGTATYGCWCWTTTGG	<i>nox</i>	345-367	U19610	59 °C	939	11
2a	BnoxF	CTTCAGACCAYCCAGTAGAAGCC		1283-1261				
2b	Pilo-f1	AGAGGAAAGTTTTTCGCCTTC	<i>nox</i>	165-185	JF430726	59 °C	821	2
2b	Pilo-r1	GCACCTATGTTAAACGTCCTTG		964-985				
2c	InnoF1	ATGGTGCTATAAAAAGTAGAC	<i>nox</i>	778-797	AF060805	59 °C	249	3
2c	InnoR1	ACCAACCAGTAGAAGCCATG		1007-1026				
2d	Murd-F1	GAATACTGCCGTACTCAAGGA	<i>nox</i>	956-976	AF060813	59 °C	260	3
2d	Murd-R1	GAGAAATGCCGTGAATAGCTTCG		1195-1215				
2e	Int1-mod	AGAGTTTGAAGACAATTATGA C	<i>nox</i>	267-288	AF060811	59 °C	453	4
2e	Interm 2004-R2	GACATAACTACCATATCTACT		699-719				3
3a	hlyA1	TCGATGAAATTTAAAGATGTTGTT	<i>hlyA</i>	1021-1043	U94886.2	60 °C	176	5
3a	hlyA2	TTTTTCTTGATCTTCTTGAGGA		1175-1096				
3a	BHlyAneu-for	TCACTGATACAGCTTCTTTTCG	<i>hlyA</i>	1078-1100	U94886.2	60 °C	148	diese Arbeit
3a	BHlyAneu-rev	GTATTTAGCAGCATCAGCTAC		1209-1231				
3b	BhtlyAF	GCAGATCTAAAGCACAGGAT	<i>tlyA</i>	514-533	X61684	60 °C	527	6
3b	BhtlyAR	GCCTTTTGAACATCACCTC		1021-1040				
3c	TlyBfor	TGAAGAGGGAGGGGACTTA	<i>tlyB</i>	1910-1929	X73140	57 °C	613	diese Arbeit
3c	TlyBrev	AGAGCCATCATTAGCATCAACG		2522-2501				
3d	TlyCfor	GGTTGTTGATGAATACGGCGG	<i>tlyC</i>	1216-1236	X73141	60 °C	252	diese Arbeit
3d	TlyCrev	GGAAGCCTGCCCAAGTATGA		1467-1448				

Tabelle 22: Primer und Reaktionsbedingungen für die konventionelle PCR (Fortsetzung)

Nr. der PCR	Primername	Primer-Sequenz (5' -> 3')	Zielgen	Primer-Position im Genom ¹	Genbank-Acc.-Nr.	Annealing-Temperatur	Amplikon (bp)	Referenz ²
3e	hlyneu-for	CGCCYCGTGTGATATGGTA	BHWA1_RS02885	705464-705483	CP001357	57 °C	177	diese Arbeit
3e	hlyneu-rev	TCTTCCGCCGCTTTAACA		705640-705621				
3f	962for	AACTTCTCCCCCTTGCTGTC	BHWA1_RS04705	1122107-1122126	NC_012225	60 °C	355	diese Arbeit
3f	962rev	CTCAGGCGATACAGTTGCCA		1122461-1122422				
3g	ypiQfor	ACAGGAGTATATGTTGGGGCT	BHWA1_RS02195	504092-504112	NC_012225	60 °C	223	diese Arbeit
3g	ypiQrev	CCCATGGCATAGGAGCTTTACT		504314-504293				
3g	ypiQ-R_423	GCTTTGCTTGGTATTGCAGGA	BHWA1_RS02195	n. b.	n. b.	60 °C	208	diese Arbeit
3h	1870for	CCACGCCATCTGTATCCGAA	BHWA1_RS09085	2156514-2156533	NC_012225	60 °C	322	diese Arbeit
3h	1870rev	CGGCAATAGCTGTCTTAGTGC		2156835-2156815				
4, Seq	FabG-1-for	AAAGGTACATATGGACTTAAATC-TTAAAAATAAACAGCT	Promotor hlyA	178-218	U94886	50 °C	1084	diese Arbeit
4, Seq	hlyA-3	CGGAGCTCGAATTCCTTATTTTTTTA-TGTTCTTCAATGTAT		1223-1261		50 °C		diese Arbeit
5a	ftnF	AGCTTGAAAGGATGCAGCAGC	ftnA	173-193	AF465937	54 °C	292	7
5a	ftnR	CTTCTTCTTCAAGCTGTTTC		446-464				

Tabelle 22: Primer und Reaktionsbedingungen für die konventionelle PCR (Fortsetzung)

Nr. der PCR	Primername	Primer-Sequenz (5' -> 3')	Zielgen	Primer-Position im Genom ¹	Genbank-Acc.-Nr.	Annealing-Temperatur	Amplikon (bp)	Referenz ²
5b	BitC-2526	GATATACTTTGGGGCGGAACCTA	<i>bitC</i>	2526-2547	U75349	54 °C	265	8
5b	BitC-2790	AAGAAGATGAAGAGGCAGAAAGGAT		2767-2790				
5c	SmpA forward	AAATGAACAAAAAATTTTCACAC	<i>bhlp 16</i>	119-140	X68401	62 °C	509	5
5c	SmpA reverse	AGCGCTAGCTCCCCAATTTTCTTTAG		576-595				
5d	SmpB1	TTGAAGTAAAAGCTCAAGAT	<i>bhlp 17.6</i>	2413352- 2413333	JXNG010000 52	55 °C	375	5
5d	SmpB2	TGTAAGTAAAGCTCAAGAT		2412998- 2412979				
5e	BmpB58	TGCGGAAATACTTCTTCTGGTG	<i>bhlp 29.7</i>	2033460- 2033481	NC_012225	55 °C	527	9
5e	BmpBR630	AGAACCAGGATTCAAAACCGAAG		2034011- 2034032				
5f	Vsp_for	ACTATTAAGGTACTTTTCGG	<i>bhmp39f</i>	2244-2263	AY027775	55 °C	437	diese Arbeit
5f	Vsp_F	ATACTCACTAGCTCCAGCTC		2671-2690				
5g	bhmp39-for	ATGAAAAAAGTTTTATTGACAGCTA	<i>bhmp39h</i>	5077-5101	AY027775	68 °C	1170	diese Arbeit
5g	bhmp39h-rev	TTGAGCACCCCTAAAGCAGGTAA		6223-6246				
6	16SF	TGCCAGCAGCCGAGGTAA	16S rRNS	384-401	KU215620.1	57 °C	872	10
6	16SR	CCCGRGAACGTATTAC		1255-1239				H. Willems, persönliche Mitteilung
7	gyrB2-for	AATATCTGCGGCACAGGCTAGAGA	<i>gyrB</i>	723455- 723478	NC_012225	55 °C	319	diese Arbeit
7	gyrB2-rev	TGAAGCACCTACACCGCATCCTAA		723750- 723773				

Tabelle 22: Primer und Reaktionsbedingungen für die konventionelle PCR (Fortsetzung)

Nr. der PCR	Primername	Primer-Sequenz (5' -> 3')	Zielgen	Primer-Position im Genom ¹	Genbank-Acc.-Nr.	Annealing-Temperatur	Amplikon (bp)	Referenz ²
8a	ADH_F206	GAAGTTTAGTAAAAGACTTTAAACC	<i>adh</i>	2146578- 2146602	CP001357	50 °C	552	12
8a	ADH-R757	CTGCTTCAGCAAAAGTTTCAAC		2147108- 2147129				
8b	ALP-F354	TCCAGATGAGGCTATACTTC	<i>alp</i>	1452603- 1452622	CP001357	50 °C	909	12
8b	ALP-R1262	TATGCTCTTTTGGCTAATATTG		1453490- 1453511				
8c	EST-F229	GATGCTTCAGCGGAGTTATG	<i>est</i>	1556069- 1556089	CP001357	50 °C	619	12
8c	EST-R847	CCACACTCATAGCATAAACTAGT		1555471- 1555493				
8d	GDH-F514	GGAGTTGGTGCTAGAGAGAT	<i>gdh</i>	159249- 159268	CP001357	50 °C	644	12
8d	GDH-R1157	ATCTCTAAAGCAGAAGTAGCA		158625- 158645				
8e	GLP-F123	AGGCTGGTAGAACATAATGC	<i>glpK</i>	2259726- 2259746	CP001357	50 °C	1035	12
8e	GLP-R1158	TCTTTACTTTTGATAAGCAATAGC		2258712- 2258734				
8f	PGM-R1220	CCGTCTTTATCGCGTACATT	<i>pgm</i>	2591370- 2591391	CP001357	50 °C	1049	12
8f	PGM-F172	GTTGGTACTAACAGAAATGAATA		2590343- 2590362				

Tabelle 22: Primer und Reaktionsbedingungen für die konventionelle PCR (Fortsetzung)

Nr. der PCR	Primername	Primer-Sequenz (5' -> 3')	Zielgen	Primer-Position im Genom ¹	Genbank-Acc.-Nr.	Annealing-Temperatur	Amplikon (bp)	Referenz ²
8g	THI-F163	TGTGTTATACAATCAGCACTTC	<i>thi</i>	1934888- 1934909	CP001357	50 °C	917	12
8g	THI-R1079	GTAGTAAGTATTCTAGCTCCAG		1935783- 1935804				
9a, Seq	Hlys1870-2Fo	CTCCTCCCGTTCAATATGTA	<i>BHWA1_</i> <i>RS09085</i>	2156200- 2156219	NC_012225	58 °C	974	13
9a, Seq	Hlys1870-2Re	AATCCGCCATGTAAAACCTGC		2157154- 2157173				
9b, Seq	tlyAS1Fo	GGTATTGGAGATGAATATAC	<i>tlyA</i>	267034- 267053	NC_012225	58 °C	956	13
9b, Seq	tlyAS1Re	TGATGTAGAAGGCTTCTATA		267970- 267989				
9c, Seq	tlyCMahuFo	TTACGAATGCCTGCTATTTG	<i>tlyC</i>	1644858- 1644877	NC_012225	50 °C	1188	13
9c, Seq	tlyCMahuneu- Re	TACATTTCCCTATGGCGGATA		1646026- 1646045				M. Mahu, persönliche Mitteilung
9d, Seq	HlyCBShlyFo	GGAAAAAGGATCCTGGAAC	<i>BHWA1_</i> <i>RS02885</i>	704725- 704744	NC_012225	54 °C	1570	13
9d, Seq	HlyCBShlyRe	TCCTGCTTGTTCAGCACA		706278- 706297				
9e, Seq	HlysyplQ-1Fo	CTATTGGAGAGCGTACATCT	<i>BHWA1_</i> <i>RS02195</i>	503577- 503596	NC_012225	58 °C	1014	13
9e, Seq	HlysyplQ-2Re	TACCCTGTACCTACAGAACA		504575- 504594				

Tabelle 22: Primer und Reaktionsbedingungen für die konventionelle PCR (Fortsetzung)

Nr. der PCR	Primername	Primer-Sequenz (5' -> 3')	Zielgen	Primer-Position im Genom ¹	Genbank-Acc.-Nr.	Annealing-Temperatur	Amplikon (bp)	Referenz ²
9f, Seq	tlyBS3Fo	GGAGTGGAGAGAAAAGTATTA	<i>tlyB</i>	1414613- 1414632	NC_012225	57 °C	974	13
9f, Seq	tlyBS3Re	TGCGGTAAGCAGACTTATAG		1415566- 1415585				
9f, Seq	tlyBS2Fo	CCCTCTTCATAACCAACATA	<i>tlyB</i>	1415533- 1415552	NC_012225	65 °C	1062	13
9f, Seq	tlyBS2Re	AGGGACTTGCTGAAAAGATA		1416654- 1416673				
9f, Seq	tlyBS1Re	AGCTCTATCTACAGCAATAC	<i>tlyB</i>	1417637- 1417656	NC_012225	54 °C	1082	13
9f, Seq	tlyBS1Fo	TTGTACCAGCAACAACACTGAA		1416575- 1416594				
9f, Seq	tlyBS4Fo	AGCTGTCCTTCTTCAAGTAC	<i>tlyB</i>	1415413- 1415432	NC_012225	63 °C	390	13
9f, Seq	tlyBS4Re	AGTCGTAGGACAGAAAAGAAG		1415783- 1415802				

Seq = Primer zur Sequenzierung der Hämolyse (s. Punkt 3.3.6) oder wenn mit internen Primern (PCR-Nummer 3a-3h) kein Signal generiert wurde; n. b. = nicht bekannt (von Stamm G423 liegt keine Gesamtgenom-Sequenz vor), 1) Die Positionsangaben beziehen sich auf den entsprechenden Eintrag in der NCBI-Datenbank. 2) Referenzen: 1: Herbst et al., 2004; 2: La et al., 2003; 3: Weissenböck et al., 2005; 4: modifiziert nach Phillips et al., 2006; 5: Barth et al., 2012; 6: Rasbäck et al., 2006; 7: Davis et al., 2005; 8: Hue, 2005; 9: La et al., 2005; 10: Chung et al., 2007; 11: Rohde et al., 2002; 12: Råsbäck et al., 2007; 13: Mahu et al., 2016

Tabelle 23: Primer und Reaktionsbedingungen für die Real-Time qPCR

Primernamen	Nukleinsäuresequenz (5' → 3')	Zielgen	Amplikon [bp]	B. hyodysenteriae-	
				Stamm	
				B204	G423
RTPCR-TlyB-Fo	AAGGATTCGATAAGAAGTATGGTGCTA	<i>tlyB</i>	79	+	+
RTPCR-TlyB-Re	TTCGGTACTCACATAATCCTCTATCTCT			+	+
RTPCR-TlyA-Fo	AAAGCGGTTTGTAGAATTTGGAAT	<i>tlyA</i>	131	+	+
RTPCR-TlyA-Re	TGTCCTACATCAAGAGCATAAACTTTTT			+	+
RTPCR-TlyC-Fo	TGCTTGAGCAGATTATAGGTGATATTAGA	<i>tlyC</i>	78	+	+
RTPCR-TlyC-Re	GTTCCATCATCATTGCTCTTTATTTTC			+	+
RTPCR-962-Fo	TGATATTCGGAGAGCTTGACCTAAA	<i>BHWA1_RS04705</i>	72	+	
RTPCR-962-Re	GCTGCAACCACCTTTTGCTATTCT			+	+
RTPCR-yplQ-Fo	TTTACTTGGTATTGCAGGACTTGTTTC	<i>BHWA1_RS02195</i>	127	+	
RTPCR-yplQ-Re	CAGGAAAGAAAATGATATAAAGAGCTAAATG			+	
RTPCR-hly-Fo	CCCGTGTGATATGGTATGTATTGA	<i>BHWA1_RS02885</i>	98	+	+
RTPCR-hly-Re	CCTCATAAACAG GAA ATC TTG AAA GTC			+	
RTPCR-1870-Fo	CATTCCTCCATGCCCTAATATCATTAC	<i>BHWA1_RS09085</i>	103	+	
RTPCR-1870-Re	CGAATACGCTTCTTAATGTGATGC			+	+
RTPCR-HlyA-Fo	TCACTGATACAGCTTCTTTTCGTAGATG	<i>hlyA</i>	113	+	+
RTPCR-HlyA-Re	CTTGATCTTCTTGAGGAATTTTGATTTTC			+	+
RTPCR-gyrB-Fo	GAGACTCTGCAGGCGGTACTG	<i>gyrB</i>	62	+	+
RTPCR-gyrB-Re	GCGGTAATAATAGCTTGGAAATGTC			+	+

Tabelle 23: Primer und Reaktionsbedingungen für die Real-Time qPCR (Fortsetzung)

Primername	Nukleinsäuresequenz (5' -> 3')	Zielgen	Amplikon [bp]	<i>B. hyodysenteriae</i> -Stamm	
				B204	G423
RTPCR_adhF_MLST	AATAGTGTAGAAGCTCAGGCTGGATAT	<i>adh</i>	63	+	+
RTPCR_adhR_MLST	TTTCCATCCGGCAAGCA			+	+
RTPCR423-962F	GATATTCGGAGAGCTTGTGCCT	<i>BHWA1_RS04705</i>	71		+
RTPCR423-hlyR	CCTCATAAACCGGAAATCTTGAAA	<i>BHWA1_RS02885</i>	98		+
RTPCR423-1870F	CATTCCCTCCATGCTTAATATCATTACA	<i>BHWA1_RS09085</i>	103		+
RTPCR423-ypIQF	GCTTGGTATTGCAGGACTTGTTTC	<i>BHWA1_RS02195</i>	116		+
RTPCR423-ypIQR	ATCAGGAAAGAAATGATATAAAGAACTAAATG	<i>BHWA1_RS02195</i>	116		+

+ = Verwendung des Primers beim entsprechenden *B. hyodysenteriae*-Stamm

Tabelle 24: Ähnlichkeiten der Nukleinsäuresequenzen der Hämolyisingene (*in silico*-Analyse) diverser *Brachyspira* spp. zu denen des *B. hyodysenteriae*-Stammes WA1

Spezies Bezeichnung GenBank Acc.-Nr. Sequenztyp (ST) ¹	Hämolyisingene							
	<i>tlyA</i> (723 bp)	<i>tlyB</i> (2487 bp)	<i>tlyC</i> (807 bp)	<i>hlyA</i> (237 bp)	<i>BHWA1_</i> <i>RS04705</i> (1299 bp)	<i>BHWA1_</i> <i>RS09085</i> (672 bp)	<i>BHWA1_</i> <i>RS02195</i> (675 bp)	<i>BHWA1_</i> <i>RS02885</i> (1389 bp)
<i>B. hyodysenteriae</i> G44 NZ_JXNI000000000 ST117	723 bp; 0;	2487 bp; 7;	807 bp; 0;	237 bp; 0;	1299 bp; 8;	672 bp; 1;	675 bp; 15;	1389 bp; 0;
	100 %;	99,72 %;	100 %;	100 %;	99,38 %;	99,85 %;	97,78 %;	100 %;
	417890 –	2339041 –	1992571 –	2773155 –	1688197 –	2391321 –	1176924 –	2190385 –
<i>B. hyodysenteriae</i> B204 NZ_JXND000000000 ST54	418612	2336555	1991765	2772919	1689495	2390650	1177598	2191773
	723 bp; 0;	2487 bp; 8;	807 bp; 0;	237 bp; 0;	1299 bp; 9;	672 bp; 1;	675 bp; 15;	1389; 0;
	100 %;	99,68 %;	100 %;	100 %;	99,31 %;	99,85 %;	97,78 %;	100 %;
<i>B. hyodysenteriae</i> B8044 NZ_JXNG000000000 ST24	2721899 –	716150 –	351439 –	1304113 –	1478839 –	2774360 –	1678415 –	3033822 –
	2721177	713664	352245	1303877	1477541	2775031	1677741	3035210
	723 bp; 0;	2487 bp; 6;	807 bp; 0;	237 bp; 0;	1299 bp; 25;	672 bp; 1;	675 bp; 8;	1389 bp; 1;
<i>B. hyodysenteriae</i> B6933 NZ_JXNE000000000 ST26	100 %;	99,76 %;	100 %;	100 %;	98,08 %;	99,85 %;	98,81 %;	99,93 %;
	2297550 –	2632882 –	2191061 –	590957 –	2441405 –	2049315 –	1475827 –	2813546 –
	2298272	2635368	2190225	590721	2442703	2049986	1476501	2812158
<i>B. hyodysenteriae</i> B78 NZ_JXNF000000000 ST56	723 bp; 0;	2487 bp; 7;	807 bp; 0;	237 bp; 0;	1299 bp; 22;	672 bp; 1;	675 bp; 15;	1389 bp; 9;
	100 %;	99,72 %;	100 %;	100 %;	98,31 %;	99,85 %;	97,78 %;	99,35 %;
	2626980 –	2024993 –	190517 –	2206563 –	1666324 –	2087120 –	1071327 –	2907304 –
<i>B. hyodysenteriae</i> B78 NZ_JXNF000000000 ST56	2626258	2027479	189711	2206799	1667622	2086449	1070653	2905916
	723 bp; 0;	2487 bp; 1;	807 bp; 5;	237 bp; 0;	1299 bp; 16;	672 bp; 1;	675 bp; 14;	1389 bp; 0;
	100 %;	99,96 %;	99,38 %;	100 %;	98,77 %;	99,85 %;	97,93 %;	100 %;
	357847 –	433476 –	1399908 –	3034130 –	1014565 –	843161 –	164575 –	2568808 –
	357125	435962	1399102	3033894	1013267	842490	165249	2567420

Länge des Gens (bp);
bei übereinstimmender Länge: Nukleinsäure-Austausche (n);
bei übereinstimmender Länge: Homologie (%) zu *B. hyodysenteriae* WA1;
Lokalisation des Gens im Genom

Tabelle 24: Ähnlichkeiten der Nukleinsäuresequenzen der Hämolyisingene (*in silico*-Analyse) diverser *Brachyspira* spp. zu denen des *B. hyodysenteriae*-Stammes WA1 (Fortsetzung)

Spezies Bezeichnung GenBank Acc.-Nr. Sequenztyp (ST) ¹	Hämolyisingene							
	<i>tlyA</i> (723 bp)	<i>tlyB</i> (2487 bp)	<i>tlyC</i> (807 bp)	<i>hlyA</i> (237 bp)	<i>BHWA1_</i> <i>RS04705</i> (1299 bp)	<i>BHWA1_</i> <i>RS09085</i> (672 bp)	<i>BHWA1_</i> <i>RS02195</i> (675 bp)	<i>BHWA1_</i> <i>RS02885</i> (1389 bp)
	Länge des Gens (bp);							
	bei übereinstimmender Länge: Nukleinsäure-Austausche (n);							
	bei übereinstimmender Länge: Homologie (%) zu <i>B. hyodysenteriae</i> WA1;							
	Lokalisation des Gens im Genom							
<i>B. hyodysenteriae</i>	723 bp;	2487 bp;	807 bp;	237 bp;	1299 bp;	672 bp;	675 bp;	1389 bp;
Vic2	0;	0;	1;	0;	1;	0;	0;	1;
NZ_JXNR000000000	100 %;	100 %;	99,88 %;	100 %;	99,92 %;	100 %;	100 %;	99,93 %;
ST30	1758209 –	2481270 –	915282 –	230634 –	2971988 –	1941576 –	1567139 –	2857460 –
	1758931	2478784	916088	230398	2970690	1940905	1566465	2856072
<i>B. hyodysenteriae</i>	723 bp;	2487 bp;	807 bp;	237 bp;	1299 bp;	672 bp;	675 bp;	1389 bp;
865	0;	7;	1;	0;	9;	1;	8;	21;
NZ_JXNA000000000	100 %;	99,72 %;	99,88 %;	100 %;	99,31 %;	99,85 %;	98,81 %;	98,49 %;
ST125	1942332 –	2494988 –	548804 –	778012 –	2336882 –	834367 –	949301 –	3001494 –
	1943054	2492502	547998	777776	2335584	833696	948627	3002882
<i>B. hyodysenteriae</i>	723 bp;	2487 bp;	807 bp;	237 bp;	1299 bp;	672 bp;	675 bp;	1389 bp;
FMV89.3323	0;	3;	0;	0;	11;	1;	15;	2;
NZ_JXNB000000000	100 %;	99,88 %;	100 %;	100 %;	99,15 %;	99,85 %;	97,78 %;	99,86 %;
ST4	983002 –	1308911 –	124413 –	2902013 –	674083 –	170134 –	1216197 –	2442209 –
	983724	1306425	123607	2902249	672785	169463	1215523	2440821
<i>B. hyodysenteriae</i> NX	723 bp;	2487 bp;	807 bp;	237 bp;	1299 bp;	672 bp;	675 bp;	1389 bp;
NZ_JXNC000000000	0;	1;	0;	0;	31;	0;	15;	21;
ST4	100 %;	99,96 %;	100 %;	100 %;	97,61 %;	100 %;	97,78 %;	98,49 %;
	2955029 –	2358724 –	1172352 –	1485934 –	916400 –	203053 –	306797 –	2511300 –
	2955751	2361210	1171546	1485698	915102	203724	307471	2509912
<i>B. hyodysenteriae</i>	723 bp;	2487 bp;	807 bp;	237 bp;	1299 bp;	672 bp;	675 bp;	1389 bp;
G21	0;	0;	0;	0;	13;	0;	15;	13;
NZ_JXNH000000000	100 %;	100 %;	100 %;	100 %;	97,61 %;	100 %;	97,78 %;	99,06 %;
ST8	1778319 –	1421281 –	956492 –	469221 –	713203 –	2938835 –	2012323 –	595841 –
	1779041	1418795	957298	468985	711905	2938164	2011649	594453

Tabelle 24: Ähnlichkeiten der Nukleinsäuresequenzen der Hämolsingene (*in silico*-Analyse) diverser *Brachyspira* spp. zu denen des *B. hyodysenteriae*-Stammes WA1 (Fortsetzung)

Spezies Bezeichnung GenBank Acc.-Nr. Sequenztyp (ST) ¹	Hämolsingene							
	<i>tlyA</i> (723 bp)	<i>tlyB</i> (2487 bp)	<i>tlyC</i> (807 bp)	<i>hlyA</i> (237 bp)	<i>BHWA1_</i> <i>RS04705</i> (1299 bp)	<i>BHWA1_</i> <i>RS09085</i> (672 bp)	<i>BHWA1_</i> <i>RS02195</i> (675 bp)	<i>BHWA1_</i> <i>RS02885</i> (1389 bp)
	Länge des Gens (bp);							
	bei übereinstimmender Länge: Nukleinsäure-Austausche (n);							
	bei übereinstimmender Länge: Homologie (%) zu <i>B. hyodysenteriae</i> WA1;							
	Lokalisation des Gens im Genom							
<i>B. hyodysenteriae</i> FM88.9	723 bp; 0;	2487 bp; 1;	807 bp; 1;	237 bp; 0;	1299 bp; 31;	672 bp; 0;	675 bp; 15;	1389 bp; 21;
NZ_JXNJ000000000	100 %; 2907703 – 2906981	99,96 %; 975689 – 978175	99,88 %; 760429 – 761235	100 %; 2359032 – 2359268	97,61 %; 1713956 – 1715254	100 %; 1227020 – 1226349	97,78 %; 1623322 – 1623996	98,49 %; 81608 – 82996
<i>B. hyodysenteriae</i> NSW15	723 bp; 0;	2487 bp; 6;	807 bp; 0;	237 bp; 0;	1299 bp; 2;	672 bp; 1;	675 bp; 6;	1389 bp; 1;
NZ_JXNK000000000	100 %; 2484945 – 2484223	99,76 %; 2009955 – 2007469	100 %; 1757632 – 1756826	100 %; 1534697 – 1534461	99,85 %; 1132990 – 1134288	99,85 %; 1264823 – 1264152	99,11 %; 2094648 – 2095322	99,93 %; 2819366 – 2820754
<i>B. hyodysenteriae</i> NSW5	723 bp; 0;	2487 bp; 1;	807 bp; 0;	237 bp; 0;	1299 bp; 8;	672 bp; 0;	675 bp; 0;	1389 bp; 0;
NZ_JXNL000000000	100 %; 2693265 – 2693987	99,96 %; 780701 – 778215	100 %; 1361766 – 1362572	100 %; 2061859 – 2061623	99,38 %; 2336533 – 2337831	100 %; 1208538 – 1209209	100 %; 2925540 – 2924866	100 %; 1415201 – 1416589
<i>B. hyodysenteriae</i> Q17	723 bp; 0;	2487 bp; 0;	807 bp; 0;	237 bp; 0;	1299 bp; 2;	672 bp; 0;	675 bp; 8;	1389 bp; 0;
NZ_JXNM000000000	100 %; 2820067 – 2819345	100 %; 908463 – 905977	100 %; 30617 – 31423	100 %; 2924110 – 2924346	99,85 %; 2583875 – 2582577	100 %; 1094929 – 1095600	98,81 %; 603295 – 602621	100 %; 3011032 – 3012420
<i>B. hyodysenteriae</i> ST190	723 bp; 0;	2487 bp; 1;	807 bp; 0;	237 bp; 0;	1299; 2;	672 bp; 1;	675 bp; 14;	1389 bp; 0;
NZ_JXNN000000000	100 %; 1012297 – 1013019	99,96 %; 1614632 – 1612146	100 %; 21215 – 20409	100 %; 506376 – 506140	99,85 %; 783164 – 781866	99,85 %; 1965016 – 1964345	97,93 %; 880689 – 880015	100 %; 1546184 – 1544796

Tabelle 24: Ähnlichkeiten der Nukleinsäuresequenzen der Hämolyisingene (*in silico*-Analyse) diverser *Brachyspira* spp. zu denen des *B. hyodysenteriae*-Stammes WA1 (Fortsetzung)

Spezies Bezeichnung GenBank Acc.-Nr. Sequenztyp (ST)'	Hämolyisingene							
	<i>tlyA</i> (723 bp)	<i>tlyB</i> (2487 bp)	<i>tlyC</i> (807 bp)	<i>hlyA</i> (237 bp)	<i>BHWA1</i> <i>RS04705</i> (1299 bp)	<i>BHWA1</i> <i>RS09085</i> (672 bp)	<i>BHWA1</i> <i>RS02195</i> (675 bp)	<i>BHWA1</i> <i>RS02885</i> (1389 bp)
	Länge des Gens (bp); bei übereinstimmender Länge: Nukleinsäure-Austausche (n); bei übereinstimmender Länge: Homologie (%) zu <i>B. hyodysenteriae</i> WA1;							
	Lokalisation des Gens im Genom							
<i>B. hyodysenteriae</i> ST195	723 bp; 1;	2487 bp; 2;	807 bp; 0;	237 bp; 0;	1299 bp; 13;	672 bp; 1;	675 bp; 8;	1389 bp; 14;
NZ_JXNO000000000	99,86 %; 541637 –	99,92 %; 1182297 –	100 %; 850468 –	100 %; 2849773 –	99 %; 717570 –	99,85 %; 1723258 –	98,81 %; 44852 –	98,99 %; 1752378 –
ST128	540915	1184783	849662	2849537	718868	1723929	45526	1753766
<i>B. hyodysenteriae</i> ST210	723 bp; 0;	2487 bp; 4;	807 bp; 1;	237 bp; 0;	1299 bp; 10;	672 bp; 1;	675 bp; 14;	1389 bp; 0;
NZ_JXNP000000000	100 %; 917216 –	99,84 %; 328535 –	99,88 %; 294938 –	100 %; 1648140 –	99,23 %; 494262 –	99,85 %; 2779600 –	97,93 %; 684210 –	100 %; 2310308 –
ST129	916404	326049	295744	1648 376	492964	2780271	684884	2308920
<i>B. hyodysenteriae</i> ST265	723 bp; 0;	2487 bp; 0;	807 bp; 0;	237 bp; 0;	1299 bp; 1;	672 bp; 0;	675 bp; 9;	1389 bp; 0;
NZ_JXNQ000000000	100 %; 199381 –	100 %; 782471 –	100 %; 1673944 –	100 %; 3081584 –	99,92 %; 235713 –	100 %; 809213 –	98,67 %; 1483318 –	100 %; 2833882 –
n. b.	198659	784957	1673138	3081348	237011	809884	1482644	2835270
<i>B. hyodysenteriae</i> WA100	723 bp; 0;	2487 bp; 3;	807 bp; 0;	237 bp; 0;	1299 bp; 11;	672 bp; 1;	675 bp; 15;	1389 bp; 2;
NZ_JXNS000000000	100 %; 980719 –	99,88 %; 1633448 –	100 %; 679381 –	100 %; 1767538 –	99,15 %; 1113681 –	99,85 %; 809835 –	97,78 %; 1238739 –	99,86 %; 2147291 –
ST130	981441	1635934	680187	1767302	1114979	809164	1239413	2145903
<i>B. suanatina</i> AN4859/03	723 bp; 73;	2487 bp; 119;	807 bp; 56;	237 bp; 1;	1296 bp; 1;	672 bp; 40;	675 bp; 60;	1392 bp; 60;
NZ_CVLB000000000	89,9 %; 1077279 –	95,22 %; 2260832 –	93,06 %; 2526229 –	99,58 %; 772154 –	94,05 %; 1949394 –	91,11 %; 3090590 –	91,11 %; 1310654 –	1203290 –
	1078001	2258346	2525423	771918	1948099	3089919	1309980	1201899

Tabelle 24: Ähnlichkeiten der Nukleinsäuresequenzen der Hämolsyngene (in silico-Analyse) diverser *Brachyspira* spp. zu denen des *B. hyodysenteriae*-Stammes WA1 (Fortsetzung)

Spezies Bezeichnung GenBank Acc.-Nr. Sequenztyp (ST) ¹	Hämolsyngene							
	<i>tlyA</i> (723 bp)	<i>tlyB</i> (2487 bp)	<i>tlyC</i> (807 bp)	<i>hlyA</i> (237 bp)	<i>BHWA1</i> <i>RS04705</i> (1299 bp)	<i>BHWA1</i> <i>RS09085</i> (672 bp)	<i>BHWA1</i> <i>RS02195</i> (675 bp)	<i>BHWA1</i> <i>RS02885</i> (1389 bp)
	Länge des Gens (bp);							
	bei übereinstimmender Länge: Nukleinsäure-Austausche (n);							
	bei übereinstimmender Länge: Homologie (%) zu <i>B. hyodysenteriae</i> WA1;							
	Lokalisation des Gens im Genom							
<i>B. innocens</i> ATCC 29796 NZ_ARQ1000000000	723 bp; 123; 82,99 %; 1262822 – 1263544	2487 bp; 286; 88,5 %; 2046884 – 2044398	831 bp; 1123252 – 1124082	237 bp; 12; 94,94 %; 331799 – 331563	1284 bp; 134; 80,06 %; 1420819 – 1422102	672 bp; 134; 80,06 %; 58751 – 58080	693 bp; 1709131 – 1708452	1401 bp; 1721911 – 1720511
<i>B. intermedia</i> PWS/A NC_017243	723 bp; 73; 89,9 %; 1356142 – 135684	2487 bp; 147; 94,09 %; 694966 – 697452	678 bp; 678 bp; 459426 – 460103	0; 100 %; 978565 – 978329	1299 bp; 76; 94,15 %; 2287627 – 2286329	672 bp; 48; 92,86 %; 160811 – 160140	675 bp; 69; 89,78 %; 1606018 – 1605344	1389 bp; 114; 91,79 %; 1378001 – 1376613
<i>B. murdochii</i> DSM 12563 NC_014150	723 bp; 124; 82,85 %; 3144321 – 3145043	2487 bp; 274; 88,98 %; 1025535 – 1025049	822 bp; 822 bp; 1930132 – 1930953	237 bp; 11; 95,36 %; 3025487 – 3025251	1299 bp; 220; 83,06 %; 844713 – 843415	672 bp; 126; 81,25 %; 1402127 – 1401456	693 bp; 49737 – 50429	1404 bp; 36797 – 35394
<i>B. pilosicoli</i> WesB NC_018604	723 bp; 131; 81,88 %; 1443149 – 1442427	2505 bp; 14; 94,09 %; 686964 – 689468	852 bp; 852 bp; 80773 – 81624	237 bp; 14; 94,09 %; 2039367 – 2039131	1272 bp; 1272 bp; 1345002 – 1343731	657 bp; 657 bp; 2451699 – 2451043	663 bp; 663 bp; 1906062 – 1906724	1383 bp; 1383 bp; 1959989 – 1961371
<i>B. pilosicoli</i> 95/1000 NC_014330	723 bp; 132; 81,74 %; 133327 – 134049	2505 bp; 14; 94,09 %; 1966286 – 1968790	852 bp; 852 bp; 1415328 – 1416179	237 bp; 14; 94,09 %; 593213 – 592977	1272 bp; 1272 bp; 2426924 – 2425653	657 bp; 657 bp; 995411 – 994755	663 bp; 663 bp; 474469 – 475131	1383 bp; 1383 bp; 524879 – 526261

Tabelle 24: Ähnlichkeiten der Nukleinsäuresequenzen der Hämolsyngene (*in silico*-Analyse) diverser *Brachyspira* spp. zu denen des *B. hyodysenteriae*-Stammes WA1 (Fortsetzung)

Spezies Bezeichnung GenBank Acc.-Nr. Sequenztyp (ST) ¹	Hämolsyngene							
	<i>tlyA</i> (723 bp)	<i>tlyB</i> (2487 bp)	<i>tlyC</i> (807 bp)	<i>hlyA</i> (237 bp)	<i>BHWA1</i> <i>RS04705</i> (1299 bp)	<i>BHWA1</i> <i>RS09085</i> (672 bp)	<i>BHWA1</i> <i>RS02195</i> (675 bp)	<i>BHWA1</i> <i>RS02885</i> (1389 bp)
<i>B. pilosicoli</i> 2904 NC_018607	723 bp; 132; 81,74 %;	2505 bp;	696 bp;	237 bp; 14; 94,09 %;	1272 bp;	657 bp;	663 bp;	1383 bp;
	1463918 – 1464640	605113 – 607617	72231 – 72926	853586 – 853822	1150676 – 1149405	461348 – 462004	991736 – 991074	940170 – 938788
	723 bp; 134; 81,47 %;	2505 bp;	852 bp;	237 bp; 14; 94,09 %;	1272 bp;	657 bp;	663 bp;	1383 bp;
<i>B. pilosicoli</i> P43/6/78 NC_019908	524502 – 523780	1302631 – 1300127	1814483 – 1813632	71219 – 71455	853268 – 854539	2221939 – 2222595	190215 – 189553	139886 – 138504
	723 bp; 87; 87,97 %;	2487 bp; 218; 91,23 %;	828 bp;	237 bp; 3; 98,73 %;	1299 bp; 115; 91,15 %;	672 bp; 83; 87,65 %;	675 bp; 80; 88,15 %;	1389 bp; 123; 91,14 %;
	2697139 – 2697861	858715 – 861201	668911 – 669738	1754946 – 1754710	1870449 – 1871747	245107 – 245778	2311013 – 2310339	2217974 – 2216586
<i>B. hampsonii</i> 30446 NZ_ALNZ000000000	723 bp; 64; 91,15 %;	2487 bp; 200; 91,96 %;	819 bp;	237 bp; 1; 99,58 %;	1293 bp;	669 bp;	428 + 135 bp;	1389 bp; 123; 91,14 %;
	2549264 – 2548542	902086 – 904572	73731 – 74549	349278 – 349042	2878708 – 2877416	1122079 – 1122747	1211556 – 1211129 + 1781918 – 1782052	131005 – 129617

¹Angabe des STs nur bei *B. hyodysenteriae*; n. b. = nicht bestimmt

Tabelle 25: Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenzen der Hämolsyline (*in silico*-Analyse) diverser *Brachyspira* spp. zu denen des *B. hyodysenteriae*-Stammes WA1

Spezies Bezeichnung GenBank Access- sion-Nummer	Hämolsyline							
	TlyA (240 AS)	TlyB (828 AS)	TlyC (268 AS)	HlyA (78 AS)	BHWA1_ RS04705 (432 AS)	BHWA1_ RS09085 (223 AS)	BHWA1_ RS02195 (224 AS)	BHWA1_ RS02885 (462 AS)
	Länge des Proteins (AS); bei übereinstimmender Länge: Aminosäure-Austausche (n); bei übereinstimmender Länge Homologie (%) zu <i>B. hyodysenteriae</i> WA1;							
<i>B. hyodysenteriae</i> G44	240 AS; 0;	828 AS; 0;	268 AS; 0;	78 AS; 0;	432 AS; 1;	223 AS; 0;	224 AS; 5;	462 AS; 0;
NZ_JXNI000000000	100 %	100 %	100 %	100 %	99,77 %	100 %	97,77 %	100 %
<i>B. hyodysenteriae</i> B204	240 AS; 0;	828 AS; 1;	268 AS; 0;	78 AS; 0;	432 AS; 1;	223 AS; 0;	224 AS; 6;	462 AS; 0;
NZ_JXND000000000	100 %	99,88 %	100 %	100 %	99,77 %	100 %	97,32 %	100 %
<i>B. hyodysenteriae</i> B8044	240 AS; 0;	828 AS; 1;	268 AS; 0;	78 AS; 0;	432 AS; 4;	223 AS; 0;	224 AS; 4;	462 AS; 0;
NZ_JXNG000000000	100 %	99,88 %	100 %	100 %	99,07 %	100 %	98,21 %	100 %
<i>B. hyodysenteriae</i> B6933	240 AS; 0;	828 AS; 0;	268 AS; 0;	78 AS; 0;	432 AS; 3;	223 AS; 0;	224 AS; 6;	462 AS; 2;
NZ_JXNE000000000	100 %	100 %	100 %	100 %	99,31 %	100 %	97,32 %	99,57 %
<i>B. hyodysenteriae</i> B78	240 AS; 0;	828 AS; 0;	268 AS; 0;	78 AS; 0;	432 AS; 1;	223 AS; 1;	224 AS; 6;	462 AS; 0;
NZ_JXNF000000000	100 %	100 %	100 %	100 %	99,77 %	99,55 %	97,32 %	100 %
<i>B. hyodysenteriae</i> Vic2	240 AS; 0;	828 AS; 0;	268 AS; 0;	78 AS; 0;	432 AS; 1;	223 AS; 0;	224 AS; 0;	462 AS; 1;
NZ_JXNR000000000	100 %	100 %	100 %	100 %	99,77 %	100 %	100 %	99,78 %
<i>B. hyodysenteriae</i> 865	240 AS; 0;	828 AS; 0;	268 AS; 0;	78 AS; 0;	432 AS; 2;	223 AS; 0;	224 AS; 4;	462 AS; 0;
NZ_JXNA000000000	100 %	100 %	100 %	100 %	99,77 %	100 %	98,21 %	100 %
<i>B. hyodysenteriae</i> FMV89.3323	240 AS; 0;	828 AS; 0;	268 AS; 0;	78 AS; 0;	432 AS; 2;	223 AS; 0;	224 AS; 5;	462 AS; 1;
NZ_JXNB000000000	100 %	100 %	100 %	100 %	99,54 %	100 %	97,77 %	99,78 %
<i>B. hyodysenteriae</i> NX	240 AS; 0;	828 AS; 0;	268 AS; 0;	78 AS; 0;	432 AS; 3;	223 AS; 0;	224 AS; 5;	462 AS; 0;
NZ_JXNC000000000	100 %	100 %	100 %	100 %	99,31 %	100 %	97,77 %	100 %

Tabelle 25: Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenzen der Hämolsyline (*in silico*-Analyse) diverser *Brachyspira* spp. zu denen des *B. hyodysenteriae*-Stammes WA1 (Fortsetzung)

Spezies Bezeichnung GenBank Access- sion-Nummer	Hämolsyline							
	TlyA (240 AS)	TlyB (828 AS)	TlyC (268 AS)	HlyA (78 AS)	BHWA1_ RS04705 (432 AS)	BHWA1_ RS09085 (223 AS)	BHWA1_ RS02195 (224 AS)	BHWA1_ RS02885 (462 AS)
	Länge des Proteins (AS); bei übereinstimmender Länge: Aminosäure-Austausche (n); bei übereinstimmender Länge Homologie (%) zu <i>B. hyodysenteriae</i> WA1;							
<i>B. hyodysenteriae</i>	240 AS;	828 AS;	268 AS;	78 AS;	432 AS;	223 AS;	224 AS;	462 AS;
G21	0;	0;	0;	0;	3;	0;	5;	0;
NZ_JXNH000000000	100 %	100 %	100 %	100 %	99,31 %	100 %	97,77 %	100 %
<i>B. hyodysenteriae</i>	240 AS;	828 AS;	268 AS;	78 AS;	432 AS;	223 AS;	224 AS;	462 AS;
FM88.9	0;	0;	0;	0;	3;	0;	5;	0;
NZ_JXNJ000000000	100 %	100 %	100 %	100 %	99,31 %	100 %	97,77 %	100 %
<i>B. hyodysenteriae</i>	240 AS;	828 AS;	268 AS;	78 AS;	432 AS;	223 AS;	224 AS;	462 AS;
NSW15	0;	0;	0;	0;	2;	0;	3;	1;
NZ_JXNK000000000	100 %	100 %	100 %	100 %	99,54 %	100 %	98,66 %	99,78 %
<i>B. hyodysenteriae</i>	240 AS;	828 AS;	268 AS;	78 AS;	432 AS;	223 AS;	224 AS;	462 AS;
NSW5	0;	1;	0;	0;	1;	0;	0;	0;
NZ_JXNL000000000	100 %	99,88 %	100 %	100 %	99,77 %	100 %	100 %	100 %
<i>B. hyodysenteriae</i>	240 AS;	828 AS;	268 AS;	78 AS;	432 AS;	223 AS;	224 AS;	462 AS;
Q17	0;	0;	0;	0;	1;	0;	4;	0;
NZ_JXNM000000000	100 %	100 %	100 %	100 %	99,77 %	100 %	98,21 %	100 %
<i>B. hyodysenteriae</i>	240 AS;	828 AS;	268 AS;	78 AS;	432 AS;	223 AS;	224 AS;	462 AS;
ST190	0;	0;	0;	0;	2;	0;	5;	0;
NZ_JXNN000000000	100 %	100 %	100 %	100 %	99,54 %	100 %	97,77 %	100 %
<i>B. hyodysenteriae</i>	240 AS;	828 AS;	268 AS;	78 AS;	432 AS;	223 AS;	224 AS;	462 AS;
ST195	0;	0;	0;	0;	3;	0;	4;	0;
NZ_JXNO000000000	100 %	100 %	100 %	100 %	99,31 %	100 %	98,21 %	100 %
<i>B. hyodysenteriae</i>	240 AS;	828 AS;	268 AS;	78 AS;	432 AS;	223 AS;	224 AS;	462 AS;
ST210	0;	0;	1;	0;	2;	0;	5;	0;
NZ_JXNP000000000	100 %	100 %	99,63 %	100 %	99,54 %	100 %	97,77 %	100 %
<i>B. hyodysenteriae</i>	240 AS;	828 AS;	268 AS;	78 AS;	432 AS;	223 AS;	224 AS;	462 AS;
ST265	0;	0;	0;	0;	1;	0;	4;	0;
NZ_JXNQ000000000	100 %	100 %	100 %	100 %	99,77 %	100 %	98,21 %	100 %

Tabelle 25: Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenzen der Hämolyse (*in silico*-Analyse) diverser *Brachyspira* spp. zu denen des *B. hyodysenteriae*-Stammes WA1 (Fortsetzung)

Spezies Bezeichnung GenBank Accession- nummer	Hämolyse							
	TlyA (240 AS)	TlyB (828 AS)	TlyC (268 AS)	HlyA (78 AS)	BHWA1_ RS04705 (432 AS)	BHWA1_ RS09085 (223 AS)	BHWA1_ RS02195 (224 AS)	BHWA1_ RS02885 (462 AS)
<i>B. hyodysenteriae</i>	240 AS;	828 AS;	268 AS;	78 AS;	432 AS;	223 AS;	224 AS;	462 AS;
WA100	0;	0;	0;	0;	2;	0;	5;	1;
NZ_JXNS000000000	100 %	100 %	100 %	100 %	99,54 %	100 %	97,77 %	99,78 %
<i>B. suanatina</i>	240 AS;	828 AS;	268 AS;	78 AS;	431 AS	223 AS;	224 AS;	463 AS
AN4859/03	21;	10;	7;	0;	2;	2;	8;	8;
NZ_CVLB000000000	87,08 %	98,79 %	97,39 %	100 %	99,10 %	99,10 %	96,43 %	96,43 %
<i>B. innocens</i>	240 AS;	828 AS;	276 AS	78 AS;	427 AS	223 AS;	230 AS	466 AS
ATCC 29796	31;	34;	1;	1;	30;	30;	224 AS;	462 AS;
NZ_ARQI000000000	82,99 %	95,89 %	225 AS	98,72 %	86,55 %	223 AS;	224 AS;	462 AS;
<i>B. intermedia</i>	240 AS;	828 AS;	225 AS	78 AS;	432 AS;	223 AS;	224 AS;	462 AS;
PWS/A	20;	14;	0;	0;	15;	2;	10;	13;
NC_017243	91,67 %	98,31 %	273 AS	100 %	96,53 %	99,1 %	95,54 %	97,19 %
<i>B. murdochii</i>	240 AS;	828 AS;	273 AS	78 AS;	432 AS;	223 AS;	230 AS	467 AS
DSM 12563	34;	36;	1;	1;	54;	28;	230 AS	467 AS
NC_014150	85,83 %	95,65 %	283 AS	98,72 %	87,5 %	87,44 %	220 AS	460 AS
<i>B. pilosicoli</i>	240 AS;	834 AS	283 AS	78 AS;	423 AS	218 AS	220 AS	460 AS
WesB	37;	37;	2;	2;	423 AS	218 AS	220 AS	460 AS
NC_018604	84,58 %	834 AS	283 AS	97,44 %	423 AS	218 AS	220 AS	460 AS
<i>B. pilosicoli</i>	240 AS;	834 AS	283 AS	78 AS;	423 AS	218 AS	220 AS	460 AS
95/1000	37;	37;	2;	2;	423 AS	218 AS	220 AS	460 AS
NC_014330	84,58 %	834 AS	231 AS	97,44 %	423 AS	218 AS	220 AS	460 AS
<i>B. pilosicoli</i>	240 AS;	834 AS	231 AS	78 AS;	423 AS	218 AS	220 AS	460 AS
2904	36;	36;	2;	2;	423 AS	218 AS	220 AS	460 AS
NC_018607	85 %	834 AS	283 AS	97,44 %	423 AS	218 AS	220 AS	460 AS
<i>B. pilosicoli</i>	240 AS;	834 AS	283 AS	78 AS;	423 AS	218 AS	220 AS	460 AS
P43/678	37;	37;	2;	2;	423 AS	218 AS	220 AS	460 AS
NC_019908	84,58 %	834 AS	283 AS	97,44 %	423 AS	218 AS	220 AS	460 AS

Tabelle 25: Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenzen der Hämolsyline (*in silico*-Analyse) diverser *Brachyospira* spp. zu denen des *B. hyodysenteriae*-Stammes WA1 (Fortsetzung)

Spezies Bezeichnung GenBank Accession- nummer	Hämolsyline							
	TlyA (240 AS)	TlyB (828 AS)	TlyC (268 AS)	HlyA (78 AS)	BHWA1_ RS04705 (432 AS)	BHWA1_ RS09085 (223 AS)	BHWA1_ RS02195 (224 AS)	BHWA1_ RS02885 (462 AS)
<i>B. hamptonii</i> 30446	240 AS; 19;	828 AS; 26;	275 AS	78 AS; 0;	432 AS; 36;	223 AS; 14;	224 AS; 20;	462 AS; 21;
NZ_ALNZ000000000	92,08 %	96,86 %		100 %	91,67 %	93,72 %	91,07 %	95,45 %
<i>B. hamptonii</i> 30599	240 AS; 13;	828 AS; 21;	272 AS	78 AS; 0;	430 AS	222 AS	142 + 45 AS	462 AS; 23;
NZ_AOMM000000000	94,58 %	97,46 %		100 %				95,02 %

Länge des Proteins (AS);
bei übereinstimmender Länge: Aminosäure-Austausche (n);
bei übereinstimmender Länge Homologie (%) zu *B. hyodysenteriae* WA1;

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hämolyse-Spotttest.....	42
Abbildung 2: Agarosegel (2 %) mit den Amplifikationsprodukten der sieben für die MLST verwendeten "Housekeeping"-Gene von <i>B. hyodysenteriae</i> B204 (Ethidiumbromid gefärbt) 53	53
Abbildung 3: eBURST-Analyse basierend auf den Allelprofilen der Sequenztypen von 127 in dieser Arbeit untersuchten und 619 öffentlich zugänglichen globalen <i>B. hyodysenteriae</i> -Stämmen.....	56
Abbildung 4: Minimum Spanning Trees basierend auf den Allelprofilen von 746 <i>B. hyodysenteriae</i> -Stämmen (n = 741 Schwein, n = 5 Mäuse und Vögel) unter Berücksichtigung der geographischen (A) und temporären Verteilung (B).....	57
Abbildung 5: Elektrophoretische Darstellung der mittels PCR generierten acht Hämolysefragmente von <i>B. hyodysenteriae</i> B204 (2 %-iges Agarosegel, Ethidiumbromid gefärbt).....	59
Abbildung 6: Nukleinsäuresequenz-„Alignment“ der intergenischen Bereiche zwischen dem <i>fabG</i> und dem <i>hlyA</i> des Referenzstammes <i>B. hyodysenteriae</i> B204 (GenBank Accession-Nr. U94886, Position 939-1010) und des schwach hämolysierenden <i>B. hyodysenteriae</i> -Feldstammes G423.	63
Abbildung 7: Neighbour-Joining Tree (NJT) des Hämolysegens <i>BHWA1_RS02195</i> (<i>hemolysin III</i> , <i>ypIQ</i>) und der konkatenierten Nukleinsäuresequenz der sieben MLST-Gene	72
Abbildung 8: Neighbour-Joining Tree (NJT) des Hämolysegens <i>BHWA1_RS02885</i> (<i>hly</i>) und der konkatenierten Nukleinsäuresequenz der sieben MLST-Gene	73
Abbildung 9: Lebendkeimzahl und hämolytische Aktivität der Zellkulturüberstände des stark hämolysierenden <i>B. hyodysenteriae</i> -Stammes B204 während der Vermehrung in BHIF (Dreifachansatz).....	75
Abbildung 10: Lebendkeimzahl und hämolytische Aktivität der Zellkulturüberstände des schwach hämolysierenden <i>B. hyodysenteriae</i> -Stammes G423 während der Vermehrung in BHIF (Dreifachansatz).....	75
Abbildung 11: Auf die Ergebnisse der Referenzgene normalisierte Ct-Werte (arithmetische Mittelwerte aus drei Versuchen) der Hämolysegen mRNA qPCRs des schwach hämolysierenden <i>B. hyodysenteriae</i> -Stammes G423 zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Vermehrung in Bouillon	78
Abbildung 12: Auf die Ergebnisse der Referenzgene normalisierte Ct-Werte (arithmetische Mittelwerte aus drei Versuchen) der Hämolysegen mRNA qPCRs des stark hämolysierenden <i>B. hyodysenteriae</i> -Stammes B204 zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Vermehrung in Bouillon	79

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 13: Differenzierung des Hämolysetyps mittels Hämolysin-Diffusionstest.....	80
Abbildung 14: Differenzierung des Hämolysetyps von <i>Brachyspira</i> spp. während der Vermehrung auf Nährmedien mit 5 % Schafblut.....	81
Abbildung 15: Temperaturstabilität der Hämolsine von <i>B. innocens</i> 2933-2.....	82
Abbildung 16: Hämolytische Aktivität der Hämolsine stark und schwach hämolysierender <i>Brachyspira</i> spp. bei verschiedenen Temperaturen.....	84
Abbildung 17: Hämolysinfreisetzung von <i>B. hyodysenteriae</i> B204 im Verhältnis zur Entwicklung der Lebendkeimzahl in Bouillon.....	86
Abbildung 18: Hämolysinfreisetzung von <i>B. innocens</i> 2933-2 im Verhältnis zur Entwicklung der Lebendkeimzahl in Bouillon.....	86
Abbildung 19: Hämolysinfreisetzung von <i>B. hampsonii</i> 5364-4x/12 im Verhältnis zur Entwicklung der Lebendkeimzahl in Bouillon.....	87
Abbildung 20: Vergleichende Untersuchung zur zeitlichen Entwicklung der starken bzw. schwachen Hämolyse im Hämolysin-Diffusionstest bei 37 °C.....	88
Abbildung 21: Hemmung der Hämolyse stark hämolysierender <i>Brachyspira</i> spp. durch das nicht hämolysierende Kulturfiltrat H68 aus der stationären Vermehrungsphase von <i>B. hyodysenteriae</i> B204.....	89
Abbildung 22: Doppeldiffusionstest mit den Hämolysinpräparationen H44 und H68 von <i>B. hyodysenteriae</i> B204 und Darstellung der Einschränkung der hämolytischen Zone.....	89
Abbildung 23: Darstellung des von <i>S. aureus</i> präparierten β -Hämolsins im Diffusionstest auf einem TSA ^{CVSSR} -Nährboden.....	91
Abbildung 24: Modifizierter CAMP-Test unter Verwendung der Hämolysinpräparationen stark (A) und schwach hämolysierender (B) <i>Brachyspira</i> spp. sowie eines löslichen β -Hämolsins (β) von <i>S. aureus</i>	92
Abbildung 25: Zytotoxischer Effekt in CrFK-Zellen durch zytotoxische Kulturfiltrate von <i>Brachyspira</i> spp. (B) im Vergleich zur unbeimpften Kontrollkultur (A).....	94
Abbildung 26: Nachweis Hämolysin-inhibierender Antikörper in Schweineseren (n = 32) vor und nach experimenteller Infektion mit stark hämolysierenden <i>B. hyodysenteriae</i> -Stämmen (n = 6) im Hämolysin-Inhibitions-Test (HIT).....	103
Abbildung 27: Nachweis Hämolysin-inhibierender Antikörper in Kaninchenseren (n = 25) vor und nach Vakzination mit Ganzzelllysaten stark hämolysierender <i>B. hyodysenteriae</i> -Stämme (n = 18) im Hämolysin-Inhibitions-Test (HIT).....	103

11. Tabellen

Tabelle 1: Charakteristische Merkmale der acht bei <i>B. hyodysenteriae</i> WA1 beschriebenen Hämolsine	21
Tabelle 2: Reaktionsbedingungen der in dieser Arbeit durchgeführten PCRs.....	36
Tabelle 3: Nachgewiesene MLST-Gen-Allele bei <i>B. hyodysenteriae</i> -Feldstämmen.....	53
Tabelle 4: Multilokus-Sequenztypen von 127 <i>B. hyodysenteriae</i> -Feldstämmen aus unterschiedlichen Herkunftsländern.....	55
Tabelle 5: Hämolsingenmuster bei stark und schwach hämolysierenden <i>Brachyspira</i> spp. 60	
Tabelle 6: Mutationen in den Hämolsingenen bzw. Hämolsinen von 32 <i>B. hyodysenteriae</i> -Stämmen im Vergleich zum <i>B. hyodysenteriae</i> -Referenzstamm WA1.....	61
Tabelle 7: Ergebnisse der <i>in silico</i> -Analyse der acht Hämolsingene bei verschiedenen <i>Brachyspira</i> spp.	66
Tabelle 8: Ergebnisse der <i>in silico</i> -Analyse der acht Hämolsine bei verschiedenen <i>Brachyspira</i> spp.	67
Tabelle 9: Verteilungsmuster der Hämolsingene sowie weiterer Virulenz- und putativer Fitnessgene in 116 <i>B. hyodysenteriae</i> -Feldstämmen	69
Tabelle 10: Nachweis einer Korrelation zwischen den MLST-Genen und den Hämolsingenen im Mantel-Test.....	71
Tabelle 11: Temperaturstabilität der präparierten Hämolsine.....	82
Tabelle 12: Hemmung der Aktivität der Hämolsine verschiedener <i>Brachyspira</i> spp. durch Osmoprotektoren nach einer 1-stündigen (stark hämolysierende Spezies) bzw. 20-stündigen (schwach hämolysierende Spezies) Inkubation bei 37 °C.....	90
Tabelle 13: Hämolytische und zytotoxische Aktivität von Kulturfiltraten während der Vermehrung von <i>B. hyodysenteriae</i> -Stamm B204 verschiedener Passagen in Bouillon mit und ohne Zusatz von Antibiotika unter Verwendung der Zellkulturlinie CrFK.....	95
Tabelle 14: Hämolytische und zytotoxische Aktivität von Kulturfiltraten während der Vermehrung diverser <i>B. hyodysenteriae</i> -Stämme in Bouillon unter Zusatz von Antibiotika und Verwendung der Zellkulturlinie CrFK	97
Tabelle 15: Hämolytische und zytotoxische Aktivität von Kulturfiltraten während der Vermehrung von <i>B. hyodysenteriae</i> -Stamm B204 verschiedener Passagen in Bouillon unter Einfluss verschiedener Milieufaktoren (Modifikationen) und dem Zusatz von Antibiotika und Verwendung der Zellkulturlinie CrFK	98
Tabelle 16: Übersicht über die verwendeten <i>B. hyodysenteriae</i> -Stämme bei den Infektions- bzw. Impfversuchen mit Schweinen/Kaninchen	102

11 Tabellen

Tabelle 17: Verwendete Puffer, Medien und Gebrauchslösungen	157
Tabelle 18: Charakteristika der verwendeten Kontrollstämme (n =18), Feldstämme (n = 221) sowie Gesamtgenom-sequenzierte (n = 31) <i>Brachyspira</i> spp. isoliert vom Schwein*	159
Tabelle 19: Lebendkeimzahl und hämolytische Aktivität der während der Vermehrung von <i>B. hyodysenteriae</i> B204 und G423 in Bouillon entnommenen Proben zur Bestimmung der Hämolysingen-Transkriptionsaktivität	168
Tabelle 20: Hämolysin-inhibierende Antikörper in Schweineseren vor und nach experimenteller Infektion mit <i>B. hyodysenteriae</i> im Hämolysin-Inhibitionstest.....	170
Tabelle 21: Hämolysin-inhibierende Antikörper in Kaninchenseren vor und nach Vakzination mit Ganzzelllysaten von <i>B. hyodysenteriae</i> im Hämolysin-Inhibitionstest	173
Tabelle 22: Primer und Reaktionsbedingungen für die konventionelle PCR	175
Tabelle 23: Primer und Reaktionsbedingungen für die Real-Time qPCR.....	181
Tabelle 24: Ähnlichkeiten der Nukleinsäuresequenzen der Hämolysingene (<i>in silico</i> -Analyse) diverser <i>Brachyspira</i> spp. zu denen des <i>B. hyodysenteriae</i> -Stammes WA1	183
Tabelle 25: Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenzen der Hämolysine (<i>in silico</i> -Analyse) diverser <i>Brachyspira</i> spp. zu denen des <i>B. hyodysenteriae</i> -Stammes WA1	189

12. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

An erster Stelle gilt mein Dank Frau Prof. Dr. habil. Christa Ewers für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und aller benötigten Mittel für die Erstellung dieser Arbeit. Außerdem bedanke ich mich für die konstruktive Zusammenarbeit, die Hilfe beim Beibehalten eines „roten Fadens“ in Vorträgen, die gute Betreuung und die sehr schnelle Korrektur von Vorträgen, Manuskripten sowie der vorliegenden Dissertationsschrift.

Meinem Betreuer Dr. Werner Herbst möchte ich für die vielen konstruktiven Gespräche, für die er sich auch im Ruhestand noch Zeit nahm, seine Geduld, die gute Betreuung und die Korrektur von Vorträgen, Publikationen und der Dissertationsschrift.

Weiterer Dank gilt auch meiner Arbeitsgruppe: Regina Weil, Jörg Heuser und Adelheid Heß, denen ich eine schnelle und gute Einarbeitung ins Labor zu verdanken habe und die mir Tipps und Tricks der Labordiagnostik verraten haben. Besonders bedanken möchte mich bei Regina, für die vielen lieben Worte und Gespräche auch außerhalb der Arbeitszeiten.

Auch bei Herrn Prof. Dr. Willems und seinen Mitarbeitern aus dem Labor der Klinik für Schweine möchte ich mich recht herzlich für die Einweisung in die Real-Time qPCR bedanken. Besonderer Dank gilt dabei Herrn Prof. Dr. Willems, der mir bezüglich der Auswahl der Gene und der Auswertung der Real-Time qPCR-Daten stets gut gelaunt mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ein herzlicher Dank geht auch an die Doktoranden des Instituts für die Hilfsbereitschaft und die motivierenden Worte. Gleiches gilt auch für die übrigen Mitarbeiter/innen des Instituts, die versucht haben mir den Umgang mit den unterschiedlichsten Programmen zu erleichtern.

Nach Fertigstellung des praktischen Teils dieser Arbeit wechselte ich in die Klinik für Wiederkäuer der Justus-Liebig-Universität Gießen und wurde Mitglied in einem fantastischen Team, mit dem ich viele schöne Momente geteilt habe. Vielen Dank für die schöne Zeit!

Letztlich möchte ich mich noch bei meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Freund bedanken, für die es eine Selbstverständlichkeit war mich auch während der Doktorarbeit zu unterstützen und die immer an mich geglaubt haben. Ohne euch wäre ich heute nicht da, wo ich jetzt bin. Danke!

Zu guter Letzt gilt mein Dank auch der Akademie für Tiergesundheit, die mich in 19 Monaten während der Erstellung dieser Arbeit finanziell unterstützt hat.

13 Schriftliche Erklärung

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

Jessica Jörling

ISBN: 978-3-86345-542-2



Verlag der DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17 • 35392 Gießen
Tel.: 0641 / 24466 • Fax: 0641 / 25375
E-Mail: info@dvg.de • Web: www.dvg.de