

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Infektionsimmunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

***Arcobacter*: pathogenes Potential und Bedeutung  
als Zoonoseerreger**

***Arcobacter*: pathogenic potential and importance  
as zoonotic agent**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Vanessa Brückner

aus Berlin, Deutschland

Datum der Promotion: 18.12.2020

## Vorwort

*Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:*

Brückner V, Fiebiger U, Ignatius R, Friesen J, Eisenblätter M, Höck M, Alter T, Bereswill S, Heimesaat MM, Gözl G. Characterization of *Arcobacter* strains isolated from human stool samples: results from the prospective German prevalence study Arcopath. Gut Pathog. 2020;12:3.

*Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden zur Veröffentlichung eingereicht bei:*

*Gut Pathogens.*

Brückner V, Fiebiger U, Ignatius R, Friesen J, Eisenblätter M, Höck M, Alter T, Bereswill S, Gözl G, Heimesaat MM. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Arcobacter* species in human stool samples: the prospective German *Arcobacter* prevalence study Arcopath. Eingereicht am 18.12.2019 bei *Gut Pathogens*.

Eine detaillierte Beschreibung des Beitrags an den erfolgten Publikationen ist der Anteilserklärung zu entnehmen (siehe S. LXXXIV).

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	X
Summary	XI
1. Einleitung	1
<i>Arcobacter</i> - ein potentieller Zoonoseerreger?	1
2. Literatur	3
2.1. Taxonomische Einordnung von <i>Arcobacter</i>	3
2.2. Charakteristika von <i>Arcobacter</i>	4
2.3. Vorkommen von <i>Arcobacter</i>	4
2.3.1. Prävalenz in Tieren	4
2.3.2. Prävalenz in Lebensmitteln	6
2.3.3. Prävalenz in der Umwelt	6
2.3.4. Prävalenz im Menschen	7
2.4. Klinische Relevanz im Menschen	11
2.5. Genotypisierungsverfahren	12
2.6. Pathogenität und Virulenzfaktoren	15
2.6.1. Vorhandensein von Virulenzgenen	15
2.6.2. Pathomechanismen von <i>Arcobacter</i>	18
2.7. Empfindlichkeit von <i>Arcobacter</i> gegenüber Antibiotika	21
3. Materialien	24
3.1. Chemikalien und Enzyme	24
3.2. Lösungen, Puffer, Nährmedien	24

## Inhaltsverzeichnis

3.2.1.	Lösungen und Puffer	24
3.2.2.	Nährmedien	25
3.3.	Reagenzsysteme	28
3.4.	Nukleinsäuren	28
3.5.	Kontrollstämme	29
3.6.	Zelllinien und Medien	30
3.7.	Verbrauchsmaterialien	30
3.8.	Geräte und Software	31
4.	Methoden	32
4.1.	Probenmaterial	32
4.2.	Bakteriologische Methoden	32
4.2.1.	Kultureller Nachweis von <i>Arcobacter</i> spp.	32
4.2.2.	Konservierung der Gebrauchsstämme	33
4.2.3.	Bakterienanzucht	33
4.2.4.	Bakterienaufbereitung für Zytotoxizitätsassay	33
4.3.	Molekularbiologische Methoden	34
4.3.1.	Extraktion von genomischer DNA	34
4.3.2.	Speziesidentifizierung durch multiplex PCR	34
4.3.3.	Agarose-Gelelektrophorese	35
4.3.4.	Speziesverifizierung durch <i>rpoB</i> Sequenzierung	36
4.3.5.	Genotypisierung von <i>Arcobacter</i> mittels ERIC-PCR	37
4.3.6.	Screening auf Virulenzgene	38
4.3.7.	Antimikrobielle Empfindlichkeitstestung von <i>Arcobacter</i> spp. mittels E-Test	41
4.4.	Zellbiologische Methoden	42
4.4.1.	Kultivierung von Zellen	42
4.4.2.	Konservierung von Zellen	42
4.4.3.	Reaktivierung konservierter Zellen	42
4.4.4.	Zellzahlbestimmung	43

## Inhaltsverzeichnis

4.4.5.	Zytotoxizitätsassay (WST-1-Assay)	43
4.5.	Statistische Analyse	45
5.	Ergebnisse	46
5.1.	Prävalenz von <i>Arcobacter</i> spp. in humanen Stuhlproben	46
5.2.	Genotypisierung von <i>Arcobacter</i> spp.	47
5.3.	Präsenz von putativen Virulenzgenen bei <i>Arcobacter</i> spp.	49
5.4.	Zytotoxische Effekte von <i>Arcobacter</i> spp. <i>in vitro</i>	51
5.5.	Antimikrobielle Empfindlichkeitstestung von <i>Arcobacter</i> spp.	52
6.	Diskussion	56
6.1.	Prävalenz von <i>Arcobacter</i> spp. in humanen Stuhlproben	56
6.2.	Genotypisierung von <i>Arcobacter</i> spp.	58
6.3.	Präsenz von putativen Virulenzgenen bei <i>Arcobacter</i> spp.	59
6.4.	Zytotoxische Effekte von <i>Arcobacter</i> spp. <i>in vitro</i>	61
6.5.	Antimikrobielle Empfindlichkeitstestung von <i>Arcobacter</i> spp.	63
7.	Fazit und Ausblick	66
8.	Literaturverzeichnis	68
	Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung	LXXXIII
	Eidesstattliche Versicherung	LXXXIII
	Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	LXXXIV
	Lebenslauf	LXXXV
	Publikationen	LXXXVI
	Danksagung	LXXXVIII

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Umwandlung des Tetrazoliniumsalzes WST-1 zu Formazan.	44
Abbildung 2:	Vorkommen von gängigen bakteriellen Krankheitserregern in einer Untergruppe der Studienpopulation (n = 2257).	47
Abbildung 3:	Dendrogramm und Bandenmuster der ERIC-PCR-Ergebnisse von 36 <i>Arcobacter</i> -Isolaten aus humanen Stuhlproben.	48
Abbildung 4:	Virulenzgenmuster der 36 <i>Arcobacter</i> -Isolaten aus humanen Stuhlproben.	50
Abbildung 5:	Viabilität von HT-29/B6-Zellen nach Inokulation mit <i>Arcobacter</i> -Isolaten aus humanen Stuhlproben.	52
Abbildung 6:	Verteilung der MHK-Werte von <i>Arcobacter</i> -Isolaten aus humanen Stuhlproben (n = 36) für sechs ausgewählte Antibiotika.	53

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht zur Detektion von <i>Arcobacter</i> spp. in humanen Stuhlproben	10
Tabelle 2:	Überblick der Präsenz von putativen Virulenzgenen in <i>Arcobacter</i> spp.	16
Tabelle 3:	Verwendete Chemikalien und Enzyme	24
Tabelle 4:	Verwendete Lösungen und Puffer	24
Tabelle 5:	Zusammensetzung des Anreicherungsmediums nach van Driessche et al (2003) (27)	25
Tabelle 6:	Zusammensetzung des Selektivagars nach van Driessche et al. (2003) (27)	26
Tabelle 7:	Zusammensetzung von Müller-Hinton-Agar	27
Tabelle 8:	Zusammensetzung von Brucella-Bouillon	27
Tabelle 9:	Verwendetes Reagenzsystem	28
Tabelle 10:	Verwendete Nukleinsäure	28
Tabelle 11:	Verwendete Oligonukleotide	28
Tabelle 12:	Verwendete Kontrollstämme	29
Tabelle 13:	Verwendete Zelllinie	30
Tabelle 14:	Verwendete Verbrauchsmaterialien	30
Tabelle 15:	Verwendete Geräte	31
Tabelle 16:	Verwendete Software	31
Tabelle 17:	Zusammensetzung eines mPCR-Reaktionsansatzes	34
Tabelle 18:	Reaktionsbedingungen der mPCR	35
Tabelle 19:	Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes zur Amplifizierung von <i>rpoB</i>	36
Tabelle 20:	Reaktionsbedingungen der PCR zur Amplifizierung von <i>rpoB</i>	36
Tabelle 21:	Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes der ERIC-PCR	37
Tabelle 22:	Reaktionsbedingungen der ERIC-PCR	38
Tabelle 23:	Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes nach Whiteduck-Leveillee et al. (2016) (157)	39

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 24:	Reaktionsbedingungen der PCR nach Whiteduck-Leveillee et al. (2016) (157)	39
Tabelle 25:	Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes nach Karadas et al. (2013) (107)	39
Tabelle 26:	Reaktionsbedingungen der PCR nach Karadas et al. (2013) (107)	40
Tabelle 27:	Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes nach Zambri et al. (2019) (118)	40
Tabelle 28:	Reaktionsbedingungen der PCR nach Zambri et al. (2019) (118)	41
Tabelle 29:	Vorkommen von <i>Arcobacter</i> in humanen Stuhlproben im Untersuchungszeitraum Okt. 2017-Okt. 2018 in Deutschland	46
Tabelle 30:	Detektion von putativen Virulenzgenen in 36 <i>Arcobacter</i> -Isolaten aus humanen Stuhlproben	49
Tabelle 31:	Empfindlichkeit von humanen <i>Arcobacter</i> -Isolaten (24 <i>A. butzleri</i> , 10 <i>A. cryaerophilus</i> und 2 <i>A. lanthieri</i> ) gegenüber ausgewählten Antibiotika	55

## Abkürzungsverzeichnis

× g	Einheit der relativen Zentrifugalbeschleunigung
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
<i>A.</i>	<i>Arcobacter</i>
AFLP	engl. <i>amplified fragment-length polymorphism</i>
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATCC	engl. <i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BB	Brucella Broth
bp	Basenpaar
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
<i>C.</i>	<i>Campylobacter</i>
Caco-2	humane intestinale Epithelzellen
CCUG	engl. <i>Culture Collection University of Gothenburg</i>
CDT	engl. <i>cytolethal-distending toxin</i>
CLSI	engl. <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ECOFF	engl. <i>epidemiological cutoff value</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

## Abkürzungsverzeichnis

ERIC-PCR	engl. <i>enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR</i>
EUCAST	engl. <i>European Comittee for Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FKS	fötale Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
HeLa	humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
Hep-2	humane Epithelzellen eines Larynxkarzinoms
HT-29	humane intestinale Adenokarzinomzellen
HT-29/B6	humane intestinale Adenokarzinomzellen, Subklon B6
ICMSF	engl. <i>International Commision on Microbiological Specification for Foods</i>
IL-8	Interleukin-8
ILSH	Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene
INT407	humane intestinale Epithelzellen
IPI-2I	porcine intestinale Epithelzellen
KI	Konfidenzintervall
l	Liter
M	Molar
MFS	engl. <i>major facilitator superfamily</i>
mg	Milligramm
MHB	Müller-Hinton-Blutagar
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minute
ml	Milliliter
MLST	engl. <i>multilocus sequence typing</i>
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MOI	engl. <i>multiplicity of infection</i>

## Abkürzungsverzeichnis

mPCR	multiplex PCR
NARMS	engl. <i>National Antimicrobial Resistance Monitoring System</i>
nm	Nanometer
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PFGE	engl. <i>pulsed-field-gelelectrophoresis</i>
pmol	Picomol
QRDR	engl. <i>quinolone resistance-determining region</i>
RAPD	engl. <i>random amplified polymorphic DNA</i>
rep-PCR	engl. <i>repetitive-element-PCR</i>
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i> )
RPP	engl. <i>ribosomal protection protein</i>
rRNA	ribosomale RNA
sek	Sekunde
spp.	Spezies (Plural)
ST	Sequenztypen
TC	engl. <i>tissue culture</i>
TLR-4	engl. <i>toll-like receptor</i>
U	Enzymeinheit (engl. <i>enzyme unit</i> )
UPGMA	engl. <i>unweighted pair group method with arithmetic mean</i>
UV	Ultraviolettstrahlung
VAG	Virulenz-assoziierte Gene
WST	engl. <i>water soluble tetrazolium</i>

## Zusammenfassung

Die Gattung *Arcobacter* (*A.*) gehört zur Familie der *Campylobacteriaceae* und umfasst gegenwärtig 29 verschiedene Spezies. Insbesondere *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* werden als potentielle Zoonoseerreger diskutiert, die vermutlich durch den Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln oder Wasser übertragen werden und beim Menschen gastrointestinale Infektionen verursachen können. Durch das Fehlen einer standardisierten Routinediagnostik für *Arcobacter* wird die tatsächliche Prävalenz beim Menschen womöglich unterschätzt und auch über deren Virulenzpotential sowie antimikrobielle Empfindlichkeit ist bisher wenig bekannt. Ziel dieser Studie war es, die Prävalenz von *Arcobacter* in humanen Stuhlproben zu untersuchen und die isolierten Stämme zu charakterisieren.

Insgesamt wurden 4636 Stuhlproben mittels selektiven Kulturverfahren auf *Arcobacter* untersucht. Verdächtige Isolate wurden durch multiplex PCR sowie anschließender *rpoB*-Sequenzierung identifiziert und durch ERIC-PCR genotypisiert. Das Vorhandensein zehn putativer Virulenzgene wurde mittels PCR untersucht und die Zytotoxizität gegenüber HT-29/B6-Zellen im WST-Assay bestimmt. Mittels Gradientendiffusionstest wurde außerdem die Empfindlichkeit gegenüber sechs Antibiotika ermittelt. Die Stuhlproben ambulanter (n = 3884) bzw. stationärer (n = 752) Patienten zeigten eine Belastung mit *Arcobacter* spp. von 0,85 bzw. 0,40 %. *A. butzleri* wurde dabei am häufigsten detektiert (n=24), gefolgt von *A. cryaerophilus* (n=10) und *A. lanthieri* (n=2). Die Genotypisierung der Isolate ergab eine hohe genetische Vielfalt innerhalb der Spezies. Die Prävalenz an putativen Virulenzgenen war in *A. butzleri*- sowie *A. lanthieri*-Stämmen höher als in *A. cryaerophilus*. Beide *A. lanthieri*-Isolate wiesen zusätzlich die Cytolethal-Distending Toxin kodierenden Gene auf. Während die *A. butzleri*- sowie beide *A. lanthieri*-Stämme überwiegend starke zytotoxische Effekte *in vitro* induzierten, zeigten die *A. cryaerophilus*-Stämme kaum zytotoxisches Potential. Die *Arcobacter*-Isolate waren ausgesprochen sensibel gegenüber Ciprofloxacin, während für Azithromycin und Ampicillin erhöhte MHKs festgestellt wurden.

Diese Studie zeigt das Vorkommen von *Arcobacter* in humanen Stuhlproben, eine hohe Prävalenz putativer Virulenzgene bei *A. butzleri* und *A. lanthieri* sowie prominente zytotoxische Effekte *in vitro*. Das Vorhandensein der CDT-Gene in *A. lanthieri*, aber nicht *A. butzleri*, könnte auf unterschiedliche Pathomechanismen hindeuten. Darüber hinaus könnte Ciprofloxacin als antimikrobielle Behandlung schwerer *Arcobacter*-Infektionen vorgeschlagen werden. Es sind jedoch weitere Studien zur Epidemiologie und Pathogenese erforderlich, um das potenzielle Risiko von *Arcobacter* als Zoonoseerreger abschließend zu bewerten.

## Summary

The genus *Arcobacter* (*A.*) belongs to the family *Campylobacteriaceae* and currently comprises 29 different species. Particularly, the three species *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* and *A. skirrowii* are discussed as potential zoonotic pathogens, likely to be transmitted through consumption of contaminated food or water and causing gastrointestinal infections in humans. Since there is no standardized routine diagnostic for *Arcobacter* spp., data about their true prevalence in humans are lacking. Furthermore, the knowledge regarding their virulence potential as well as their antimicrobial susceptibility is still limited. Therefore, this study aimed at investigating the prevalence of *Arcobacter* in human stool samples and characterizing the isolated strains.

Overall, a total of 4636 specimen were collected and screened for *Arcobacter* by selective cultural procedure. Suspicious isolates were identified using multiplex PCR followed by *rpoB* sequencing and genotyped by ERIC-PCR. Furthermore, the presence of ten putative virulence genes was investigated using PCR and cytotoxic effects on the human intestinal cell line HT-29/B6 were determined applying the WST-assay. Moreover, susceptibility to six antibiotics was investigated using the gradient strip diffusion method. *Arcobacter* spp. were detected in 0,85 % and 0,40 % of specimens obtained from 3884 outpatients and 752 hospitalized patients, respectively. Among the 36 *Arcobacter* isolates *A. butzleri* was the most prevalent species (n=24) followed by *A. cryaerophilus* (n=10) and *A. lanthieri* (n=2). Genotyping of the isolates revealed a high genetic diversity within the species. The incidence of the analyzed virulence genes was higher in *A. butzleri* and *A. lanthieri* isolates compared to *A. cryaerophilus*. Additionally, the three cytolethal distending toxin (CDT) genes were detectable in both *A. lanthieri* isolates. Cytotoxic effects were observed for most of *A. butzleri* and both *A. lanthieri* strains, while *A. cryaerophilus* strains induced less cytotoxic effects on HT-29/B6 cells. Antimicrobial susceptibility testing of *Arcobacter* isolates revealed high susceptibility to ciprofloxacin, whereas elevated MIC values were detected for azithromycin and ampicillin.

This study demonstrates the occurrence of *Arcobacter* in human stool samples, high prevalence of putative virulence genes in *A. butzleri* as well as *A. lanthieri* isolates and prominent cytotoxic effects of these strains *in vitro*. The presence of CDT genes in *A. lanthieri* but not *A. butzleri* could suggest different pathomechanisms. Furthermore, ciprofloxacin could be proposed as antimicrobial treatment of severe *Arcobacter* infections. However, further studies regarding epidemiology and pathogenesis are needed to finally assess the potential risk of *Arcobacter* as zoonotic pathogens.

# 1. Einleitung

## ***Arcobacter* - ein potentieller Zoonoseerreger?**

Der Begriff „Zoonose“ ist abgeleitet aus dem Griechischen, wobei „zoon“ für Lebewesen steht und „nosos“ für Krankheit. Bei Zoonosen handelt es sich laut WHO-Definition um Infektionskrankheiten, die von Bakterien, Viren, Parasiten, Pilzen oder Prionen verursacht und wechselseitig zwischen Tieren und Menschen übertragen werden können. Eine Übertragung kann dabei auf direktem Wege, durch lebende Vektoren, wie Zecken und Mücken, oder durch den Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln und Wasser erfolgen (1). Bakterielle Erreger wie *Campylobacter* (*C.*), Salmonellen, Yersinien und *Escherichia* (*E.*) *coli* gehören zu den in der Humanmedizin bedeutsamen lebensmittelassoziierten Zoonoseerregern (2). Allein in Deutschland wurden 2018 insgesamt 416 lebensmittelbedingte Krankheitsausbrüche an das Robert Koch-Institut (RKI) bzw. an das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) übermittelt, die mit über 2000 Erkrankungen, rund 300 Krankenhausaufnahmen und 11 Todesfällen im Zusammenhang standen. Am häufigsten wurden dabei die Ausbrüche durch *Campylobacter* (41 %) und Salmonellen (31 %) verursacht (3). Mit insgesamt 76.872 gemeldeten Erkrankungen war *Campylobacter* auch der zweithäufigste Durchfallerreger nach dem Norovirus (4). Seit einigen Jahren findet auch die Gattung *Arcobacter* (*A.*) zunehmend wissenschaftliche Beachtung als potentieller lebensmittelassoziiertes Krankheitserreger. Insbesondere die Spezies *A. butzleri* und *A. cryaerophilus* wurden 2002 als „emerging foodborne pathogen“ anerkannt, und ihnen wird eine ernste Gefahr für die menschliche Gesundheit zugesprochen (5). Im Gegensatz zu vielen Krankheitserregern, die auch hinsichtlich ihrer Pathogenität weitestgehend analysiert sind, wird in der Humanmedizin bisher noch nicht routinemäßig gezielt auf *Arcobacter* untersucht, und daher liegen keine Daten zur Häufigkeit von Infektionen vor. Insbesondere durch das Fehlen einer Standardisolationmethode und der mangelnden Untersuchungshäufigkeit wird das Vorkommen und allgemein die epidemiologische Bedeutung von *Arcobacter* als Humanpathogen vermutlich stark unterschätzt.

*Arcobacter* können in Kotproben unterschiedlicher Tierarten, Lebensmitteln tierischen Ursprungs und auch diversen Wasserhabitaten detektiert werden (6, 7). Während über *Arcobacter* bei Tieren hauptsächlich als Kommensale berichtet wird und bei diesen keine Beschwerden verursacht, konnten *Arcobacter* in der Humanmedizin vermehrt im Zusammenhang mit gastrointestinalen Erkrankungen isoliert werden, die jedoch meistens selbstlimitierend verlaufen und nur in seltenen

## Einleitung

Fällen eine antibiotische Behandlung erfordern (8-10). Bisher reichen die verfügbaren Daten jedoch nicht aus, *Arcobacter* spp. als humanpathogene oder über Lebensmittel oder Wasser übertragbare pathogene Keime einzuschätzen, sodass weitere Untersuchungen insbesondere zur Epidemiologie und Pathogenese erforderlich sind. Vor allem für Deutschland fehlen bislang verlässliche Daten in Bezug auf die humane Prävalenz. Im Zuge dieser Arbeit sollte daher zunächst das Vorkommen von *Arcobacter* spp. in humanen Stuhlproben aus Deutschland bestimmt und die isolierten Stämme weitestgehend charakterisiert werden, und zwar hinsichtlich ihres Genotyps, dem Vorhandensein von Virulenzgenen, dem zytotoxischen Potential und der Empfindlichkeit gegenüber bestimmten antimikrobiellen Substanzen.

## 2. Literatur

### 2.1. Taxonomische Einordnung von *Arcobacter*

Auf Grundlage der phylogenetischen Analyse des 16S rRNA Gens wurde *Arcobacter* neben *Campylobacter* und *Sulfurospirillum* als eigene Gattung der Familie der *Campylobacteraceae* innerhalb der Klasse der Epsilon-Proteobakterien zugeordnet (11-13). Derzeit umfasst der Genus *Arcobacter* 29 verschiedene Spezies (14, 15), wobei insbesondere die drei Spezies *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* mit Humanerkrankungen assoziiert und erstere beiden seit 2002 von der International Commission on Microbiological Specification for Foods (ICMSF) als „ernsthafte Gefahr für die menschliche Gesundheit“ eingestuft werden (5). Trotz ähnlicher genotypischer und phänotypischer Merkmale von *Arcobacter* und *Campylobacter* konnte anhand einer Ganzgenomsequenzierung von *A. butzleri* gezeigt werden, dass *A. butzleri* auf Proteomebene höhere Ähnlichkeiten zu Vertretern der *Helicobacteraceae*, insbesondere *Sulfurimonas denitrificans* und *Wolinella succinogenes*, hat sowie zu *Sulfurovum* und *Nitratiruptor*, die Vertreter der Tiefsee-Epsilonproteobakterien sind (12). Daher wurde angeraten, die Einteilung von *Arcobacter* in die Familie der *Campylobacteraceae* zu überdenken. Erst kürzlich wurde anhand vergleichender Genomanalysen von Vertretern der Klasse der Epsilon-Proteobakterien eine Reklassifizierung der Gattung *Arcobacter* als eine neue eigene Familie *Arcobacteraceae* vorgeschlagen (16). Darüber hinaus wurden in einem polyphasischen Ansatz von Perez-Cataluna et al. (2018) Informationen aus der Analyse von Housekeeping-Genen, ribosomalen Genen und dem Core Genom sowie verschiedene genomische Indizes genutzt, um die Taxonomie von *Arcobacter* neu zu bewerten. Dabei wurde angebracht, die aktuelle Gattung *Arcobacter* in sieben verschiedene Gattungen einzuteilen, einschließlich *Aliarcobacter* gen. nov., die unter anderem die humanassoziierten Spezies *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* beinhalten würde (14). Wenn auch die Vorschläge hinsichtlich einer neuen taxonomischen Einteilung vorliegen, ist die Anerkennung dieser noch ausstehend. Durch die zunehmende Verfügbarkeit von genomischen Sequenzen und der Analyse dieser wird davon ausgegangen, dass es zu weiteren Umstrukturierungen auf taxonomischer Ebene kommen kann (17).

## 2.2. Charakteristika von *Arcobacter*

*Arcobacter* sind gramnegative, nicht-sporenbildende Bakterien, die im mikroskopischen Präparat als S- bzw. spiralförmige Stäbchen mit einer Länge von 1 bis 3 µm und einer Breite von 0,2 bis 0,9 µm zu erkennen sind. Durch ihre polare monotriche Begeißelung können sie sich selbstständig, korkenzieherähnlich fortbewegen (13). Auf Blutagarplatten bilden sich nach zwei bis drei Tagen Inkubation kleine, runde, weiß bis gräulich gefärbte Kolonien mit einem Durchmesser von 2 bis 4 mm. Trotz enger phylogenetischer Verwandtschaft und morphologischer Ähnlichkeit zu der Gattung *Campylobacter* sind die Wachstumsbedingungen von *Arcobacter* weniger anspruchsvoll. Sie sind in der Lage, sich unter aeroben sowie anaeroben Bedingungen innerhalb eines breiten Temperaturbereichs von 15 bis 37°C zu vermehren, wobei die optimalen Wachstumsbedingungen bei einer Temperatur von 30°C im mikroaeroben Milieu gegeben sind. Dieses niedrige Temperaturoptimum stellt bei der Isolierung von *Arcobacter* ein wesentliches Differenzierungsmerkmal zu *Campylobacter* dar (13, 18).

## 2.3. Vorkommen von *Arcobacter*

Seit Anfang der neunziger Jahre beschäftigen sich zahlreiche Studien mit dem Vorkommen von *Arcobacter* in verschiedensten Habitaten wie Gewässern, Tieren und diversen Nahrungsmitteln sowohl tierischen als auch nicht-tierischen Ursprungs. Darüber hinaus wird zunehmend im Bereich der Humanmedizin geforscht, da einige Vertreter der Gattung *Arcobacter* als „emerging pathogen“ angesehen werden; bisher fehlen allerdings solide Daten zur Humanprävalenz und Pathogenese. Das Fehlen eines standardisierten Nachweisverfahrens von *Arcobacter* stellt ein großes Problem im Vergleich der Prävalenzstudien untereinander dar, da Prävalenzunterschiede neben geographischen Aspekten auch auf die verschiedenen Nachweisverfahren zurückzuführen sind und die Erregerhäufigkeit dadurch eventuell stark unterschätzt wird.

### 2.3.1. Prävalenz in Tieren

Vertreter der Gattung *Arcobacter* kommen in zahlreichen Tierarten vor. Die Spezies *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* konnten in verschiedenen Nutztieren wie Rindern, Schweinen und Schafen im Zusammenhang mit Aborten, Mastitis und Enteritis isoliert werden (19-21). Auch in erkrankten Wildtieren und Exoten konnten *Arcobacter* nachgewiesen werden. In einer in Amerika durchgeführten Studie beispielsweise wurden *Arcobacter* spp. in Waschbären, die

Darminvaginationen aufwiesen, detektiert (22). Weitere Studien berichten über die Assoziation von *A. butzleri* mit Durchfallerkrankungen bei nichthumanen Primaten (23, 24).

Häufiger konnten *Arcobacter* jedoch in Tieren detektiert werden, die keine klinische Symptomatik aufwiesen. Der Nachweis im Verdauungstrakt klinisch gesunder Nutztiere lässt vermuten, dass es sich bei *Arcobacter* um opportunistische Erreger handelt und diese Tiere als Erregerreservoir und Infektionsquelle für den Menschen dienen könnten (25). *Arcobacter* konnten vor allem in Kotproben gesunder Rinder, Schweine, Schafe und Pferde nachgewiesen werden (26-30), wobei *A. butzleri* die am häufigsten detektierte Spezies war. Die Prävalenzen variieren dabei mitunter stark in den einzelnen Studien verschiedener Länder. Prinzipiell konnte aber beobachtet werden, dass in Schweinen häufiger *Arcobacter* nachgewiesen werden als in Rindern. In einjährigen Studien aus Belgien und Japan, in denen Rinder und Schweine aus Schlachtbetrieben beprobt wurden, konnten in 39 bzw. 4 % der Rinderkot- und in 44 bzw. 10 % der Schweinekotproben *Arcobacter* spp. detektiert werden (26, 27); und auch in einer Studie aus Chile wurden höhere *Arcobacter*-Prävalenzen in Schweinekotproben (50 %) im Gegensatz zu Rinderkotproben (33 %) nachgewiesen (30). Van Driessche et al. (2004) untersuchten Kotproben von Schweinen auf vier unterschiedlichen belgischen Farmen. Dabei variierten die Prävalenzen von *Arcobacter* zwischen 16 und 85 %, was möglicherweise an dem unterschiedlichen Alter der untersuchten Tiere lag oder durch jahreszeitliche Schwankungen bedingt war (28).

*Arcobacter* können ebenfalls in Geflügel nachgewiesen werden. Studien aus Chile, Japan und Indien ermittelten Prävalenzen zwischen 15 und 30 % in Geflügelkotproben bzw. Kloakenabstrichen (26, 30, 31). Darüber hinaus konnten *Arcobacter* spp. auf 46 % der untersuchten Schlachtkörper von Hähnchen und Puten detektiert werden, wobei auch hier *A. butzleri* die am häufigsten detektierte Spezies war (32). In einer Studie von Ho et al. (2008) wurden *Arcobacter* des Weiteren in Geflügeldärmen nachgewiesen. Es wird vermutet, dass diese ein Reservoir für *Arcobacter* darstellen und während des Schlachtprozesses zu Kontaminationen der Geflügelkarkassen führen (33).

Abgesehen von dem Vorkommen in gesunden Nutztieren, konnten *Arcobacter* spp. des Weiteren in Haustieren, wie Katzen und Hunden, ermittelt werden (34, 35). In einer Studie aus Süditalien waren 79 % der Kotproben von Katzen positiv für *Arcobacter* (34). Hingegen wurden in einer belgischen Studie keine mit *Arcobacter* infizierten Katzen ermittelt, der Erreger konnte jedoch in 2,6 % der untersuchten Hunde nachgewiesen werden (35).

### 2.3.2. Prävalenz in Lebensmitteln

Neben den Tieren selbst findet man *Arcobacter* auch in Lebensmitteln tierischen Ursprungs. Die Verbreitung von *Arcobacter* spp. im Intestinaltrakt und in Kotproben von gesunden landwirtschaftlichen Nutztieren führt vermutlich zur Kontamination von Fleisch und Fleischprodukten mit dem Erreger während des Schlacht- und Verarbeitungsprozesses. In mehreren Studien, die aus dem Einzelhandel erhältliche tierische Lebensmittel untersuchten, konnten dabei die höchsten Prävalenzen in Geflügel-, gefolgt von Schweine- und Rindfleisch berichtet werden. Die detektierten Prävalenzen in Ländern wie Portugal, Spanien und Polen liegen dabei zwischen 64 und 92 % für Geflügelfleisch, 15 und 53 % für Schweinefleisch und 20 und 42 % für Rindfleisch (36-38). Das potenzielle Infektionsrisiko für den Menschen durch den Verzehr von nicht ausreichend gegartem Fleisch, konnte bei einer Hochzeitsfeier in Wisconsin (USA) aufgezeigt werden. Teilnehmer des Hochzeitsempfangs litten an Symptomen einer Gastroenteritis, und *Arcobacter* spp. konnten als Erreger identifiziert werden, wobei als Kontaminationsquelle das auf dem Empfang servierte Brathähnchen vermutet wurde (39).

*Arcobacter* konnten des Weiteren in tierischen Produkten wie Milch, Milcherzeugnissen und auch Meeresfrüchten nachgewiesen werden. Es wurden hohe Nachweisraten von *Arcobacter* spp. zwischen 36 und 46 % in untersuchten Rohmilchproben festgestellt (40, 41), und auch in Käse, der aus Kuh- bzw. Schafsmilch hergestellt wurde, konnten Prävalenzen von 56 bzw. 22 % ermittelt werden (41, 42). In Fisch und Meeresfrüchten wurde das Vorkommen von diversen *Arcobacter*-Spezies nachgewiesen, mit Prävalenzen zwischen 18 und 38 % (43-45), was vermutlich durch (fäkale) Verunreinigung des Wassers bedingt war (36).

Auch in nichttierischen Lebensmitteln, wie beispielsweise Salat, konnten *Arcobacter* spp. mit Prävalenzen zwischen 21 und 28 % ermittelt werden (44, 46). Besonders bei verzehrfertigen Lebensmitteln, wie Salat oder auch Meeresfrüchten, deren Verzehr kein vorheriges Erhitzen oder keine weitere Verarbeitung voraussetzt, ist das Risiko einer Übertragung von Erregern hoch.

Im Allgemeinen zeigten die Untersuchungen von Lebensmitteln, dass *A. butzleri* am häufigsten isoliert werden konnte, gefolgt von *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii*.

### 2.3.3. Prävalenz in der Umwelt

*Arcobacter* konnten bereits in verschiedenen Gewässertypen nachgewiesen werden, wobei *A. butzleri* meist als dominante Spezies gefolgt von *A. cryaerophilus* detektiert wurde. In mehreren Studien wurde deutlich, dass das Vorkommen von *Arcobacter* spp. besonders in Abwasser sehr

hoch ist, mit Prävalenzen zwischen 86 bis 100 % (47-50). In einer kanadischen Studie konnte *A. butzleri* sogar in vom Klärwerk behandelten Abwasserproben mit einer Prävalenz von 78 % detektiert werden (51). Des Weiteren zeigten auch Untersuchungen von Fluss- und Seewasser aus Ländern wie Kanada, Spanien und Südafrika zum Teil hohe Belastungen mit *Arcobacter* spp. in 26 bis 88 % der untersuchten Proben (48, 49, 51). Weiterhin scheinen sowohl Meer- als auch Grundwasser ebenfalls ein Reservoir von *Arcobacter* darzustellen, mit Prävalenzen um 40 % (48, 52). In einer Studie aus der Türkei konnten *Arcobacter* sogar in 3 % der untersuchten Trinkwasserproben detektiert werden, was darauf hindeuten könnte, dass die Desinfektion des Trinkwassers durch Chlorierung nicht ausreichend wirksam ist (53). Das zum Teil hohe Vorkommen und Überleben von *Arcobacter* in verschiedenen Gewässern bzw. Wassersproben lässt darauf schließen, dass Wasser als Kontaminationsquelle eine wesentliche Rolle in der Übertragung dieses Erregers auf Menschen und Tiere einnimmt. Dafür spricht auch die Beobachtung bei drei Krankheitsausbrüchen, in denen mit Abwasser kontaminiertes Trinkwasser als Grund des Ausbruchs angenommen wurde und unter anderem *Arcobacter* als mutmaßliche Erreger damit in Zusammenhang gebracht werden konnte (52, 54, 55).

*Arcobacter* konnten auch in Bodenproben detektiert werden, was vermutlich durch fäkale Kontaminationen von Tieren bedingt ist (56). Nach Regenfällen können *Arcobacter* dadurch ins Grundwasser versickern und über Quellen und Flüsse in die Meere abfließen, was wiederum die hohen Prävalenzen im Wasser erklären würde (48).

### 2.3.4. Prävalenz im Menschen

Es gibt mehrere Studien aus verschiedenen Ländern, die die Prävalenz von *Arcobacter* in der Humanmedizin untersucht haben (Tabelle 1). Dabei reichen die Prävalenzen von 0,1 bis 10,9 %, wobei *A. butzleri* hierbei die am häufigsten detektierte Spezies ist, gefolgt von *A. cryaerophilus*. In Studien aus Belgien, Frankreich, Portugal und Chile konnte *A. butzleri* als vierthäufigster *Campylobacter*-ähnlicher Erreger aus humanen Stuhlproben isoliert werden (8, 57-59). Darüber hinaus wurden *Arcobacter* spp. in einer belgischen Studie sogar als vierthäufigste pathogene Erregergruppe (nach *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. und *Clostridoides difficile*) aus Stuhlproben von Personen mit akuter Darmerkrankung detektiert (60). Spezies wie *A. skirrowii* oder *A. thereius* konnten bisher nur vereinzelt in humanen Stuhlproben nachgewiesen werden (60-62). Die Prävalenzen untereinander kann man nur bedingt vergleichen, da es, wie bereits erwähnt, für die Isolierung von *Arcobacter* bisher keine Standardmethode gibt und demnach viele verschiedene Methoden zum Einsatz kommen (Tabelle 1). Dabei kann man zwischen

molekularbiologischen und diversen kulturellen Nachweismethoden unterscheiden, die hinsichtlich der eingesetzten Medien, Inkubationszeiten und -temperaturen variieren. Betrachtet man die kulturellen Methoden, so finden sich Prävalenzen von *Arcobacter* im Bereich von 0,1 bis 3,6 % wieder. Höhere Prävalenzen wurden hingegen mittels molekularbiologischer Methoden ermittelt, mit Detektionsraten von 0,4 bis 10,9 %. Der Einfluss der verschiedenen Methoden auf die detektierte Prävalenzrate durch direkten Vergleich konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden. Während verschiedene kulturelle Methoden Prävalenzunterschiede von 7 bis 36 % erzielten (63-66), wurde erst kürzlich in einer kanadischen Studie eine PCR-basierte Methode mit einer kulturellen Isolierung verglichen, und *A. butzleri* konnte in 0,8 bzw. 60,0 % der untersuchten humanen Stuhlproben detektiert werden (67). In zwei weiteren Humanstudien konnte eine höhere Prävalenz von *Arcobacter* unter PCR-Einsatz ermittelt werden. So wurde *A. butzleri* in 4 bzw. 1,4 % von Durchfallproben mittels PCR detektiert, im Vergleich zu 2,7 bzw. 0,7 % mittels kultureller Verfahren (31, 57). Eine Studie von de Boer et al. (2013) hat gezeigt, dass *A. butzleri* zwar in 0,4 % von Durchfallproben mittels PCR detektiert werden konnte, kulturell auf Nährmedien jedoch nicht nachzuweisen war (68).

Es konnte bisher nicht eindeutig gezeigt werden, dass das Vorkommen von *Arcobacter* in Durchfallproben höher ist als in normalem Stuhl. Einerseits konnte eine doppelt so hohe Prävalenz in Durchfallproben wie in gesunden Stuhlproben (0,14 bzw. 0,06 %) ermittelt werden (59), andererseits zeigten sich aber auch ähnliche Prävalenzen ohne signifikanten Unterschied (67). Mittels molekularer Nachweisverfahren wurden *Arcobacter* in einer in Südafrika durchgeführten Studie in 13 % der getesteten Krankenhauspatienten nachgewiesen, aber nur in 3 % der Stuhlproben gesunder Schulkinder (61). Hingegen untersuchten Fera et al. (2010) 99 Stuhlproben von Patienten ohne jegliche Symptome einer Magen-Darm-Erkrankung und konnten *Arcobacter* spp. mittels PCR in 47 % und kulturell in 3 % der Proben ermitteln, wobei *A. cryaerophilus* am häufigsten detektiert wurde (69). Dies ist in Übereinstimmung mit einer weiteren Studie, in der ebenfalls Stuhlproben gesunder Probanden untersucht wurden und *A. cryaerophilus* als einzige Spezies in 1,4 % der Proben identifiziert werden konnte (70). Andererseits gibt es auch eine Studie, in der *Arcobacter* zwar in Durchfallproben detektiert wurden, in der gesunden Kontrollgruppe jedoch nicht nachgewiesen werden konnten (57).

Obwohl weltweit vereinzelt Daten zur *Arcobacter*-Prävalenz in der Humanmedizin vorhanden sind, fehlen bisher fundierte Daten für Deutschland. Bisher ist nur eine deutsche Studie bekannt, in der Patienten mit schwerer Gastroenteritis routinemäßig auf gastrointestinale Erreger getestet, aber hauptsächlich für Noroviren oder *Campylobacter* positiv befunden wurden und keine *Arcobacter* isoliert werden konnten (71). Aufgrund der sehr geringen Stichprobengröße (n = 104)

## Literatur

und der Nachweismethode ohne selektive Voranreicherung sollten die Ergebnisse jedoch mit Vorsicht betrachtet werden.

**Tabelle 1: Übersicht zur Detektion von *Arcobacter* spp. in humanen Stuhlproben**

Land	Matrix	Probenanzahl	Methode	Prävalenz in %			Referenz
				<i>Arcobacter</i> spp.	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	
Südafrika	Durchfallproben	19535	kulturell (Cape Town (Filter))	0,1	0,1		Lastovica & Le Roux (2000) (72)
Hong Kong	Durchfallproben	4741	kulturell (CMA <sup>a</sup> )	0,1	0,1		Lau et al. (2003) (73)
Belgien	Stuhlproben	40995	kulturell (Filter)	0,2	0,2	0,02	Vandenberg et al. (2004) (59)
Südafrika	Stuhlproben	322	PCR	10,9	6,2	2,8	Samie et al. (2007) (61)
Deutschland	Durchfallproben	104	kulturell (Skirrow-Medium)	0	0		Jansen et al. (2008) (71)
Indien	Durchfallproben	75	kulturell (Johnson & Murano Medium)	2,7	2,7		Patyal et al. (2011) (31)
Türkei	Durchfallproben	3287	kulturell (mCCDA <sup>b</sup> )	0,3	0,3		Kayman et al. (2012) (74)
Neuseeland	Durchfallproben	1380	kulturell (Houf-Medium)	0,9	0,5	0,4	Mandisodza et al. (2012) (75)
Niederlande	Stuhlproben	493	qPCR	0,4	0,4		de Boer et al. (2013) (68)
Chile	Durchfallproben	140	kulturell (CAT <sup>c</sup> -Medium)	0,7	0,7		Collado et al. (2013) (57)
Portugal	Durchfallproben	298	qPCR	1,6	1,3	0,3	Ferreira et al. (2014) (58)
Belgien	Stuhlproben	6774	kulturell (Houf-Medium)	1,3	0,7	0,6	van den Abeele et al. (2014) (60)
Chile	Stuhlproben	83	kulturell (Houf-Medium)	3,6	3,6		Fernandez et al. (2015) (30)

<sup>a</sup> CMA: Cefoperazon MacConkey Agar; <sup>b</sup> mCCDA: modifizierter Aktivkohle-Cefoperazon-Desoxycholat-Agar; <sup>c</sup> CAT: Cefoperazon, Amphotericin B und Teicoplanin

## 2.4. Klinische Relevanz im Menschen

Die Bedeutung von *Arcobacter* als humanem Krankheitserreger ist noch nicht hinreichend geklärt. Insbesondere die drei Spezies *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* werden vermehrt mit gastrointestinalen Infektionen in Verbindung gebracht, wobei die Symptome von abdominalen Krämpfen, Übelkeit, Übereben bis hin zu akuten oder chronischen Durchfall reichen (9, 20, 39, 55, 62). Damit ähnelt die Symptomatik einer Erkrankung mit *Campylobacter* oder Salmonellen, wobei die durch *A. butzleri* hervorgerufene Diarrhö eher länger anhaltend und wässrig zu sein scheint, im Gegensatz zum blutigen Durchfall, der durch *C. jejuni* häufig verursacht wird (59). In seltenen Fällen konnten *Arcobacter* spp. auch von Patienten mit Bakteriämie, Peritonitis und Appendizitis isoliert werden (76-78).

Bei humanen *Arcobacter*-Erkrankungen handelt es sich im Regelfall um Einzelerkrankungen, aber bisher konnten auch einige wenige lebensmittel- bzw. wasserbedingte Ausbrüche in Zusammenhang mit *Arcobacter* gebracht werden (20, 39, 55). Ein Ausbruch, der mit dem Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln assoziiert wurde, ereignete sich 1983 in einer Grundschule in Italien. Zehn Kinder litten unter starken Bauchkrämpfen ohne Durchfall, und *A. butzleri* konnte als einziger potentieller Erreger in allen Stuhlproben nachgewiesen werden. Sämtliche detektierten *A. butzleri*-Stämme gehörten zum gleichen Serotyp und wiesen identische Proteinprofile und Phänotypen auf, sodass ein epidemiologischer Zusammenhang der Stämme untereinander vermutet wurde. Als Ursache des Ausbruchs wurde die Schulmensa angenommen, wobei dort keine Proben von Mitarbeitern oder Lebensmitteln untersucht wurden (20). Des Weiteren traten nach einem Hochzeitsempfang in Wisconsin, USA, bei 51 Gästen Symptome einer gastrointestinalen Infektion wie Übelkeit, Bauchkrämpfe und Durchfall auf. In vier von fünf untersuchten Stuhlproben von Betroffenen, konnten *Arcobacter* spp. als einzige Erreger identifiziert werden. Das bei der Hochzeitsfeier servierte Hühnchen wurde als mögliche Kontaminationsquelle vermutet (39). Neben lebensmittelbedingten Ausbrüchen durch *Arcobacter* wurde auch über Ausbrüche berichtet, bei denen durch *Arcobacter* kontaminiertes Wasser als Ursache diskutiert wurde. In einem Pfadfindercamp in den USA (1996), beklagten sich beispielsweise 117 Erkrankte über Symptome wie Übelkeit, Erbrechen und Durchfall. Zur gleichen Zeit des Ausbruchs kam es zum Ausfall der automatischen Chlorierungsanlage, sodass kontaminiertes Trinkwasser als Ursache des Ausbruchs angenommen wurde. *A. butzleri* konnte zwar nicht in direkten Zusammenhang mit dem Ausbruch gebracht, aber in einem Brunnen detektiert werden, der das Pfadfinder-Camp mit Trinkwasser versorgte (55). Über einen weiteren Ausbruch wurde 2004 berichtet, bei dem rund 1450 Personen unter Symptomen einer

Gastroenteritis litten, nachdem sie die Insel South Bass Island in Ohio, USA, besucht hatten. Untersuchungen des Grundwassers ergaben eine hohe fäkale Verunreinigung, die vermutlich durch Einleitung von Abwasser aus Kläranlagen nach extremen Regenfällen verursacht wurde. *Arcobacter* spp. konnten in 41 % der untersuchten Wasserproben nachgewiesen werden (52).

Einer klinischen Studie zur Folge, wird *Arcobacter* des Weiteren als ein Erreger von Reisedurchfall angenommen, nachdem *A. butzleri* in 8 % der untersuchten Stuhlproben amerikanischer und europäischer Reisenden, die während ihrer Reise durch Mexiko, Guatemala und Indien an akutem Durchfall erkrankt waren, ermittelt werden konnte (79).

Bei den zuvor beschriebenen Ausbrüchen liegen keine eindeutigen Beweise darüber vor, ob *Arcobacter* tatsächlich die alleinige Ursache der Ausbrüche darstellen. Dennoch verstärken sie die Annahme, dass es sich bei *Arcobacter* um durch wasser- bzw. lebensmittelübertragbare Erreger handelt. Neben den beschriebenen Ausbrüchen und Einzelerkrankungen liegen auch Daten zu Prävalenzen von *Arcobacter* spp. in humanen klinischen Proben vor (siehe 2.3.4.). Wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben, variieren die Nachweisraten von *Arcobacter* in klinischen Proben abhängig vom Untersuchungsland und verwendeter Isolations- bzw. Detektionsmethode. Dies zusammen mit der Tatsache, dass *Arcobacter* auch in gesunden Menschen nachweisbar waren, erschwert die Einschätzung und Bewertung von *Arcobacter* als potentielle humanpathogene Erreger.

## 2.5. Genotypisierungsverfahren

Genotypisierungsverfahren können neben der Identifizierung von Mikroorganismen auch für epidemiologische Fragestellungen, wie Bestimmung der Ähnlichkeit bzw. der Verwandtschaft von Stämmen, Verfolgung von Übertragungswegen, Identifizierung von Infektionsquellen und zur Aufklärung lebensmittelbedingter Ausbrüche eingesetzt werden. Für die molekulare Typisierung von *Arcobacter* haben sich verschiedene banden- und sequenzbasierte Methoden bewährt. Zu den bandenspezifischen Methoden gehört die Amplifikation repetitiver Elemente mittels Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC)-PCR, die zufällige Amplifikation von DNA mittels Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR (80), die selektive Amplifikation nach Restriktionsverdau durch Amplified Fragment-Length Polymorphism (AFLP) (81, 82) und die Auftrennung größerer DNA-Fragmente nach Restriktionsverdau mittels Pulsed-Field-Gelelektrophorese (PFGE) (25). Des Weiteren gibt es noch die Methode des Multilocus Sequence Typing (MLST), die auf der Sequenzanalyse von sieben ausgewählten Haushaltsgenen

(„housekeeping genes“) basiert und durch die Zuordnung von Sequenztypen (ST) ein Vergleich von Stämmen innerhalb einer Spezies ermöglicht (83).

Das von Miller et al. (2009) entwickelte MLST-Protokoll für *Arcobacter* konnte bei der Untersuchung von 374 *Arcobacter*-Stämmen unterschiedlichster Herkunft keinen Zusammenhang zwischen MLST-Sequenztyp und der Herkunft der Isolate erkennen, was auf eine hohe genetische Diversität innerhalb der *Arcobacter* spp. schließen ließ. Die gewonnenen Daten wurden in einer freiverfügbaren erstellten MLST-Datenbank für *Arcobacter* im Internet hinterlegt (83). Andere Studien konnten ebenfalls mit dieser Methode die Heterogenität von *Arcobacter* aus Lebensmittel-, Tierfäzes- und Schlachthofproben bestätigen, wobei vermutet wird, dass das stetige Finden von neuen ST und die daraus resultierende hohe Diversität auf die noch begrenzte Anzahl der in der Datenbank vorhandenen Sequenzen zurückzuführen ist (65, 84, 85).

Die PFGE wurde bislang in der epidemiologischen Analyse von Krankheitserregern aufgrund der hohen Auflösung als Goldstandard für mikrobielle genetische Fingerprints angesehen (86). Für *Arcobacter* wurde diese Methode einerseits zur Bewertung der genetischen Diversität eingesetzt, erwies sich andererseits aber auch für die Erkennung bzw. Überwachung von Ausbrüchen als sinnvoll (25, 87). Hume et al. (2001) konnten eine große genotypische Vielfalt unter *Arcobacter*-Isolaten in einem Schweinezuchtbetrieb ermitteln, die unter anderem auf genomische Veränderungen, wie zum Beispiel Rekombination, während der Aufzucht schließen lässt (25). Bei der Typisierung von Isolaten verschiedener Fleischproben konnten teilweise Übereinstimmungen der PFGE-Profile entdeckt werden, die durch eine Kreuzkontamination entstanden sein könnten (87). Obwohl die PFGE oft als Goldstandard für die Genotypisierung dargestellt wird, handelt es sich hierbei um eine Methode, die sowohl sehr zeit- als auch kostenintensiv ist.

Die AFLP-Methode wird auch zur Evaluierung der genetischen Diversität von *Arcobacter* eingesetzt und konnte ebenfalls ein hohes Maß an Heterogenität von *Arcobacter*-Isolaten verschiedenen Ursprungs und geografischer Herkunft ermitteln. Darüber hinaus konnte durch die als effektiv und reproduzierbar beschriebene Methode eine potentiell neue *Arcobacter*-Spezies identifiziert werden (81, 82).

Auch mit der RAPD-PCR konnte die genetische Diversität von *Arcobacter*-Isolaten, die beispielsweise von Hühnerkarkassen isoliert wurden, gezeigt werden (88). Houf et al. (2002) optimierten sowohl RAPD-PCR als auch ERIC-PCR für die genetische Charakterisierung von *Arcobacter*-Isolaten aus Geflügelfleisch und konnten im direkten Vergleich zeigen, dass sich die genetischen Fingerprint-Profile, die mit der ERIC-PCR erhalten wurde, als komplexer und besser reproduzierbar erwiesen, als die der RAPD-PCR (80).

Die bevorzugte Methode für die Genotypisierung von *Arcobacter* stellt die ERIC-PCR dar. Dabei

handelt es sich um eine PCR-basierte Methode, die Bereiche innerhalb repetitiver DNA-Sequenzen (ERIC-Sequenzen), die mehrfach im Genom von Bakterien vorkommen können, amplifiziert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung ergibt sich ein spezifisches Bandenmuster, das zum Vergleich von Stämmen herangezogen wird.

So konnte mittels ERIC-PCR die genotypische Identität von klinischen *A. butzleri*-Stämmen, die bei einem Ausbruch von Gastroenteritis an einer italienischen Schule aus den Stuhlproben von Kindern isoliert wurden, nachgewiesen werden (89). Andererseits konnte bei der Charakterisierung von *A. butzleri*-Isolaten aus mechanisch zerlegten Puten einzelner Aufbereitungsanlagen eine hohe Heterogenität durch ERIC-PCR ermittelt werden, was auf das Vorhandensein mehrerer Kontaminationsquellen auf dem Schlachthof schließen lässt. Des Weiteren wurde die ERIC-PCR genutzt, um die Verwandtschaft neuer Isolate zu untersuchen und deren taxonomische Einordnung in neue Spezies zu unterstützen (90).

Mehrere Studien untersuchten mittels ERIC-PCR die genetische Diversität von *Arcobacter*-Isolaten verschiedener Herkunft, wie aus Lebensmitteln, Wasser und von Nutztieren, und konnten dabei eine hohe Heterogenität der Stämme feststellen (28, 29, 80, 91-95). Bisher gibt es nur wenige Studien, die sich mit der Genotypisierung von *Arcobacter* spp. aus humanen Stuhlproben beschäftigt haben. Dennoch konnte anhand von ERIC-PCR und PFGE für alle in den jeweiligen Studien untersuchten Isolate der Spezies *A. butzleri* und *A. cryaerophilus* verschiedene Genotypen bestimmt werden (70, 74, 95, 96).

Die hohe genetische Heterogenität von *Arcobacter*-Isolaten ist vermutlich auf verschiedene Gründe zurückzuführen, wie auf das Vorhandensein mehrerer Kontaminationsquellen aber auch auf genomische Rekombination (80). In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie bildeten 52 *A. cryaerophilus*-Stämme unterschiedlicher geografischer Herkunft nach der Typisierung mit MLST vier Cluster, sodass die Unterteilung dieser Spezies in vier Genomovare vorgeschlagen wurde, was die bisher ermittelte genetische Heterogenität von *A. cryaerophilus* erklären könnte (14). Während einerseits kein Zusammenhang zwischen verschiedenen Genotypen und der Herkunft von Lebensmittelisolaten erkennbar war (84, 93), konnten andererseits bei der Clusteranalyse von Tier- und Humanisolaten genetische Übereinstimmungen gezeigt werden, die für eine womöglich zoonotische Übertragung von *Arcobacter* sprechen (95).

## 2.6. Pathogenität und Virulenzfaktoren

### 2.6.1. Vorhandensein von Virulenzgenen

Im Genom vom Referenzstamm *A. butzleri* RM4018 konnten bisher die zehn putativen Virulenzfaktoren *ciaB*, *cadF*, *cj1349*, *pldA*, *tlyA*, *mviN*, *hecA*, *hecB*, *irgA*, und *iroE* identifiziert werden, die Homologien zu Virulenzfaktoren anderer Bakterien, vor allem von *C. jejuni* und *E. coli* aufweisen (12). Die Funktionen der verschiedenen Gene sollen im Weiteren kurz erläutert werden. Das Genprodukt von *ciaB* ist in *Campylobacter* mit der Invasion in die Wirtszelle assoziiert (97). *cadF* und *cj1349* codieren in *Campylobacter* für äußere Membranproteine, die durch die Bindung an Fibronectin den Zellkontakt zu intestinalen Epithelzellen ermöglichen (98, 99). Zwei weitere Proteine, PldA und TlyA, sind mit der Hämolyse von Erythrozyten assoziiert; dabei codiert *pldA* für ein in die äußere Membran integriertes Enzym Phospholipase A (100), und *tlyA* codiert ein Hämolysin (101). Das in *Arcobacter* identifizierte *mviN* Gen zeigt Homologien zu einem Gen aus *E. coli*, das für ein Protein codiert, welches an der Peptidoglycanbiosynthese beteiligt ist (102). Das Gen *hecA* codiert in *Erwinia crysanthemi* ein Adhäsins, das zur Familie der filamentösen Hämagglutinine gehört und mit der Anheftung an Wirtszellen assoziiert wird (103). Das Genprodukt von *hecB* ist ein Hämolysin-Aktivierungsprotein (12). Der eisenregulierte Enterobactin-Rezeptor IrgA und das periplasmatische Enzym IroE sind mit der Eisenaufnahme in *E. coli* assoziiert und werden dadurch auch mit der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Infektion in Verbindung gebracht (104, 105). Bisher ist es jedoch noch unklar, ob diese vermeintlichen Virulenzfaktoren auch tatsächlich die gleichen Funktionen in *Arcobacter* haben, wie sie für ihre Homologen in anderen Bakterienarten beschrieben sind.

**Tabelle 2: Überblick der Präsenz von putativen Virulenzgenen in *Arcobacter* spp.**

Spezies	Stammherkunft	Anteil positiver Isolate für VAGs in %										Referenz
		<i>ciaB</i>	<i>cj1349</i>	<i>cadF</i>	<i>tlyA</i>	<i>pldA</i>	<i>mviN</i>	<i>hecA</i>	<i>hecB</i>	<i>iroE</i>	<i>irgA</i>	
<i>A. butzleri</i> (n=78)		100	100	100	100	100	100	21	86		35	Doudah et al. (2012) (106)
<i>A. cryaerophilus</i> (n=22)	Humanisolate	91	73	64	54	59	100	9	36	n.u.	5	
<i>A. skirrowii</i> (n=1)		100	100	100	100	100	100	0	0		0	
<i>A. butzleri</i> (n=52)	Human-, Lebensmittel- und Wasserisolate	100	100	100	100	100	100	13	44	60	15	Karadas et al. (2013) (107)
<i>A. butzleri</i> (n=113)	Tierfäzes-, Schlachthaus- und Wasserisolate	100	100	100	100	100	100					Tabatabatei et al. (2014) (108)
<i>A. cryaerophilus</i> (n=40)		98	45	55	38	33	90		n.u.			
<i>A. skirrowii</i> (n=15)		87	60	53	40	13	80					
<i>A. butzleri</i> (n=40)	Lebensmittelisolate	100	100	100	98	100	100	48	45	40	35	Lehmann et al. (2015) (93)
<i>A. butzleri</i> (n=47)	Lebensmittelisolate	100	100	100	100	100	100	19	28	17	4	Girbau et al. (2015) (109)
<i>A. cryaerophilus</i> (n=10)		100	20	10	40	10	100	30	0	0	20	
<i>A. butzleri</i> (n=75)	Fleischproduktisolate	97	66	89	100	92	97	30	48		46	Zacharow et al. (2015) (110)
<i>A. cryaerophilus</i> (n=6)		100	0	17	50	0	50	0	0	n.u.	0	
<i>A. butzleri</i> (n=212)	Umweltisolate	100	97	96	98	97	98	22	16	30	14	Piva et al. (2017) (111)
<i>A. butzleri</i> (n=16)	Human-, Tierfäzes- und Lebensmittelisolate	100	100	100	100	100	100					Sekhar et al. (2017) (112)
<i>A. cryaerophilus</i> (n=13)		85	77	62	62	62	77		n.u.			
<i>A. skirrowii</i> (n=12)		92	83	50	50	50	67					
<i>A. butzleri</i> (n=80)	Human-, Lebensmittel- und Wasserisolate	99	95		95	99	98	31	39		23	Silha et al. (2019) (113)
<i>A. cryaerophilus</i> (n=22)		96	0	n.u.	32	9	91	0	0	n.u.	0	

n.u. = nicht untersucht; VAG = Virulenz-assoziierte Gene

Bisher gab es schon einige Studien, die das Vorhandensein dieser putativen Virulenzgene, vor allem in *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und teilweise auch *A. skirrowii*, mittels PCR untersucht haben (93, 106-109, 112). Ein Überblick darüber verschafft Tabelle 2. Insgesamt wird deutlich, dass sechs dieser putativen Virulenzgene, und zwar *ciaB*, *cj1349*, *cadF*, *tlyA*, *pldA* und *mviN*, am häufigsten in *A. butzleri* detektiert werden, unabhängig von der Herkunft der Isolate. Die Prävalenzen liegen dabei in den meisten Studien zwischen 98 und 100 % (106-108, 111-113), während eine Studie aus Polen geringere Prävalenzen zwischen 66 und 97 % für die genannten Gene, bis auf *tlyA*, detektierte (110). Die Gene *hecA*, *hecB* und *irgA* wurden in geringeren Raten in *A. butzleri* detektiert, mit Prävalenzen von 13 bis 48 % für *hecA*, 16 bis 86 % für *hecB* und 4 bis 35 % für *irgA* (93, 106, 107, 109-111, 113). Das Gen *iroE* wurde bisher nur vereinzelt in den Untersuchungen miteingebunden, und es konnten Prävalenzen von 17 bis 60 % ermittelt werden (93, 107, 109, 111).

In *A. cryaerophilus*-Isolaten konnten insgesamt weniger dieser putativen Gene nachgewiesen werden. Zu den am häufigsten detektierten Genen gehören *ciaB* und *mviN* mit Prävalenzen von 85 bis 100 % bzw. 50 bis 100 % (106, 108-110, 112, 113). Die Detektionsraten für die anderen Gene variierten stark.

Bisher gibt es nur einzelne Studien, die sich mit der Prävalenz von putativen Virulenzgenen in *A. skirrowii* befasst haben. Nur die sechs Gene, die in *A. butzleri* Isolaten am häufigsten detektiert wurden (*ciaB*, *cj1349*, *cadF*, *tlyA*, *pldA* und *mviN*), konnten auch in *A. skirrowii* mit unterschiedlichsten Prävalenzraten nachgewiesen werden (106) bzw. wurden nur diese in den Untersuchungen überhaupt betrachtet (108, 112). Da die verwendeten Primer zur Detektion der Gene auf Basis des *A. butzleri*-Genoms entwickelt wurden, können die Unterschiede in der Detektion und insgesamt die geringere Anzahl an Virulenzgenen, die in *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* nachgewiesen werden konnten, auf eine schlechtere Bindung der Primer an die Zielsequenzen aufgrund genetischer Heterogenität zurückzuführen sein (106).

Neben den oben genannten zehn putativen Virulenzgenen, die teilweise Homologien zu *Campylobacter* aufweisen, gibt es des Weiteren auch Virulenzfaktoren, die zwar in *C. jejuni* vorkommen, im Genom von *A. butzleri* jedoch nicht nachgewiesen werden konnten, wie zum Beispiel das Cytolethal-Disseminating Toxin (CDT) (12). Dabei handelt es sich um ein Enterotoxin, das durch die drei Untereinheiten *cdtA*, *cdtB* und *cdtC* codiert wird und an der Hemmung der Zellteilung von eukaryotischen Zellen beteiligt ist (114). Die Expression von CDT konnte in mehreren *C. jejuni*-Stämmen nachgewiesen werden, und es wird vermutet, dass es als einer von mehreren Virulenzfaktoren zu deren Pathogenität beiträgt (114-116). Während bisherige Studien die Abwesenheit der CDT-Gene im Genom von *A. butzleri* beschreiben (12, 117) konnten diese

erst kürzlich in *A. lanthieri*- und *A. faecis*-Isolaten nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurden in dieser Studie mittels spezies-spezifischer Primer die putativen Virulenzgene *cadF*, *ciaB*, *mviN*, *pldA*, *tlyA* und *irgA* in 80 bis 100 % der untersuchten Stämme identifiziert (118).

### 2.6.2. Pathomechanismen von *Arcobacter*

Bisher haben sich nur wenige Studien mit der Untersuchung zum pathogenen Potential von *Arcobacter* beschäftigt. Neben Studien zum Vorkommen von putativen Virulenzgenen, wurden des Weiteren die adhäsiven, invasiven und zytotoxischen Fähigkeiten von *Arcobacter* spp. an verschiedenen Zelllinien *in vitro* getestet und auch erste *in vivo*-Untersuchungen durchgeführt, um die pathogenen Mechanismen, die hinter einer Infektion mit *Arcobacter* stehen, aufzuklären.

Die Adhäsion von pathogenen Mikroorganismen an die Oberfläche der Wirtszelle, wie z. B. Epithelzellen, stellt den ersten Schritt in der Etablierung einer Infektion dar und wird durch Adhäsine, den bakteriellen Oberflächenproteinen, vermittelt. Dadurch kann es zur Ansiedlung oder in manchen Fällen auch zum Eindringen der Bakterien in die Wirtszelle, auch Invasion genannt, kommen, was wiederum deren Vermehrung und Verbreitung in andere Gewebe oder auch deren Persistenz ermöglicht (119). Die Fähigkeit von *Arcobacter*, an Zelloberflächen anzuhaften, wurde bereits an verschiedenen Zelllinien, wie Hep-2, Caco-2, IPI-2I, HeLa, INT407 und HT-29 getestet und auch nachgewiesen (70, 107, 120-125). Dabei wurden überwiegend *A. butzleri*- und *A. cryaerophilus*-Isolate diverser Herkunft untersucht, und es konnten Unterschiede in der Adhäsionsfähigkeit festgestellt werden. Bei der Untersuchung von *A. cryaerophilus*-Isolaten aus humanen Stuhlproben zeigten beispielsweise 57 % der Isolate eine Adhäsion an Hep-2-Zellen, während nur 29 % an Caco-2-Zellen anhafteten (70). Des Weiteren konnte einerseits für alle untersuchten *A. butzleri*-Isolate aus Flusswasser die Adhäsion an Hep-2-Zellen nachgewiesen werden (121), während in einer anderen Studie die *A. butzleri*-Stämme (17/18), die auch aus Flusswasser isoliert wurden, keine Adhäsion an HeLa- oder INT407-Zellen zeigten (125). Tier- und Fleischisolate erwiesen sich hingegen alle als an Caco-2-, IPI-2I- und Hep-2-Zellen adhäsiv (121, 123, 124). Neben den hauptsächlich betrachteten Spezies *A. butzleri* und *A. cryaerophilus* wurden auch andere Spezies auf ihre Adhäsionsfähigkeit hin untersucht. Levican et al. (2013) analysierten in ihrer Studie insgesamt 60 *Arcobacter*-Stämme unterschiedlicher Herkunft, die 16 verschiedenen Spezies angehörten, und konnten zeigen, dass fast alle Spezies (14/16) in der Lage waren, an die humane Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 anzuhaften (124).

Einen weiteren wichtigen Schritt im Verlauf einer Infektion stellt die Invasion in eukaryotische Zellen dar. Die Invasionsfähigkeit von *Arcobacter* wurde meist im direkten Zusammenhang mit

der Adhäsionsfähigkeit und daher auch an den bereits genannten Zelllinien, wie HeLa, INT407, Caco-2, IPI-2I und HT-29 getestet (70, 107, 124, 125). In der Studie von Musmanno et al. (1997) konnten die analysierten *A. butzleri*-Isolate aus Flusswasser weder in HeLa- noch in INT407 eindringen, und bis auf ein Isolat zeigten sich diese auch nicht adhäsiv (125). Im Gegensatz dazu zeigten in der Studie von Levican et al. (2013) alle untersuchten Stämme der Spezies *A. cryaerophilus*, *A. butzleri* und *A. skirrowii* eine Adhäsion an Caco-2-Zellen, und bis auf jeweils ein *A. butzleri*- und ein *A. skirrowii*-Isolat konnten alle Stämme zusätzlich in die humanen Epithelzellen eindringen (124). Andere Studien zeigten hingegen keine Korrelation zwischen Adhäsions- und Invasionsfähigkeit. Während alle acht getesteten Stämme in der Studie von Ho et al. (2007) in der Lage waren, an den Zelllinien Caco-2 und IPI-2I anzuhaften, zeigten nur die zwei Stämme der Spezies *A. cryaerophilus* eine Invasion in dieselben Zelllinien (123). Karadas et al. (2013) untersuchten *A. butzleri*-Stämme aus Human- und Hähnchenfleischproben, die zwar alle eine Adhäsion an Caco-2-Zellen und auch eine Invasion in diese aufwiesen, auf HT-29-Zellen sich hingegen nur jeweils zwei der Stämme als adhäsiv zeigten und nur ein Humanisolat und die beiden Hähnchenisolate invasiv waren (107). Zusammengefasst können die beobachteten Unterschiede in der Adhäsions- bzw. Invasionsfähigkeit von *Arcobacter* vermutlich auf die Verwendung verschiedener Zelllinien, die verschiedenen Herkunftsquellen der Stämme oder aber auch auf unterschiedliche Untersuchungsprotokolle zurückzuführen sein (107, 123, 125). Des Weiteren kann es ein Indiz dafür sein, dass verschiedene Spezies bzw. Stämme von *Arcobacter* auch verschiedene Virulenzmechanismen besitzen (126).

Einen weiteren Pathogenitätsfaktor, neben dem Anheften und Eindringen des Bakteriums in die Wirtszelle, stellen bakterielle Toxine dar, welche maßgebend an der Zellschädigung beteiligt sein können (127). In einigen *Campylobacter* spp. konnte die Expression eines Enterotoxins, dem CDT, nachgewiesen werden, und es wird davon ausgegangen, dass dieses Toxin, neben anderen Virulenzfaktoren, zu deren Pathogenität beitragen könnte (114-116). Im Genom von *A. butzleri* konnte bereits das Vorhandensein putativer Virulenzfaktoren, die Homologien zu *Campylobacter* aufweisen, bestätigt werden, das Vorkommen von CDT jedoch wurde bisher nicht aufgezeigt (12, 117). Johnson and Murano (2002) untersuchten in ihrer Studie 26 *Arcobacter*-Stämme der Spezies *A. butzleri* und *A. cryaerophilus* unterschiedlicher Herkunft und konnten mittels PCR keine CDT-Gene nachweisen. Dennoch zeigten ausgewählte Isolate *in vitro* eine zytotoxische Wirkung auf INT407- und HeLa-Zellen, was sich im langsameren Wachstum, dem Abrunden der Zellen, Zellablösungen und Zelltod äußerte. Daher wurde vermutet, dass von *Arcobacter* ein CDT-differentes Toxinmolekül gebildet wird, welches die zytotoxische Aktivität induziert (117). Bereits in einer früheren Studie konnte für 95 % der untersuchten *A. butzleri*-Isolate aus

Flusswasser eine zytotoxische Wirkung auf Vero- und CHO-Zellen nachgewiesen werden, was sich morphologisch im Abrunden der Zellen sowie Zellkernpyknosen zeigte (125). Andere Studien konnten ebenfalls ein Abrunden von Vero-Zellen nach *Arcobacter*-Infektion und damit deren zytotoxische Aktivität aufzeigen (120, 122). In einer Studie von Villarruel-Lopez et al. (2003) erwiesen sich 95 % der untersuchten Schweinefleischisolate als zytotoxisch auf Vero-Zellen, was sich unter anderem in einer Elongation und Vakuolenproduktion äußerte (126). In den bisher genannten Studien wurde die Cytotoxizität von *Arcobacter* anhand morphologischer Beobachtungen detektiert. Karadas et al. (2016) untersuchten hingegen die Cytotoxizität von *A. butzleri* mittels enzymatischem Nachweis der Zellviabilität. HT-29/B6-Zellen wurden dafür mit Isolaten aus Human- und Hähnchenfleischproben inokuliert, und zwei Stämme (je ein Human- und Hähnchenstamm) erwiesen sich als stark zytotoxisch (128). Interessanterweise konnten für die gleichen Stämme in vorangehenden Untersuchungen weder adhäsive noch invasive Eigenschaften nachgewiesen werden (107), ähnlich wie in anderen Studien (120, 125), was auf stamm-spezifische Pathomechanismen schließen lässt (128).

Während für *A. butzleri* vermutet wird, dass die Toxizität in den Wirtszellen durch ein CDT-differentes Toxin hervorgerufen wird, konnte dieses jedoch erst kürzlich in zwei anderen *Arcobacter*-Spezies, nämlich *A. lanthieri* und *A. faecis*, nachgewiesen werden, sodass auch übergreifend von spezies-spezifischen Pathomechanismen ausgegangen wird (118).

Neben den *in vitro*-Untersuchungen zu Adhäsion, Invasion und Zytotoxizität konnte zusätzlich gezeigt werden, dass *A. butzleri* Barriere-Funktionsstörungen in HT-29/B6-Monolayern hervorrufen kann, die die bakterielle Translokation vereinfachen und somit als potentielle Mechanismen zur Induktion von Durchfall beim Menschen angesehen werden (128, 129). Zur weiteren Aufklärung bezüglich der Pathogenese wurden ebenfalls Studien zu potentiellen immunpathogenen Mechanismen durchgeführt. Zum einen konnte die Expression des Entzündungsmediators Interleukin-8 (IL-8) durch Caco- und IPI-2I-Zellen in Folge einer Infektion mit *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* und *A. cibarius* nachgewiesen werden (123). Die Induktion der Freisetzung des Zytokins IL-8 wird als wesentlicher Virulenzmechanismus in *Campylobacter* spp. und *Helicobacter pylori* angesehen (130). Zum anderen konnte auch im Maus-Modell die Induktion einer pro-inflammatorischen Entzündungsreaktion nach der Infektion mit *A. butzleri* in Dün- und Dickdarm, sowie eine extraintestinale und systemische Immunantwort nachgewiesen werden (131, 132). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass der Toll-like Rezeptor-4 (TLR-4) an der Entzündungsreaktion nach *A. butzleri*-Infektion beteiligt ist. Der TLR-4 erkennt unter anderem Lipopolysaccharide und Lipooligosaccharide aus der Zellwand gramnegativer Bakterien, sodass vermutet wird, dass diese

bakteriellen Bestandteile die Entzündungserkrankung von Magen und Darm verschlimmern (133, 134). Darüber hinaus konnten Veränderungen in der Expression von Genen, die für pro-inflammatorische, regulatorische und gewebsabbauende Moleküle kodieren, nach der Infektion mit *A. butzleri* detektiert werden (135). Um die immunpathogenen Eigenschaften von *Arcobacter* besser einordnen zu können, wurden in einer Meta-Analyse bisher durchgeführte Infektionsversuche im Maus-Modell verglichen, und es wurde deutlich, dass *A. butzleri* im Vergleich zu *C. jejuni* eine weniger stark ausgeprägte entzündungsfördernde Immunantwort induziert, aber dennoch eine stärkere lokale und systemische im Gegensatz zu *E. coli* (136).

Zusammenfassend konnte in den zuvor genannten Studien für *Arcobacter* neben der Fähigkeit zur Adhäsion, Invasion und zur Produktion von Toxinen auch die Induktion einer Entzündungsreaktion nachgewiesen werden, was zusammengenommen das humanpathogene Potential vor allem von *A. butzleri* unterstreicht. Bisher ist aber noch unklar, welche Virulenzfaktoren dafür verantwortlich sind.

### **2.7. Empfindlichkeit von *Arcobacter* gegenüber Antibiotika**

Die meisten *Arcobacter*-Infektionen verlaufen in der Regel eher mild und sind gewöhnlich selbstlimitierend. Eine Behandlung mit Antibiotika sollte demnach nur bei schweren klinischen Fällen zum Einsatz kommen, unter Beachtung der antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung, da ansonsten die Entwicklung von Resistenzen gefördert werden kann (59). Die Datenlage bezüglich der antimikrobiellen Empfindlichkeit von *Arcobacter* spp. ist bisher noch begrenzt und beschränkt sich vor allem auf die drei Spezies *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii*. Durch den Einsatz vieler verschiedener Testmethoden und dem Fehlen definierter Grenzwerte wird eine einheitliche Bewertung und der Vergleich von Studien untereinander erschwert. Mit der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) können Mikroorganismen anhand spezifischer Grenzwerte in die Kategorien „sensibel“, „sensibel bei erhöhter antimikrobieller Exposition“ und „resistent“ eingeordnet werden. Da für *Arcobacter* jedoch noch keine spezifischen Grenzwerte existieren, wurden in bisherigen Studien verschiedene Grenzwerte anderer Mikroorganismen genutzt, um die antimikrobielle Empfindlichkeit von *Arcobacter* zu bewerten. So dienten unter anderem Grenzwerte für Enterobakteriazeae oder *Staphylococcus* spp. gemäß CSLI-Richtlinie (Clinical Laboratory Standards Institute), Grenzwerte nach NARMS (National Antimicrobial Resistance Monitoring System) für *Campylobacter* oder EUCAST (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing) Grenzwerte für

Enterobakteriazeen, *Campylobacter* oder nicht artenbezogene Grenzwerte zur Beurteilung herangezogen (10, 137, 138).

Für die Behandlung von *Arcobacter*-Infektionen in der Human- und Tiermedizin wurden mehrere Antibiotika aus verschiedenen Gruppen vorgeschlagen, wie Fluorchinolone (59), Tetrazykline, Aminoglykoside (137, 139), Makrolide (140) und  $\beta$ -Laktam-Antibiotika (9).

Gegenüber dem Fluorchinolon Ciprofloxacin konnte in bisherigen Studien größtenteils eine hohe Empfindlichkeit von klinischen *A. butzleri*-Isolaten nachgewiesen werden, mit Empfindlichkeitsraten von 87 bis 100 % (74, 75, 96, 138, 141-143). Dies steht im Gegensatz zu klinischen *Campylobacter*-Isolaten, die hohe Resistenzraten von 45 bis 71,4 % aufwiesen (144, 145). Trotz der allgemein hohen Empfindlichkeit gegenüber Ciprofloxacin, wurden teilweise auch Resistenzraten von 21 bis 56 % in *A. butzleri*-Isolaten vom Geflügelschlachthof und aus Lebensmitteln detektiert (37, 146), und auch in 51 % von *A. cryaerophilus*-Isolaten aus Patienten mit Gastroenteritis konnte eine Resistenz beobachtet werden (143). Darüber hinaus ergab der Vergleich mehrerer Studien in einer Meta-Regressionsanalyse eine sich in den letzten Jahren entwickelnde Resistenz von *Arcobacter* gegenüber Fluorchinolonen. Als Hauptursache für den Erwerb der Resistenz gegen Ciprofloxacin bei *A. butzleri* und *A. cryaerophilus* wird eine Mutation innerhalb der QRDR (quinolone resistance-determining region) im *gyrA* Gen angesehen, die zu einer Aminosäuresubstitution von Threonin zu Isoleucin führt (141).

Die Sensitivität von *Arcobacter* gegenüber Tetrazyklin unterscheidet sich in den verschiedenen Studien. Während einerseits hohe Empfindlichkeitsraten humaner *Arcobacter*-Isolate zwischen 89 und 100 % gezeigt werden konnten (74, 138, 142, 143) und auch alle untersuchten Geflügelfleisch- und Wasserisolate in zwei weiteren Studien sich als sensibel erwiesen (147, 148), wurde andererseits bei Isolaten aus Lebensmitteln eine Resistenz in 95 bis 100 % der *A. butzleri*-Stämme beobachtet (38, 41). Eine Tetrazyklinresistenz kann auf verschiedene Mechanismen zurückzuführen sein: Efflux von Tetrazyklin unter ATP-Hydrolyse, Mutationen an der Bindungsstelle der 16S rRNA oder durch RPPs (ribosomal protection protein), wie zum Beispiel Tet(O), die Tetrazyklin durch GTP-Hydrolyse vom Ribosom entfernen. Im Genom von Tetrazyklin-resistenten *Arcobacter*-Stämmen konnten putative Resistenzproteine identifiziert werden, die Ähnlichkeiten zur MFS-Effluxpumpe und RPPs in *E. coli* aufweisen (17).

Eine sehr gute Wirkung gegen *Arcobacter* zeigen Aminoglykoside wie Gentamicin. Mehrere Studien konnten für Isolate aus Humanproben (74, 96, 138, 142, 143), Meeresfrüchte- und Wasserproben (148) und aus Geflügelfleischproben (147) hohe Sensitivitätsraten von 96 bis 100 % nachweisen. Dennoch konnte in einer Studie in Irland, in der fünf Schweineisolate untersucht wurden, über eine hohe Resistenzrate von 80 % berichtet werden (149). Die bakterielle Resistenz

gegenüber Aminoglykosiden wird hauptsächlich über die Inaktivierung dieser durch Aminoglykosid-modifizierende Enzyme bedingt (150).

Für Makrolide, insbesondere Erythromycin, konnten relativ geringe Resistenzraten zwischen 0 und 22 % bei *A. butzleri*-Isolaten aus humanen Stuhlproben (74, 75, 96, 138, 142, 143) detektiert werden, und auch Isolate aus Meeresfrüchten, Geflügelfleisch und Tieren zeigten sich sensitiv (147, 151, 152). In einzelnen Studien konnten allerdings hohe Resistenzraten von 80 - 100 % in *A. butzleri*-Isolaten aus Milch, Käse, Schweinen und Meeresfrüchten nachgewiesen werden, wobei jedoch nur eine geringe Anzahl an Stämmen untersucht wurde (17, 41, 149). Für Azithromycin, einem weiteren Makrolid, konnten bei Geflügelisolaten ebenfalls hohe Resistenzraten von bis zu 95 % detektiert werden (137, 147), und auch in einer Humanstudie wiesen etwa die Hälfte der untersuchten humanen Isolate eine Resistenz gegenüber Azithromycin auf (143). Die Sensitivität von *Arcobacter* gegenüber Erythromycin im Gegensatz zu Azithromycin ist bemerkenswert, da es sich bei beiden Antibiotika um Makrolide handelt. Aber auch in *Campylobacter*, wo man eigentlich eine Kreuzresistenz der beiden Antibiotika beobachten kann, konnte eine unterschiedliche Sensibilität in einzelnen Isolaten gezeigt werden (153). Bakterielle Resistenz gegenüber Makroliden stellt überwiegend die post-transkriptionelle Methylierung der 23S-rRNA dar. In Erythromycin-resistenten *A. butzleri*-Stämmen konnten auch Gene für rRNA Methyltransferasen mit Ähnlichkeiten zu *Enterococcus faecium* detektiert werden (17).

Gegenüber Ampicillin, einem Aminopenicillin aus der Gruppe der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, erwiesen sich 50 bis 100 % der *Arcobacter*-Isolate aus humanen Stuhlproben als resistent (74, 75, 138, 143). Ähnlich hohe Resistenzen konnten auch für Isolate aus Geflügelproben und Meeresfrüchten (146-148, 152) nachgewiesen werden. Die Resistenz von Bakterien gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika beruht im Allgemeinen auf der Produktion von Enzymen, den  $\beta$ -Laktamasen, die wiederum das Antibiotikum inaktivieren (154). Fanelli et al. (2019) konnten in *A. butzleri*-Isolaten, die sich als resistent gegenüber Ampicillin erwiesen, drei mutmaßliche  $\beta$ -Laktamase-Gene identifizieren (17).

### 3. Materialien

#### 3.1. Chemikalien und Enzyme

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Enzyme

Substanz	Hersteller
Accutase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Agarose	Biozym, Hessisch-Oldendorf, D
Chelex 100 Resin	BioRad, München, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, D
dNTP Set	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, D
EDTA	Roth, Karlsruhe, D
ETEST <sup>®</sup> -Reagenzstreifen Ampicillin 0,016-256	bioMérieux, Nürtingen, D
ETEST <sup>®</sup> -Reagenzstreifen Azithromycin 0,016-256	bioMérieux, Nürtingen, D
ETEST <sup>®</sup> -Reagenzstreifen Ciprofloxacin 0,002-32	bioMérieux, Nürtingen, D
ETEST <sup>®</sup> -Reagenzstreifen Erythromycin 0,016-256	bioMérieux, Nürtingen, D
ETEST <sup>®</sup> -Reagenzstreifen Gentamicin 0,016-256	bioMérieux, Nürtingen, D
ETEST <sup>®</sup> -Reagenzstreifen Tetracyclin 0,016-256	bioMérieux, Nürtingen, D
Ethanol	Roth, Karlsruhe, D
fötale Kälberserum (FKS)	Lonza Bioscience, Köln, D
Gentamicin	Biochrom, Berlin, D
GR Green	Labgene, Châtel-Saint-Denis, CH
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5U/μl)	Qiagen, Venlo, NL
Tris/HCL	Roth, Karlsruhe, D
Trypanblau	Serva, Heidelberg, D
water soluble tetrazolium Reagenz (WST-1)	Roche Applied Science, Mannheim, D

#### 3.2. Lösungen, Puffer, Nährmedien

##### 3.2.1. Lösungen und Puffer

Tabelle 4: Verwendete Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Hersteller
10 x PCR Puffer	Qiagen, Venlo, NL
10 x TBE-Puffer	Roth, Karlsruhe, D

## Materialien

Lösung/Puffer	Hersteller
CoralLoad PCR Puffer	Qiagen, Venlo, NL
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ) Lösung [25 mM]	Qiagen, Venlo, NL
PBS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
TE-Puffer	Roth, Karlsruhe, D

### 10 x PCR Puffer

- Tris-Cl, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 15 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 8,7

### 10 x TBE-Puffer

- 1,0 M Tris-Borat, 20 mM EDTA; pH 8,3
- für Gebrauchslösung 1:10 verdünnen

### 5 % Chelex 100 Resin Lösung

- 5 g Chelex Pulver auf 100 ml Aqua dest.

### CoralLoad PCR Puffer

- Tris-Cl, KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, Gel-Ladereagenz, oranger Farbstoff, roter Farbstoff; pH 8.7

### PBS

- 145 mM NaCl<sub>2</sub> in 150 mM Phosphatpuffer; pH 7,2

### TE-Puffer

- 1 mM Tris/HCl, 100 µM EDTA; pH 8

## 3.2.2. Nährmedien

### Anreicherungsmedium nach van Driessche et al. (2003) (27)

**Tabelle 5: Zusammensetzung des Anreicherungsmediums nach van Driessche et al (2003) (27)**

Zusammensetzung	Konzentration
<i>Arcobacter</i> broth (Oxoid, Wesel, D)	24 g/l
5'-Fluorouracil (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D)	100 mg/l

## Materialien

Zusammensetzung	Konzentration
Trimethoprim (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D)	64 mg/l
Novobiocin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D)	32 mg/l
Cefoperazone (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D)	16 mg/l
Amphotericin B (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D)	10 mg/l
lysiertes Pferdeblut (Oxoid, Wesel, D)	5 %

### Herstellung:

- 24 g *Arcobacter* broth in 1 l Aqua dest. lösen
- autoklavieren bei 121°C, 15 min
- nach Abkühlen auf ca. 50°C Zugabe der vorbereiteten Antibiotikallösungen (5'-Fluorouracil, Amphotericin B und Trimethoprim jeweils in DMSO gelöst, Novobiocin und Cefoperazone in Aqua dest. gelöst)
- anschließende Zugabe von 50 ml lysierten Pferdeblut
- pH-Wert von  $7,2 \pm 0,2$

### Selektivagar nach van Driessche et al. (2003) (27)

Tabelle 6: Zusammensetzung des Selektivagars nach van Driessche et al. (2003) (27)

Zusammensetzung	Konzentration
<i>Arcobacter</i> broth (Oxoid, Wesel, D)	24 g/l
Agar Nr. 3 (Oxoid, Wesel, D)	12 g/l
5'-Fluorouracil (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D)	100 mg/l
Trimethoprim (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D)	64 mg/l
Novobiocin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D)	32 mg/l
Cefoperazone (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D)	16 mg/l
Amphotericin B (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D)	10 mg/l

### Herstellung:

- 24 g *Arcobacter* broth und 12 g Agar Nr. 3 in 1 l Aqua dest. lösen
- autoklavieren bei 121°C, 15 min
- nach Abkühlen auf ca. 50°C Zugabe der vorbereiteten Antibiotikallösungen (5'-Fluorouracil, Amphotericin B und Trimethoprim jeweils in DMSO gelöst, Novobiocin und Cefoperazone in Aqua dest. gelöst)
- Einfüllen in sterile Petrischalen

## Materialien

- pH-Wert von  $7,2 \pm 0,2$

### **Müller-Hinton-Agar (MHB; Oxoid, Wesel, D) mit 5 % Schafblut**

**Tabelle 7: Zusammensetzung von Müller-Hinton-Agar**

Zusammensetzung	Konzentration
Rindfleisch, getrocknete Infusion aus 300 g	2,0 g/l
Caseinhydrolysat	17,5 g/l
Stärke	1,5 g/l
Agar	17,0 g/l
lysiertes Schafblut (Oxoid, Wesel, D)	5,0 %

#### Herstellung:

- 38 g in 1,0 l Aqua dest. lösen
- autoklavieren bei  $121^{\circ}\text{C}$ , 15 min
- nach Abkühlen auf ca.  $50^{\circ}\text{C}$  Zugabe von 50 ml defibrinierten Schafblut (Oxoid, Wesel, D)
- Einfüllen in sterile Petrischalen
- pH-Wert von  $7,3 \pm 0,1$

### **Brucella-Bouillon (BD Bioscience, Heidelberg, D)**

**Tabelle 8: Zusammensetzung von Brucella-Bouillon**

Zusammensetzung	Konzentration
Tryptone	10,0 g/l
Peptamin	10,0 g/l
Glucose	1,0 g/l
Hefeextrakt	2,0 g/l
Natriumchlorid	5,0 g/l
Natriumbisulfit	0,1 g/l

#### Herstellung:

- 28 g in 1,0 l Aqua dest. lösen
- autoklavieren bei  $121^{\circ}\text{C}$ , 15 min
- pH-Wert von  $7,0 \pm 0,2$

**Rohmedium RPMI 1640 (Lonza Bioscience, Köln, D)**

supplementiert mit:

- 10 % FKS
- 10 µg/ml Gentamicin

**3.3. Reagenzsysteme****Tabelle 9: Verwendetes Reagenzsystem**

Reagenzsystem	Verwendung	Hersteller
GeneJET PCR Purification Kit	DNA Aufreinigung	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, D

**3.4. Nukleinsäuren****Tabelle 10: Verwendete Nukleinsäure**

Nukleinsäure	Hersteller
GeneRuler 100bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, D

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma metabion international AG (Planegg, D) synthetisiert und in Aqua dest. gelöst.

**Tabelle 11: Verwendete Oligonukleotide**

Oligo-nukleotid	Sequenz (5'-3')	Produktgröße(bp)	Referenz
<i>Identifizierung von Arcobacter</i>			
ARCO R	CGT ATT CAC CGT AGC ATA GC		Houf et al. (2000) (155)
BUTZ F	CCT GGA CTT GAC ATA GTA AGA ATG A	401	Houf et al. (2000) (155)
SKIR F	GGC GAT TTA CTG GAA CAC A	641	Houf et al. (2000) (155)
CRY1	TGC TGG AGC GGA TAG AAG TA	257	Houf et al. (2000) (155)
CRY2	AAC AAC CTA CGT CCT TCG AC		Houf et al. (2000) (155)
<i>rpoB Sequenzierung</i>			
CamrpoB-L	CCA ATT TAT GGA TCA AAC	524	Korczak et al. (2006) (156)
RpoB-R	GTT GCA TGT TNG NAC CCA T		Korczak et al. (2006) (156)
<i>Genotypisierung</i>			
ERIC 1R	ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C		Houf et al. (2002) (80)
ERIC 2	AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G		Houf et al. (2002) (80)
<i>Detektion von putativen Virulenzgenen mit A. butzleri spezifischen Primern</i>			
<i>cadF</i> -F	TTA CTC CTA CAC CGT AGT	283	Douidah et al. (2012) (106)
<i>cadF</i> -R	AAA CTA TGC TAA CGC TGG TT		Douidah et al. (2012) (106)
<i>irgA</i> -F	TGC AGA GGA TGC TTG GAG CGT AAC T	437	Whiteduck-Leveillee et al. (2016) (157)
<i>irgA</i> -R	GTA TAA CCC CAT TGA TGA GGA GCA		Whiteduck-Leveillee et al. (2016) (157)
<i>hecA</i> -F	GTG GAA GTA CAA CGA TAG CAG GCT C	537	Whiteduck-Leveillee et al. (2016) (157)
<i>hecA</i> -R	GTC TGT TTT AGT TGC TCT GCA GTC		Whiteduck-Leveillee et al. (2016) (157)

## Materialien

Oligo-nukleotid	Sequenz (5'-3')	Produktgröße(bp)	Referenz
<i>hecB</i> -F	CTA AAC TCT ACA AAT CGT GC	528	Whiteduck-Leveillee et al. (2016) (157)
<i>hecB</i> -R	CTT TTG AGT GTT GAC CTC		Whiteduck-Leveillee et al. (2016) (157)
<i>pldA</i> -F	TTG ACG AGA CAA TAA GTG CAG C	293	Whiteduck-Leveillee et al. (2016) (157)
<i>pldA</i> -R	CGT CTT TAT CTT TGC TTT CAG GGA		Whiteduck-Leveillee et al. (2016) (157)
<i>ciaB</i> -F	TGG GCA GAT GTG GAT AGA GCT TGG A	284	Whiteduck-Leveillee et al. (2016) (157)
<i>ciaB</i> -R	TAG TGC TGG TCG TCC CAC ATA AAG		Whiteduck-Leveillee et al. (2016) (157)
<i>cj1349</i> -F	CCA GAA ATC ACT GGC TTT TGA G	659	Whiteduck-Leveillee et al. (2016) (157)
<i>cj1349</i> -R	GGG CAT AAG TTA GAT GAG GTT CC		Whiteduck-Leveillee et al. (2016) (157)
<i>tlyA</i> -F	CAA AGT CGA AAC AAA GCG ACT G	230	Whiteduck-Leveillee et al. (2016) (157)
<i>tlyA</i> -R	TCC ACC AGT GCT ACT TCC TAT A		Whiteduck-Leveillee et al. (2016) (157)
<i>mviN</i> -F	TGC ACT TGT TGC AAA ACG GTG	294	Whiteduck-Leveillee et al. (2016) (157)
<i>mviN</i> -R	TGC TGA TGG AGC TTT TAC GCA AGC		Whiteduck-Leveillee et al. (2016) (157)
<i>iroE</i> -F	AAT GGC TAT GAT GTT GTT TAC	415	Karadas et al. (2013) (107)
<i>iroE</i> -R	TTG CTG CTA TGA AGT TTT		Karadas et al. (2013) (107)
Detektion von putativen Virulenzgenen mit <i>A. lanthieri</i> spezifischen Primern			
AL_cdtB F	GCA AAA GGT GAT TGG GCT CC	303	Zambri et al. (2019) (118)
AL_cdtB R	TCC TCC AGC TCC TTG AAC AC		Zambri et al. (2019) (118)
AL_cadF F	TCC AAC TCC AGT TGC TGC TC	243	Zambri et al. (2019) (118)
AL_cadF R	TGT CCT TCG ATG TCA GCT TTC		Zambri et al. (2019) (118)
AL_irgA F	AGA GCT GTT GGT TGG GAT GG	186	Zambri et al. (2019) (118)
AL_irgA R	TGC ATT TGC TCT TGT AGG GT		Zambri et al. (2019) (118)
AL_cdtC F	GAT GAA TCC ACC AGA AAT AGA G	196	Zambri et al. (2019) (118)
AL_cdtC R	TTT GGG ATC AAG AGT ATA AAG TTC		Zambri et al. (2019) (118)
AL_pldA F	TGC TCC ATT TAG AGA AAC TAA C	132	Zambri et al. (2019) (118)
AL_pldA R	GAA CGA GAT TCT TCA CCA TCT T		Zambri et al. (2019) (118)
AL_cdtA F	CAG GAA TAG ATC TCG CTA CAA ATG	220	Zambri et al. (2019) (118)
AL_cdtA R	TTT GGT AGA AGA GGA AGT TCA TTG		Zambri et al. (2019) (118)
AL_mviN F	ACC TTT GGT TCT TCA ACT TTA C	170	Zambri et al. (2019) (118)
AL_mviN R	CGT GCT ACC ATA GGA AAT AGG		Zambri et al. (2019) (118)
AL_ciaB F	GAT AGA TGC TAT TCT GCT CTT G	207	Zambri et al. (2019) (118)
AL_ciaB R	ATC TTC ACT AAA TGC TAC TAT T		Zambri et al. (2019) (118)
AL_tlyA F	GAC ATT GTA ACA TGT GAT GTA TCT T	125	Zambri et al. (2019) (118)
AL_tlyA R	TTT ACA TTT GTT CCC ACT TCA AA		Zambri et al. (2019) (118)

### 3.5. Kontrollstämme

Tabelle 12: Verwendete Kontrollstämme

Spezies	Stamm-bezeichnung	Bezugsquelle	Verwendung
<i>A. butzleri</i>	CCUG 30485	CCUG	DNA als Positivkontrolle bei Speziesidentifizierung durch mPCR, Speziesverifizierung anhand rpoB-Sequenzierung sowie Genotypisierung durch ERIC-PCR
<i>A. cryaerophilus</i>	DSM 7289	DSMZ	DNA als Positivkontrolle bei Speziesidentifizierung durch mPCR
<i>A. skirrowii</i>	CCUG 10374	CCUG	DNA als Positivkontrolle bei Speziesidentifizierung durch mPCR
<i>A. cryaerophilus</i>	ILSH 02659	FU-Berlin, ILSH	Negativkontrolle im Zytotoxizitätsassay
<i>C. jejuni</i>	81-176	ATCC	Positivkontrolle im Zytotoxizitätsassay
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	ATCC	Positivkontrolle für Antibiotikaempfindlichkeitstestungen

### 3.6. Zelllinien und Medien

Tabelle 13: Verwendete Zelllinie

Zelllinie	Beschreibung	Bezugsquelle	Verwendung
HT-29/B6	humane intestinale Adenokarzinomzellen, Subklon B6	FU-Berlin, Institut für Biochemie	Zytotoxizitätsassay

### 3.7. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 14: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Kryobank-Röhrchen	Mast Diagnostica, Reinfeld, D
Filterspitzen PP, 0 - 100 µl	Nerbe plus, Winsen/Luhe, D
Filterspitzen PP, 0,1 -10 µl	Nerbe plus, Winsen/Luhe, D
Filterspitzen PP, 100 - 1000 µl	Nerbe plus, Winsen/Luhe, D
Gasentwicklerbeutel CampyGen 2,5 l	Oxoid, Wesel, D
Impfnadeln, Ø 1,45 mm	VWR, Dresden, D
Impfösen, 1 µl	VWR, Dresden, D
Impfösen, 10 µl	VWR, Dresden, D
PCR SoftStrips mit Single Caps	Biozym, Hessisch-Oldendorf, D
Pipettenspitzen PP, 100 - 1000 µl	Nerbe plus, Winsen/Luhe, D
Pipettenspitzen, 0,1 - 10 µl	Nerbe plus, Winsen/Luhe, D
Pipettenspitzen, 1 - 100 µl	Nerbe plus, Winsen/Luhe, D
Reaktionsgefäße PP, 1,5 ml	Nerbe plus, Winsen/Luhe, D
Serologische Pipetten 10 ml	Nerbe plus, Winsen/Luhe, D
Serologische Pipetten 25 ml	Nerbe plus, Winsen/Luhe, D
Serologische Pipetten 5 ml	Nerbe plus, Winsen/Luhe, D
Stuhlröhrchen, 13 ml	Roth, Karlsruhe, D
TC-Flasche T75	Sarstedt, Nümbrecht, D
TC-Platte 96 Well	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zentrifugenröhrchen, 15 ml	VWR, Dresden, D

### 3.8. Geräte und Software

**Tabelle 15: Verwendete Geräte**

Geräte	Hersteller
AlphaImager	Alpha Innotec, Kasendorf, D
Anoxomat AN2CTS	Mart Microbiology B.V., Drachten, NL
FLUOstar OPTIMA Mikroplattenleser	BMG Labtech, Ortenberg, D
Inkubator BB15 CO <sub>2</sub>	Thermo Scientific, Bonn, D
Inkubator Typ 1532-2	VWR, Dresden, D
Inkubator Typ 700	Memmert, Schwabach, D
Lichtmikroskop Axiovert 40C	Carl Zeiss, Göttingen, D
Mikroskop Typ Standard KF 2	Carl Zeiss, Göttingen, D
NanoDrop 2000c Spektrophotometer	Thermo Scientific, Bonn, D
Sicherheitswerkbank ScanLaf Mars Safety Class 2	LaboGene, Lillerød, DK
Thermal Cycler C1000 oder S1000	BioRad, München, D
Thermomixer compact und comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Tischzentrifuge Typ 5418	Eppendorf, Hamburg, D
Tischzentrifuge Typ 5430 R	Eppendorf, Hamburg, D
UV Sterilizing PCR Workstation	Bender + Hobein AG, Bruchsal, D
Vortex Genie 2	Bender + Hobein AG, Bruchsal, D

**Tabelle 16: Verwendete Software**

Software	Anbieter
BioNumerics Version 7.1	Applied Maths, Sint-Martens-Latem, B
FLUOstar OPTIMA Software	BMG Labtech, Ortenberg, D
GraphPad-Prism, Version 5.04	GraphPad-Software, Inc., La Jolla, US

## **4. Methoden**

### **4.1. Probenmaterial**

Im Zeitraum Oktober 2017 bis Oktober 2018 wurden insgesamt 4636 Stuhlproben von drei verschiedenen diagnostischen Laboren in Berlin, Deutschland, für die Untersuchung auf *Arcobacter* spp. bereitgestellt. Darunter befanden sich sowohl ambulante als auch klinische Proben, die auf gängige bakterielle Enteropathogene untersucht werden sollten. Die Proben wurden bis zu einer Woche bei 4°C gelagert, bis sie gekühlt ins Labor transportiert und sofort verarbeitet wurden. Für eine zufällig ausgewählte und aus 2257 Stuhlproben von ambulanten Patienten bestehende Untergruppe wurden Daten über die Detektion anderer bakterieller Enteropathogene im Rahmen der Routinediagnostik zur Verfügung gestellt.

### **4.2. Bakteriologische Methoden**

#### **4.2.1. Kultureller Nachweis von *Arcobacter* spp.**

Soweit nicht anders gekennzeichnet, erfolgten alle Inkubationen bei 30°C in Anaerobiertöpfen, in denen zuvor entweder durch einen Anoxomaten (AN2CTS von MART Microbiology) oder durch den Einsatz von Gasentwicklerbeuteln (CampyGen, Oxoid, Deutschland) ein mikroaerobes Milieu erzeugt wurde.

Der kulturelle Nachweis von *Arcobacter* spp. wurde mit Hilfe eines selektiven Anreicherungsmediums nach van Driessche et al. (2003) durchgeführt (27). Dafür wurde 1 g der Probe in einem Verhältnis von 1:10 mit dem Anreicherungsmedium versetzt, gründlich gemischt und für 72 h inkubiert. Von der Anreicherung wurden zunächst 50 µl mit steriler Impföse auf selektive Agarplatten (ebenfalls nach van Driessche et al. (2003)) ausgestrichen und für weitere 48 h inkubiert. Von den Platten wurden bis zu sechs verdächtige Kolonien mit für *Arcobacter* typischer Morphologie (kleine, weiß oder grau runde Kolonien) auf Mueller-Hinton-Blutagar (MHB) subkultiviert und für weitere 48 h inkubiert. Daraufhin wurden die Reinkulturen für eine erste Identifizierung mikroskopiert. Dazu wurde ein Tropfen Aqua dest. auf einen Objektträger gegeben, etwas Koloniematerial darin suspendiert und bei 100-facher Vergrößerung mit einer Ölimmersion die Morphologie und Motilität betrachtet. Sofern bewegliche, spiralkrümmte Stäbchen erkennbar waren, wurde zunächst die DNA der verdächtigen Reinkulturen extrahiert, um

dann anschließend mittels speziesspezifischer mPCR und *rpoB*-Sequenzierung die Spezies identifizieren und bestätigen zu können. Bestätigte Isolate wurden bei -80°C in einer Kryobank gelagert.

### 4.2.2. Konservierung der Gebrauchsstämme

Bestätigte Isolate wurden in die institutseigene Stammsammlung aufgenommen und im Mikrobanksystem (Mast Diagnostika) nach Herstellerangaben konserviert. Dafür wurde eine Übernachtskultur der Stämme in BB angesetzt und in die hypertonische Konservierungslösung eines sterilen Kryobank-Röhrchens gegeben. Durch vorsichtiges Mischen kommt es zu einer Bindung der Mikroorganismen mit den im Röhrchen enthaltenen porösen Kügelchen. Nach Abnahme des Mediums wird das Kryogefäß bei -80°C gelagert.

### 4.2.3. Bakterienanzucht

Die Anzucht der kryokonservierten *Arcobacter*-Stämme erfolgte auf MHB-Agar. Dazu wurden unter sterilen Bedingungen ein bis zwei Kügelchen aus dem Kryoröhrchen auf eine Agarplatte gegeben und mit einer Impföse verstrichen. Anschließend wurden die Platten mindestens für 48 h mikroaerob inkubiert. Für Übernachtskulturen wurde etwas Koloniematerial in ca. 2 ml BB-Medium suspendiert und für 24 h inkubiert.

### 4.2.4. Bakterienaufbereitung für Zytotoxizitätsassay

Als Vorbereitung für die Durchführung der Zytotoxizitätsassays wurden *Arcobacter*-Stämme zunächst über Nacht kultiviert. Diese Vorkulturen wurden 1:100 in 10 ml BB verdünnt und für weitere 24 h inkubiert. Die Übernachtskulturen wurden anschließend für 10 min bei  $5000 \times g$  zentrifugiert und die Pellets in 1 ml PBS resuspendiert, um eine Zelldichte von ungefähr  $1 \times 10^8$  CFU/50  $\mu$ l zu erhalten. Um auch für die *A. cryaerophilus*-Isolate, die ein geringeres Wachstum aufwiesen, eine ähnlich hohe Konzentration zu erhalten, wurden von jedem Isolat jeweils drei Übernachtskulturen vorbereitet und für 48 h inkubiert. Die Kulturen wurden zusammengefügt, zentrifugiert und das entstandene Pellet in 600  $\mu$ l PBS resuspendiert.

### 4.3. Molekularbiologische Methoden

#### 4.3.1. Extraktion von genomischer DNA

Die Extraktion der genomischen DNA der Isolate erfolgte mittels modifizierter Chelex-Methode wie von Karadas et al. (2013) beschrieben (107). Grundsätzlich handelt es sich hierbei um eine Kochlyse, bei der die DNA aus den Zellen extrahiert wird. Der Abbau freiliegender DNA durch Nukleasen wird durch die Zugabe des Chelatbildners Chelex verhindert, indem dieser mehrwertige Kationen (z.B.  $Mg^{2+}$ -Ionen) bindet, die andernfalls DNA-abbauenden Enzymen als Cofaktor dienen.

Für die DNA-Extraktion wurde etwas Koloniematerial mit einer Impföse in 250  $\mu$ l TE-Puffer suspendiert und bei  $16.000 \times g$  für 6 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Pellet in 250  $\mu$ l Chelex (5 %) resuspendiert und die Probe zunächst für 1 h bei  $56^\circ C$  und anschließend für 10 min bei  $95^\circ C$  im Heizblock inkubiert. Daraufhin wurde erneut zentrifugiert ( $16.000 \times g$ , 5 min) und der Überstand entweder bei  $4^\circ C$  gelagert oder direkt in der mPCR für die Speziesidentifizierung verwendet.

#### 4.3.2. Speziesidentifizierung durch multiplex PCR

Die Speziesidentifizierung der verdächtigen Stämme erfolgte mittels multiplex Polymerase chain reaction (mPCR) nach Houf et al. (2002) (155). Durch den Einsatz von fünf Primern, basierend auf den 16S rRNA- und 23S rRNA-Sequenzen, ermöglicht diese PCR den simultanen Nachweis von *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii*. Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für die Amplifizierung sowie die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 17 und Tabelle 18 angegeben, die verwendeten Primer sind in Tabelle 11 zu finden.

**Tabelle 17: Zusammensetzung eines mPCR-Reaktionsansatzes**

Reagenzien	Konzentration im Reaktionsansatz	Volumen je Reaktionsansatz in $\mu$ l
10 x PCR-Puffer (inkl. 1,5 mM $MgCl_2$ )	1x	2,5
$MgCl_2$ [25 mM]	1,3 mM	1,3
dNTPs [10 mM]	0,2 mM	0,5
ARCO R [50 pmol/ $\mu$ l]	1 $\mu$ M	0,5
BUTZ F [50 pmol/ $\mu$ l]	1 $\mu$ M	0,5
SKIR F [50 pmol/ $\mu$ l]	0,5 $\mu$ M	0,25

## Methoden

Reagenzien	Konzentration im Reaktionsansatz	Volumen je Reaktionsansatz in $\mu\text{l}$
CRY1 [50 pmol/ $\mu\text{l}$ ]	1 $\mu\text{M}$	0,5
CRY2 [50 pmol/ $\mu\text{l}$ ]	1 $\mu\text{M}$	0,5
Taq-Polymerase [5 U/ $\mu\text{l}$ ]	0,75 U	0,15
DNA-Template		2
Aqua dest.		16,3
		$\Sigma$ 25

**Tabelle 18: Reaktionsbedingungen der mPCR**

Reaktionsschritt	Zeit in sek	Temperatur in $^{\circ}\text{C}$
Initiale Denaturierung	120	94
32 x		
Denaturierung	45	94
Primer Anlagerung	45	61
Elongation	30	72
Finale Elongation	300	72
Kühlung	$\infty$	12

Zur Überprüfung der Reaktion wurden immer Positivkontrollen und eine Negativkontrolle mitgeführt. Für die Positivkontrollen wurde die DNA der Referenzstämme *A. butzleri* CCUG 30485, *A. cryaerophilus* DSM 7289 und *A. skirrowii* CCUG 10374 jeweils als Template eingesetzt, und Aqua dest. diente als Negativkontrolle.

### 4.3.3. Agarose-Gelelektrophorese

Die durch die mPCR entstandenen DNA-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Es wurde ein 3%iges Agarose-Gel verwendet. Zur Herstellung des Gels wurde die entsprechende Menge an Agarose in 1xTBE-Puffer gegeben und bis zum vollständigen Lösen in der Mikrowelle erhitzt. Nach einer Abkühlphase wurde die Lösung in die Gelkammer gegeben und der Gelkamm eingesetzt. Nach vollständiger Verfestigung wurde der Kamm entnommen und das Gel in der Gelelektrophorese-Apparatur mit 1x TBE-Puffer bedeckt. Jeweils 8  $\mu\text{l}$  der DNA-Amplifikate wurden mit 2  $\mu\text{L}$  Ladepuffer (CoralLoad PCR-Puffer versetzt mit GR Green (50:1)) vermischt und in die Vertiefungen des Gels pipettiert. Die Proben wurden bei 80 Volt aufgetrennt. Als Längenmarker wurde der GeneRuler 100bp DNA Marker verwendet. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht.

#### 4.3.4. Speziesverifizierung durch *rpoB* Sequenzierung

Von mPCR-positiven Isolaten wurde zusätzlich das Housekeeping Gen *rpoB* amplifiziert und sequenziert, um die Speziesidentität zu verifizieren. Die Amplifizierung des *rpoB* Gens erfolgte mittels PCR und Primer von Korczak et al. (2006) (156). Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für die Amplifizierung sowie die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 19 und Tabelle 20 angegeben, die verwendeten Primer sind in Tabelle 11 zu finden.

**Tabelle 19: Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes zur Amplifizierung von *rpoB***

Reagenzien	Konzentration im Reaktionsansatz	Volumen je Reaktionsansatz in $\mu\text{l}$
10 x PCR-Puffer (inkl. 1,5 mM $\text{MgCl}_2$ )	1x	5
$\text{MgCl}_2$ [25 mM]	1 mM	2
dNTPs [10 mM]	0,2 mM	1
CamrpoB-L [50 pmol/ $\mu\text{l}$ ]	0,4 $\mu\text{M}$	0,2
RpoB-R [50 pmol/ $\mu\text{l}$ ]	0,4 $\mu\text{M}$	0,2
Taq-Polymerase [5 U/ $\mu\text{l}$ ]	1 U	0,2
DNA-Template		4
Aqua dest.		37,4
		$\Sigma$ 50

**Tabelle 20: Reaktionsbedingungen der PCR zur Amplifizierung von *rpoB***

Reaktionsschritt	Zeit in sek	Temperatur in $^{\circ}\text{C}$
Initiale Denaturierung	180	95
35 x		
Denaturierung	30	94
Primer Anlagerung	30	54
Elongation	30	72
Finale Elongation	420	72
Kühlung	$\infty$	12

Zur Überprüfung der Reaktion wurde die DNA von *A. butzleri* CCUG 30485 als Positivkontrolle und Aqua dest. als Negativkontrolle mitgeführt. Die Darstellung der PCR-Produkte erfolgte anschließend in der Gelelektrophorese wie in 4.3.3 beschrieben. Positive Amplifikate wurden anschließend mithilfe des GeneJET PCR Purification Kit nach Herstellerangaben aufgearbeitet, um Primer, Nukleotide, Salze und Polymerasen aus dem PCR-Ansatz zu entfernen. Für die

## Methoden

Sequenzierung wurden 5 µL des aufgereinigten PCR-Produktes (80 – 100 ng/µl) mit jeweils 5 µl der Primer CamrpoB-L und RpoB-R (5 µM) versetzt. Dieser Reaktionsansatz wurde von der Firma GATC (Eurofins GATC Biotech, Konstanz, Deutschland) sequenziert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von BioNumerics und dem Vergleich der Sequenzen mit dem BLAST Algorithmus der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI), um letztendlich die Spezies bestimmen zu können.

### 4.3.5. Genotypisierung von *Arcobacter* mittels ERIC-PCR

Um die genetische Diversität der identifizierten Isolate zu bewerten, wurden diese mittels ERIC-PCR genotypisiert. Die ERIC-PCR ist ein etabliertes Verfahren zur Typisierung von *Arcobacter* und basiert auf der Amplifikation repetitiver DNA Elemente. Die sogenannten ERIC-Sequenzen sind 127 bp große Abschnitte im nicht-codierenden Bereich, die in mehrfacher Ausführung im Genom aller Arten der *Enterobacteriaceae* vorkommen können. Konsensus-Primer binden an diese Sequenzen und amplifizieren die DNA-Abschnitte zwischen diesen Bereichen, die sich in ihrer Größe unterscheiden und somit nach gelelektrophoretischer Auftrennung ein spezifisches Bandenmuster ergeben. Die ERIC-PCR wurde nach Houf et al. (2002) durchgeführt (80). Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für die Amplifizierung sowie die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 20 und Tabelle 21 angegeben, die verwendeten Primer sind in Tabelle 11 zu finden.

**Tabelle 21: Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes der ERIC-PCR**

Reagenzien	Konzentration im Reaktionsansatz	Volumen je Reaktionsansatz in µl
10 x PCR-Puffer (inkl. 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )	1x	2,5
MgCl <sub>2</sub> [25 mM]	2,5 mM	2,5
dNTPs [10 mM]	0,2 mM	0,5
ERIC 1R [50 pmol/µl]	0,5 µM	0,25
ERIC 2 [50 pmol/µl]	0,5 µM	0,25
Taq-Polymerase [5 U/µl]	2,5 U	0,5
DNA-Template		4
Aqua dest.		18
		Σ 25

Tabelle 22: Reaktionsbedingungen der ERIC-PCR

Reaktionsschritt	Zeit in sek	Temperatur in °C
Initiale Denaturierung	300	94
35 x		
Denaturierung	60	94
Primer Anlagerung	60	25
Elongation	120	72
Finale Elongation	300	72
Kühlung	∞	12

Es wurde bei jeder Reaktion eine Negativkontrolle (Aqua dest.) und der Referenzstamm *A. butzleri* CCUG 30485 als Positivkontrolle mitgeführt. Das Auftrennen der PCR-Fragmente erfolgte anschließend in der Gelelektrophorese (siehe 4.3.3). Die Kontrollen dienten zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit. Für die Auswertung wurden nur Gelelektrophoresen verwendet, bei denen der Referenzstamm ein identisches Bandenmuster zeigte. Die Analyse des erhaltenen Fragmentmusters erfolgte mit der Computer-Software BioNumerics. Zunächst wurden mit Hilfe dieses Programms die einzelnen Banden detektiert und durch Normalisierung an dem auf dem Gel mitgeführten Größenstandard ausgerichtet, um die Fragmentmuster miteinander vergleichen zu können. Die Ähnlichkeiten der detektierten Bandenmuster wurden über den Dice-Koeffizienten berechnet und die eigentliche Cluster-Analyse mit Dendrogrammerstellung anhand der „Unweighted pair group method with arithmetic mean“ (UPGMA) Methode durchgeführt.

#### 4.3.6. Screening auf Virulenzgene

Von den isolierten *Arcobacter*-Stämmen wurde die Präsenz der zehn beschriebenen putativen Virulenzgenen mittels PCR ermittelt. Alle verwendeten Primer sind in Tabelle 11 aufgelistet. Für die Amplifizierung der Gene *ciaB*, *mviN*, *pldA*, *tlyA*, *irgA*, *hecA*, *hecB* und *cj1349* wurde mit dem Protokoll nach Whiteduck-Leveillee et al. (2016) gearbeitet (Tabelle 23 und Tabelle 24) (157). Die Gene *iroE* und *cadF* wurden mit dem von Karadas et al. (2013) beschriebenen Protokoll amplifiziert (Tabelle 25 und Tabelle 26) (107).

## Methoden

**Tabelle 23: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes nach Whiteduck-Leveillee et al. (2016) (157)**

Reagenzien		Konzentration im Reaktionsansatz	Volumen je Reaktionsansatz in $\mu\text{l}$
10 x PCR-Puffer	(inkl. 1,5 mM $\text{MgCl}_2$ )	1x	2,5
dNTPs	[10 mM]	0,2 mM	0,5
Primer Sense	[50 pmol/ $\mu\text{l}$ ]	0,1 $\mu\text{M}$	0,05
Primer Antisense	[50 pmol/ $\mu\text{l}$ ]	0,1 $\mu\text{M}$	0,05
Taq-Polymerase	[5 U/ $\mu\text{l}$ ]	0,5 U	0,1
DNA-Template			2
Aqua dest.			19,8
			$\Sigma$ 25

**Tabelle 24: Reaktionsbedingungen der PCR nach Whiteduck-Leveillee et al. (2016) (157)**

Reaktionsschritt	Zeit in min	Temperatur in $^{\circ}\text{C}$
Initiale Denaturierung	240	95
30 x		
Denaturierung	30	95
Primer Anlagerung	45	56
Elongation	45	72
Finale Elongation	300	72
Kühlung	$\infty$	12

**Tabelle 25: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes nach Karadas et al. (2013) (107)**

Reagenzien		Konzentration im Reaktionsansatz	Volumen je Reaktionsansatz in $\mu\text{l}$
10 x PCR-Puffer	(inkl. 1,5 mM $\text{MgCl}_2$ )	1x	2,5
dNTPs	[10 mM]	0,2 mM	0,5
Primer Sense	[50 pmol/ $\mu\text{l}$ ]	1 $\mu\text{M}$	0,25
Primer Antisense	[50 pmol/ $\mu\text{l}$ ]	1 $\mu\text{M}$	0,25
Taq-Polymerase	[5 U/ $\mu\text{l}$ ]	0,5 U	0,1
DNA-Template			2
Aqua dest.			19,8
			$\Sigma$ 25

## Methoden

**Tabelle 26: Reaktionsbedingungen der PCR nach Karadas et al. (2013) (107)**

Reaktionsschritt	Zeit in min	Temperatur in °C
Initiale Denaturierung	240	95
30 x		
Denaturierung	30	95
Primer Anlagerung	45	56
Elongation	45	72
Finale Elongation	300	72
Kühlung	∞	12

Es wurde bei jeder Reaktion eine Negativkontrolle und der Referenzstamm *A. butzleri* CCUG 30485 als Positivkontrolle mitgeführt.

Darüber hinaus wurden noch zusätzliche Primerpaare und Protokolle nach Zambri et al. (2019) zur Detektion von *ciaB*, *mviN*, *cadF*, *pldA*, *tlyA*, *irgA*, *cdtA*, *cdtB* und *cdtC* angewendet (118). In Abhängigkeit der Primerpaare (Tabelle 11) ergaben sich aufgrund von unterschiedlich eingesetzten Konzentrationen und Anlagerungstemperaturen verschiedene Reaktionsansätze und -bedingungen (Tabelle 27 und Tabelle 28).

**Tabelle 27: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes nach Zambri et al. (2019) (118)**

Reagenzien	Konzentration im Reaktionsansatz	Volumen je Reaktionsansatz in µl
10 x PCR-Puffer (inkl. 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )	1x	2,5
dNTPs [10 mM]	0,2 mM	0,5
Primer Sense [50 pmol/µl]	0,1 – 0,4 µM*	0,05 – 0,2*
Primer Antisense [50 pmol/µl]	0,1 – 0,4 µM*	0,05 – 0,2*
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0,5 U	0,1
DNA-Template		2
Aqua dest.		auf 25 µl auffüllen
		∑ 25

\*0,4 µM der Primer AL\_cdtB, AL\_cadF, AL\_irgA, und AL\_mviN (0,2 µl)

0,3 µM der Primer AL\_cdtC und AL\_cdtA (0,15 µl)

0,2 µM der Primer AL\_ciaB (0,1 µl)

0,1 µM der Primer AL\_pldA und AL\_tlyA (0,05 µl)

Tabelle 28: Reaktionsbedingungen der PCR nach Zambri et al. (2019) (118)

Reaktionsschritt	Zeit in min	Temperatur in °C
Initiale Denaturierung	120	94
35 x		
Denaturierung	30	95
Primer Anlagerung	45	55 – 60*
Elongation	45	72
Finale Elongation	300	72
Kühlung	∞	12

\*55°C für Primer AL\_cdtA und AL\_mviN

56°C für Primer AL\_cdtB, AL\_cadF und AL\_irgA

57°C für Primer AL\_cdtC und AL\_pldA

60°C für Primer AL\_ciaB und AL\_tlyA

#### 4.3.7. Antimikrobielle Empfindlichkeitstestung von *Arcobacter* spp. mittels E-Test

Zur Überprüfung der Empfindlichkeit von *Arcobacter*-Isolaten gegenüber Azithromycin, Ampicillin, Ciprofloxacin, Gentamicin, Erythromycin und Tetracyclin wurde der Epsilometertest (E-Test) angewendet. Die Bestimmung der MHKs erfolgte anhand gebrauchsfertiger ETEST®-Reagenzstreifen (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland) mit einem vordefinierten Konzentrationsgradienten des zu untersuchenden antimikrobiellen Wirkstoffes.

Dafür wurden zunächst *Arcobacter*-Isolate auf MHB-Agar angezüchtet (30°C, mikroaerob, 48 h) und anschließend über Nacht in BB (30°C, mikroaerob) vorkultiviert, um ein Inokulum von ca.  $1 \times 10^8$  CFU/ml zu erhalten. Für die *A. cryaerophilus*-Stämme, die ein langsames Wachstum aufwiesen, wurden jeweils drei Übernachtskulturen pro Isolat angesetzt, nach Inkubation gepoolt (6 ml), zentrifugiert und das Pellet in 600 µl BB resuspendiert, um eine ähnliche Konzentration der Bakteriensuspension zu erhalten. MHB-Agarplatten wurden gleichmäßig mit jeweils 100 µl Vorkultur beimpft und nach kurzer Trocknungszeit maximal zwei verschiedene Teststreifen luftblasenfrei pro Platte aufgelegt, ohne sie nachträglich erneut zu bewegen. Anschließend wurden die Agarplatten bei 30°C für 48 h unter mikroaeroben Bedingungen bebrütet. Nach der Inkubation wurde die MHK an der Schnittstelle der ellipsenförmigen Wachstumshemmzone mit dem Teststreifen abgelesen. *Escherichia coli* ATCC 25922 wurde als Referenzstamm verwendet, die Kultivierung erfolgte jedoch bei 37°C und in aerober Atmosphäre.

## **4.4. Zellbiologische Methoden**

### **4.4.1. Kultivierung von Zellen**

Alle Arbeitsschritte wurden unter der Sterilwerkbank durchgeführt, um eine sterile Kultivierung zu gewährleisten. In den Experimenten wurden epitheliale HT-29/B6-Zellen verwendet. Dabei handelt es sich um einen Subklon der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29, der in Kultur einen konfluenten Monolayer erzeugt und zur Schleimproduktion (Mucus) fähig ist (159). Die genutzte Zelllinie wurde in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit dem der Zelllinie entsprechenden Medium kultiviert und in einem Begasungsbrutschrank unter physiologischen Bedingungen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Mindestens zweimal in der Woche erhielten die Zellen frisches Medium. Von der konfluent bewachsenen Zellkulturflasche wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und einmal mit 1x PBS gewaschen. Nach Entfernung des PBS wurden 3 ml Accutase auf die Zellen gegeben und für 10 min im Begasungsbrutschrank inkubiert, um die Zellen vom Untergrund zu lösen. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von FKS-haltigem Medium gestoppt, die abgelösten Zellen resuspendiert und je nach Ermessen passagiert.

### **4.4.2. Konservierung von Zellen**

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 70 bis 80 % kultiviert, mit Accutase abgelöst und in 10 ml Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 400 × g und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in Einfriermedium (RPMI 1640, 10 % FKS, 10 % DMSO, 10 µg/ml Gentamicin) resuspendiert und die Zellsuspension in 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen gefüllt. Diese wurden sofort in einer Einfrierbox bei kontrollierter Temperaturabnahme (1°C/min) für 24 h bei -80°C gelagert und danach in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### **4.4.3. Reaktivierung konservierter Zellen**

Um die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen schonend zu reaktivieren, wurden die Zellen zügig bei 37°C aufgetaut, in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche inklusive 10 ml vorgewärmtem Medium überführt und vorsichtig durchmischt. Nach 24 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde das Kulturmedium gewechselt, um das restliche DMSO zu entfernen und die Zellen bis zum

Erreichen der gewünschten Konfluenz weiter inkubiert.

### 4.4.4. Zellzahlbestimmung

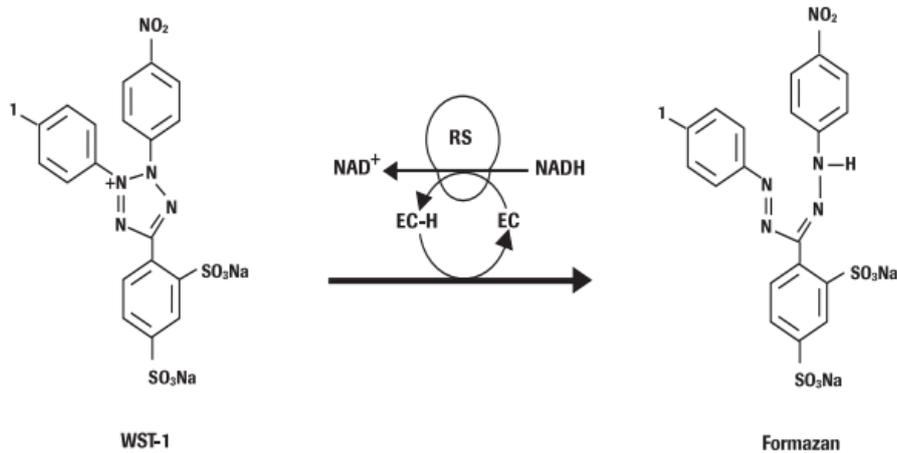
Für die späteren Infektionsversuche musste eine definierte Anzahl von Zellen ausgesät werden, um eine gewisse Konfluenz zu erhalten. Die Zellzahl wurde unter dem Mikroskop mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurden 50 µl der abgelösten und mit Medium resuspendierten Zellen mit 50 µl Trypanblau (0,5 %) vermischt, in die Zählkammer gefüllt und die Zellen in vier Großquadranten ausgezählt. War das Zählen aufgrund zu vieler Zellen nicht möglich, wurde zuvor mit Medium verdünnt. Es wurde der Mittelwert (MW) der gezählten Zellen aus vier Großquadranten gebildet und die Zellzahl mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zellzahl}/_{ml} = \text{MW der 4 Großquadranten} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerkonstante} (10^4)$$

### 4.4.5. Zytotoxizitätsassay (WST-1-Assay)

Zur Untersuchung des zytotoxischen Potentials der isolierten *Arcobacter*-Stämme auf HT-29/B6-Zellen wurde das kolorimetrische WST-1-Assay angewandt. Dieses Verfahren beruht auf der enzymatischen Umwandlung des Tetrazoliums Salzes WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitro-phenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) zu Formazan. Diese Reaktion wird durch mitochondriale Dehydrogenasen (Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System) katalysiert, welche ausschließlich in lebenden Zellen aktiv sind (Abbildung 1). Der daraus resultierende Farbumschlag von rot zu dunkelgelb kann durch die Messung der Absorption bei 450 nm quantifiziert werden. Dabei korreliert die gemessene Absorption direkt mit der Anzahl an metabolisch aktiven Zellen. Je mehr lebende Zellen vorhanden sind, desto mehr WST-1 wird verstoffwechselt und desto höher ist die Absorption. Eine Abnahme der Zellproliferation, hervorgerufen durch zytotoxische Effekte, spiegelt sich demnach in einer geringen Absorption wieder.

## Methoden



**Abbildung 1: Umwandlung des Tetrazoliniumsalzes WST-1 zu Formazan.** (EC: Elektronenakzeptor; RS: mitochondriales Succinat-Tetrazolium Dehydrogenase System). Verändert nach Sigma Aldrich (2019) (160).

Für die Infektion von Zellen mit *Arcobacter* wurde nach dem Protokoll von Karadas et al. (2016) vorgegangen (128). Zunächst wurden HT-29/B6-Zellen in 96-Well-Platten mit einer Zelldichte von  $3 \times 10^4$  Zellen/Well (500  $\mu$ l/Well) ausgesät und für sieben Tage bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die jeweils äußeren Wells jeder Platte sowie die Zwischenräume und nicht mit Zellen bestückte Wells, wurden mit PBS gefüllt, um ein gleichmäßiges Klima in der 96-Well-Platte zu garantieren. Die sieben Tage lang differenzierten Zellen mit einer Konfluenz von ca. 80 % wurden mit PBS gewaschen und mit antibiotikafreiem Medium versetzt. Anschließend wurden die Zellen mit 50  $\mu$ l der aufgearbeiteten Bakterienkulturen (siehe 4.2.4) mit einer MOI (multiplicity of infection) von 100 infiziert. Die MOI gibt dabei das zahlenmäßige Verhältnis von Bakterienzellen zu deren Zielzellen an. Eine MOI von 100 bedeutet somit, dass 100-mal mehr Bakterienzellen als Zielzellen für die Infektion eingesetzt werden. Als Negativkontrolle wurden die Zellen nur mit Medium oder mit *A. cryaerophilus* (ILSH 02659) inokuliert, ein humaner Stamm, der sich in diesem Assay als nicht-zytotoxisch erwies. Als Positivkontrollen kamen DMSO und *C. jejuni* (81-176) in jedem Experiment zum Einsatz. Nach 48 h Inkubation (37°C und 5 % CO<sub>2</sub>) wurden die Zellen mit PBS gewaschen und pro Well 10  $\mu$ l WST-1-Reagenz aus dem WST-1 Zellproliferations-Kit auf 100  $\mu$ l Medium gegeben. Nach 1 h Inkubation unter den benannten Bedingungen wurden jeweils 100  $\mu$ l Überstand in eine neue 96-Well-Platte übertragen und die Absorption des entstandenen Formazans bei 450 nm mittels Mikroplattenleser bestimmt. Bei jedem durchgeführten Experiment diente Medium, welches mit derselben Menge WST-1 inkubiert worden war, als Leerwert. Der Leerwert wurde zur Berechnung der endgültigen Werte miteinbezogen und von allen bestimmten Absorptionen subtrahiert. Um möglichst genaue Ergebnisse zu erhalten wurden mindestens drei unabhängige Experimente mit jeweils sechs

Replikaten pro untersuchtem Isolat durchgeführt. Das Ausmaß der Toxizität wurde subjektiv in drei Gruppen eingeteilt, darunter Stämme mit schwacher (Gruppe I), mäßiger (Gruppe II) und starker Zytotoxizität (Gruppe III), die eine Absorptionsminderung von 20 bis 49 %, 50 bis 94 % und mindestens 95 % im Vergleich zur nicht-infizierten Mediumkontrolle aufwiesen.

### **4.5. Statistische Analyse**

Die erforderliche Stichprobengröße für die Prävalenzstudie wurde unter der Annahme einer *Arcobacter*-Prävalenz von 1,0 % und einer Fehlerquote von 0,3 % berechnet. Um mit 95%iger Wahrscheinlichkeit sagen zu können, dass die Prävalenz der Grundgesamtheit zwischen 0,7 und 1,3 % liegt, mussten mindestens 4226 humane Stuhlproben in der Studie untersucht werden. Die Berechnung der Stichprobengröße sowie der 95 %-Konfidenzintervalle (KI) der Prävalenzen von *Arcobacter* in Stuhlproben ambulanter und stationärer Proben wurde mit WinEpi (Working in Epidemiology; <http://www.winepi.net>) durchgeführt. Unter Verwendung von GraphPad-Prism Version 5.04 wurden der Chi-Quadrat-Test und der exakte Fisher-Test verwendet, um signifikante Unterschiede zwischen den Prävalenzen zu ermitteln. Des Weiteren wurde der nichtparametrische zweiseitige Mann-Whitney U Test eingesetzt, um signifikante Unterschiede der zytotoxischen Effekte einzelner *Arcobacter*-Isolate zu bestimmen. Die Ergebnisse wurden als signifikant betrachtet, wenn die *P*-Werte kleiner als 0,05 waren.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Prävalenz von *Arcobacter* spp. in humanen Stuhlproben

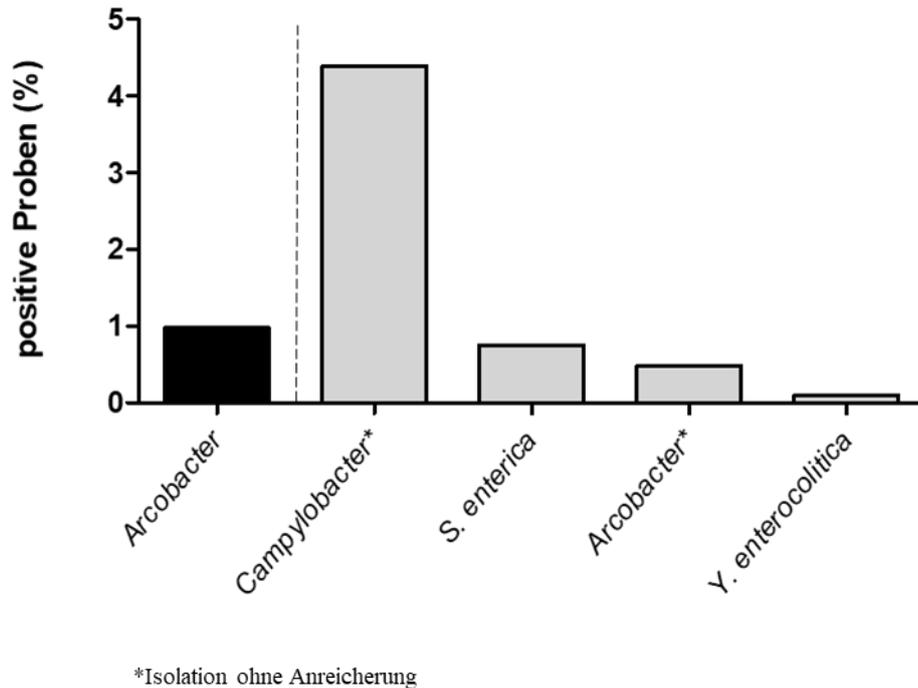
Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 4646 humane Stuhlproben untersucht, und *Arcobacter* spp. konnten in 0,77 % [95 % KI = 0,47 – 0,95] der Proben nachgewiesen werden (siehe Tabelle 29). Die untersuchten Stuhlproben stammten von ambulanten (n = 3884) und stationären (n = 752) Patienten und zeigten eine Belastung mit *Arcobacter* spp. von 0,85 % [95 % KI = 0,56 – 1,14 %] bzw. 0,40 % [95 % KI = 0 – 0,85 %]. In den ambulanten Proben konnten die drei Spezies *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. lanthieri* identifiziert werden, während in den stationären Proben lediglich *A. butzleri* nachgewiesen wurde. Insgesamt war *A. butzleri* die am häufigsten detektierte Spezies in 24 (67 %) der Stuhlproben, gefolgt von *A. cryaerophilus* in zehn (28 %) und *A. lanthieri* in zwei (6 %) der Stuhlproben.

**Tabelle 29: Vorkommen von *Arcobacter* in humanen Stuhlproben im Untersuchungszeitraum Okt. 2017-Okt. 2018 in Deutschland**

Probenart	Probenanzahl	<i>Arcobacter</i> spp.	Identifizierte Spezies		
			<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. lanthieri</i>
ambulant	3884	0.85 % (33)	64 % (21/33)	30 % (10/33)	6 % (2/33)
stationär	752	0.40 % (3)	100 % (3/3)	-	-
Insgesamt	4636	0.77 % (36)	67 % (24/36)	28 % (10/36)	6 % (2/36)

Für einen Teil der Studienpopulation (n = 2257) lagen zusätzlich auch Daten zur Prävalenz von anderen bakteriellen Krankheitserregern vor. Dabei erfolgte die Isolierung von Yersinien und Salmonellen, im Gegensatz zu der Isolierung von *Campylobacter*, nach Anreicherung in Flüssigmedium. In dieser Untergruppe konnte am häufigsten *Campylobacter* spp. (4,39 %) nachgewiesen werden, gefolgt von *Salmonella enterica* (0,75 %) und *Yersinia enterocolitica* (0,09 %) (Abbildung 2).

## Ergebnisse



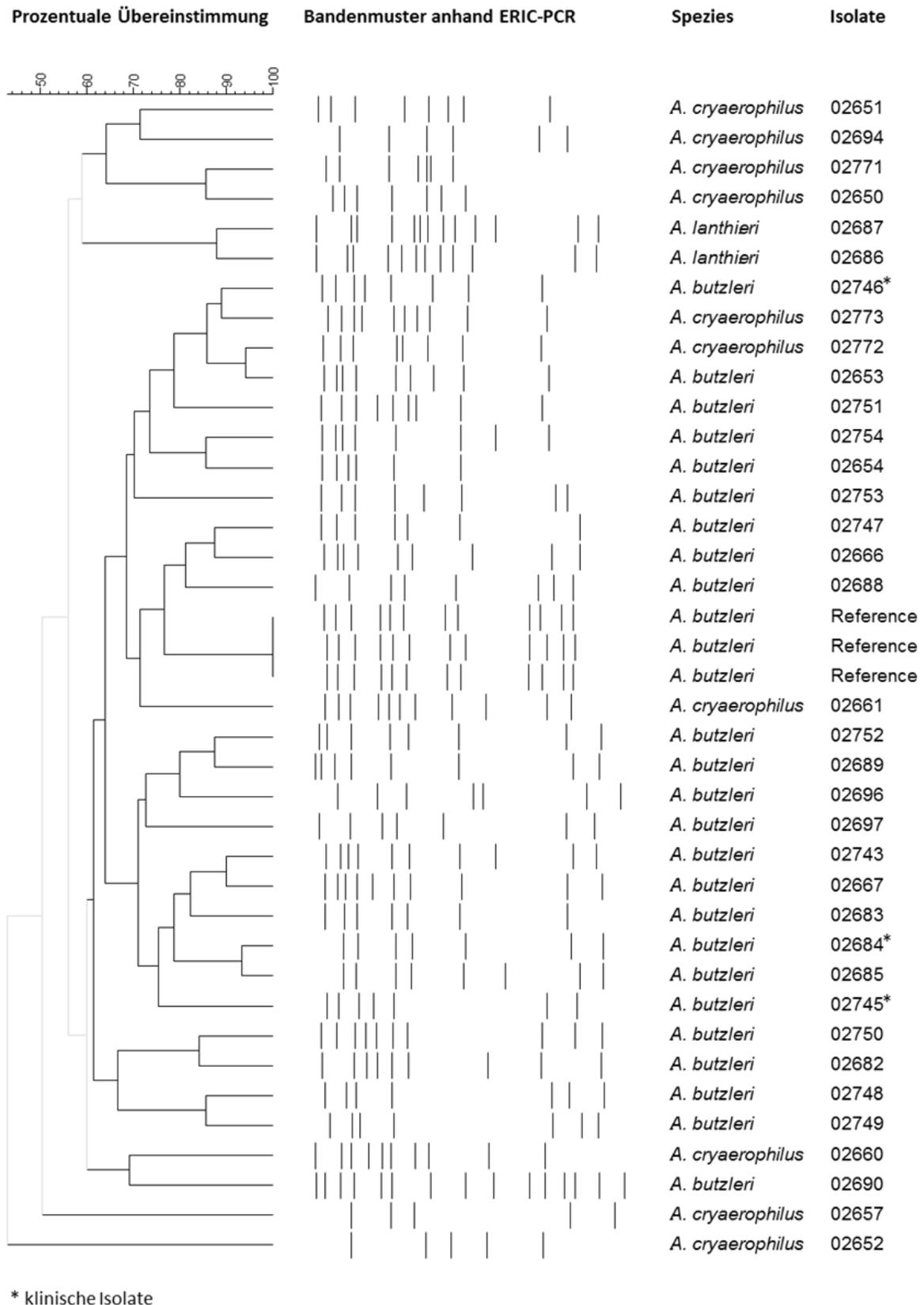
**Abbildung 2: Vorkommen von häufigen bakteriellen Krankheitserregern in einer Untergruppe der Studienpopulation (n = 2257).** Der schwarze Balken gibt die Prävalenz von *Arcobacter* wieder, die mit der in der vorliegenden Studie angewandten *Arcobacter*-spezifischen Nachweismethode ermittelt wurde, und der graue Balken die Prävalenz von anderen bakteriellen Pathogenen, die im Rahmen von Routineverfahren im diagnostischen Labor nachgewiesen wurden.

Mit der in der vorliegenden Studie angewandten spezifischen Methode zur Isolierung von *Arcobacter* konnte eine höhere *Arcobacter*-Prävalenz innerhalb dieser Untergruppe identifiziert werden (0,97 %), verglichen mit der in der Routinediagnostik ermittelten Prävalenz (0,49 %) (Abbildung 2).

### 5.2. Genotypisierung von *Arcobacter* spp.

Mittels ERIC-PCR konnten in allen 36 *Arcobacter*-Isolaten entsprechende Sequenzen nachgewiesen werden. Insgesamt ergaben sich 36 verschiedene Bandenmuster, bestehend aus 5 bis 15 Fragmenten pro Isolat mit einer Länge im Bereich von ca. 100 - 1000 bp. Durch Analyse und Vergleich der Fragmentmuster sollte die Verwandtschaft aller Isolate ermittelt werden. Dazu wurden mit der Computer-Software BioNumerics mittels Dice-Koeffizienten und der UPGMA-Methode Ähnlichkeiten berechnet und das Ergebnis in einem Dendrogramm visualisiert (Abbildung 3).

## Ergebnisse



**Abbildung 3: Dendrogramm und Bandenmuster der ERIC-PCR-Ergebnisse von 36 *Arcobacter*-Isolaten aus humanen Stuhlproben.** Die Clusteranalyse und anschließende Dendrogrammerstellung erfolgte unter Verwendung des Dice-Koeffizienten und der UPGMA-Methode.

## Ergebnisse

Insgesamt wies die Dendrogrammanalyse eine hohe genetische Diversität der Isolate auf, mit einer Ähnlichkeit von 43 %, was sich bereits in den 36 verschiedenen ermittelten Bandenmuster zeigte. Alle *A. butzleri*-Isolate bündelten sich in einem großen Cluster mit 60 % Ähnlichkeit. Innerhalb dieser Gruppe sortierten sich ebenfalls drei unabhängige mitgeführte Replikate des humanen Referenzstammes *A. butzleri* (CCUG30485), die alle ein identisches Fragmentmuster aufwiesen und damit die Reproduzierbarkeit der angewandten Methode untermauerten. Allerdings wurden auch vier *A. cryaerophilus*-Isolate in dieses Cluster miteingeschlossen. Während allgemein für *A. cryaerophilus* keine artspezifischen Cluster identifiziert werden konnten, konzentrierten sich die beiden *A. lanthieri*-Stämme mit einem hohen Ähnlichkeitsgrad von 86 % in einem Cluster.

### 5.3. Präsenz von putativen Virulenzgenen bei *Arcobacter* spp.

Im Zuge dieser Arbeit wurde des Weiteren das Vorhandensein von zehn mutmaßlichen Virulenz-assoziierten Genen (VAG) untersucht, die bisher im Genom von *A. butzleri* identifiziert werden konnten (12). Allgemein konnte in den isolierten *A. butzleri*- und *A. lanthieri*-Stämmen ein Großteil der betreffenden putativen Virulenzgene nachgewiesen werden, während in *A. cryaerophilus* weniger dieser Gene detektierbar waren (Abbildung 4, Tabelle 30).

**Tabelle 30: Detektion von putativen Virulenzgenen in 36 *Arcobacter*-Isolaten aus humanen Stuhlproben**

Spezies	Anzahl (%) positiver Isolate für VAGs									
	<i>ciaB</i>	<i>cj1349</i>	<i>cadF</i>	<i>tlyA</i>	<i>pldA</i>	<i>mviN</i>	<i>hecA</i>	<i>hecB</i>	<i>iroE</i>	<i>irgA</i>
<i>A. butzleri</i> (n = 24)	24 (100)	24 (100)	24 (100)	24 (100)	23 (96)	20 (83)	6 (25)	7 (29)	3 (12)	2 (8)
<i>A. cryaerophilus</i> (n = 10)	10 (100)	0 (0)	4 (40)	1 (10)	2 (20)	8 (80)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (10)
<i>A. lanthieri</i> (n = 2)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	2 (100)

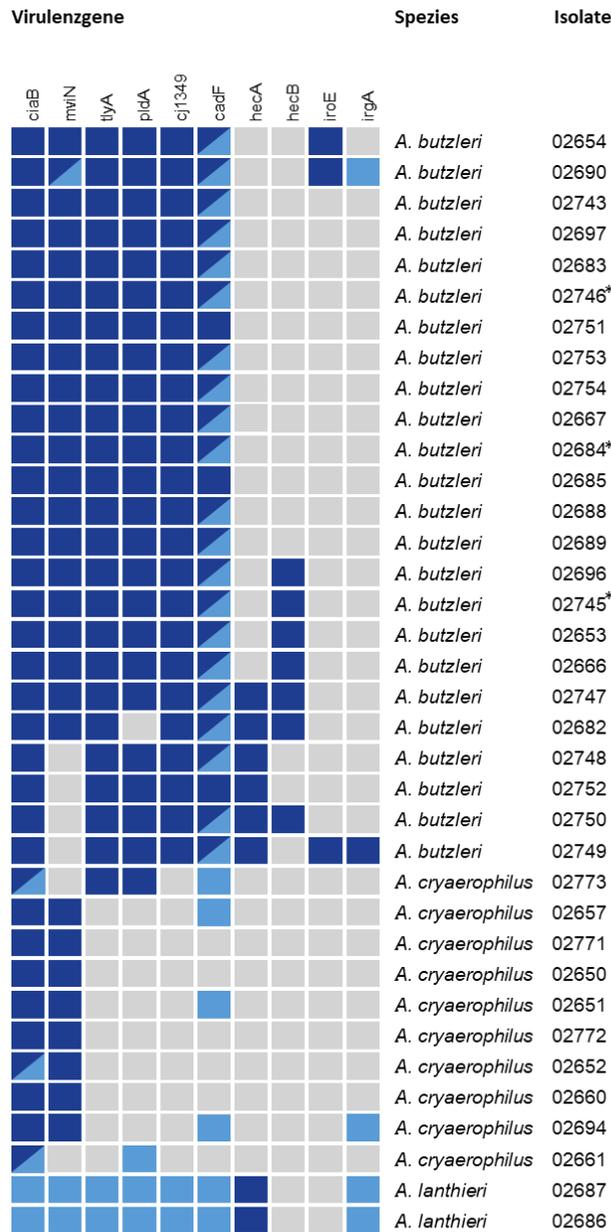
In allen *A. butzleri*-Isolaten (n = 24) wurden die Gene *ciaB*, *cj1349*, *cadF* und *tlyA* nachgewiesen. Die Gene *pldA*, *mviN*, *hecB* und *hecA* waren in 96 %, 83 %, 29 % bzw. 25 % der Isolate vorhanden, während *iroE* und *irgA* nur in 12 % (n = 3) bzw. 8 % (n = 2) identifiziert werden konnten.

Bei den zehn *A. cryaerophilus*-Stämmen konnte *ciaB* als einziges Gen in allen Isolaten nachgewiesen werden, während in 80 %, 40 % und 20 % der Stämme die Gene *mviN*, *cadF* und *pldA* detektierbar waren. Des Weiteren wurden die Gene *tlyA* und *irgA* je in einem einzelnen Isolat

## Ergebnisse

detektiert.

Mit den *A. butzleri*-spezifischen PCR-Primern war nur *hecB* in beiden *A. lanthieri*-Stämmen detektierbar, wohingegen *ciaB*, *mviN*, *cadF*, *pldA*, *tlyA* und *irgA* nur mit den *A. lanthieri*-spezifischen Primern nachgewiesen werden konnten. Darüber hinaus waren in beiden *A. lanthieri*-Stämmen die für den Virulenzfaktor CDT kodierenden Gene *cdtA*, *cdtB* und *cdtC* vorhanden.



\* klinische Isolate

**Abbildung 4: Virulenzgenmuster der 36 *Arcobacter*-Isolate aus humanen Stuhlproben.** Dunkelblau: durch *A. butzleri*-spezifische Primer detektiertes Gen; hellblau: durch *A. lanthieri*-spezifische Primer detektiertes Gen. grau: weder durch *A. butzleri*- noch *A. lanthieri*-spezifische Primer detektiertes Gen.

#### 5.4. Zytotoxische Effekte von *Arcobacter* spp. *in vitro*

Weiterhin sollten potentielle zytotoxische Effekte der isolierten *Arcobacter*-Stämme auf die humane intestinale Adenokarzinomzelllinie HT-29/B6 *in vitro* untersucht werden. Dazu wurden HT-29/B6-Zellen mit den *Arcobacter*-Isolaten (MOI von 100) für 48 h bei 37°C inkubiert und anschließend die zytotoxischen Aktivitäten der jeweiligen Isolate durch Messung der Restviabilität von HT-29/B6-Zellen unter Anwendung des kolorimetrischen WST-Assays bewertet.

Die Inokulation mit dem humanen Isolat *A. cryaerophilus* (ILSH 02659) zeigte keine signifikante Änderung der Absorption im Vergleich zur nicht infizierten Mediumkontrolle (10 %), was darauf schließen lässt, dass die meisten Zellen noch metabolisch aktiv geblieben waren. Dieser Stamm wurde daher als Negativkontrolle verwendet.

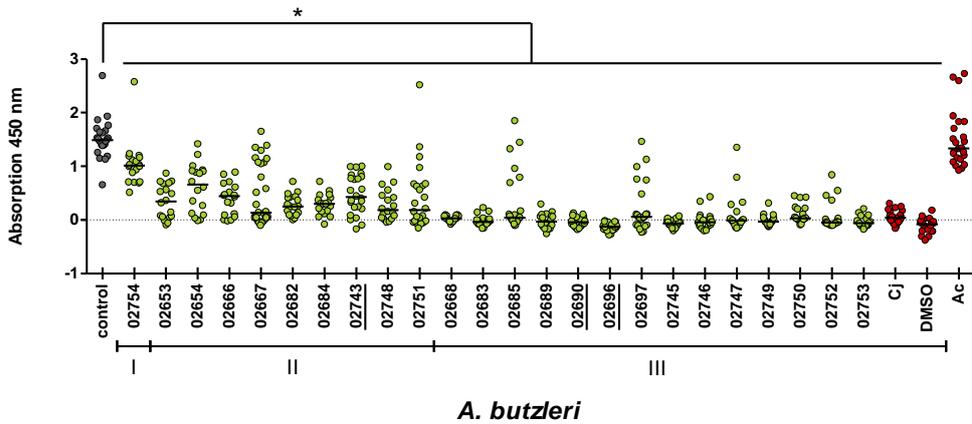
Hingegen führte die Inokulation mit allen *A. butzleri*-Stämmen, sowohl ambulanten als auch stationären Isolaten, zu einer signifikanten Reduktion der Absorption im Vergleich zur Mediumkontrolle, was auf signifikante zytotoxische Effekte der Isolate in HT-29/B6-Zellen hindeutet (Abbildung 5a). Vierzehn Isolate wurden dabei als stark zytotoxische Stämme identifiziert (Gruppe III), da diese eine Abnahme der Absorption um mindestens 95 % gegenüber der Kontrolle induzierten. Ähnliche Reduktionen wurden durch die Positivkontrollen *C. jejuni* 81-176 (97 %) bzw. DMSO (105 %) hervorgerufen. Weitere neun Isolate bewirkten eine signifikante Verringerung der Absorption um 50 bis 95 % gegenüber der Kontrolle und wiesen damit eine mäßige Zytotoxizität auf (Gruppe II). Im Gegensatz zu allen anderen *A. butzleri*-Isolaten führte nur der Stamm 02754 zu einer geringeren Abnahme der Absorption um 32 % und erwies sich somit als schwach zytotoxisch (Gruppe I).

Anders als die *A. butzleri*-Isolate induzierte die Mehrheit der untersuchten *A. cryaerophilus*-Isolate (8 von 10) keine zytotoxischen Effekte in HT-29/B6-Zellen. Die Inokulation mit diesen Stämmen führte zu Absorptionen, die sich nicht wesentlich von denen der Mediumkontrolle unterschieden (Abbildung 5b). Nur die Stämme 02657 und 02771 bewirkten eine signifikante Reduktion der Absorption um 29 bzw. 20 % im Vergleich zur Kontrolle, was auf eine schwache zytotoxische Aktivität hindeutet (Gruppe I). Aufgrund des begrenzten Wachstums wurde die Inokulation mit den Stämmen 02651 und 02771 mit MOI 50 statt MOI 100 durchgeführt, sodass die entsprechenden Ergebnisse mit Vorsicht interpretiert werden sollten.

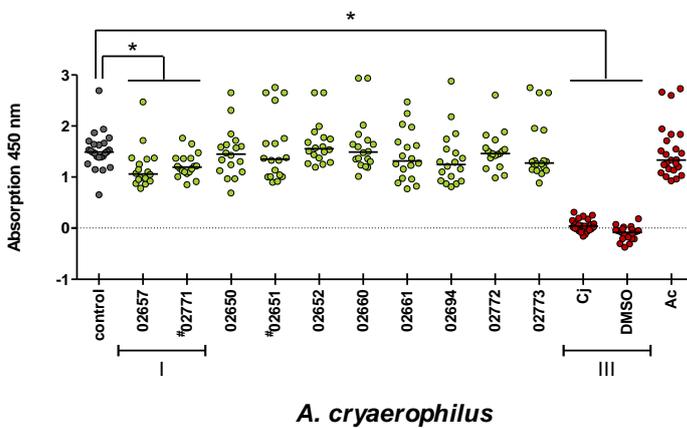
Beide *A. lanthieri*-Isolate induzierten eine starke Zytotoxizität (Gruppe III) in HT-29/B6-Zellen, die sich in der Reduktion der Absorption um mindestens 96 % zeigte und damit der zytotoxischen Wirkung von *C. jejuni* und der DMSO-Kontrolle entsprach. (Abbildung 5c).

## Ergebnisse

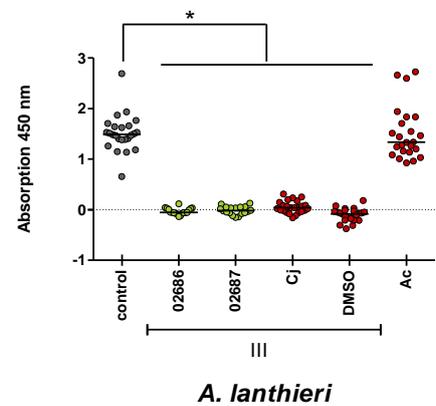
(a)



(b)



(c)



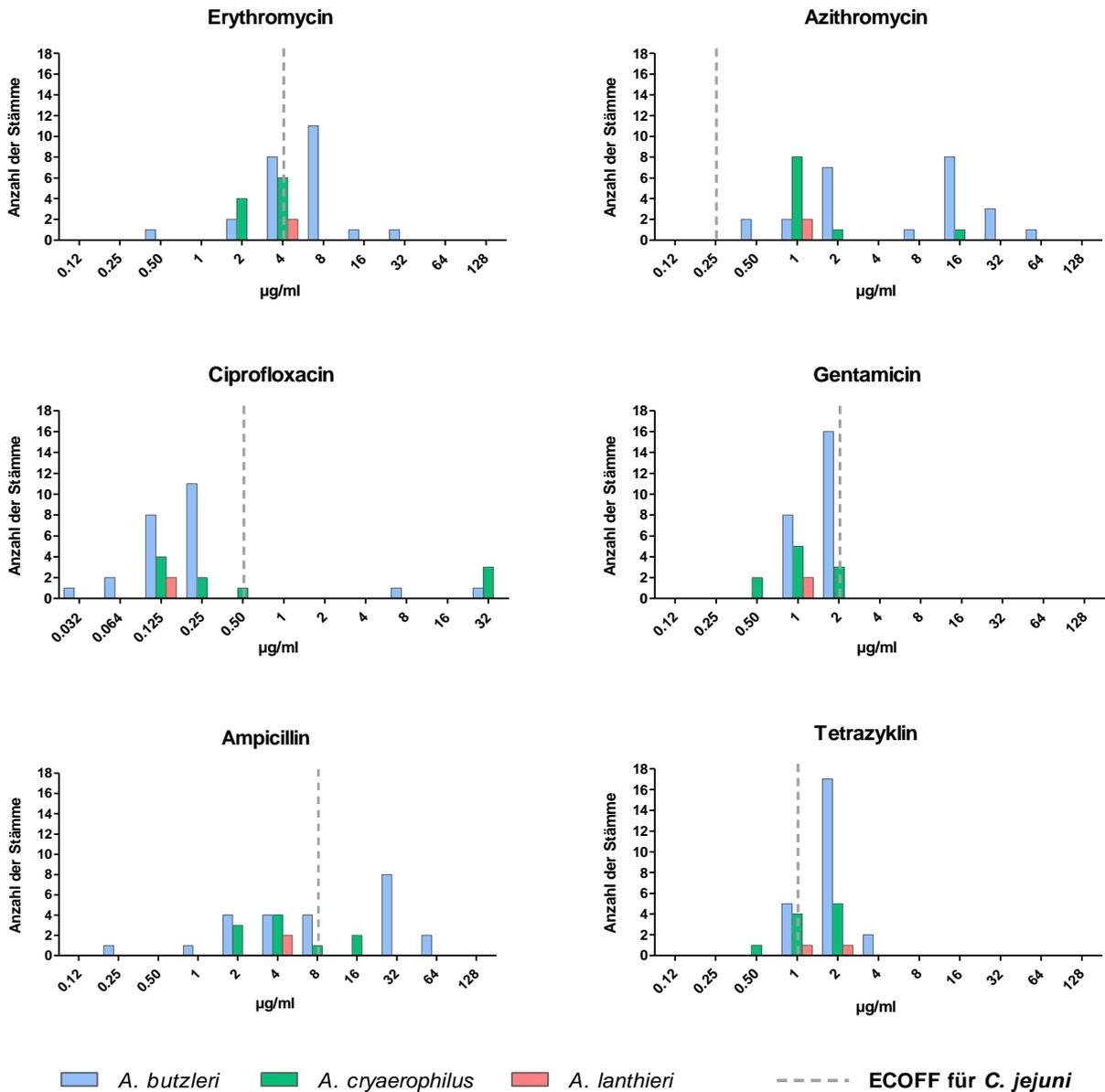
**Abbildung 5: Viabilität von HT-29/B6-Zellen nach Inokulation mit *Arcobacter*-Isolaten aus humanen Stuhlproben.** Differenzierte HT-29/B6-Zellen wurden mit *A. butzleri*- (a), *A. cryaerophilus*- (b) und *A. lanthieri*- (c) Isolaten (MOI 100) inokuliert und die Zytotoxizität nach 48 h Inkubation mittels WST-1-Assay gemessen. Mindestens drei unabhängige Experimente wurden mit jeweils sechs Replikaten durchgeführt. Als Negativkontrollen wurden die Zellen nur mit Medium oder mit *A. cryaerophilus* ILSH 02659 (Ac) behandelt, während Dimethylsulfoxid (DMSO) und *Campylobacter jejuni* 81-176 (Cj) als Positivkontrollen dienen. Der Grad der Toxizität wurde subjektiv in drei Gruppen eingeteilt, darunter Stämme mit schwacher (Gruppe I), mäßiger (Gruppe II) und starker Zytotoxizität (Gruppe III) mit 20 bis 49 %, 50 bis 94 % und mindestens 95 % Verringerung der Absorption im Vergleich zur Mediumkontrolle. Klinische Isolate sind unterstrichen dargestellt; # Inokulation mit MOI 50; \*  $p < 0,05$  (MannWhitney U-Test) im Vergleich zur Kontrolle.

### 5.5. Antimikrobielle Empfindlichkeitstestung von *Arcobacter* spp.

Für die antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung von humanen *Arcobacter*-Isolaten wurden sechs Antibiotika ausgewählt, die häufig in der Humanmedizin eingesetzt werden. Insgesamt zeigten die

## Ergebnisse

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit normalverteilte MHK-Werte für Erythromycin, Ciprofloxacin, Gentamicin und Tetrazyklin, während für Azithromycin und Ampicillin eine bimodale Verteilung für *Arcobacter* erkennbar war (Tabelle 31). Die MHKs für Erythromycin waren um den ECOFF (epidemiological cutoff value) von *C. jejuni* (4 µg/ml) verteilt, wobei einzelne *A. butzleri*-Isolate (n = 2) erhöhte MHK-Werte außerhalb der unimodal verteilten Population aufwiesen ( $\geq 16$  µg/ml) (Abbildung 6).



**Abbildung 6:** Verteilung der MHK-Werte von *Arcobacter*-Isolaten aus humanen Stuhlproben (n = 36) für sechs ausgewählte Antibiotika. Die durch den E-Test ermittelten MHK-Werte wurden zur nächst höheren log<sub>2</sub> Verdünnung aufgerundet. Gestrichelte Linie: ECOFF für *C. jejuni*

## Ergebnisse

Sämtliche für Azithromycin ermittelten MHKs lagen im Bereich zwischen 0,5 und 64 µg/ml und somit oberhalb des ECOFFs von *C. jejuni* (0,25 µg/ml). In der bimodalen Verteilung zeigten 54 % der *A. butzleri* und 10 % der *A. cryaerophilus*-Isolate erhöhte MHKs ( $\geq 8$  µg/ml) (Tabelle 31). Für den Großteil der Isolate (86 %) konnte eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Ciprofloxacin beobachtet werden, mit MHKs unter dem ECOFF von *C. jejuni* (0,5 µg/ml) zwischen 0,032 und 0,5 µg/ml. Während nur zwei *A. butzleri*-Isolate hohe MHK-Werte außerhalb der unimodal verteilten Population aufwiesen, konnte die höchste Konzentration an Ciprofloxacin (32 µg/ml) bei 30 % der *A. cryaerophilus*-Isolate keine Wachstumsinhibierung bewirken. Für Gentamicin konnten nur MHKs unter dem ECOFF von *C. jejuni* (2 µg/ml) bestimmt werden, unabhängig von der untersuchten Spezies. Für Ampicillin waren die MHKs bimodal um den ECOFF von *C. jejuni* (8 µg/ml) verteilt, wobei 42 % der *A. butzleri*-Isolate und 20 % der *A. cryaerophilus*-Isolate erhöhte MHKs ( $\geq 16$  µg/ml) aufwiesen. In 33 % der *A. butzleri*-Isolate konnten erhöhte MHKs sowohl für Azithromycin als auch für Ampicillin beobachtet werden. Die MHKs für Tetrazyklin waren alle um den ECOFF von *C. jejuni* (1,0 µg/ml) verteilt. Beide *A. lanthieri*-Isolate wiesen MHK-Werte innerhalb der normalverteilten Populationen von *A. butzleri* und *A. cryaerophilus* auf, allerdings sollten die entsprechenden Ergebnisse aufgrund der begrenzten Anzahl an Isolaten mit Vorsicht interpretiert werden (Tabelle 31).

**Tabelle 31: Empfindlichkeit von humanen *Arcobacter*-Isolaten (24 *A. butzleri*, 10 *A. cryaerophilus* und 2 *A. lanthieri*) gegenüber ausgewählten Antibiotika**

Antibiotika	Spezies	Gehemmte Isolate bei MHK ( $\mu\text{g/ml}$ ) von:																							
		0.023	0.032	0.047	0.064	0.094	0.125	0.19	0.25	0.38	0.50	0.75	1	1.5	2	3	4	6	8	12	16	24	32	> 32	48
Azithromycin	<i>A. butzleri</i>									2	1	1	2	5			1		4	4	1	2			1
	<i>A. cryaerophilus</i>											8	1							1					
	<i>A. lanthieri</i>											2													
Ampicillin	<i>A. butzleri</i>							1				1	1	3	3	1	1	3			4	4		1	1
	<i>A. cryaerophilus</i>													3		4		1		2					
	<i>A. lanthieri</i>											1				1									
Ciprofloxacin*	<i>A. butzleri</i>		1		2	2	6	7	4									1						1	
	<i>A. cryaerophilus</i>					2	2	1	1	1														3	
	<i>A. lanthieri</i>					2																			
Gentamicin	<i>A. butzleri</i>											1	7	10	6										
	<i>A. cryaerophilus</i>									1	1		5	1	2										
	<i>A. lanthieri</i>											1	1												
Erythromycin	<i>A. butzleri</i>								1				1	1	7	1	6	5		1		1			
	<i>A. cryaerophilus</i>													4	3	3									
	<i>A. lanthieri</i>															2									
Tetracycline	<i>A. butzleri</i>											1	4	4	13	1	1								
	<i>A. cryaerophilus</i>										1	1	3	4	1										
	<i>A. lanthieri</i>												1	1											

\* Die maximale Konzentration von Ciprofloxacin auf dem Teststreifen betrug 32  $\mu\text{g/ml}$ . MHK > 32  $\mu\text{g/ml}$  bedeutet keine Wachstumshemmung.

## 6. Diskussion

### 6.1. Prävalenz von *Arcobacter* spp. in humanen Stuhlproben

Dies ist die erste prospektive Prävalenzstudie zum Vorkommen von *Arcobacter* in Stuhlproben von ambulanten und stationären Patienten in Deutschland mittels *Arcobacter*-spezifischer Nachweismethode. Insgesamt konnten 36 *Arcobacter*-Stämme aus 4646 (0,77 %) untersuchten Proben isoliert werden. Diese Detektionsrate ist vergleichbar mit humanen Prävalenzstudien aus Neuseeland und Belgien, bei denen in 0,9 % (12/1380) bzw. 1,31 % (89/6774) der Stuhlproben von Personen mit gastrointestinaler Erkrankung *Arcobacter* spp. nachgewiesen wurden (60, 75). Diese Studien verwendeten ebenfalls eine kulturelle *Arcobacter*-spezifische Isolationsmethode, und auch die Probenanzahl war ähnlich der von der vorliegenden Studie, sodass optimalerweise ein direkter Vergleich möglich ist. Insbesondere durch die Anwendung verschiedener mikrobiologischer Isolations- und Identifikationsmethoden werden unterschiedliche Detektionsraten ermittelt, wobei auch andere Faktoren, wie z.B. geographische Aspekte und untersuchte Patientengruppen bzw. Stichprobengrößen womöglich eine Rolle spielen und dadurch einen direkten Vergleich vieler Studien untereinander erschweren. So zeigten Studien aus verschiedenen Ländern weltweit wie etwa Südafrika, China, Belgien, Portugal, Indien, Türkei und Chile Nachweisraten von *Arcobacter* spp. zwischen 0,1 und 3,6 % (30, 31, 58, 59, 72-74). In der vorliegenden Arbeit konnte des Weiteren durch die *Arcobacter*-spezifische Anreicherungs-methode eine doppelt so hohe *Arcobacter*-Prävalenz (0,97 %) ermittelt werden im Vergleich zu der im Routinelabor detektierten Prävalenz (0,49 %) unter Anwendung unspezifischer Methoden. In der routinemäßigen Stuhldiagnostik wird gewöhnlich noch kein geeignetes Isolationsverfahren für *Arcobacter* eingesetzt, sondern diese im Zuge der *Campylobacter*-Identifizierung nachgewiesen und dadurch deren Prävalenz vermutlich stark unterschätzt. Darüberhinaus konnte bereits im Vergleich zu kulturellen Nachweismethoden mittels PCR-basierten Methoden eine höhere Prävalenz von *Arcobacter* ermittelt werden (31, 57, 67). Molekulare Methoden, insbesondere die PCR, haben gegenüber der Kultur diverse Vorteile beim Nachweis von Bakterien, da sie schneller, spezifischer und sensitiver sind. Es können jedoch auch nicht-kultivierbare Organismen nachgewiesen werden (68), bei denen man nicht mit Sicherheit sagen kann, ob es sich auch tatsächlich um lebensfähige Mikroorganismen oder um „tote DNA“ handelt, womit dann wiederum die Ergebnisse verfälscht sein könnten. Dies unterstreicht nochmals die Notwendigkeit einer gut ausgewählten Standardmethode zum Nachweis von *Arcobacter*, um Studien

## Diskussion

untereinander vergleichen und Fehlinterpretationen vermeiden zu können. In zukünftigen Studien sollte dennoch auch untersucht werden, ob es einen klinischen Unterschied zwischen Patienten gibt, bei denen *Arcobacter* nur unter Anwendung spezifischer Anreicherungsverfahren bzw. einfach im Rahmen der Routinekulturverfahren nachgewiesen werden können. Beim Nachweis kleinster Mengen des Erregers durch spezifische Anreicherungsverfahren bzw. PCR stellt sich die Frage, ob dieser in Hinblick auf die Erkrankungsursache dann überhaupt relevant ist.

In der vorliegenden Studie konnte des Weiteren eine höhere *Arcobacter*-Prävalenz in ambulanten (0,85 % (33/3884)) als in stationären Stuhlproben (0,40 % (3/752)) festgestellt werden. Mit diesem Prävalenzunterschied wurde gerechnet, da *Arcobacter* bei den meisten Patienten höchstwahrscheinlich keine derart schwere Infektion verursachen, dass ein Krankenhausaufenthalt notwendig wird. Andere Studien, die klinische Durchfallproben auf *Arcobacter* spp. untersucht haben, zeigten ähnlich niedrige Prävalenzen von 0 bis 0,1 % (71-73).

Unter den 36 *Arcobacter*-Stämmen, die in der vorliegenden Studie isoliert wurden, war *A. butzleri* die am häufigsten vertretene Spezies (n = 24), gefolgt von *A. cryaerophilus* (n = 10), was in Übereinstimmung mit anderen Studien steht (58-61, 75). Im Gegensatz zu einzelnen anderen Studien, konnten keine Isolate der Spezies *A. skirrowii* detektiert werden (61, 62). Es konnten jedoch, dem derzeitigen Wissensstand nach, die ersten zwei Stämme der erst kürzlich durch Whiteduck-Leveillee et al. (2015) beschriebenen Spezies *A. lanthieri* aus humanen Stuhlproben isoliert werden (161).

Das in dieser Studie verwendete selektive Anreicherungsmedium sowie die mPCR zur Ermittlung der Prävalenz von *Arcobacter* spp. wurde nur für die Detektion der drei Spezies *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. skirrowii* validiert, sodass es möglich ist, dass das Ergebnis hinsichtlich der Artenvielfalt verfälscht sein könnte (27, 155).

Insgesamt konnten *Arcobacter* spp. als zweithäufigste Erreger (0,97 %) nach *Campylobacter* spp. (4,39 %) nachgewiesen werden, noch vor *Salmonella enterica* (0,75 %) und *Yersinia enterocolitica* (0,09 %). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stimmen mit denen einer früheren belgischen Studie überein, in der *Arcobacter* spp. als vierthäufigste Erreger aus Stuhlproben von Patienten mit Verdacht auf Gastroenteritis identifiziert wurde (1,31 %), nach *Campylobacter* spp. (5,61 %), *Salmonella* spp. (2,04 %) und *Clostridoides difficile* (1,61 %). Insgesamt konnte jedoch eine höhere Gesamtprävalenz der jeweiligen Enteropathogene im Vergleich zu der vorliegenden Studie festgestellt werden (60).

## 6.2. Genotypisierung von *Arcobacter* spp.

Um die genetische Vielfalt von *Arcobacter* zu entschlüsseln, stellt die ERIC-PCR eine etablierte und zuverlässige Methode dar. In der vorliegenden Studie konnten mittels ERIC-PCR für alle der 36 Humanisolate unterschiedliche ERIC-Profile nachgewiesen werden. Diese hohe genetische Diversität ließ sich auch in anderen Humanstudien anhand der gleichen Methode ermitteln. Houf et al. (2004) und Sekhar et al. (2017) identifizierten bei sieben bzw. 30 *A. butzleri*-Isolaten aus humanen Stuhlproben auch sieben bzw. 30 verschiedene Genotypen (95, 96). Für neun *A. butzleri*-Isolate aus Patienten mit Gastroenteritis konnten ebenfalls neun unterschiedliche ERIC-Profile generiert werden (74). Und auch die Typisierung von *A. cryaerophilus*-Isolaten aus Stuhlproben gesunder Patienten zeigte keine Übereinstimmung der Genotypen (70). Da sowohl in den genannten Studien als auch in der vorliegenden Studie kein Ausbruch untersucht wurde, sondern voneinander unabhängige Individuen, war auch eher damit zu rechnen, dass die Genotypen sich voneinander unterscheiden.

Die Dendrogrammanalyse in dieser Studie ergab für die meisten *A. butzleri*- (23/24) und den zwei *A. lanthieri*-Isolaten ein spezies-spezifisches Cluster, wohingegen die *A. cryaerophilus*-Isolate eher gestreut vorlagen und eine Speziesdiskriminierung in diesem Fall nicht möglich gewesen wäre. Erst kürzlich wurde auf Basis genomischer Analysen die Unterteilung der Spezies *A. cryaerophilus* in vier Genomovare vorgeschlagen, was eine Erklärung für die sehr hohe Heterogenität von *A. cryaerophilus* in dieser und vorherigen Studien darstellen könnte (14).

Die genetische Vielfalt von *Arcobacter* konnte des Weiteren auch bei der Typisierung von Isolaten aus verschiedenen Lebensmittel-, Tier- und Wasserproben nachgewiesen werden (28, 91-93). Dies kann zum einen durch mehrere mögliche Kontaminationsquellen bedingt sein, zum anderen werden aber auch genomische Veränderungen durch beispielsweise Rekombination als Ursache der Heterogenität diskutiert (25). Um letztlich Übertragungswege oder Infektionsquellen genauer analysieren und identifizieren zu können, müssen Isolate aus verschiedenen Quellen genotypisiert und untereinander verglichen werden. In einer Studie von Lehmann et al. (2015) zeigte die Typisierung von *Arcobacter*-Isolaten verschiedener Lebensmittel keine Korrelation von Genotyp und Herkunft der Isolate (93). Andererseits konnten mittels rep-PCR beim Vergleich von Human- und Tierisolaten Übereinstimmungen im Genotyp gefunden werden, was auf eine mögliche zoonotische Übertragung hinweist (95). In zukünftigen Studien sollten demnach verstärkt *Arcobacter*-Isolate verschiedener Herkunft typisiert und miteinander verglichen werden, um die Verwandtschaft der Isolate und damit infektionsepidemiologische Zusammenhänge zu klären. Gelingt es diese ausfindig zu machen wird damit gleichzeitig die Grundlage für

infektionspräventive Maßnahmen geschaffen.

### 6.3. Präsenz von putativen Virulenzgenen bei *Arcobacter* spp.

Über die Pathogenitätsmechanismen und potentiellen Virulenzfaktoren von *Arcobacter* ist bisher nur wenig bekannt. Im Genom von *A. butzleri* konnten bisher zehn putative Virulenzgene nachgewiesen werden, die unter anderem Homologien zu *Campylobacter* aufweisen (12). Jedoch ist unklar, ob diese mutmaßlichen Virulenzfaktoren auch die gleiche Funktion in *Arcobacter* übernehmen und inwieweit diese zum Virulenzpotential beitragen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Vorhandensein dieser zehn putativen Virulenzgene untersucht, um einen ersten Eindruck über die Verbreitung dieser Gene in Humanisolaten zu erhalten. Insgesamt ergaben die Untersuchungen ein relativ häufiges Vorkommen der untersuchten Virulenzgene in *A. butzleri*-Isolaten. Dabei konnten vier der Gene, und zwar *ciaB*, *cj1349*, *cadF* und *tlyA* in allen Isolaten nachgewiesen werden, aber auch die Gene *pldA* und *mviN* waren in 83 und 96 % der Isolate vorhanden. Diese sechs Gene konnten auch in anderen Studien in 66 bis 100 % der *A. butzleri*-Stämmen verschiedener Herkunft detektiert werden (93, 106-113). Dabei handelt es sich um Gene, die unter anderem mit dem Anheften und Eindringen in die Wirtszelle und der Hämolyse von Erythrozyten assoziiert sind (97-101). Die Gene *hecA*, *hecB*, *iroE* und *irgA* wurden weniger häufig in den in dieser Studie untersuchten humanen *A. butzleri*-Isolaten detektiert. Etwa in einem Viertel der Isolate konnten *hecA* und *hecB* nachgewiesen werden, was mit den bisher beschriebenen Prävalenzen für diese beiden Gene von 13 bis 48 % einhergeht (93, 106, 107, 109-111, 113). Im Gegensatz dazu wurde in einer Studie, die auch Humanisolate untersucht hatte, das Gen *hecB* in 86 % der Isolate detektiert (106). Das Vorhandensein von *iroE* wurde bisher eher selten gezielt untersucht, mit Prävalenzen zwischen 30 und 60 % (93, 107, 111), wobei eine Studie eine weitaus geringere Prävalenz von 17 % beschrieb (103). Auch in der vorliegenden Studie konnte dieses Gen in nur 12 % der *A. butzleri*-Isolate nachgewiesen werden. In nur zwei Isolaten wurde des Weiteren das *irgA* Gen detektiert (8 %). Andere Studien zeigen einerseits ebenfalls nur geringe Detektionsrate von *irgA*, mit Prävalenzen von 4 bis 23 % (107, 109, 111, 113), während andererseits Prävalenzen von 35 bis 46 % ermittelt wurden (93, 106, 110). Trotz unterschiedlicher Prävalenzen scheinen die vier Gene *hecA*, *hecB*, *iroE* und *irgA*, die teilweise mit der Anheftung an Wirtszellen, der Hämolyse, und der Aufrechterhaltung einer Infektion assoziiert sind (12, 103-105), insgesamt weitaus weniger in *A. butzleri* verbreitet zu sein. In den humanen *A. cryaerophilus*-Isolaten der vorliegenden Studie konnten im Vergleich zu

## Diskussion

*A. butzleri* insgesamt weniger der untersuchten Gene detektiert werden. *CiaB* ist das einzige Gen, dass in allen Isolaten nachgewiesen werden konnte, gefolgt von *mviN* in 80 % der Stämme. Dies ist im Einklang mit anderen Studien, in denen diese beiden Gene auch am häufigsten detektiert wurden, und zwar *ciaB* in 85 bis 100 % und *mviN* in 50 bis 100 % der untersuchten Stämme (106, 108-110, 112, 113). Weiterhin konnten in 40 % der *A. cryaerophilus*-Isolate das Gen *cadF* nachgewiesen werden, das auch in anderen Studien, und zwar in 10 bis 64 % der untersuchten Isolate, detektiert wurde (106, 108-110, 112, 113). Das Gen *pldA* konnte in 20 % und *tlyA* sowie *irgA* in 10 % der Isolate ermittelt werden. Die Nachweisraten der vorliegenden Studie für die Gene *pldA* und *irgA* liegen zwischen denen aus anderen Studien, die Prävalenzen von 0 bis 62 % für *pldA* (102, 103, 105, 106, 108, 109) und 0 bis 20 % für *irgA* berichten (102, 103, 108, 109). Für *tlyA* konnten hingegen deutlich höhere Prävalenzen zwischen 32 und 62 % detektiert werden (106, 108-110, 112, 113). Während keine anderen Gene in *A. cryaerophilus* ermittelt werden konnten, zeigten andere Studien noch das Vorhandensein von *cj1349* in 20 bis 77 % der untersuchten Isolate (106, 108, 109, 112). Allerdings gibt es auch Studien, wie es in dieser Arbeit der Fall ist, die dieses Gen nicht detektierten (110, 113). Ähnlich wie bei *A. butzleri* konnten eher geringe Prävalenzen der drei Gene *hecA*, *hecB* und *iroE* in *A. cryaerophilus* nachgewiesen werden bzw. wurden diese, wie auch in der vorliegenden Studie, gar nicht detektiert (106, 109, 110, 113).

Die Unterschiede in den Prävalenzen von Virulenzgenen in *A. butzleri*- sowie *A. cryaerophilus*-Isolaten können womöglich auf genomische Heterogenität der Spezies innerhalb der Bindungssequenzen der Primer zurückzuführen sein. Für letzteres spricht eine weitere Beobachtung aus der vorliegenden Studie bezüglich der Detektion von den putativen Virulenzgenen in den beiden *A. lanthieri*-Isolaten.

Während mit den *A. butzleri*-spezifischen Primern nur *hecA* nachgewiesen wurde, konnte durch die *A. lanthieri*-spezifischen Primer das Vorhandensein von sechs weiteren Genen, und zwar *ciaB*, *cadF*, *tlyA*, *pldA*, *mviN* und *irgA*, ermittelt werden, wodurch *A. lanthieri* ein ähnliches Virulenzgenmuster wie *A. butzleri* aufwies. Zambri et al. (2019) konnten ebenfalls ein häufiges Vorkommen der untersuchten mutmaßlichen Virulenzgene in *A. lanthieri*-Isolaten aus landwirtschaftlichen Wasser- und Fäkalquellen ermitteln (118). Unter Verwendung der auf *A. lanthieri*-Sequenzen basierenden Primer konnten auch in den *A. cryaerophilus*-Isolaten mehr Virulenzgene nachgewiesen werden als mit den auf *A. butzleri*-Sequenzen basierenden Primern. Diese Beobachtung verdeutlicht die Notwendigkeit Genus-spezifischer Primer, die die putativen Virulenzgene in diversen *Arcobacter* Spezies detektieren können und an deren Entwicklung demnach in zukünftigen Studien gearbeitet werden sollte. Ebenso wie in der Studie von Zambri et al. (2019) konnten zusätzlich in den *A. lanthieri*-Isolaten die für den Virulenzfaktor CDT

kodierenden Gene *cdtA*, *cdtB* und *cdtC* nachgewiesen werden (118). Im Gegensatz dazu wurde dieser Virulenzfaktor im Genom von *A. butzleri* bisher nicht detektiert (12, 117). In *C. jejuni*-Stämmen wird das Exotoxin CDT, das nachweislich zum Zelltod eukaryotischer Zellen führt, unter anderem in Zusammenhang mit deren Pathogenität gebracht (114-116). Das Vorhandensein der CDT Gene in *A. lanthieri* aber nicht in *A. butzleri*, kann auf Spezies-spezifische Pathogenitätsmechanismen innerhalb der Gattung *Arcobacter* hindeuten.

### **6.4. Zytotoxische Effekte von *Arcobacter* spp. *in vitro***

Zusätzlich zu der Präsenz von bestimmten putativen Virulenzgenen wurden in dieser Arbeit auch die zytotoxischen Eigenschaften der aus den humanen Stuhlproben isolierten *Arcobacter*-Stämme *in vitro* untersucht, um das pathogene Potential von *Arcobacter* weiter bewerten zu können. Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurde der kolorimetrische WST-1-Assay verwendet, mit dessen Hilfe die Aktivität von mitochondrialen Dehydrogenasen nachgewiesen wird, die nur in lebensfähigen Zellen aktiv sind. Für die *A. butzleri*-Isolate konnten insgesamt Stamm-spezifische zytotoxische Effekte auf HT-29/B6-Zellen nachgewiesen werden, wobei die meisten Isolate sich als stark (14/24) bzw. mäßig (9/24) zytotoxisch erwiesen und nur für ein Isolat ein schwächerer Effekt erkennbar war. Diese Stamm-spezifischen Eigenschaften von *A. butzleri* konnten bereits in einer ähnlichen Studie, in der die Zytotoxizität ebenfalls mittels Messung der Enzymaktivität der infizierten intestinalen Zellen beurteilt wurde, gezeigt werden. In anderen Studien äußerte sich die Zytotoxizität von *A. butzleri* in Veränderungen der Zellmorphologie (Zellverlängerung, Zellabrundung, Kernpyknose) von CHO-, Vero-, HeLa- und INT407-Zellen nach Zugabe von zellfreien Überständen der Übernachtskulturen (117, 120, 122, 125). Diese morphologischen Veränderungen sind vermutlich auf die Sekretion eines Enterotoxins zurückzuführen. Während in einigen *Campylobacter* spp. die Expression des Enterotoxins CDT nachgewiesen wurde und es auch als einer der Virulenzfaktoren angesehen wird, der deren Pathogenität ausmacht (114-116), konnten bisher keine der CDT codierenden Gene im Genom von *A. butzleri* identifiziert werden (12, 117). Daher wird vermutet, dass die durch *A. butzleri* induzierte Zytotoxizität durch ein CDT-differentes Toxinmolekül hervorgerufen wird. In einer Studie von Villarruel-Lopez et al. (2003) konnte nach Zugabe von *Arcobacter*-Überständen auf Vero-Zellen neben der Elongation auch die Bildung von Vakuolen innerhalb der Zellen beobachtet werden, was die Sekretion eines vakuolisierenden Toxins vermuten lässt, wie es unter anderem bei *Helicobacter pylori* und *Vibrio cholerae* der Fall ist (126, 162). Bisher haben sich nur wenige

## Diskussion

Studien mit der Zytotoxizität von *A. cryaerophilus* befasst. Während die Mehrheit der *A. cryaerophilus*-Isolate aus den humanen Stuhlproben aus der vorliegenden Studie keine Zytotoxizität auf HT-29/B6-Zellen induzierten, und sich nur zwei der Isolate als schwach zytotoxisch erwiesen, konnte in anderen Studien auf Vero-, HeLa- und INT407-Zellen zytotoxische Effekte dieser Spezies beobachtet werden (117, 126). Die unterschiedlichen Beobachtungen können sich aus den verschiedenen Untersuchungsmethoden, den eingesetzten Zelllinien oder den Isolaten ergeben. Wie bei *A. butzleri* konnten in *A. cryaerophilus*-Isolaten keine CDT-Gene nachgewiesen werden (117).

Des Weiteren wurde die Zytotoxizität von den ersten zwei aus humanen Stuhlproben isolierten *A. lanthieri*-Stämmen untersucht, und beide Isolate erwiesen sich als stark zytotoxisch. Die Aussagekraft hinsichtlich der allgemeinen Zytotoxizität für diese Spezies ist allerdings aufgrund der geringen Anzahl untersuchter Isolate begrenzt und muss erst noch durch weitere Studien diesbezüglich bestätigt werden. Durch die Tatsache, dass in beiden Isolaten mittels PCR auch die für das CDT-Toxin codierenden Gene detektiert werden konnten, stellt das CDT-Toxin einen möglichen Virulenzfaktor von *A. lanthieri* dar. Die CDT-Gene konnten auch in *A. lanthieri*- und *A. faecis*-Isolaten aus Umwelt- und Fäzesproben detektiert werden (118).

Zusammenfassend konnten für die beiden Spezies *A. butzleri* und *A. lanthieri* in dieser Arbeit eine Fülle an putativen Virulenzgenen und starke zytotoxische Aktivität *in vitro* nachgewiesen werden. Das Vorhandensein der CDT-Gene in *A. lanthieri*, aber nicht in *A. butzleri* könnte ein Indiz für spezies-spezifische Pathogenitätsmechanismen sein. Inwieweit die vermeintlichen Virulenzgene jedoch für die Pathogenität von *Arcobacter* verantwortlich sind, ist noch unklar. Bisher konnte noch keine Korrelation zwischen dem Virulenzgenmuster einerseits und den adhäsiven, invasiven und zytotoxischen Eigenschaften andererseits gefunden werden (107). So konnten in der vorliegenden Studie beispielsweise in allen untersuchten *A. butzleri*- und *A. lanthieri*-Isolaten, die zytotoxische Effekte in HT29/B6-Zellen aufwiesen, die beiden Gene *cj1349* und *tlyA* nachgewiesen werden. In anderen Bakterien ist *cj1349* mit der Adhäsion an Darmzellen und *tlyA* mit der Hämolyse von Erythrozyten assoziiert. In der Studie von Karadas et al. (2013) wiesen alle sechs untersuchten *A. butzleri*-Isolate, in denen das Adhäsionsgen *cj1349* detektiert wurde, verschiedene adhäsive Phänotypen auf, und es konnte zudem kein Zusammenhang zwischen den Phänotypen und Aminosäuresequenzen des jeweiligen Gens gefunden werden (107). In einer weiteren Studie der gleichen Arbeitsgruppe konnte für zwei nicht- bzw. schwach-adhäsive Stämme dennoch eine starke zytotoxische Fähigkeit nachgewiesen werden (128). Ob oder inwieweit das Gen *cj1349* letztendlich zur Toxizität von *Arcobacter* beiträgt, lässt sich durch die oben genannte Studie von Karadas et al. (2016) sowie durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie nicht

eindeutig klären. In weiteren Studien sollte zusätzlich das Gen *tlyA* näher untersucht werden, um dessen Einfluss auf die pathogenen Eigenschaften von *Arcobacter* bewerten zu können.

### **6.5. Antimikrobielle Empfindlichkeitstestung von *Arcobacter* spp.**

Die Entstehung und Ausbreitung bakterieller Resistenzen gegenüber Antibiotika stellt weltweit ein zunehmendes Problem dar, da dadurch die Behandlung von bakteriellen Infektionskrankheiten zunehmend erschwert wird. Obwohl Infektionen mit *Arcobacter* meistens eher mild verlaufen und selbst-limitierend sind, kann in schwerwiegenden Fällen der Einsatz von Antibiotika durchaus gerechtfertigt sein. Es konnten unterschiedliche Resistenzraten für Human-, Tier- und Umweltisolate gegenüber gängigen Antibiotika wie Makroliden, Fluorchinolonen, Aminoglykosidne,  $\beta$ -Laktamen und Tetrazyklinen beobachtet werden (10). Dennoch ist die Datenlage bezüglich der Empfindlichkeit von *Arcobacter* gegenüber Antibiotika stark begrenzt, vor allem durch das Fehlen standardisierter Protokolle und definierter Grenzwerte, die die Interpretation der Ergebnisse und eine damit verbundene Resistenzdefinition erschweren.

In der vorliegenden Studie wurde die Empfindlichkeit der humanen *Arcobacter*-Isolate gegenüber verschiedenen Antibiotika mittels E-Test bestimmt. Zur Einordnung der ermittelten MHKs, wurden diese mit den von EUCAST definierten ECOFFs für *C. jejuni* verglichen (163). Für Ciprofloxacin, Gentamicin und Ampicillin scheinen die *C. jejuni* ECOFFS auch für *Arcobacter* anwendbar zu sein, was mit den Ergebnissen einer Studie von Riesenberg et al. (2017) einhergeht (164). Der Großteil der Stämme wurde dabei als Wildtyp (MHKs  $\leq$  ECOFF) klassifiziert und einzelne Isolate als weniger empfindlich gegenüber Ciprofloxacin und Ampicillin, was auf eine erworbene Resistenz hindeuten könnte. Anhand der ermittelten Daten für Erythromycin, Azithromycin und Tetrazyklin, die überwiegend MHKs über dem ECOFF von *C. jejuni* zeigten, könnten hingegen die realen *Arcobacter* ECOFFs höher sein als die von *C. jejuni*.

Innerhalb der unimodalen Verteilung für Erythromycin zeigten sich niedrige MHKs bis 8  $\mu\text{g/ml}$ , was mit den Ergebnissen anderer Studien übereinstimmt, die eine hohe Empfindlichkeit von *Arcobacter* gegenüber Erythromycin ermittelten (74, 75, 141, 142). Während nur einzelne Isolate aus der vorliegenden Studie ( $n = 2$ ) erhöhte Erythromycin-MHKs aufwiesen, wurde in anderen Studien von Resistenzraten bis zu 62 % berichtet (17, 37). Im Gegensatz zu der Untersuchung in der vorliegenden Arbeit wurde in diesen Studien das Disk-Diffusionsverfahren mit 15  $\mu\text{g}$  Erythromycin pro Disk angewendet und die Resistenz nach CLSI-Richtlinien für *Enterobacteriaceae* bzw. *Staphylococcus* spp. bestimmt.

## Diskussion

Gegenüber Azithromycin wiesen 54 % der *A. butzleri*-Isolate aus der vorliegenden Studie MHKs  $\geq 8 \mu\text{g/ml}$  auf, was mit den Ergebnissen von Van den Abeele et al. (2016) übereinstimmt (143). Darüber hinaus konnten in anderen Studien erhöhte MHKs für Azithromycin in bis zu 95 % bzw. in 20 % der aus Geflügelprodukten isolierten *A. butzleri*- bzw. *A. cryaerophilus*-Stämmen gezeigt werden (137, 147). Sowohl Azithromycin als auch Erythromycin gehören beide zu den Makrolidantibiotika und dennoch konnte eine bimodale Verteilung für Azithromycin im Gegensatz zu Erythromycin gezeigt werden. In *Campylobacter* wird normalerweise eine Kreuzresistenz zwischen Azithromycin und Erythromycin beobachtet, dennoch erwiesen sich einzelne Isolate als empfindlich gegenüber Erythromycin aber resistent gegenüber Azithromycin (153). Eine Ganzgenomanalyse zur Detektion der möglichen Ursache ergab eine Aminosäuresubstitution im ribosomalen Protein L22, die zur Resistenz gegenüber Azithromycin führt, aber keine weitere Mutation im 23S rRNA Gen, das die Sensitivität gegenüber Erythromycin erklärt (153). Um die vorliegenden unterschiedlichen MHK-Verteilungen in *Arcobacter* erklären zu können, bedarf es weiterer Untersuchungen auf Genomebene.

Gegenüber Ciprofloxacin zeigte sich die Mehrheit der untersuchten *Arcobacter*-Isolate (86 %) als sensibel, was mit anderen Studien übereinstimmt, die Sensibilitätsraten von 87 bis 100 % bei Humanisolaten berichteten (74, 75, 96, 138, 141-143). Im Gegensatz zu den aus der vorliegenden Studie ermittelten niedrigen MHKs von Ciprofloxacin in *Arcobacter* spp. zwischen 0,032 und 0,50  $\mu\text{g/ml}$ , zeigten klinische *Campylobacter*-Isolate hohe Resistenzraten von 45 bis 71 % mit MHKs  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$  (144, 145). In 8 % der *A. butzleri*-Isolate und sogar in 30 % der *A. cryaerophilus*-Isolate konnten auch in der vorliegenden Studie erhöhte MHKs für Ciprofloxacin nachgewiesen werden, was den Ergebnissen einer belgischen Studie ähnelt, in der sogar mehr als 50 % der untersuchten *A. cryaerophilus*-Isolate eine Resistenz gegenüber Ciprofloxacin aufwiesen (143). Trotz der auffälligen Resistenz von *A. cryaerophilus*, könnte Ciprofloxacin als bevorzugtes Medikament bei einer *A. butzleri*-Infektion angewendet werden, sofern eine antibiotische Behandlung erforderlich wäre.

Alle *Arcobacter*-Isolate aus der vorliegenden Studie erwiesen sich als sensibel gegenüber Gentamicin, was mit anderen Studien übereinstimmt, die nur über geringe Resistenzraten von *Arcobacter* spp. zwischen 0 und 4 % berichteten (74, 96, 138, 142, 143).

Für Ampicillin hingegen wurden in verschiedenen Studien Resistenzraten zwischen 50 und 100 % beschrieben (74, 75, 143), und auch 42 % der in der vorliegenden Studie untersuchten *A. butzleri*-Isolate zeigten hohe MHKs für Ampicillin (24 – 64  $\mu\text{g/ml}$ ).

Ähnlich wie bei Gentamicin waren die *Arcobacter*-Isolate empfindlich gegenüber Tetrazyklin. Die Sensibilität von *Arcobacter* spp. gegenüber Tetrazyklin konnte auch in anderen Studien beobachtet

## Diskussion

werden (138, 142, 143). In einer aktuellen Studie aus Portugal, die *Arcobacter*-Stämme aus Lebensmitteln untersuchten, konnte jedoch eine Resistenz gegenüber Tetrazyklin in 95 % der untersuchten *A. butzleri*-Isolate festgestellt werden (38).

Trotz der Empfindlichkeit von *Arcobacter* gegenüber verschiedenen Antibiotika, konnten bei Azithromycin, Ciprofloxacin sowie Ampicillin bei einigen Isolaten erhöhte MHKs festgestellt werden. Im Falle einer schweren *Arcobacter*-Infektion, bei der der Einsatz von Antibiotika notwendig wäre, sollte daher zunächst eine individuelle Resistenztestung erfolgen, um unnötige Antibiotikagabe und eine damit verbundene Resistenzentwicklung zu vermeiden.

## 7. Fazit und Ausblick

*Arcobacter* spp. können aus unterschiedlichen Habitaten, wie Tieren, Lebensmitteln tierischen und nicht-tierischen Ursprungs und Wasser isoliert werden, wobei vor allem Lebensmittel und Wasser Kontaminationsquellen darstellen und somit durch den Verzehr auf den Menschen übertragen werden können. Bisher konnten jedoch keine direkten Transmissionswege identifiziert werden. Sporadische Ausbrüche, deren Ursache vermutlich im Verzehr von kontaminiertem Wasser oder Lebensmitteln liegen, und generell das Vorkommen in erkrankten Menschen, führen zunehmend zu der Annahme, dass es sich bei *Arcobacter* um pathogene Zoonoseerreger handelt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Spezies *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* und *A. lanthieri* in geringen Prävalenzen in humanen Stuhlproben ambulanter und stationärer Patienten vorkommen. Die isolierten Stämme, vor allem *A. butzleri*- und *A. lanthieri*-Isolate, wiesen eine hohe Nachweisrate von putativen Virulenzgenen und überwiegend starke zytotoxische Effekte *in vitro* auf. Das Vorhandensein der CDT-Gene in *A. lanthieri* im Gegensatz zu *A. butzleri* deutet auf unterschiedliche Pathogenitätsmechanismen innerhalb der Gattung *Arcobacter* hin. Welche Virulenzfaktoren aber letztlich für die Pathogenese dieses Erregers verantwortlich sind bleibt noch immer unklar. Anders als bei den *A. butzleri* und *A. lanthieri*-Isolaten konnten für die *A. cryaerophilus*-Isolate weniger putative Virulenzgene nachgewiesen werden, und diese zeigten keine bzw. nur sehr schwache zytotoxische Effekte *in vitro*. Ob Genus-spezifische Primer bzw. ein anderes „Setup“ zur Bestimmung der Zytotoxizität andere Ergebnisse liefern würden, sollte in weiteren Studien analysiert werden. Darüber hinaus ergab die antimikrobielle Empfindlichkeitstestung in der vorliegenden Studie, dass *Arcobacter* spp. gegenüber verschiedenen Antibiotika teilweise erhöhte MHKs aufweisen, was auf eine Resistenzentwicklung hindeuten könnte.

Die in dieser Arbeit untersuchten humanen Stuhlproben wurden von drei mikrobiologischen Diagnostiklaboren aus Berlin gesammelt. Es wurden nur Stuhlproben, die dort zur Untersuchung auf bakterielle Enteropathogene eingegangen sind, in die Studie mit aufgenommen und auf *Arcobacter* spp. untersucht. Da die Proben vor der Bearbeitung pseudonymisiert wurden, lagen keine detaillierten Patienteninformationen vor, und eine retrospektive Zuordnung der Proben zu beispielsweise einem Krankheitsbild war daher nicht möglich. In folgenden Studien sollten unter anderem die Symptome der Patienten mit betrachtet werden, um eine mögliche Korrelation zwischen diesen und einer *Arcobacter*-Infektion ermitteln zu können.

## Fazit und Ausblick

Um die Bedeutung von *Arcobacter* spp. als Zoonoseerreger besser einschätzen zu können und um zu klären, welches Risiko insbesondere für den Menschen von diesen Erregern ausgeht, sind noch weitere Studien nötig. Es ist dringend notwendig, eine Standard-Isolationsmethode zu definieren und *Arcobacter* in die Routinediagnostik zu integrieren, um die tatsächliche Prävalenz des Erregers im Menschen und in der Umwelt und seine Rolle als ätiologisches Agens von humanen Erkrankungen bewerten zu können. Es sollte bei weiteren humanen Prävalenzstudien eine Kontrollgruppe mit gesunden Patienten mitgeführt werden, um einen direkten Vergleich zu haben. Um weiter der Bedeutung von *Arcobacter* als Zoonoseerreger auf den Grund zu gehen, müssen Infektionsquellen und mögliche Übertragungswege eindeutig geklärt werden, ebenso wie die Pathogenitätsmechanismen und die zugrundeliegenden Virulenzfaktoren. Da schwerwiegende *Arcobacter*-Infektionen den Einsatz von Antibiotika erfordern könnten, müssen des Weiteren definierte Grenzwerte für *Arcobacter* festgelegt werden, um Resistenzdaten besser interpretieren und eine Resistenzentwicklung besser überwachen bzw. vermeiden zu können. All die genannten Aspekte sind Voraussetzung, um endgültig die Rolle und das Gefährdungspotential von *Arcobacter* sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin zu beurteilen.

## 8. Literaturverzeichnis

1. World Health Organization. JointWHO/FAO expert committee on zoonoses. 2nd report. WHO technical report series no. 169, Geneva; 1959. 3rd report, WHO Technical Report Series no.378, Geneva; The Organization; 1967.
2. Dhama K, Rajagunalan S, Chakraborty S, Verma AK, Kumar A, Tiwari R, Kapoor S. Food-borne pathogens of animal origin-diagnosis, prevention, control and their zoonotic significance: a review. Pak J Biol Sci. 2013;16(20):1076-85.
3. BVL. Gemeinsamer nationaler Bericht des BVL und RKI zu lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüchen in Deutschland 2018. 2019.  
[https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Berichte/10\\_BELA\\_lebensmittelbed\\_Krankheitsausbruechen\\_Dtl/Jahresbericht2018.pdf](https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Berichte/10_BELA_lebensmittelbed_Krankheitsausbruechen_Dtl/Jahresbericht2018.pdf) (abgerufen am 22.11.2019).
4. Robert Koch-Institut. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2018. Berlin; 2019.  
[https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch\\_2018.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2018.pdf?__blob=publicationFile) (abgerufen am 29.01.2020).
5. ICMSF ICoMSfF. 2002. p 171. In Tompkin RB (ed), Microbiological testing in food safety management, vol 7. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY.
6. Ferreira S, Oleastro M, Domingues F. Current insights on *Arcobacter butzleri* in food chain. Curr Opin Food Sci. 2019;26:9-17.
7. Hsu TTD, Lee J. Global distribution and prevalence of *Arcobacter* in food and water. Zoonoses Public Health. 2015;62(8):579-89.
8. Prouzet-Mauleon V, Labadi L, Bouges N, Menard A, Megraud F. *Arcobacter butzleri*: underestimated enteropathogen. Emerg Infect Dis. 2006;12(2):307-9.
9. Figueras MJ, Levican A, Pujol I, Ballester F, Rabada Quilez MJ, Gomez-Bertomeu F. A severe case of persistent diarrhoea associated with *Arcobacter cryaerophilus* but attributed to *Campylobacter* sp. and a review of the clinical incidence of *Arcobacter* spp. New Microbes New Infect. 2014;2(2):31-7.
10. Ferreira S, Queiroz JA, Oleastro M, Domingues FC. Insights in the pathogenesis and resistance of *Arcobacter*: A review. Crit Rev Microbiol. 2016;42(3):364-83.
11. Vandamme P, Deley J. Proposal for a New Family, *Campylobacteraceae*. Int J Syst Bacteriol. 1991;41(3):451-5.

## Literaturverzeichnis

12. Miller WG, Parker CT, Rubenfield M, Mendz GL, Wosten MM, Ussery DW, Stolz JF, Binnewies TT, Hallin PF, Wang G, Malek JA, Rogosin A, Stanker LH, Mandrell RE. The complete genome sequence and analysis of the epsilonproteobacterium *Arcobacter butzleri*. PLoS One. 2007;2(12):e1358.
13. Vandamme P, Falsen E, Rossau R, Hoste B, Segers P, Tytgat R, De Ley J. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. Int J Syst Bacteriol. 1991;41(1):88-103.
14. Perez-Cataluna A, Collado L, Salgado O, Lefinanco V, Figueras MJ. A polyphasic and taxonomic evaluation uncovers *Arcobacter cryaerophilus* as a species complex that embraces four genomovars. Front Microbiol. 2018;9:805.
15. Perez-Cataluna A, Salas-Masso N, Figueras MJ. *Arcobacter lacus* sp. nov. and *Arcobacter caeni* sp. nov., two novel species isolated from reclaimed water. Int J Syst Evol Microbiol. 2019;69(11):3326-32.
16. Waite DW, Vanwonterghem I, Rinke C, Parks DH, Zhang Y, Takai K, Sievert SM, Simon J, Campbell BJ, Hanson TE, Woyke T, Klotz MG, Hugenholtz P. Comparative genomic analysis of the class *Epsilonproteobacteria* and proposed reclassification to Epsilonbacteraeota (phyl. nov.). Front Microbiol. 2017;8:682.
17. Fanelli F, Di Pinto A, Mottola A, Mule G, Chieffi D, Baruzzi F, Tantillo G, Fusco V. Genomic characterization of *Arcobacter butzleri* isolated from shellfish: novel insight into antibiotic resistance and virulence determinants. Front Microbiol. 2019;10:670.
18. Hilton CL, Mackey BM, Hargreaves AJ, Forsythe SJ. The recovery of *Arcobacter butzleri* NCTC 12481 from various temperature treatments. J Appl Microbiol. 2001;91(5):929-32.
19. On SL, Jensen TK, Bille-Hansen V, Jorsal SE, Vandamme P. Prevalence and diversity of *Arcobacter* spp. isolated from the internal organs of spontaneous porcine abortions in Denmark. Vet Microbiol. 2002;85(2):159-67.
20. Vandamme P, Vancanneyt M, Pot B, Mels L, Hoste B, Dewettinck D, Vlaes L, van den Borre C, Higgins R, Hommez J, et al. Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. Int J Syst Bacteriol. 1992;42(3):344-56.
21. Logan EF, Neill SD, Mackie DP. Mastitis in dairy cows associated with an aerotolerant campylobacter. Vet Rec. 1982;110(10):229-30.

## Literaturverzeichnis

22. Hamir AN, Sonn RJ, Franklin S, Wesley IV. *Campylobacter jejuni* and *Arcobacter* species associated with intussusception in a raccoon (*Procyon lotor*). *Vet Rec.* 2004;155(11):338-40.
23. Anderson KF, Kiehlbauch JA, Anderson DC, McClure HM, Wachsmuth IK. *Arcobacter* (*Campylobacter*) *butzleri*-associated diarrheal illness in a nonhuman primate population. *Infect Immun.* 1993;61(5):2220-3.
24. Higgins R, Messier S, Daignault D, Lorange M. *Arcobacter butzleri* isolated from a diarrhoeic non-human primate. *Lab Anim.* 1999;33(1):87-90.
25. Hume ME, Harvey RB, Stanker LH, Droleskey RE, Poole TL, Zhang HB. Genotypic variation among *Arcobacter* isolates from a farrow-to-finish swine facility. *J Food Prot.* 2001;64(5):645-51.
26. Kabeya H, Maruyama S, Morita Y, Kubo M, Yamamoto K, Arai S, Izumi T, Kobayashi Y, Katsube Y, Mikami T. Distribution of *Arcobacter* species among livestock in Japan. *Vet Microbiol.* 2003;93(2):153-8.
27. van Driessche E, Houf K, van Hoof J, De Zutter L, Vandamme P. Isolation of *Arcobacter* species from animal feces. *FEMS Microbiol Lett.* 2003;229(2):243-8.
28. Van Driessche E, Houf K, Vangroenweghe F, Nollet N, De Zutter L, Vandamme P, Van Hoof J. Occurrence and strain diversity of *Arcobacter* species isolated from healthy Belgian pigs. *Res Microbiol.* 2004;155(8):662-6.
29. Van Driessche E, Houf K, Vangroenweghe F, De Zutter L, Van Hoof J. Prevalence, enumeration and strain variation of *Arcobacter* species in the faeces of healthy cattle in Belgium. *Vet Microbiol.* 2005;105(2):149-54.
30. Fernandez H, Villanueva MP, Mansilla I, Gonzalez M, Latif F. *Arcobacter butzleri* and *A. cryaerophilus* in human, animals and food sources, in southern Chile. *Braz J Microbiol.* 2015;46(1):145-7.
31. Patyal A, Rathore RS, Mohan HV, Dhama K, Kumar A. Prevalence of *Arcobacter* spp. in humans, animals and foods of animal origin including sea food from India. *Transbound Emerg Dis.* 2011;58(5):402-10.
32. Rahimi E, Hormozipoor H, Gholami-ahangaran M, Yazdi F. Prevalence of *Arcobacter* species on chicken carcasses during processing in Iran. *J Appl Poult Res.* 2012;21:407-12.
33. Ho HT, Lipman LJ, Gaastra W. The introduction of *Arcobacter* spp. in poultry slaughterhouses. *Int J Food Microbiol.* 2008;125(3):223-9.
34. Fera MT, La Camera E, Carbone M, Malara D, Pennisi MG. Pet cats as carriers of *Arcobacter* spp. in Southern Italy. *J Appl Microbiol.* 2009;106(5):1661-6.

## Literaturverzeichnis

35. Houf K, De Smet S, Bare J, Daminet S. Dogs as carriers of the emerging pathogen *Arcobacter*. *Vet Microbiol.* 2008;130(1-2):208-13.
36. Collado L, Guarro J, Figueras MJ. Prevalence of *Arcobacter* in meat and shellfish. *J Food Prot.* 2009;72(5):1102-6.
37. Zacharow I, Bystron J, Walecka-Zacharska E, Podkowik M, Bania J. Prevalence and antimicrobial resistance of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* isolates from retail meat in Lower Silesia region, Poland. *Pol J Vet Sci.* 2015;18(1):63-9.
38. Vicente-Martins S, Oleastro M, Domingues FC, Ferreira S. *Arcobacter* spp. at retail food from Portugal: Prevalence, genotyping and antibiotics resistance. *Food Control.* 2018;85:107-12.
39. Lappi V, Archer JR, Cebelinski E, Leano F, Besser JM, Klos RF, Medus C, Smith KE, Fitzgerald C, Davis JP. An outbreak of foodborne illness among attendees of a wedding reception in Wisconsin likely caused by *Arcobacter butzleri*. *Foodborne Pathog Dis.* 2013;10(3):250-5.
40. Scullion R, Harrington CS, Madden RH. Prevalence of *Arcobacter* spp. in raw milk and retail raw meats in Northern Ireland. *J Food Prot.* 2006;69(8):1986-90.
41. Yesilmen S, Vural A, Erkan ME, Yildirim IH. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Arcobacter* species in cow milk, water buffalo milk and fresh village cheese. *Int J Food Microbiol.* 2014;188:11-4.
42. Scarano C, Giacometti F, Manfreda G, Lucchi A, Pes E, Spanu C, De Santis EP, Serraino A. *Arcobacter butzleri* in sheep ricotta cheese at retail and related sources of contamination in an industrial dairy plant. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(22):7036-41.
43. Zhang X, Alter T, Golz G. Characterization of *Arcobacter* spp. isolated from retail seafood in Germany. *Food Microbiol.* 2019;82:254-8.
44. Mottola A, Bonerba E, Bozzo G, Marchetti P, Celano GV, Colao V, Terio V, Tantillo G, Figueras MJ, Di Pinto A. Occurrence of emerging food-borne pathogenic *Arcobacter* spp. isolated from pre-cut (ready-to-eat) vegetables. *Int J Food Microbiol.* 2016;236:33-7.
45. Rathlavath S, Kumar S, Nayak BB. Comparative isolation and genetic diversity of *Arcobacter* sp. from fish and the coastal environment. *Lett Appl Microbiol.* 2017a;65(1):42-9.
46. Gonzalez A, Bayas Morejon IF, Ferrus MA. Isolation, molecular identification and quinolone-susceptibility testing of *Arcobacter* spp. isolated from fresh vegetables in Spain. *Food Microbiol.* 2017;65:279-83.

## Literaturverzeichnis

47. Levican A, Collado L, Figueras MJ. The use of two culturing methods in parallel reveals a high prevalence and diversity of *Arcobacter* spp. in a wastewater treatment plant. *Biomed Res Int.* 2016;2016:8132058.
48. Collado L, Inza I, Guarro J, Figueras MJ. Presence of *Arcobacter* spp. in environmental waters correlates with high levels of fecal pollution. *Environ Microbiol.* 2008;10(6):1635-40.
49. Diergaardt SM, Venter SN, Spreeth A, Theron J, Brozel VS. The occurrence of campylobacters in water sources in South Africa. *Water Res.* 2004;38(10):2589-95.
50. Merga JY, Royden A, Pandey AK, Williams NJ. *Arcobacter* spp. isolated from untreated domestic effluent. *Lett Appl Microbiol.* 2014;59(1):122-6.
51. Webb AL, Taboada EN, Selinger LB, Boras VF, Inglis GD. Prevalence and diversity of waterborne *Arcobacter butzleri* in southwestern Alberta, Canada. *Can J Microbiol.* 2017;63(4):330-40.
52. Fong TT, Mansfield LS, Wilson DL, Schwab DJ, Molloy SL, Rose JB. Massive microbiological groundwater contamination associated with a waterborne outbreak in Lake Erie, South Bass Island, Ohio. *Environ Health Perspect.* 2007;115(6):856-64.
53. Ertas N, Dogruer Y, Gonulalan Z, Guner A, Ulger I. Prevalence of *Arcobacter* species in drinking water, spring water, and raw milk as determined by multiplex PCR. *J Food Prot.* 2010;73(11):2099-102.
54. Kopilovic B, Ucakar V, Koren N, Krek M, Kraigher A. Waterborne outbreak of acute gastroenteritis in a coastal area in Slovenia in June and July 2008. *Euro Surveill.* 2008;13(34).
55. Rice EW, Rodgers MR, Wesley IV, Johnson CH, Tanner SA. Isolation of *Arcobacter butzleri* from ground water. 1999;28(1):31-5.
56. Chinivasagam HN, Corney BG, Wright LL, Diallo IS, Blackall PJ. Detection of *Arcobacter* spp. in piggery effluent and effluent-irrigated soils in southeast Queensland. *J Appl Microbiol.* 2007;103(2):418-26.
57. Collado L, Gutierrez M, Gonzalez M, Fernandez H. Assessment of the prevalence and diversity of emergent campylobacteria in human stool samples using a combination of traditional and molecular methods. *Diagn Micr Infect Dis.* 2013;75(4):434-6.
58. Ferreira S, Julio C, Queiroz JA, Domingues FC, Oleastro M. Molecular diagnosis of *Arcobacter* and *Campylobacter* in diarrhoeal samples among Portuguese patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014;78(3):220-5.

## Literaturverzeichnis

59. Vandenberg O, Dediste A, Houf K, Ibekwem S, Souayah H, Cadranel S, Douat N, Zissis G, Butzler JP, Vandamme P. *Arcobacter* species in humans. *Emerging Infectious Diseases*. 2004;10(10):1863-7.
60. Van den Abeele AM, Vogelaers D, Van Hende J, Houf K. Prevalence of *Arcobacter* species among humans, Belgium, 2008-2013. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(10):1731-4.
61. Samie A, Obi CL, Barrett LJ, Powell SM, Guerrant RL. Prevalence of *Campylobacter* species, *Helicobacter pylori* and *Arcobacter* species in stool samples from the Venda region, Limpopo, South Africa: studies using molecular diagnostic methods. *J Infect*. 2007;54(6):558-66.
62. Wybo I, Breynaert J, Lauwers S, Lindenburg F, Houf K. Isolation of *Arcobacter skirrowii* from a patient with chronic diarrhea. *J Clin Microbiol*. 2004;42(4):1851-2.
63. Fallas-Padilla KL, Rodriguez-Rodriguez CE, Fernandez Jaramillo H, Arias Echandi ML. *Arcobacter*: comparison of isolation methods, diversity, and potential pathogenic factors in commercially retailed chicken breast meat from Costa Rica. *J Food Prot*. 2014;77(6):880-4.
64. Kim NH, Park SM, Kim HW, Cho TJ, Kim SH, Choi C, Rhee MS. Prevalence of pathogenic *Arcobacter* species in South Korea: Comparison of two protocols for isolating the bacteria from foods and examination of nine putative virulence genes. *Food Microbiol*. 2019;78:18-24.
65. Merga JY, Leatherbarrow AJ, Winstanley C, Bennett M, Hart CA, Miller WG, Williams NJ. Comparison of *Arcobacter* isolation methods, and diversity of *Arcobacter* spp. in Cheshire, United Kingdom. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(5):1646-50.
66. Scullion R, Harrington CS, Madden RH. A comparison of three methods for the isolation of *Arcobacter* spp. from retail raw poultry in Northern Ireland. *J Food Prot*. 2004;67(4):799-804.
67. Webb AL, Boras VF, Kruczkiewicz P, Selinger LB, Taboada EN, Inglis GD. Comparative detection and quantification of *Arcobacter butzleri* in stools from diarrheic and nondiarrheic people in Southwestern Alberta, Canada. *J Clin Microbiol*. 2016;54(4):1082-8.
68. de Boer RF, Ott A, Guren P, van Zanten E, van Belkum A, Kooistra-Smid AM. Detection of *Campylobacter* species and *Arcobacter butzleri* in stool samples by use of real-time multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2013;51(1):253-9.
69. Fera MT, Russo GT, Di Benedetto A, La Camera E, Orlando A, Giandalia A, Ruffa VF, Lanza G, Lentini V, Perdichizzi G, Cucinotta D. High prevalence of *Arcobacter* carriage in older subjects with type 2 diabetes. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:489784.

## Literaturverzeichnis

70. Houf K, Stephan R. Isolation and characterization of the emerging foodborn pathogen *Arcobacter* from human stool. *J Microbiol Meth.* 2007;68(2):408-13.
71. Jansen A, Stark K, Kunkel J, Schreier E, Ignatius R, Liesenfeld O, Werber D, Gobel UB, Zeitz M, Schneider T. Aetiology of community-acquired, acute gastroenteritis in hospitalised adults: a prospective cohort study. *BMC Infect Dis.* 2008;8:143.
72. Lastovica AJ, le Roux E. Efficient isolation of campylobacteria from stools. *J Clin Microbiol.* 2000;38(7):2798.
73. Lau SKP, Woo PCY, Hui WT, Li MWS, Teng JLL, Que TL, Luk WK, Lai RWM, Yung RWH, Yuen KY. Use of cefoperazone MacConkey agar for selective isolation of *Laribacter hongkongensis*. *J Clin Microbiol.* 2003;41(10):4839-41.
74. Kayman T, Abay S, Hizlisoy H, Atabay HI, Diker KS, Aydin F. Emerging pathogen *Arcobacter* spp. in acute gastroenteritis: molecular identification, antibiotic susceptibilities and genotyping of the isolated arcobacters. *J Med Microbiol.* 2012;61(Pt 10):1439-44.
75. Mandisodza O, Burrows E, Nulsen M. *Arcobacter* species in diarrhoeal faeces from humans in New Zealand. *N Z Med J.* 2012;125(1353):40-6.
76. Arguello E, Otto CC, Mead P, Babady NE. Bacteremia caused by *Arcobacter butzleri* in an immunocompromised host. *J Clin Microbiol.* 2015;53(4):1448-51.
77. Lau SK, Woo PC, Teng JL, Leung KW, Yuen KY. Identification by 16S ribosomal RNA gene sequencing of *Arcobacter butzleri* bacteraemia in a patient with acute gangrenous appendicitis. *Mol Pathol.* 2002;55(3):182-5.
78. Yap DYH, Kwan LPY, To KKW, Chan TM. *Arcobacter* peritonitis after fluoroscopic repositioning of a Tenckhoff catheter. *Perit Dial Int.* 2013;33(2):222-3.
79. Jiang Z-D, Dupont HL, Brown EL, Nandy RK, Ramamurthy T, Sinha A, Ghosh S, Guin S, Gurleen K, Rodrigues S, Chen JJ, McKenzie R, Steffen R. Microbial etiology of travelers' diarrhea in Mexico, Guatemala, and India: importance of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* and *Arcobacter* species. *J Clin Microbiol.* 2010;48(4):1417-9.
80. Houf K, De Zutter L, Van Hoof J, Vandamme P. Assessment of the genetic diversity among arcobacters isolated from poultry products by using two PCR-based typing methods. *Appl Environ Microb.* 2002;68(5):2172-8.
81. On SL, Atabay HI, Amisu KO, Coker AO, Harrington CS. Genotyping and genetic diversity of *Arcobacter butzleri* by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis. *Lett Appl Microbiol.* 2004;39(4):347-52.

## Literaturverzeichnis

82. On SL, Harrington CS, Atabay HI. Differentiation of *Arcobacter* species by numerical analysis of AFLP profiles and description of a novel *Arcobacter* from pig abortions and turkey faeces. *J Appl Microbiol.* 2003;95(5):1096-105.
83. Miller WG, Wesley IV, On SL, Houf K, Megraud F, Wang G, Yee E, Srijan A, Mason CJ. First multi-locus sequence typing scheme for *Arcobacter* spp. *BMC Microbiol.* 2009;9:196.
84. Alonso R, Girbau C, Martinez-Malaxetxebarria I, Fernandez-Astorga A. Multilocus sequence typing reveals genetic diversity of foodborne *Arcobacter butzleri* isolates in the North of Spain. *Int J Food Microbiol.* 2014;191:125-8.
85. Rasmussen LH, Kjeldgaard J, Christensen JP, Ingmer H. Multilocus sequence typing and biocide tolerance of *Arcobacter butzleri* from Danish broiler carcasses. *BMC Res Notes.* 2013;6:322.
86. Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol.* 1999;37(6):1661-9.
87. Rivas L, Fegan N, Vanderlinde P. Isolation and characterisation of *Arcobacter butzleri* from meat. *Int J Food Microbiol.* 2004;91(1):31-41.
88. Atabay HI, Bang DD, Aydin F, Erdogan HM, Madsen M. Discrimination of *Arcobacter butzleri* isolates by polymerase chain reaction-mediated DNA fingerprinting. 2002;35(2):141-5.
89. Vandamme P, Giesendorf BA, van Belkum A, Pierard D, Lauwers S, Kersters K, Butzler JP, Goossens H, Quint WG. Discrimination of epidemic and sporadic isolates of *Arcobacter butzleri* by polymerase chain reaction-mediated DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol.* 1993;31(12):3317-9.
90. Figueras MJ, Collado L, Levican A, Perez J, Solsona MJ, Yustes C. *Arcobacter molluscorum* sp. nov., a new species isolated from shellfish. *Syst Appl Microbiol.* 2011;34(2):105-9.
91. Aydin F, Gumussoy KS, Atabay HI, Ica T, Abay S. Prevalence and distribution of *Arcobacter* species in various sources in Turkey and molecular analysis of isolated strains by ERIC-PCR. *J Appl Microbiol.* 2007;103(1):27-35.
92. Collado L, Kasimir G, Perez U, Bosch A, Pinto R, Saucedo G, Huguet JM, Figueras MJ. Occurrence and diversity of *Arcobacter* spp. along the Llobregat River catchment, at sewage effluents and in a drinking water treatment plant. *Water Res.* 2010;44(12):3696-702.

## Literaturverzeichnis

93. Lehmann D, Alter T, Lehmann L, Uherkova S, Seidler T, Golz G. Prevalence, virulence gene distribution and genetic diversity of *Arcobacter* in food samples in Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2015;128(3-4):163-8.
94. Ramees TP, Rathore RS, Bagalkot PS, Sailo B, Mohan HV, Kumar A, Dhama K, Singh RK. Genotyping and genetic diversity of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* isolated from different sources by using ERIC-PCR from India. *Vet Q.* 2014;34(4):211-7.
95. Sekhar MS, Rao TS, Chinnam BK, Subramanyam KV, Metta M, Sharif NM. Genetic diversity of *Arcobacter* species of animal and human origin in Andhra Pradesh, India. *Indian J Microbiol.* 2017a;57(2):250-2.
96. Houf K, Devriese LA, Haesebrouck F, Vandenberg O, Butzler JP, Van Hoof J, Vandamme P. Antimicrobial susceptibility patterns of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* strains isolated from humans and broilers. *Microb Drug Resist.* 2004;10(3):243-7.
97. Konkel ME, Kim BJ, Rivera-Amill V, Garvis SG. Bacterial secreted proteins are required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. *Mol Microbiol.* 1999;32(4):691-701.
98. Flanagan RC, Neal-McKinney JM, Dhillon AS, Miller WG, Konkel ME. Examination of *Campylobacter jejuni* putative adhesins leads to the identification of a new protein, designated FlpA, required for chicken colonization. *Infect Immun.* 2009;77(6):2399-407.
99. Monteville MR, Yoon JE, Konkel ME. Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer-membrane protein and microfilament reorganization. *Microbiology.* 2003;149(Pt 1):153-65.
100. Grant KA, Belandia IU, Dekker N, Richardson PT, Park SF. Molecular characterization of *pldA*, the structural gene for a phospholipase A from *Campylobacter coli*, and its contribution to cell-associated hemolysis. *Infect and Immun.* 1997;65(4):1172-80.
101. Salamaszynska-Guz A, Klimuszko D. Functional analysis of the *Campylobacter jejuni* *cj0183* and *cj0588* genes. *Curr Microbiol.* 2008;56(6):592-6.
102. Inoue A, Murata Y, Takahashi H, Tsuji N, Fujisaki S, Kato J-i. Involvement of an essential gene, *mviN*, in murein synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2008;190(21):7298-301.
103. Rojas CM, Ham JH, Deng WL, Doyle JJ, Collmer A. HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana glauca* seedlings. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(20):13142-7.

## Literaturverzeichnis

104. Rashid RA, Tarr PI, Moseley SL. Expression of the *Escherichia coli* IrgA homolog adhesin is regulated by the ferric uptake regulation protein. *Microb Pathog.* 2006;41(6):207-17.
105. Zhu M, Valdebenito M, Winkelmann G, Hantke K. Functions of the siderophore esterases IroD and IroE in iron-salmochelin utilization. *Microbiol.* 2005;151(7):2363-72.
106. Doudah L, de Zutter L, Bare J, De Vos P, Vandamme P, Vandenberg O, Van den Abeele AM, Houf K. Occurrence of putative virulence genes in *Arcobacter* species isolated from humans and animals. *J Clin Microbiol.* 2012;50(3):735-41.
107. Karadas G, Sharbati S, Hanel I, Messelhauser U, Glocker E, Alter T, Golz G. Presence of virulence genes, adhesion and invasion of *Arcobacter butzleri*. *J Appl Microbiol.* 2013;115(2):583-90.
108. Tabatabaei M, Shirzad Aski H, Shayegh H, Khoshbakht R. Occurrence of six virulence-associated genes in *Arcobacter* species isolated from various sources in Shiraz, Southern Iran. *Microb Pathog.* 2014;66:1-4.
109. Girbau C, Guerra C, Martinez-Malaxetxebarria I, Alonso R, Fernandez-Astorga A. Prevalence of ten putative virulence genes in the emerging foodborne pathogen *Arcobacter* isolated from food products. *Food Microbiol.* 2015;52:146-9.
110. Zacharow I, Bystron J, Walecka-Zacharska E, Podkowik M, Bania J. Genetic Diversity and Incidence of Virulence-Associated Genes of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* Isolates from Pork, Beef, and Chicken Meat in Poland. *Biomed Res Int.* 2015;2015:956507.
111. Piva S, Gariano GR, Bonilauri P, Giacometti F, Decastelli L, Florio D, Massella E, Serraino A. Occurrence of putative virulence genes on *Arcobacter butzleri* isolated from three different environmental sites throughout the dairy chain. *J Appl Microbiol.* 2017;122(4):1071-7.
112. Sekhar MS, Tumati SR, Chinnam BK, Kothapalli VS, Sharif NM. Virulence gene profiles of *Arcobacter* species isolated from animals, foods of animal origin, and humans in Andhra Pradesh, India. *Vet World.* 2017;10(6):716-20.
113. Silha D, Vackova B, Silhova L. Occurrence of virulence-associated genes in *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* isolates from foodstuff, water, and clinical samples within the Czech Republic. *Folia Microbiol.* 2019;64(1):25-31.
114. Pickett CL, Pesci EC, Cottle DL, Russell G, Erdem AN, Zeytin H. Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. *cdtB* gene. *Infect Immun.* 1996;64(6):2070-8.

## Literaturverzeichnis

115. Johnson WM, Lior H. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microb Pathog.* 1988;4(2):115-26.
116. Zheng J, Meng J, Zhao S, Singh R, Song W. *Campylobacter*-induced interleukin-8 secretion in polarized human intestinal epithelial cells requires *Campylobacter*-secreted cytolethal distending toxin- and Toll-like receptor-mediated activation of NF-kappaB. *Infect Immun.* 2008;76(10):4498-508.
117. Johnson LG, Murano EA. Lack of a cytolethal distending toxin among *Arcobacter* isolates from various sources. *J Food Prot.* 2002;65(11):1789-95.
118. Zambri M, Cloutier M, Adam Z, Lapen DR, Wilkes G, Sunohara M, Topp E, Talbot G, Khan IUH. Novel virulence, antibiotic resistance and toxin gene-specific PCR-based assays for rapid pathogenicity assessment of *Arcobacter faecis* and *Arcobacter lanthieri*. *BMC Microbiol.* 2019;19(1):11.
119. Pizarro-Cerda J, Cossart P. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell.* 2006;124(4):715-27.
120. Carbone M, Maugeri TL, Giannone M, Gugliandolo C, Midiri A, Fera MT. Adherence of environmental *Arcobacter butzleri* and *Vibrio* spp. isolates to epithelial cells *in vitro*. *Food Microbiol.* 2003;20(5):611-6.
121. Fernandez H, Flores S, Inzunza F. *Arcobacter butzleri* strains isolated from different sources display adhesive capacity to epithelial cells *in vitro*. *Acta Sci Vet.* 2010;38(3):287-91.
122. Gugliandolo C, Irrera GP, Lentini V, Maugeri TL. Pathogenic *Vibrio*, *Aeromonas* and *Arcobacter* spp. associated with copepods in the Straits of Messina (Italy). *Mar Pollut Bull.* 2008;56(3):600-6.
123. Ho HTK, Lipman LJA, Hendriks HGCJM, Tooten PCJ, Ultee T, Gaastra W. Interaction of *Arcobacter* spp. with human and porcine intestinal epithelial cells. *Fems Immunol Med Mic.* 2007;50(1):51-8.
124. Levican A, Alkeskas A, Gunter C, Forsythe SJ, Figueras MJ. Adherence to and invasion of human intestinal cells by *Arcobacter* species and their virulence genotypes. *Appl Environ Microb.* 2013;79(16):4951-7.
125. Musmanno RA, Russi M, Lior H, Figura N. *In vitro* virulence factors of *Arcobacter butzleri* strains isolated from superficial water samples. *New Microbiol.* 1997;20(1):63-8.
126. Villarruel-Lopez A, Marquez-Gonzalez M, Garay-Martinez LE, Zepeda H, Castillo A, Mota de la Garza L, Murano EA, Torres-Vitela R. Isolation of *Arcobacter* spp. from retail meats and cytotoxic effects of isolates against vero cells. *J Food Prot.* 2003;66(8):1374-8.

## Literaturverzeichnis

127. Guerrant RL, Steiner TS, Lima AAM, Bobak DA. How Intestinal Bacteria Cause Disease. *J Infect Dis.* 1999;179(Suppl 2):S331-S7.
128. Karadas G, Bücken R, Sharbati S, Schulzke JD, Alter T, Golz G. *Arcobacter butzleri* isolates exhibit pathogenic potential in intestinal epithelial cell models. *J Appl Microbiol.* 2016;120(1):218-25.
129. Bücken R, Troeger H, Kleer J, Fromm M, Schulzke JD. *Arcobacter butzleri* induces barrier dysfunction in intestinal HT-29/B6 cells. *J Infect Dis.* 2009;200(5):756-64.
130. Hickey TE, Baqar S, Bourgeois AL, Ewing CP, Guerry P. *Campylobacter jejuni*-stimulated secretion of interleukin-8 by INT407 cells. *Infect Immun.* 1999;67(1):88-93.
131. Gözl G, Karadas G, Alutis ME, Fischer A, Kuhl AA, Breithaupt A, Gobel UB, Alter T, Bereswill S, Heimesaat MM. *Arcobacter butzleri* induce colonic, extra-intestinal and systemic inflammatory responses in gnotobiotic IL-10 deficient mice in a strain-dependent manner. *PLoS One.* 2015;10(9):e0139402.
132. Heimesaat MM, Karadas G, Alutis M, Fischer A, Kuhl AA, Breithaupt A, Gobel UB, Alter T, Bereswill S, Golz G. Survey of small intestinal and systemic immune responses following murine *Arcobacter butzleri* infection. *Gut Pathog.* 2015;7:28.
133. Gözl G, Karadas G, Fischer A, Gobel UB, Alter T, Bereswill S, Heimesaat MM. Toll-Like Receptor-4 is essential for *Arcobacter butzleri*-induced colonic and systemic immune responses in gnotobiotic IL-10(-/-) Mice. *Eur J Microbiol Immunol (Bp).* 2015;5(4):321-32.
134. Heimesaat MM, Karadas G, Fischer A, Gobel UB, Alter T, Bereswill S, Golz G. Toll-Like Receptor-4 dependent small intestinal immune responses following murine *Arcobacter butzleri* infection. *Eur J Microbiol Immunol (Bp).* 2015b;5(4):333-42.
135. Heimesaat MM, Alter T, Bereswill S, Golz G. Intestinal expression of genes encoding inflammatory mediators and gelatinases during *Arcobacter butzleri* infection of gnotobiotic Il-10 deficient mice. *Eur J Microbiol Immunol (Bp).* 2016;6(1):56-66.
136. Gözl G, Alter T, Bereswill S, Heimesaat MM. The immunopathogenic potential of *Arcobacter butzleri* - Lessons from a meta-analysis of murine infection studies. *PLoS One.* 2016;11(7):e0159685.
137. Son I, Englen MD, Berrang ME, Fedorka-Cray PJ, Harrison MA. Antimicrobial resistance of *Arcobacter* and *Campylobacter* from broiler carcasses. *Int J Antimicrob Ag.* 2007;29(4):451-5.

## Literaturverzeichnis

138. Vandenberg O, Houf K, Douat N, Vlaes L, Retore P, Butzler JP, Dediste A. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of non-jejuni/coli campylobacters and arcobacters from Belgium. *J Antimicrob Chemoth.* 2006;57(5):908-13.
139. Abay S, Kayman T, Hizlisoy H, Aydin F. *In vitro* antibacterial susceptibility of *Arcobacter butzleri* isolated from different sources. *J Vet Med Sci.* 2012;74(5):613-6.
140. Fernández H, Krause S, Paz Villanueva M. *Arcobacter butzleri* an emerging enteropathogen: communication of two cases with chronic diarrhea. *Braz J Microbiol.* 2004;35:216-8.
141. Abdelbaqi K, Menard A, Prouzet-Mauleon V, Bringaud F, Lehours P, Megraud F. Nucleotide sequence of the *gyrA* gene of *Arcobacter* species and characterization of human ciprofloxacin-resistant clinical isolates. *Fems Immunol Med Mic.* 2007;49(3):337-45.
142. Perez-Cataluna A, Tapiol J, Benavent C, Sarvise C, Gomez F, Martinez B, Terron-Puig M, Recio G, Vilanova A, Pujol I, Ballester F, Rezusta A, Figueras MJ. Antimicrobial susceptibility, virulence potential and sequence types associated with *Arcobacter* strains recovered from human faeces. *J Med Microbiol.* 2017;66(12):1736-43.
143. Van den Abeele AM, Vogelaers D, Vanlaere E, Houf K. Antimicrobial susceptibility testing of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* strains isolated from Belgian patients. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(5):1241-4.
144. Sproston EL, Wimalarathna HML, Sheppard SK. Trends in fluoroquinolone resistance in *Campylobacter*. *Microb genom.* 2018;4(8).
145. Wagner J, Jabbusch M, Eisenblatter M, Hahn H, Wendt C, Ignatius R. Susceptibilities of *Campylobacter jejuni* isolates from Germany to ciprofloxacin, moxifloxacin, erythromycin, clindamycin, and tetracycline. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(7):2358-61.
146. Ferreira S, Fraqueza MJ, Queiroz JA, Domingues FC, Oleastro M. Genetic diversity, antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Arcobacter butzleri* isolated from poultry and environment from a Portuguese slaughterhouse. *Int J Food Microbiol.* 2013;162(1):82-8.
147. Rahimi E. Prevalence and antimicrobial resistance of *Arcobacter* species isolated from poultry meat in Iran. *Brit Poultry Sci.* 2014;55(2):174-80.
148. Rathlavath S, Kohli V, Singh AS, Lekshmi M, Tripathi G, Kumar S, Nayak BB. Virulence genotypes and antimicrobial susceptibility patterns of *Arcobacter butzleri* isolated from seafood and its environment. *Int J Food Microbiol.* 2017b;263:32-7.

## Literaturverzeichnis

149. Scanlon KA, Cagney C, Walsh D, McNulty D, Carroll A, McNamara EB, McDowell DA, Duffy G. Occurrence and characteristics of fastidious *Campylobacteraceae* species in porcine samples. *Int J Food Microbiol.* 2013;163(1):6-13.
150. Garneau-Tsodikova S, Labby KJ. Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. *Medchemcomm.* 2016;7(1):11-27.
151. Collado L, Jara R, Vásquez N, Telsaint C. Antimicrobial resistance and virulence genes of *Arcobacter* isolates recovered from edible bivalve molluscs. *Food Control.* 2014;46:508-12.
152. Silha D, Pejchalova M, Silhova L. Susceptibility to 18 drugs and multidrug resistance of *Arcobacter* isolates from different sources within the Czech Republic. *J Glob Antimicrob Resist.* 2017;9:74-7.
153. Zhao S, Tyson GH, Chen Y, Li C, Mukherjee S, Young S, Lam C, Folster JP, Whichard JM, McDermott PF. Whole-Genome sequencing analysis accurately predicts antimicrobial resistance phenotypes in *Campylobacter* spp. *Appl Environ Microbiol.* 2016;82(2):459-66.
154. Georgopapadakou NH. Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to beta-lactams. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37(10):2045-53.
155. Houf K, Tutenel A, De Zutter L, Van Hoof J, Vandamme P. Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and identification of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii*. *FEMS Microbiol lett.* 2000;193(1):89-94.
156. Korczak BM, Stieber R, Emler S, Burnens AP, Frey J, Kuhnert P. Genetic relatedness within the genus *Campylobacter* inferred from *rpoB* sequences. *Int J Syst Evol Micr.* 2006;56(5):937-45.
157. Whiteduck-Leveillee J, Cloutier M, Topp E, Lapen DR, Talbot G, Villemur R, Khan IU. Development and evaluation of multiplex PCR assays for rapid detection of virulence-associated genes in *Arcobacter* species. *J Microbiol Methods.* 2016;121:59-65.
158. Houf K, Devriese LA, De Zutter L, Van Hoof J, Vandamme P. Development of a new protocol for the isolation and quantification of *Arcobacter* species from poultry products. *Int J Food Microbiol.* 2001;71(2-3):189-96.
159. Kreusel KM, Fromm M, Schulzke JD, Hegel U. Cl<sup>-</sup> secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cells (HT-29/B6). *Am J Physiol.* 1991;261(4 Pt 1):C574-82.
160. Sigma Aldrich. Protocol Guide: WST-1 Assay for Cell Proliferation and Viability. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/roche/cell-proliferation-reagent-wst-1.html> (abgerufen am 02.08.2019).

## Literaturverzeichnis

161. Whiteduck-Leveillee K, Whiteduck-Leveillee J, Cloutier M, Tambong JT, Xu R, Topp E, Arts MT, Chao J, Adam Z, Andre Levesque C, Lapen DR, Villemur R, Talbot G, Khan IU. *Arcobacter lanthieri* sp. nov., isolated from pig and dairy cattle manure. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015;65(8):2709-16.
162. Leunk RD, Johnson PT, David BC, Kraft WG, Morgan DR. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol.* 1988;26(2):93-9.
163. EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Data from the EUCAST MIC distribution website 2019. <http://www.eucast.org> (abgerufen am 01.12.2019).
164. Riesenberg A, Fromke C, Stingl K, Fessler AT, Golz G, Glocker EO, Kreienbrock L, Klarmann D, Werckenthin C, Schwarz S. Antimicrobial susceptibility testing of *Arcobacter butzleri*: development and application of a new protocol for broth microdilution. *J Antimicrob Chemoth.* 2017;72(10):2769-74.

## **Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung**

### **Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Vanessa Brückner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "*Arcobacter*: pathogenes Potential und Bedeutung als Zoonoseerreger" ("*Arcobacter*: pathogenic potential and importance as zoonotic agent") selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

---

Datum, Unterschrift

## **Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen**

Vanessa Brückner hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

**Brückner V**, Fiebiger U, Ignatius R, Friesen J, Eisenblätter M, Höck M, Alter T, Bereswill S, Heimesaat MM, Gözl G. Characterization of *Arcobacter* strains isolated from human stool samples: results from the prospective German prevalence study Arcopath. *Gut Pathog.* 2020;12:3.

Beitrag im Einzelnen:

- Erstautorin
- Durchführung aller Experimente
- Wesentlicher Anteil an der Auswertung und Analyse der Ergebnisse
- Selbstständige graphische Darstellung der Ergebnisse in Abbildungen
- Hauptanteil am Verfassen des Manuskripts
- Gemeinsame Erarbeitung des zur Publikation führenden Manuskripts mit Co-Autoren
- Mitarbeit an der Revision und Umsetzung der Reviewer-Kommentare

**Brückner V**, Fiebiger U, Ignatius R, Friesen J, Eisenblätter M, Höck M, Alter T, Bereswill S, Gözl G, Heimesaat MM. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Arcobacter* species in human stool samples: the prospective German *Arcobacter* prevalence study Arcopath. Eingereicht am 18.12.2019 bei *Gut Pathogens*.

Beitrag im Einzelnen:

- Erstautorin
- Hauptanteil an der Durchführung der Experimente (Frau Ulrike Fiebiger unterstützte bei der Abholung der Proben und der kulturellen Isolierung der Bakterien)
- Wesentlicher Anteil an der Auswertung und Analyse der Ergebnisse
- Selbstständige graphische Darstellung der Ergebnisse in Abbildungen und Tabellen
- Hauptanteil am Verfassen des Manuskripts
- Gemeinsame Erarbeitung des zur Einreichung führenden Manuskripts mit Co-Autoren

---

Datum, Unterschrift, Stempel des betreuenden Hochschullehrers

---

Datum, Unterschrift Doktorandin

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Publikationen

### Zeitschriftenartikel:

- (1) **Brückner V**, Fiebiger U, Ignatius R, Friesen J, Eisenblätter M, Höck M, Alter T, Bereswill S, Heimesaat MM, Gözl G. Characterization of *Arcobacter* strains isolated from human stool samples: results from the prospective German prevalence study Arcopath. *Gut Pathog.* 2020;12:3.
- (2) **Brückner V**, Fiebiger U, Ignatius R, Friesen J, Eisenblätter M, Höck M, Alter T, Bereswill S, Gözl G, Heimesaat MM. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Arcobacter* species in human stool samples: the prospective German *Arcobacter* prevalence study Arcopath. Eingereicht am 18.12.2019 bei *Gut Pathogens*.

### Posterpräsentationen:

- (1) **Brückner V**, Fiebiger U, Ignatius R, Friesen J, Eisenblätter M, Höck M, Alter T, Bereswill S, Gözl G, Heimesaat MM. (2020):  
Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Arcobacter* species in human stool samples: the prospective German *Arcobacter* prevalence study Arcopath.  
6th Joint Conference of the German Society for Hygiene and Microbiology (DGHM) and the Association for General and Applied Microbiology (VAAM)  
Leipzig, Deutschland – 08.03.-11.03.2020.
- (2) **Brückner V**, Heimesaat MM, Fiebiger U, Ignatius R, Friesen J, Eisenblätter M, Höck M, Bereswill S, Alter T, Gözl G. (2019):  
Isolation and characterization of *Arcobacter* strains derived from human stool samples – results from a prospective German prevalence study (Arcopath).  
Zoonoses 2019 - International Symposium on Zoonoses Research  
Berlin, Deutschland – 16.10.-18.10.2019.
- (3) **Brückner V**, Heimesaat MM, Fiebiger U, Ignatius R, Friesen J, Eisenblätter M, Höck M, Bereswill S, Alter T, Gözl G. (2019):  
Characterization of *Arcobacter* spp. isolated from human stool samples in Germany.  
20th Campylobacter, Helicobacter and Related Microorganisms conference (CHRO 2019)  
Belfast, Northern Ireland, UK – 08.09.-11.09.2019

## Publikationen

- (4) Gölz G, Zhang X, Markgraf A, **Brückner V**, Karadas G, Heimesaat MM, Bucker R, Bereswill S, Alter T. (2018):  
Prevalence and pathogenic potential of *Arcobacter butzleri*.  
FoodMicro 2018 – 26th International ICFMH Conference  
Berlin, Deutschland – 03.09.-06.09.2018.

### Vorträge:

- (1) **Brückner V**, Fiebiger U, Ignatius R, Friesen J, Eisenblätter M, Höck M, Alter T, Bereswill S, Heimesaat MM, Gölz G. (2020)  
Characterization of *Arcobacter* strains isolated from human stool samples: results from the prospective German prevalence study Arcopath.  
6th Joint Conference of the German Society for Hygiene and Microbiology (DGHM) and the Association for General and Applied Microbiology (VAAM)  
Leipzig, Deutschland – 08.03.-11.03.2020.
- (2) **Brückner V**, Gölz G, Fiebiger U, Ignatius R, Friesen J, Höck M, Eisenblätter M, Bereswill S, Alter T, Heimesaat MM. (2019):  
Prevalence of *Arcobacter* spp. in humans in Germany.  
20th Campylobacter, Helicobacter and Related Microorganisms conference (CHRO 2019)  
Belfast, Northern Ireland, UK – 08.09.-11.09.2019.

## Danksagung

Das Gelingen meiner Doktorarbeit wäre ohne die vielseitige Unterstützung zahlreicher Personen und Institutionen nicht möglich gewesen. Dafür möchte ich mich an dieser Stelle recht herzlich bedanken. Die Arbeit fand im Rahmen des Verbundprojektes Arcopath statt und wurde durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert.

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Markus M. Heimesaat (Institut für Mikrobiologie und Infektionsimmunologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin) sowie meinem Zweitbetreuer und Chef Herrn Prof. Dr. Thomas Alter (Institut für Lebensmittelsicherheit- und hygiene, Freie Universität Berlin) für die freundliche Überlassung des spannenden Forschungsthemas, die hervorragende Betreuung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit und das Vertrauen in meine Person. Ich danke Herrn Prof. Dr. Thomas Alter auch recht herzlich für die Möglichkeit zur Teilnahme an mehreren Konferenzen und dem damit entgegengebrachten Vertrauen zur Präsentation der Forschungsergebnisse.

Mein größter Dank gebührt Frau Dr. Greta Gözl vom Institut für Lebensmittelsicherheit- und hygiene, die mich während der gesamten Zeit wissenschaftlich betreut hat. Ihre hilfreichen Anregungen und konstruktive Kritik waren unverzichtbar bei der Bearbeitung des Themas. Ich bedanke mich für ihre unerschöpfliche fachliche Kompetenz und dafür, dass sie trotz des ganzen Arbeitsstresses stets ein offenes Ohr für alle und alles hatte.

Ein großer Dank geht an die kooperierenden Diagnostiklabore für die hervorragende Zusammenarbeit und Unterstützung. Ohne die Bereitstellung der humanen Stuhlproben wäre die Studie erst gar nicht möglich gewesen.

Ich möchte mich besonders bei Frau Ulrike Fiebiger aus dem Institut für Mikrobiologie und Infektionsimmunologie bedanken, die mich vor allem in der Abholung der Proben und der kulturellen Isolierung unterstützte. Ohne ihr großartiges Engagement hätte die Bearbeitung von knapp 5000 Proben deutlich mehr Zeit in Anspruch genommen.

Vielen Dank auch an alle anderen MitarbeiterInnen des Instituts für Lebensmittelsicherheit und -hygiene, die mir während der gesamten Zeit nicht nur als KollegInnen, sondern auch als FreundInnen zur Seite standen und mir eine schöne Doktorandenzeit beschert haben.

## Danksagung

Insbesondere möchte ich mich bei Frau Christine Zilk für die Bereitstellung unzähliger Nährböden bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei dem Institut für Biochemie der FU Berlin für das Zurverfügungstellen von Materialien und Räumlichkeiten zur Durchführung der Zellkulturarbeiten bedanken.