

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1. Material

4.1.1 Untersuchungszeitraum/-gebiet

Die Probenentnahme wurde während der Jagdsaison in den Jahren 2001/2002, 2002/2003, 2003/2004, jeweils in den Monaten Dezember bis März im Białowieża Nationalpark in Polen durchgeführt (Abb. 4.1).

Untersuchungsgebiete für die Kontrolltiere aus Deutschland waren das Wisentgehege Springe bei Hannover, sowie die Zoos Hellbrunn (Stuttgart), Wilhelma (München) und der Tierpark Stralsund.

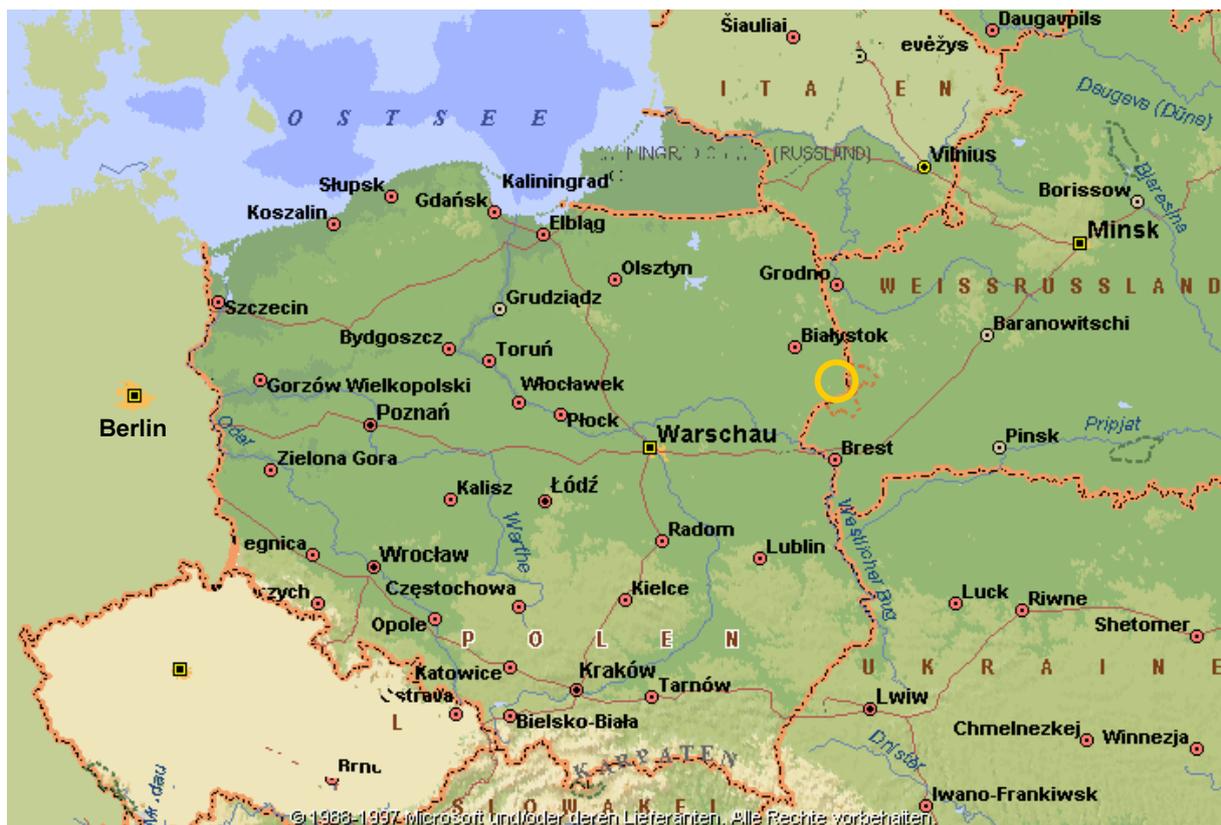


Abb. 4.1: Lage des Białowieża Nationalpark innerhalb des gelb markierten Gebietes 

4.1.2 Untersuchungsmaterial

Folgende Proben wurden von an Balanoposthitis erkrankten und gesunden Wisentbullen aus dem Białowieża Nationalpark, sowie den Wisentbullen aus den Gehegen in Deutschland entnommen:

Tupfer aus der Präputialöffnung, der Präputialhöhle und von der Penisspitze. Je zwei Biopate vom Übergang der äußeren Haut auf die Präputialschleimhaut, der Präputialschleimhaut und der Penisspitze. Tupfer aus den Bronchien der Lungenspitzenlappen. Vollblut aus der Jugularvene (jeweils Serum und EDTA Blut). Von weiblichen Wisenten aus dem Białowieża Nationalpark wurden folgende Proben entnommen: Klitoristupfer, Vaginaltupfer, Tupfer aus den Bronchien der Lungenspitzenlappen. Vollblut aus der Jugularvene zur Gewinnung von Serum und EDTA Blut.

4.1.3 Geräte

Brutschrank kelvitron® t	Heraeus, Deutschland
Einbettautomat DDM-P800	Medim GmbH, Schweiz
Elektrophoresekammern	Peqlab, Deutschland
Elektronenmikroskop SEM 940 A	Zeiss, Deutschland
Gelkammer	BioRad, Deutschland
Gießstation Histoembedder	Leica Instruments GmbH, Deutschland
Heizblock 1101	Pequlab, Deutschland
Hybridisierungssofen Hybaid-Micro-4	MWG-Biotech, Deutschland
Lichtmikroskop Leica DMLB	Leica Microsystems GmbH, Deutschland
Mikroliterpipetten	Eppendorf, Deutschland
Mikroskopkamera DC Viewer	Leica Instruments GmbH, Deutschland
Mikrotom 2065 Supercut	Leica Instruments GmbH, Deutschland
Paraffinspender Histoembedder	Leica Instruments GmbH, Deutschland
Paraffinstreckbad TFB 35	Mesite Medizintechnik, Deutschland
pH-Meter	WTW, Deutschland
Powersupply	Consort, Belgium
Sequenzierer ABI 3100	Applied Biosystems, USA
Sputter Coater Emitech K 550	Emitech, Deutschland
Thermocycler	Biometra, Deutschland
Transilluminator Bioview	Biostep, Deutschland

MATERIAL UND METHODEN

Transportabler Brutschrank BD/BED53	Binder, Deutschland
Transportable Gefriertruhe (-20°C)	
MRFT-515DG3	Sawafuji Electric Co. Ltd., Japan
Transportabler Kühlschrank (+4°C)	Camping Gaz GmbH, Deutschland
Zentrifuge Labofuge 400R	Heraeus, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus, Deutschland

4.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Agarose GTQ	Carl Roth GmbH und Co., Deutschland
AnaeroGen™	Oxoid GmbH, Deutschland
BSA Albumin Fraktion V aus Rinderserum	Merck, Deutschland
Big Dye	IBM Fermentas GmbH, Deutschland
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH und Co., Deutschland
Brilliant Blau R250 (Coomassie blue)	Carl Roth GmbH und Co., Deutschland
Chloroform	VWR International, Deutschland
CO ₂ Gen™	Oxoid GmbH, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Carl Roth GmbH und Co. Deutschland
DNTP's	IBM Fermentas GmbH, Deutschland
Eindeckmedium Roti Histokitt	Carl Roth GmbH und Co., Deutschland
Eisessig Rotipuran 100%	Carl Roth GmbH und Co., Deutschland
EDTA	Merck KGaA, Deutschland
Eosin	Merck KGaA, Deutschland
Ethanol 96%	Alkohol Handels Kontor, Deutschland
Ethanol 99%	Alkohol Handels Kontor, Deutschland
Ethanol 99% für die Molekularbiologie	Merck KGaA, Deutschland
Ethidiumbromid 1%	Carl Roth GmbH und Co., Deutschland
Gelatine	VWR International, Deutschland
Gel Criterion Precast	BioRad, Deutschland
Giemsa-Lösung	Carl Roth GmbH und Co., Deutschland
Glukose	VWR International GmbH, Deutschland
Glutaraldehyd	Carl Roth GmbH und Co., Deutschland
Glyzerol	Carl Roth GmbH und Co., Deutschland
Gold-Palladium	Plano, Deutschland
H ₂ O ₂ Wasserstoffperoxid	Merck KGaA, Deutschland

MATERIAL UND METHODEN

Hämatoxylin	Merck KGaA,, Deutschland
Hexamethyldisilazane	Sigma, Deutschland
Hydrochinon	VWR International, Deutschland
Indol BBL™ Dry Slide™	Becton Dickinson, USA
Kaninchenplasma	VWR International GmbH, Deutschland
Karbolgentianaviolett	VWR International GmbH, Deutschland
Karbofuchsin	VWR International GmbH, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH und Co. Deutschland
Ladepuffer Orange Loading Dye Solution	IBM Fermentas GmbH, Deutschland
Lugol'sche Lösung	VWR International GmbH, Deutschland
Maleinsäure	Carl Roth GmbH und Co., Deutschland
Mannit	VWR International GmbH, Deutschland
Magnesiumchlorid	IBM Fermentas GmbH, Deutschland
Molekulargewichtsstandard 10.000-250.000k	Amersham Bioscience, Deutschland
Natronlauge	Carl Roth GmbH und Co., Deutschland
Natriumacetat	Merck KGaA, Deutschland
Natriumcitrat	Sigma diagnostics USA
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH und Co., Deutschland
Natrium- Lauroylsarcosine	Serva, Deutschland
Natriumthiosulfat	VWR International, Deutschland
Osmiumtetroxyd	Carl Roth GmbH und Co., Deutschland
Oxidase Reagent Stain Dropper	Becton Dickinson, USA
Paraffin Paraplast plus	Carl Roth GmbH und Co., Deutschland
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Deutschland
PBS	Carl Roth gmbH und Co., Deutschland
PCR-Puffer (10x)	IBM Fermentas GmbH, Deutschland
Pferdeserum	Oxoid GmbH, Deutschland
Proteinase K	Quiagen, Deutschland
Silbernitrat	VWR International, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck KGaA, Deutschland
Standard 100bp O'Range Ruler™ (0,25 mg DNA/ml)	IBM Fermentas GmbH, Deutschland
TRIS	Carl Roth GmbH und Co., Deutschland
Tween 20	Merck, Deutschland
Taq-Polymerase (5u/µl)	IBM Fermentas GmbH, Deutschland

Trehalose	VWR International GmbH, Deutschland
Sequenzierungspuffer	IBM Fermentas GmbH, Deutschland

4.1.5 Nährmedien

Columbia Agar mit 5% Schafblut	Oxoid GmbH, Deutschland
Enterococcus BAA	Oxoid GmbH, Deutschland
Gassner Agar	Oxoid GmbH, Deutschland
Kochblut Agar	Oxoid GmbH, Deutschland
McConkey Agar	Oxoid GmbH, Deutschland
Nährbouillon	Sifin, Deutschland
OMIZ-Pat Medium*	nach Wyss et al. (1998)
Oxidativ/Fermentativ (O/F)–Medium	VWR International GmbH, Deutschland
Schaedler Agar	Oxoid GmbH, Deutschland
Schaedlerbouillon	Sifin, Deutschland

*Für die Überlassung des Mediums danke ich freundlicherweise Marcell Nordhoff, Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, FU Berlin, Deutschland.

4.1.6 Testkits

api [®] CORYNE	bioMérieux, Deutschland
api [®] Staph	bioMérieux, Deutschland
api [®] NE	bioMérieux, Deutschland
api [®] E	bioMérieux, Deutschland
api [®] ZYM	bioMérieux, Deutschland
api [®] CH 50	bioMérieux, Deutschland
DIG Luminescent Detection Kit	Boehringer Mannheim, Deutschland
DNeasy Tissue Kit	Quiagen GmbH, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Quiagen GmbH, Deutschland
RapID™ ANA II System	Remel, USA

4.1.7 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	Merck, Deutschland
Einbettkassetten Rotilabo	Carl Roth GmbH und Co., Deutschland
Kunststoff-Einmalimpfösen, steril	Mickley Diagnostika, Deutschland
Lighttabs Klebefolien	Plano, Deutschland
Mikrotom-Klingen	Thermo Shandon, Deutschland
Nylon-Membran Hybond™-N	Amersham, Deutschland
Objekträger	Merck, Deutschland
Probenteller	Plano, Deutschland
Reaktionsgefäße Safe lock Tubes	Eppendorf, Deutschland
Sterile Wattetupfer	VWR International GmbH, Deutschland
Transportmedium Venturi Transssystem für Anaerobier und Aerobier	Copan Diagnostics, USA

4.1.8 Oligonukleotid-Sonden und -Primer

Oligonukleotid-Primer

Name	Sequenz (5'-3')	Annealingtemperatur
BOXA1R ¹	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	53°C
TPU1 ²	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	55°C
SPU1 ⁵	GTYTAAAGCATGCAAGTCG	55°C
RTU8 ²	AAGGAGGTGATCCAACCCCA	55°C
SeqFW	GGAGGAAGGTGGGGATG	55°C
SeqREV	CGGGTTGTAACTCCTTTC	55°C
ArcFW1	CCTCTTCTTTGGGATAAGCT	58°C
ArcRev1	AAAGCCTTCATCCCCCACGC	58°C
SER-1F ³	TGCGCCGAAAATGTAACGGGGCTC	65°C
SER-2R ³	TCACCCACCTGTGTCGGTTTGCGG	65°C
1730F ⁴	CTTGGICCIGGIGGACTTTC	52°C
2900R ⁴	AGAAATIAAIATIGCATCCTC	52°C

¹Louws et al., 1994

²Wyss et al., 1996

³Barcellos et al., 2000

⁴Renesto et al., 2000

⁵Schrank, 2000

MATERIAL UND METHODEN

Oligonukleotidsequenzen für die Dot blot- Hybridisierung

Name	Sequenz (5' → 3')
DDK2 ¹	GGCTTTATCCGTATAAGCGTATTC
DDK 3 ¹	CCCTTATTCACATGATTACCGT
Tre I ²	ACGCAAGCTCATCCTCAAG
Tre II ²	GCTCTTTTCCTCATTTACCTTTAT
Tre III ²	CCCCATCTTAAAGGTAGATCAC
Tre IV ²	CGGTCACATTCGGTATTACCTACT
Tre V ²	CCTTTATTCCGTGAGACCTTATC
Tre VI ²	GTGGGCGCGTTCGTCCACGCGTTAC
Tre VII ²	CCCATCCGAGAGGTACGTCATCCA
TVIN ²	ATTGAGACTATTCGGTATTACCTGC
TDEN ²	CATGACTACCGTCATCAAAGAAGC
TMAL ²	CTATTGTGCTTATTCATCAGGC

¹ Choi et al., 1997

² Moter et al., 1998

4.1.9 Referenz – Bakterienstämme

Stamm:	DSMZ Nummer:
<i>Arcanobacterium hippocolae</i>	DSM15539
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	DSM20595
<i>Arcanobacterium phocae</i>	DSM10002
<i>Arcanobacterium bernardiae</i>	DSM9152
<i>Arcanobacterium pluranimalium</i>	DSM13483
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	DSM20630
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	Feldisolat
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	Feldisolat
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM12463
<i>Staphylococcus luteus</i>	Feldisolat
<i>Staphylococcus intermedius</i>	Feldisolat
<i>Streptococcus agalactiae</i>	DSM6784
<i>Mannheimia haemolytica</i>	Feldisolat
<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto B31*	
<i>Borrelia afzelii</i> N34*	

MATERIAL UND METHODEN

Stamm:

Borrelia garinii VS461*

Borrelia valaisiana VS116*

*Leptospira interrogans***

*Treponema succinifaciens***

*Brachyspira hyodysenteriae***

*Für die Überlassung der Stämme danke ich freundlicherweise Prof. Dr. M. M. Wittenbrink, Institut für Veterinär bakteriologie, Zürich, Schweiz.

** Für die Überlassung der Stämme danke ich freundlicherweise Marcell Nordhoff, Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, FU Berlin, Deutschland.

4.1.10 Computerprogramme

BioEdit Alignment Editor	(www.mbio.ncsu.edu)
Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA)	(Kumar et al., 2001)
National Center for Biotechnology Information (NCBI) Blast	(www.ncbi.nlm.nih.gov)
EMBL, European Bioinformatics Institute, Fasta 33	(www.ebi.ac.uk)

4.1.11 Lösungen

A Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese

Probenpuffer nach Lämmli (4fach konzentriert)	2,5 ml 10,0 ml 10,0 ml 3-10 Tropfen ad 25,0 ml	1M TRIS-Puffer pH 6,8 SDS 10% Glyzerol Bromphenolblau 0,1% Aqua bidest.
SDS-Laufpuffer	14,4 g 1,0 g 3,0 g	Glycin SDS Tris pH 8,3
Färbelösung	5,0 g 500,0 ml 100,0 ml	Coomassie Blue Methanol Eisessig

MATERIAL UND METHODEN

Entfärber	250,0 ml	Ethanol
	100,0 ml	Eisessig
⇒ ad	1000,0 ml	Aqua bidest.

B Lösungen für die Polymerase Ketten Reaktion

50xTAE Puffer	242,0 g	Tris Base
	57,1 ml	Essigsäure
	200,0 ml	0,5 M EDTA Lösung pH 8,0
⇒ ad	1000,0 ml	Aqua bidest

0,5 M EDTA Lösung	186,12 g	EDTA
⇒ ad	1000,0 ml	Aqua bidest

Agarose	1,5 g	Agarose
⇒ ad	150,0 ml	TAE (1x)

C Lösungen für die DNA Extraktion aus Bakterien

PBS (pH 7,2)	4,80 g	NaCl
	7,60 g	Na ₂ HPO ₄ ·x2H ₂ O
	1,45 g	KH ₂ PO ₄
⇒ ad	1000,0 ml	Aqua bidest

D Lösungen für die Dot Blot Hybridisierung

Zusammensetzung der Lösungen unter Verwendung des DIG Luminescent Detection Kit.

Maleinsäurepuffer pH 7,5	50,0 ml	Maleinsäure 1M
	25,0 ml	NaCl
⇒ ad	500,0 ml	Aqua bidest
Blocking Stock Solution 10%	20,0 g	Blocking Reagenz
⇒ ad	200,0 ml	Maleinsäurepuffer
SDS 10%	20,0 g	SDS
⇒ ad	200,0 ml	Aqua bidest.

M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

SSC 20x		300,0 ml	1 M Na-Citrat
	⇒ ad	1000,0 ml	NaCl
Standard-Hybridisierungspuffer		5,0 ml	Blocking Reagenz
		0,5 ml	Na-Lauroylsarkosin 10%
		0,1 ml	SDS 10%
		12,5 ml	20x SSC
	⇒ ad	50,0 ml	Aqua bidest.
Waschpuffer (WP) 0		250,0 ml	20 x SSC
		20,0 ml	SDS 10%
	⇒ ad	1000,0 ml	Aqua bidest.
Waschpuffer (WP) 1		50,0 ml	20 x SSC
		5,0 ml	SDS 10%
	⇒ ad	500,0 ml	Aqua bidest.
Waschpuffer (WP) 2		2,5 ml	20 x SSC
		5,0 ml	SDS 10%
	⇒ ad	500,0 ml	Aqua bidest.
Waschpuffer (WP) 3		5,0 ml	Tween 20
	⇒ ad	50,0 ml	Maleinsäurepuffer
Blocking Working Solution		2,5 ml	Blocking Stock solution
		10,0 ml	Maleinsäurepuffer
Detection Puffer pH 9,5		50,0 ml	Tris HCl pH 8,0
		16,7 ml	NaCl 3 M
	⇒ ad	500,0 ml	Aqua bidest.
Substratlösung		10,0 ml	Detection Puffer
		20,0 µl	CSPD (DIG Kit)
Stripping Puffer		66,6 ml	NaOH
		10,0 ml	SDS 10%

MATERIAL UND METHODEN

Anti-DIG-antikörperhaltiger Lösung	2,0 µl	Anti-DIG (DIG Kit)
	12,5 ml	Blocking Working Solution

E Nährmedien

Serumplatte nach Löffler	100,0 ml	Pferdeserum
	33,3 ml	Nährbouillon
	2,0 g	Glucose

OMIZ-Pat Medium		nach Wyss (1992), (vor der Verwendung Vorreduzierung für 3-4 Stunden bei 37°C im anaeroben Milieu (AnaeroGen™))
-----------------	--	--

F Lösungen für die histologischen Färbungen

Lösung A	4,1 g	Natriumacetat
⇒ ad	250,0 ml	Aqua bidest

Lösung B	11,8 ml	Eisessig
⇒ ad	500,0 ml	Aqua bidest

Gebrauchslösung	1,5 ml	Lösung A
	18,5 ml	Lösung B
⇒ ad	500,0 ml	Aqua bidest

AgNO ₃ Lsg. 1%	1,0 g	AgNO ₃
⇒ ad	100,0 ml	Gebrauchslösung

AgNO ₃ Lsg. 2%	0,3 g	AgNO ₃
⇒ ad	15,0 ml	Gebrauchslösung

Gelatinelsg.	6,0 g	Gelatine
⇒ ad	90,0 ml	Gebrauchslösung

M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

Hydrochinonlsg.		0,3 g	Hydrochinon
	⇒ ad	8,0 ml	Gebrauchslösung
Natriumthiosulfatlsg.		1,0 g	Natriumthiosulfat
	⇒ ad	100,0 ml	Gebrauchslösung
Entwicklerlsg.		90,0 ml	Gelatinelsg.
		15,0 ml	AgNO ₃ Lsg. 2%
		8,0 ml	Hydrochinonlsg.
Giemsalösung 10%		10,0 ml	Giemsa-Lsg.
		90,0 ml	Aqua dest. gepuffert 7,2

G Lösungen für die Elektronenmikroskopie

Lsg. A:		13,6 g	KH ₂ PO ₄
	⇒ ad	1000,0 ml	Aqua bidest.
Lsg. B:		17,8 g	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O
	⇒ ad	1000,0 ml	Aqua bidest.
Phosphatpuffer nach Sörensen 0,1M, pH 7,2		100,0 ml	Lösung A
	⇒	Lösung B unter pH Kontrolle zugeben, bis die Lösung einen pH von 7,2 erhält.	
Fixierlösung nach Karnovsky		2,0 g	Paraformaldehyd
	⇒ ad	25,0 ml	Aqua bidest.
unter Rühren erhitzen, verdünnte NaOH tropfenweise dazugeben bis eine Klärung des Gemisches eintritt. Abkühlen lassen.			
		15,0 ml	PBS
		10,0 ml	Glutaraldehyd 25%
	⇒	kurz vor Gebrauch: Ansatz 1:1 mit PBS mischen	

4.2 Methoden

4.2.1 Eigene Untersuchungen

4.2.1.1 Pathologische Untersuchungen

Die Präputien der geschossenen Bullen wurden äußerlich makroskopisch beurteilt, auffällige Veränderungen fotografisch dokumentiert und anschließend vom Tierkörper separiert. Der Präputialschlauch wurde eröffnet und Veränderungen der Schleimhaut sowie der Penisspitze wurden beurteilt und protokolliert.

4.2.1.2 Histopathologische Untersuchungen

A Lichtmikroskopie

Die Formalin fixierten Gewebeproben von Präputium und Penis wurden in Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke wurden mit einem Mikrotom in Schichtdicken von ca. 4 µm geschnitten. Nach dem Strecken der Schnitte im Wasserbad wurden sie auf Objektträger gezogen mittels Haematoxylin Eosin (HE) und Giemsa gefärbt und anschließend unter dem Lichtmikroskop beurteilt.

Zusätzlich wurden Schnitte von nekrotischem Präputialgewebe nach Warthin Starry gefärbt, um Spirochäten und fusiforme Bakterien besser darzustellen.

B Histologische Färbungen

Zur histologischen Untersuchung wurden von jedem Bullen Gewebeschnitte mit Giemsa, Hämalaun und Eosin (HE) und nach Warthin Starry gefärbt.

HE Färbung

Schnitte in 37°C Wärmeschrank über nacht trocknen lassen.

Anschließend nach folgendem Protokoll färben:

Xylol	5 min
Xylol	5 min

MATERIAL UND METHODEN

Alkohol 99%	3 min
Alkohol 99%	3 min
Alkohol 96%	3 min
Alkohol 80%	3 min
Alkohol 70 %	3 min
Aqua bidest.	5 min
Hämalaun nach Mayer (mod.)	5 min
Leitungswasser	5 min bläuen (lauwarm)
HCL-Alkohol	kurz eintauchen
Leitungswasser	5 min bläuen (lauwarm)
Alkohol 70%	1 min
Alkohol 80%	1 min
Alkohol 96%	1 min
Eosin (alk)	8-10 sec
Alkohol 96%	kurz
Alkohol 99%	1 min
Alkohol 99%	2 min
Xylol	5 min
Xylol	5 min
Mit Entellan eindecken	

Giemsa-Färbung

Schnitte entparaffinieren.

Anschließend nach folgendem Protokoll färben:

absteigende Alkoholreihe

Aqua dest.

Giemsalösung 10% 1 h

abspülen bis keine Farbwolken mehr abgehen mit:

Essigsäure 1% Rosafärbung

Alkohol 96% Blaufärbung

Alkohol 99% kurz

Xylol

Eindecken

Warthin Starry Versilberung

Vorbereitung:

1 Küvette mit AgNO ₃ Lsg. 1%	in 60°C (Wärmeschrank) temperieren
2 Küvetten mit Leitungswasser	in 60°C (Wärmeschrank) temperieren
1 Leerküvette	in 60°C (Wärmeschrank) temperieren
15 ml AgNO ₃ Lsg. 2%	in 60°C (Wärmeschrank) temperieren
90 ml Gelatinelsg. in Meßzylinder mit Alufolie umwickeln	in 60°C (Wärmeschrank) temperieren
8 ml Hydrochinonlsg. in Meßzylinder mit Alufolie umwickeln	in 60°C (Wärmeschrank) temperieren

Imprägnierung:

Xylol	
absteigende Alkoholreihe	
Aqua dest.	
AgNO ₃ Lsg. 1%	1 h bei 60°C
Entwickeln	Schnitte in Entwicklerlsg. tauchen und bewegen bis der Schnitt eine goldbraune Farbe hat.
warmes Wasser	2x kurz eintauchen
Gebrauchslsg.	3x kurz eintauchen
Natriumthiosulfat	2 min
Aqua dest.	
Aufsteigende Alkoholreihe	
Xylol	
Eindecken	

B Elektronenmikroskopie

Die Aufarbeitung der Proben für die Elektronenmikroskopie wurde wie folgt vorgenommen:

Rastereinbettung

Fixierlsg. nach Karnovsky	
spülen mit Phosphatpuffer	3x5 min
Nachfixierung mit Osmiumtetroxyd 1%	30 min
alles bei 4° C	
spülen mit Phosphatpuffer,	3x5 min
Alkohol 35%	20 min
Alkohol 70%	20 min
Alkohol 85%	20 min
Alkohol 96%	20 min
Alkohol abs.	20 min
Trocknung mit	
Hexamethyldisilazane (HMDS)	10 min
Lufttrocknung	30 min

montieren der Gewebstücke auf Probenteller mit Lighttabs-Klebefolie

besputtern mit Goldpalladium

Beurteilung der Proben bei 15 kV im SEM 940 A

4.2.1.3 Bakteriologische Diagnostik

A Aufbereitung des Untersuchungsmaterials

Die Tupfer für die bakteriologische Diagnostik wurden sofort nach der Entnahme in Transportmedium verbracht und bei Raumtemperatur maximal 5 h gelagert. Sie wurden dann als dreifach Verdünnungsausstrich auf folgende Nährböden ausgestrichen: Columbia Agar mit 5% Schafblut, Gassner Agar, Kochblut Agar, Schaedler Agar, McConkey Agar. Anschließend wurde der Tupfer in vorreduzierte Schaedler Bouillon verbracht und luftdicht in einem Anaerobiertopf verschlossen. Die beimpften Schaedlerplatten wurden in Töpfen mit anaerober Atmosphäre für 48 h, die Kochblutplatten in CO₂ Atmosphäre für 24 h bei 37°C

inkubiert. Die beimpften Columbia Agar-, Gassner Agar- und McConkey Agar-Platten wurden ebenfalls 24h bei 37°C inkubiert. Tupfer für die Untersuchung auf Mykoplasmen wurden in modifiziertes Hayflick Medium (Spergser et. al, 2002) verbracht und bei 4°C gelagert. Für die Untersuchung auf Treponemen wurden die entnommenen Tupfer in vorreduziertes Omiz Pat Medium (Wyss, 1992) verbracht und bei 37°C inkubiert. Nach 24 h wurden die Columbia Agar-, Gassner Agar- und McConkey-Agarplatten aus dem Brutschrank genommen und von allen nicht identischen Bakterienkolonien wurde eine Subkultur auf Columbia- und Gassner-Agarplatten angelegt. Die Primär- Platten wurden für weitere 24 h bei 37°C in CO₂ Atmosphäre inkubiert. Nach 48 h wurden die Agarplatten nochmals kontrolliert und ggf. Subkulturen von weiteren Kolonien angelegt.

Die Schaedlerplatten wurden nach 48 h aus dem Brutschrank genommen und es wurden je zwei Kulturen von allen nicht identischen Kolonien auf Columbia- Agar angelegt. Eine dieser Kulturen diente als aerobe Kontrolle die andere wurde in anaerobe Atmosphäre verbracht und für 48 h bei 37°C inkubiert.

B Identifizierung der Bakterien

Alle Bakterienkulturen wurden nach Standardprotokollen identifiziert. Die Menge der einzelnen Bakterienspezies wurde dokumentiert; dabei wurde das Wachstum auf dem ersten Impfstrich des Verdünnungsausstrichs mit +, das Wachstum auf dem zweiten Impfstrich mit ++ und Wachstum auf dem dritten Impfstrich mit +++ bewertet. Es wurde eine Gramfärbung angefertigt, um die Bakterien gemäß dem Färbeverhalten und der Morphologie einzuordnen: Für die Gramfärbung wurde eine Bakterienkolonie mit einer sterilen Impföse von der Agarplatte gehoben und mit einem Tropfen physiologischer NaCl auf einem Objektträger ausgestrichen. Dieser wurde kurz in die Flamme eines Bunsenbrenners gehalten um die Bakterien zu fixieren und dann nach folgendem Protokoll gefärbt:

Karbolgentianviolett	3 min
Lugol'sche Lösung	3 min
Ethanol 96%	1 min
Karbofuchsin	15 sec

Weiterhin wurden die Katalase und Oxidase Reaktion getestet, sowie ein O/F Test angesetzt. Anhand der Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden weiterführenden Tests festgelegt.

C Bestimmung des biochemischen Profils

Staphylokokken wurden mit dem api Staph Test System identifiziert. Die zu identifizierenden Staphylokokken wurden auf Columbia Agar ausgestrichen und 24 h bei 37°C inkubiert. Gemäß Angaben des Herstellers wurde mit wenig Kulturmaterial eine Suspension mit einem Trübungsgrad entsprechend McFarland Standard 0,5 hergestellt. Anschließend wurde der Test-Streifen nach dem Protokoll des Herstellers beschickt. Der Streifen wurde dann in einer feuchten Kammer bei 37°C für 24 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden Zusatz-Reagenzien in die beimpften Röhrchen pipettiert, die Reaktionen abgelesen und anhand der Tabelle des Herstellers beurteilt. Zusätzlich wurde die Koagulase- und Hyaluronidaseaktivität ermittelt.

Coryneforme Bakterien wurden anhand des api®CORYNE Test Systems identifiziert. Die zu identifizierenden coryneformen Bakterien wurden auf Columbia Agar ausgestrichen und 24 h bei 37°C inkubiert. Gemäß Angaben des Herstellers wurde mit Kulturmaterial eine Suspension mit einem Trübungsgrad entsprechend McFarland Standard 6 hergestellt. Anschließend wurde der Test-Streifen nach dem Protokoll des Herstellers beschickt.

Der Streifen wurde dann in einer feuchten Kammer bei 37°C für 24 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden Zusatz-Reagenzien in die beimpften Röhrchen pipettiert, die Reaktionen abgelesen und anhand der Tabelle des Herstellers beurteilt.

Enterokokken wurden anhand Schwarzfärbung und Wachstums auf Enterococcus BAA Agar auf Gattungsebene identifiziert. Enterokokken hydrolysieren Aesculin zu Aesculetin und Dextrose. Aesculetin bildet zusammen mit dem im Medium enthaltenen Eisencitrat einen schwarzen Komplex. Dem Medium zugesetzte Gallensalze inhibieren das Wachstum von anderen grampositiven Bakterien.

Streptokokken wurden anhand der Kolonie- und Bakterienmorphologie, sowie fehlender Katalase Aktivität auf Gattungsebene bestimmt.

Enterobacteriaceae wurden anhand ihres Wachstums auf Gassner und McConkey Agar sowie mit Hilfe der api®NE und api®E Testsysteme identifiziert. Auch hier wurden die zu identifizierenden *Enterobacteriaceae* auf Columbia Agar ausgestrichen und 24 h bei 37°C inkubiert. Gemäß Angaben des Herstellers wurde mit Kulturmaterial eine Suspension mit einem Trübungsgrad entsprechend McFarland Standard 4 hergestellt. Anschließend wurde der Test-Streifen nach dem Protokoll des Herstellers beschickt. Der Streifen wurde dann in einer feuchten Kammer bei 37°C für 24 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden Zusatz-Reagenzien in die beimpften Röhrchen pipettiert, die Reaktionen abgelesen und anhand der Tabelle des Herstellers beurteilt.

Bakterienkulturen, die mittels dieser Methoden nicht eindeutig zu identifizieren waren, wurden mit Hilfe einer 16S r DNA PCR, mit anschließender Sequenzanalyse, typisiert.

4.2.1.4 PCR und Sequenzierung der Bakterienisolate

A DNA Extraktion aus Bakterienkulturen

Eine Kolonie der Bakterienkultur wurde in 500 µl PBS resuspendiert. Fünfzig µl dieser Suspension wurden mit 5 µl Proteinase K versetzt und dann für 2 h bei 56°C im heißen Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Suspensionen für 10 min bei 100°C gekocht und sofort auf Eis gestellt.

B DNA Extraktion aus Präputialgewebe

Hierzu wurde das DNeasy Tissue Kit von Quiagen verwendet. Das Gewebe wurde aus dem –80°C Gefrierschrank genommen. Es wurden ca. 25 mg abgeschnitten, in sehr kleine Stücke zerteilt und dann nach dem Protokoll von Quiagen bearbeitet:

25 mg Gewebe wird zerkleinert und zusammen mit 180 µl ATL Puffer und 20 µl Proteinase K in ein 1,5 ml Eppendorf Röhrchen gegeben und gevortext. Das Ganze wird bei 55°C inkubiert, bis das Gewebe vollständig aufgelöst ist. Nach nochmaligem vortexen werden 200 µl AL Puffer zugegeben und bei 70°C für 10 min inkubiert. Anschließend werden 200 µl Ethanol (96-100%) zugegeben, gemischt und in ein DNeasy Zentrifugen Röhrchen gegeben. Dieses wird bei 6000 x g zentrifugiert und das Filtrat wird entsorgt. Anschließend werden 500 µl AW1 Puffer zugegeben und 1 min bei 6000 x g zentrifugiert. Das Filtrat wird wiederum entsorgt. Dann werden 500 µl AW2 Puffer zugegeben und 3 min mit Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert um die DNeasy Membran zu trocknen. Das Filtrat wird entsorgt.

Um die DNA zu eluieren werden 200 µl AE Puffer auf die Membran gegeben, bei Raumtemperatur inkubiert und für 1 min bei 6000 x g zentrifugiert.

C Polymerase – Kettenreaktion (PCR)

Zur Identifizierung der Bakterienkulturen mittels PCR wurde die Primerkombination TPU1/RTU8 verwendet. Diese flankieren die gesamte 16S rDNA (ca. 1500 bp) der Bakterien. Die lyophilisierten Primer wurden in dd H₂O rekonstituiert und auf eine Konzentration von 25 pmol/µl eingestellt. Das Ansetzen der PCR erfolgte auf Eis, um

MATERIAL UND METHODEN

vorzeitige Reaktionen der Taq- Polymerase zu verhindern. Folgender Reaktionsansatz wurde verwendet:

Lösung	Menge in μl pro Probe/ 50 μl Ansatz
dd H ₂ O	34,75
MgCl ₂ 50mM	2,0
10x PCR-Puffer	5,0
DNTP's	5,0
Primer 1 (25 pmol/ μl)	0,5
Primer 2 (25 pmol/ μl)	0,5
Taq-Polymerase	0,25
Proben-DNA	je 2,0
Summe	50,0

Das Ansetzen des „Master Mix“, die Zugabe der Template DNA, sowie die Amplifizierungsreaktion wurden räumlich getrennt voneinander durchgeführt, um das Entstehen falsch-positiver Ergebnisse zu verhindern. Das Pipettieren erfolgte mit gestopften Spitzen, um Kreuzkontamination zwischen den Proben zu vermeiden. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch kurz zentrifugiert. Bei jeder PCR wurde eine Negativkontrolle (Mastermix + 2 μl Aqua dest) mitgeführt. Als Positivkontrolle diente DNA von *Staphylococcus aureus*. Die Amplifizierung erfolgte in einem automatischen Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

Denaturierung	94°C	3 min	
Denaturierung	94°C	60 sec	
Annealing	55°C	60 sec	30 Zyklen
Polymerisation	72°C	60 sec	30 Zyklen
Polymerisation	72°C	30 min	
Pause	4°C		

Das PCR Produkt wurde bei 4°C gelagert bzw. zur längeren Lagerung bei -20°C eingefroren. Zur Ermittlung der Fragmentgröße wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

D Horizontale Agarosegelelektrophorese

Agarose (1,5 g) wird durch aufkochen in 150 ml TAE Puffer gelöst und mit 7,5 µl Ethidiumbromid versetzt. Diese Gellösung wurde dann in eine Gelkammer gegossen, in der sich ein Probenaschenkamm mit einer Breite von 10 mm befand. Nach 30 min wurde der Kamm vorsichtig entfernt und das Gel in eine horizontale Gelelektrophoresekammer gelegt. Diese wurde dann mit Laufpuffer (TAE Puffer) gefüllt bis das Gel bedeckt war. Die PCR Produkte wurden mit Probenladungspuffer gemischt und in die Probenaschen pipettiert. In die erste Tasche wurde ein 100 bp Molekulargewichtsstandard pipettiert, um die Größe der DNA Fragmente zu ermitteln. Die Elektrophorese wurde bei 80 V für 75 min durchgeführt. Anschließend wurde das Gel vorsichtig aus der Gelkammer genommen und zur Visualisierung der DNA Fragmente auf einen Transilluminator gelegt und fotografiert.

E DNA Reinigung

Zur Aufreinigung der DNA wurde das DNA Purification Kit von Quiagen verwendet. Dabei wurde nach folgendem Protokoll des Herstellers verfahren:

5 Teile des Puffers PB werden mit 1 Teil der PCR Probe gemischt. Das "QIAquick spin column" wird anschließend in die mitgelieferten 2 ml Rörchen gestellt. Um die DNA aufzufangen, wird die Probe in das QIAquick Rörchen verbracht und für 30-60 s bei ~17.900 x g zentrifugiert. Das Filtrat wird entsorgt und das QIAquick Rörchen zurück in das 2 ml Rörchen gestellt. 0,75 ml PE Puffer werden zugegeben und erneut für 30-60 bei ~17.900 x g zentrifugiert. Das Filtrat wird entsorgt und das QIAquick Rörchen zurück in das 2 ml Rörchen gestellt. Dann wird erneut für 1 min zentrifugiert. Das QIAquick Rörchen wird anschließend in ein sauberes 1,5 ml Eppendorf Rörchen gestellt. Um die DNA zu eluieren, gibt man 50 µl EB Puffer oder H₂O auf die QIAquick Membran und zentrifugiert für 1 min.

F Sequenzierung

Für den Vergleich der Sequenzen wurde ein ca. 400 bp langes Stück der 16S rDNA sequenziert. Die gereinigte DNA wurde direkt in die Sequenzierungsreaktion eingesetzt. Für die Sequenz-PCR wurde ein „Master Mix“ nach folgendem Schema hergestellt. Als Sequenzierprimer wurde RTU8 verwendet:

MATERIAL UND METHODEN

Lösung	10,0 µl Ansatz
Primer (10 nmol/µl)	1,0 µl
Sequenzierungspuffer	2,0 µl
Big Dye	1,0 µl
Probe	6,0 µl

Dieser Reaktionsansatz wurde dann unter folgenden Bedingungen in einen automatischen Thermocycler gestellt.

Denaturierung	96°C	10 sec	
Annealing	50°C	5 sec	35 Zyklen
Polymerisation	60°C	4 min	35 Zyklen

Nach Ablauf des Programms wurden die Proben aus dem Thermocycler genommen und eine DNA Fällung durchgeführt. Hierzu wurden zu dem 10 µl Ansatz 2 µl 2,2% SDS und 8 µl H₂O gefügt und 5 min bei 98°C inkubiert. In ein 0,5 ml Eppendorf Röhrchen werden 125 µl absolutes Ethanol vorgelegt. Anschließend wird der PCR-Ansatz mit 30 µl 0,5 M Natrium - acetatlösung gut suspendiert. Dieses Gemisch wird zum Ethanol pipettiert, gevortext, und anschließend bei hoher Geschwindigkeit (~17.900 x g) 20 min zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgezogen und mit 180 µl 70% Ethanol gewaschen. Dann wird noch mal bei hoher Geschwindigkeit (~17.900 x g) 5-8 min zentrifugiert und der Überstand vollständig abgezogen. Die verbleibende DNA wird im Thermoblock bei 37°C 5 min mit offenem Deckel getrocknet und anschließend noch mal 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Im Anschluss daran werden 20 µl H₂O zugegeben, und beides gut vermischt (Vortexer) und anzentrifugiert. Das Gemisch wird anschließend in eine Lochplatte pipettiert und in den Sequenzierautomaten gestellt.

G Auswerten der Sequenzen

Die ermittelten Sequenzen wurden mit Hilfe des BLAST Programms der NCBI Webseite (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und dem FASTA Programm der EMBL-EBI Webseite (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/>) mit bekannten Sequenzen der 16S rDNA von Bakterien verglichen.

4.2.1.5 Charakterisierung/ Identifizierung einer neuen Bakterienart

A Bestimmen der Enzymaktivitäten

Zur Bestimmung der biochemischen Profile wurde das api[®]CORYNE Test Systems angewendet (siehe Kapitel 4.2.1.3). Weitere Enzymaktivitäten wurden mit dem api[®]Zym Teststreifen ermittelt. Gemäß Angaben des Herstellers wurde mit Kulturmaterial eine Suspension mit einem Trübungsgrad entsprechend McFarland Standard 2 hergestellt. Anschließend wurde der Test-Streifen nach dem Protokoll des Herstellers beschickt.

Der Streifen wurde dann in einer feuchten Kammer bei 37°C für 4 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden Zusatz-Reagenzien in die beimpften Röhrchen pipettiert, die Reaktionen abgelesen und anhand der Tabelle des Herstellers beurteilt.

Um die Fermentation verschiedener Zucker zu überprüfen, wurde das api[®]CH50 verwendet. Gemäß Angaben des Herstellers wurde mit Kulturmaterial eine Suspension mit einem Trübungsgrad entsprechend McFarland Standard 2 hergestellt. Anschließend wurde der Test-Streifen nach dem Protokoll des Herstellers beschickt.

Der Streifen wurde dann in einer feuchten Kammer bei 37°C für insgesamt 48h inkubiert. Nach 24 h Inkubation wurden die Reaktionen zum ersten mal abgelesen und ein Farbumschlag anhand der Tabelle des Herstellers beurteilt. Das zweite Ablesen erfolgte nach 48 h.

Des weiteren wurde die Fähigkeit zur Serolyse von Pferdeserum auf Löffler Serumagar getestet.

B Weitere Untersuchungen

Wie in Kapitel 4.2.1.3 beschrieben, wurden ein Katalase, Oxidase und O/F Test sowie eine Gramfärbung durchgeführt. Außerdem wurde das Wachstum in CO₂ Atmosphäre (CO₂Gen) und unter anaeroben Bedingungen (AnaeroGen™) sowie das Wachstum auf McConkey Agar und bei 42°C getestet.

C Sequenzierung 16S rDNA

Die Sequenzierung der DNA erfolgte wie in Kapitel 4.2.1.4 beschrieben. Als Sequenzierprimer wurden TPU1, RTU8, SeqFW und SeqREV verwendet.

D Auswerten der Sequenzen

Die ermittelten Sequenzen wurden an den sich überschneidenden Enden zusammengefügt und die komplette (ca. 1450 Basen) 16S rDNA wurde mithilfe des BLAST Search der NCBI Homepage (www.ncbi.nlm.nih.gov) mit bekannten Sequenzen verglichen.

E Berechnung des Dendogramms

Alle erhaltenen 16S rDNA Sequenzen sowie die 16S rDNA Sequenzen von den sechs beschriebenen *Arcanobacterium* sp. und weiteren Vertretern der Familie *Actinomycetaceae* wurden mit dem Programm Alignment Editor von Mega 2.1 aliniert (Kumar et al., 2001) und für die Berechnung eines Dendrogramms nach der Neighbour joining Methode verwendet. Zur Berechnung wurde der Tree Explorer von MEGA 2.1 (Kumar et al., 2001) verwendet.

F spezifische PCR

Zur Identifizierung der Bakterienspezies aus Gewebe wurde eine PCR entwickelt. Die DNA Extraktion aus Gewebe sowie die Durchführung einer PCR wurde bereits in Kapitel 4.1.2.4 beschrieben. In diesem Fall wurden die Primer ArcFw1 und ArcRev1 verwendet. Diese flankieren ein ca. 250 bp großes Stück der 16S rDNA der Bakterien. Die Annealing Temperatur betrug 58°C. Bei jeder PCR wurde eine Negativkontrolle (Mastermix + 2 µl Aqua dest.) mitgeführt. Als Positivkontrolle diente DNA von der neuen *Arcanobacterium* sp. Zum Austesten der Spezifität wurden verwandte *Arcanobacterium* sp. sowie nicht verwandte Bakterien als Kontrolle in der PCR eingesetzt.

G Sequenzierung des PCR Produkts

Um nachzuprüfen, ob es sich bei der ermittelten Bande um die richtige Sequenz handelt, wurde das PCR Produkt sequenziert. Als Sequenzierprimer wurde der Primer ArcFW1 in einer Verdünnung von 10 pmol /µl verwendet und das Reaktionsgemisch unter den bereits in Kapitel 4.2.1.4 beschriebenen Bedingungen bei einer Annealing Temperatur von 58°C in einen automatischen Thermocycler gestellt.

Im Anschluss erfolgte DNA Fällung, Sequenzierung und Auswertung der Sequenzen wie bereits in Kapitel 4.2.1.4 beschrieben.

H SDS – Polyacrylamid – Gelelektrophorese

Um das spezifische Proteinbandenmuster der neuen Stämme im Unterschied zu den Referenzstämmen zu ermitteln wurde eine gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine durchgeführt.

Herstellung der Zell-Lysate

Ca. 4 mg *Arcanobacterium* -Reinkulturen wurden im Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 98°C denaturiert.

Durchführung der Elektrophorese

Für die Elektrophorese wurden fertig hergestellte Gele verwendet. Die Gelkammer wurde mit 1x SDS-Lauf-Puffer gefüllt. Die Proteinproben (20 µl) wurden in die Geltaschen gefüllt. Parallel wurde bei jedem Lauf ein Proteinmolekulargewichtsgrößenstandard mitgeführt, um eine Größenbestimmung der Proteinbanden vornehmen zu können. Die Elektrophorese wurde bei 200 V für 55 min durchgeführt. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte durch Färbung mit Coomassie blue und anschließendes Entfärben mit Entfärbelösung. Beides wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Hierzu wurde im Anschluss an die Gelelektrophorese das Gel vorsichtig von den 2 Kunststoffplatten gelöst, in die Färbelösung gelegt und 60 min unter Schüttelbewegungen bei Raumtemperatur inkubiert.

Zum Entfärben wurde das Gel zunächst in konzentrierte Entfärbelösung verbracht und unter Schüttelbewegungen 15 min entfärbt. Dies wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurde die Entfärbelösung 1:1 mit Aqua dest. verdünnt und es wurde weitere 30 min entfärbt. Das Gel wurde dann über Nacht in Aqua dest bei 4°C gelagert und am nächsten Tag auf einer Durchlichtquelle visualisiert und fotografiert.

I BOX PCR

Die BOX Elemente sind repetitive Sequenzen im Bakteriengenom. Einzelne Primer, die an diese Stellen binden werden verwendet, um genetische Fingerprintanalysen von Bakterien durchzuführen. Zu diesem Zweck wurde wie in Kapitel 4.2.1.4 beschrieben, eine PCR durchgeführt. Es wurde der Primer BOX A1R verwendet. Die Annealing Temperatur betrug 53°C und die Polymerisation fand bei 63°C statt.

4.2.1.6 Molekulargenetische Untersuchungen auf Spirochäten

A PCR

Die aus dem Gewebe von erkrankten Bullen extrahierte bakterielle DNA wurde mittels PCR unter Verwendung der Primerkombination TPU1/RTU8 und SPU1/RTU8 amplifiziert und im Anschluss für die Dot blot-Hybridisierung verwendet.

B Dot Blot-Hybridisierung

Mittels der Dot blot-Hybridisierung sollte auf 16S rDNA von Treponemen untersucht werden. Der DNA-Transfer auf die Nylon-Membran erfolgte durch Pipettieren. Die DNA wurde zuvor in einem Eppendorfgefäß (500 µl) 5 min bei 98°C denaturiert. Nach schneller Abkühlung im Eisbad wurden 2-3 µl auf eine Nylon-Membran transferiert und die Nukleinsäuren auf der Membran nachfolgend mittels UV-Bestrahlung je 3 min pro Seite fixiert. Die Hybridisierungen wurden unter ständiger Rotation der Hybridisierungsröhren in einem Hybridisierungssofen durchgeführt.

Die Nylon-Membranen wurden für 30 min mit dem Standard-Hybridisierungspuffer (ca. 10 ml) prähybridisiert. Der Prähybridisierungspuffer wurde dekantiert und durch die Hybridisierungslösung (15 pmol Oligonukleotidsonde in 10 ml Standard-Hybridisierungspuffer) ersetzt. Nach 1,5 Stunden Hybridisierung wurde diese Lösung in ein 50 ml Falcon-Gefäß gegossen und bei -20°C für weitere Hybridisierungen aufbewahrt. Die Temperaturen der Prä- und Hybridisierung waren identisch und abhängig von der verwendeten DIG-markierten Oligonukleotidsonde. Anschließend wurden zwei Waschschriffe (I und II) für je 15 min mit Waschpuffer durchgeführt. Die Wahl der Temperatur und der Waschpuffer waren von der verwendeten Oligonukleotidsonde abhängig. Der Waschpuffer wurde zuvor auf die entsprechende Temperatur erwärmt. Alle folgenden Schritte wurden bei 37°C durchgeführt. Die Membranen wurden für 30 min mit der Blocking Working Solution inkubiert und anschließend für 30 min mit Anti-DIG-Antikörperhaltiger Lösung inkubiert. Es folgte unmittelbar danach ein zweimaliger Waschschriff mit Maleinsäurepuffer (je 15 min) und im Anschluß daran eine Äquilibration mit 5 ml Detektionspuffer (5 min). Nach der Äquilibration wurde die Membran 5 min mit Substratlösung inkubiert. Nach kurzem Abtropfen wurden die Membranen so zwischen zwei Klarsichtfolien eingeschlagen, daß sich zwischen Membranen und Folie möglichst keine Luftblasen befanden. Die so verpackten Membranen wurden in eine Röntgenfilmkassette auf einen Röntgenfilm gelegt und für ca. 45-

60 min bei 37°C exponiert. Anschließend wurde der Röntgenfilm im Entwicklungsautomaten entwickelt. Eine mehrfache Verwendung der Nylon-Membranen wurde durch Entfernung der gebundenen Oligonukleotide durch zweimaliges Waschen für 10 min mit Stripping- Puffer ermöglicht.

C Gattungsspezifische PCR

Zur Identifizierung der Gattungen *Leptospira*, *Brachyspira* und *Borrelia* aus Gewebe wurde eine PCR durchgeführt. Die DNA Extraktion aus Gewebe, sowie die Durchführung einer PCR, wurde bereits in Kapitel 4.1.2.4 beschrieben. In diesem Fall wurden gattungsspezifische Primer verwendet. Für die Gattung *Leptospira* und *Borrelia* wurde eine PCR durchgeführt mit der das *rpoB* Gen der Gattungen *Leptospira* und *Borrelia* amplifiziert wird. RpoB kodiert für die β -Untereinheit der RNA-Polymerase, ein hochkonserviertes Enzym. Als Positivkontrolle wurde DNA von *Leptospira interrogans* und einem Gemisch aus *Borrelia burgdorferi sensu stricto* B31, *Borrelia afzelii* N34, *Borrelia garinii* VS461 und *Borrelia valaisiana* VS116 verwendet. Für beide Gattungen wurden die Primer 1730F und 2900R verwendet.

Folgender Reaktionsansatz wurde angesetzt:

Lösung	Menge in μ l pro Probe/ 50 μ l Ansatz
dd H ₂ O	34,75
MgCl ₂ 50mM	2,0
10x PCR-Puffer	5,0
DNTP's	5,0
Primer 1 (25 pmol/ μ l)	0,5
Primer 2 (25 pmol/ μ l)	0,5
Taq-Polymerase	0,25
Proben-DNA	je 2,0 μ l
Summe	50,0

MATERIAL UND METHODEN

Die Amplifizierung erfolgte in einem automatischen Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

Denaturierung	94°C	2 min	
Denaturierung	94°C	30 sec	35 Zyklen
Annealing	52°C	30 sec	35 Zyklen
Polymerisation	72°C	60 sec	35 Zyklen
Polymerisation	72°C	3 min	
Pause	4°C		

Für die Gattung *Brachyspira* wurde eine 23S rRNA PCR durchgeführt. Verwendet wurden die *Brachyspira* spezifischen Primer SER-1F und SER-2R. Als Positivkontrolle wurde DNA von *Brachyspira hyodisenteriae* verwendet. Folgender Reaktionsansatz wurde angesetzt:

Lösung	Menge in µl pro Probe/ 50 µl Ansatz
dd H ₂ O	34,75
MgCl ₂ 50mM	2,0
10x PCR-Puffer	5,0
DNTP's	5,0
Primer 1 (25 pmol/µl)	0,5
Primer 2 (25 pmol/µl)	0,5
Taq-Polymerase	0,25
Proben-DNA	je 2,0 µl
Summe	50,0

Die Amplifizierung erfolgte in einem automatischen Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

Denaturierung	94°C	3 min	
Denaturierung	94°C	20 sec	40 Zyklen
Annealing	65°C	40 sec	40 Zyklen
Polymerisation	72°C	60 sec	40 Zyklen
Polymerisation	72°C	5 min	
Pause	4°C		

4.2.1.7 Statistische Berechnungen

Um gesunde und kranke Bullen hinsichtlich der Testreaktion auf *M.bovigenitalium* Antikörper zu vergleichen wurde der Chi Quadrat Test verwendet. Alle statistischen Berechnungen wurden durchgeführt mit SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

4.2.2 Fremduntersuchungen

Die Untersuchungen auf Mykoplasmen wurden vom Institut für Bakteriologie, Mykologie und Hygiene der Veterinärmedizinischen Universität Wien durchgeführt und werden daher als Fremduntersuchung beschrieben.

4.2.2.1 Kulturelle Untersuchung auf Mykoplasmen

Zum Nachweis von Mykoplasmen wurde 5 ml modifiziertes Hayflick Medium (Spergser et al., 2002) mit den Tupferproben versetzt und anschließend bei 37°C und atmosphärischen CO₂-Partialdruck bis zu sieben Tage inkubiert. Anschließend erfolgte die Subkultivierung von 100 µl der Flüssigkultur auf festem Nährboden und eine bis zu 14-tägige Inkubation bei 37°C in 5%iger CO₂-Atmosphäre. Nach regelmäßiger Kontrolle auf Mykoplasmenwachstum mittels stereomikroskopischer Untersuchung erfolgte die Artdiagnose mit Hilfe der Kolonieblot-Technik unter Verwendung artspezifischer Kaninchen-Hyperimmunseren.

4.2.2.2 Mykoplasmen-spezifische PCR

Zur Isolierung genomischer DNA aus Tupferproben wurde die CTAB-Methode mit anschließender Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol DNS-Extraktion durchgeführt (Spergser et al., 2002). Der molekulare Nachweis von *M. bovigenitalium* erfolgte mit Hilfe des von Kobayashi et al. (1998) beschriebenen PCR-Systems. Die Visualisierung der Amplifikationsprodukte erfolgte durch gelelektrophoretische Auftrennung und Ethidiumbromid-Färbung.

4.2.2.3 Infektionsserologie Mykoplasmen mittels Westernblot Analyse

Mit Hilfe der Westernblot-Analyse (Brank et al. 1999), erfolgte die Detektion von Antikörpern in Serum gegen *M. bovis genitalium* (Typstamm PG11). Hierfür wurden Proteine eines Ganzzell-Lysat von *M. bovis genitalium* mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und diese anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Nach Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit 1%igem BSA wurde der Westernblot mit Kontroll- und Feldseren (1:100) beschickt. Als positive Kontrollseren dienten Seren von Rindern mit nachgewiesener *M. bovis genitalium*-Infektion. Nach Inkubation des Blots über Nacht bei 4°C und dreimaligem Waschen mit PBS-Tween wurden die Blots für zwei Stunden bei 37°C mit einem Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper (anti-Rind IgG) inkubiert. Nach einem weiteren dreimaligen Waschschrift mit PBS konnte die Antigen-Antikörper-Bindung mit 4-Chloro-1-Naphthol sichtbar gemacht werden.