

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Konventionelle Anzucht

Von den 58 Bioplaten konnten 53 bakteriologisch untersucht werden. Bei 5 Bioplaten wurde keine Anzucht durchgeführt, da diese infolge eines mehrere Tage dauernden Transportes durch unspezifische Begleitflora überwuchert worden waren. Bei 2 weiteren Proben konnten keine Anaerobier nachgewiesen werden und 1 Probe war von *Proteus* spp. überwuchert. Somit war bei 50 Proben eine Kultivierung von Anaerobiern erfolgt. Abb. 4 zeigt die Häufigkeit der nachgewiesenen Spezies.

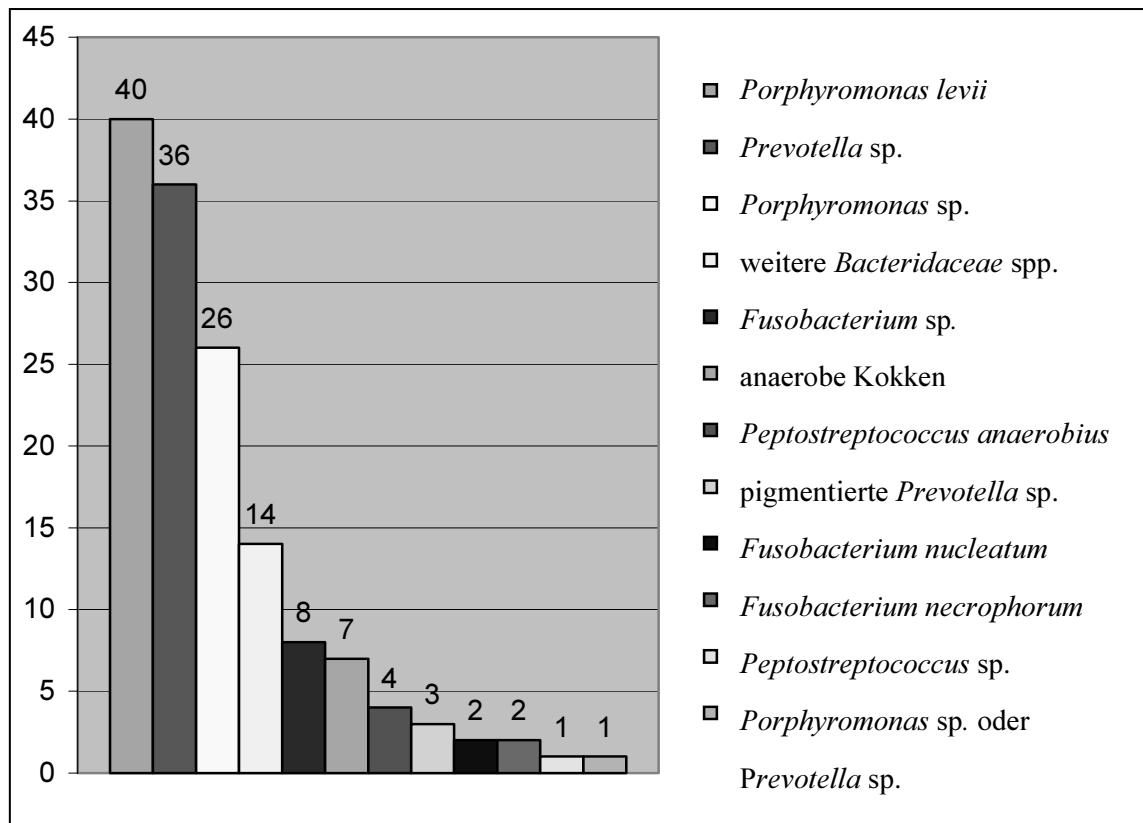


Abbildung 4: Nachweis von Anaerobiern in DD-Bioplaten (Probenumfang n = 50).

Wie Abb. 4 zu entnehmen ist, sind die dominanten Keime vor allem typische Vertreter wie *Porphyromonas levii*, *Prevotella* spp. nicht weiter charakterisierte *Porphyromonas* spp. sowie *Bacteroidaceae* spp.. In deutlich geringerer Anzahl kommen Fusobakterien, anaerobe Kokken, Peptostreptokokken, sowie pigmentierte *Prevotella* spp. vor. In einem Fall konnte nicht zwischen *Porphyromonas* oder *Prevotella* sp. unterschieden werden.

## 4.2 Charakterisierung der angezüchteten Isolate

### 4.2.1 Isolierung von Treponemen

Mit Hilfe des Limit-dilution-Verfahrens war es möglich, insgesamt 9 Isolate aus drei verschiedenen Bioptatproben (Bioptat-Nr. 49,52 und 53) anzuzüchten. Dabei handelt es sich um die Isolate:

- Isolat DD49/1-DD49/2
- Isolat DD52/1-DD52/4
- Isolat DD53/1

### 4.2.2 Biochemische Charakterisierung

Mit Hilfe kommerziell erhältlicher Enzymtests wurden verschiedene Stoffwechselleistungen der Isolate überprüft. Mit dem **apizym**®-Teststreifen (Biomerieux) war bei allen Isolaten der Nachweis der alkalischen Phosphatase, der sauren Phosphatase sowie der Naphthol-AS-BI-Phosphohydrolase deutlich positiv. Schwach-positiv war bei allen Isolaten die Aktivität der Esterase (C4) sowie zusätzlich bei Isolat DD53/1 der Nachweis der Esterase-Lipase C8. Mittels des **rapid ID32A**®-Teststreifens (Biomerieux) ergaben sich außerdem bei allen Isolaten schwach-positive Reaktionen für das Enzym Arginindihydrolase.

Tabelle 5: Enzymaktivitäten der verschiedenen Isolate.

	Arginin-dihydrolase	Alkalische Phosphatase	Esterase(C4)	Saure Phosphatase	Naphthol-AS-BI-Phosphohydrolase	Esterase-Lipase (C8)
Isolat DD49/1–DD49/2	+/-	+	+/-	+	+	-
Isolat DD52/1–DD52/4	+/-	+	+/-	+	+	-
Isolat DD53/1	+/-	+	+/-	+	+	+/-

In nachfolgender Tabelle sind die Enzymaktivitäten einiger *Treponema* spp. vergleichend aufgelistet. Die größte Übereinstimmung der Enzymmusters besteht hierbei mit den Vertretern der verschiedenen Subspezies von *Treponema socranskii*, insbesondere mit *Treponema socranskii socranskii* besitzen alle Isolate gemeinsam die Enzyme Alkalische Phosphatase, Saure Phosphatase, die Naphtol-AS-BI-Phosphohydrolase sowie Esterase (C4).

Isolat DD53/1 besitzt zudem eine schwache Aktivität der Esterase Lipase (C8) und weist somit mehr Übereinstimmung mit *Treponema socranskii paredis* auf

Tabelle 6: Enzymaktivitäten verschiedener *Treponema* spp. im Vergleich mittels *apizym*®-Teststreifenverfahren (Biomerieux).

Taxon	Stamm	Alkalische Phosphatase	Esterase (C 4)	Esterase Lipase (C 8)	Lipase (C 14)	Leucin-Arylamidase	Valin-Arylamidase	Cystin-Arylamidase	Trypsin	Chymotrypsin	Saure Phosphatase	Naphthol-AS-BI-Phosphohydrolase	$\alpha$ -Galactosidase	$\beta$ -Galactosidase	$\beta$ -Glucuronidase	$\alpha$ -Glucosidase	$\beta$ -Glucosidase	N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase	$\alpha$ -Mannosidase	$\alpha$ -Fucosidase
<i>T. brennaborensis</i> <sup>3</sup>	DD 5/3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
<i>T. maltophilum</i> <sup>1</sup>	BR	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+
	HO2A	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	PNA1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>T. denticola</i> <sup>1</sup>	CD-1	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	51B2	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>T. pectinovorum</i> <sup>1</sup>	ATCC 33768	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>T. socranskii ssp. buccale</i> <sup>1</sup>	ATCC 35534	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>T. socranskii ssp. paredis</i> <sup>1</sup>	ATCC 35535	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>T. socranskii ssp. socranskii</i> <sup>1</sup>	ATCC 35536	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>T. vincentii</i> <sup>1</sup>	LA-1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
	Ritz A	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>T. amylovorum</i> <sup>2</sup>		+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
<b><u>DD-Isolate</u></b>																				
Isolat DD 49/1-DD 49/2		+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Isolat DD 52/1-DD 52/4		+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Isolat DD53/1		+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

1 Wyss et al. 1996 2 Wyss et al. 1997 3 Schrank et al. 1998

### 4.2.3 Genotypische Charakterisierung

Mit Hilfe einer kommerziellen DNA-Sequenzanalyse (AGOWA, Berlin) konnten für das Isolat DD49/1 die ersten 660 Basen der 16S rDNA, für das Isolat DD 52/7 die ersten 706 Basen und für Isolat DD 53/1 die ersten 708 Basen sequenziert werden. Ein Alignment (MegAlign, DNASTar®) dieser Sequenzen ergab, dass diese untereinander 100 % identisch

waren. Ein blastN-Abgleich (EditSeq, DNASTar®) dieser 16S rDNA-Sequenzen mit in Genbank (NCBI) hinterlegten Sequenzen zeigte, dass die Isolate im Vergleich mit kultivierbaren *Treponema*-Spezies mit den jeweiligen Subspezies von *Treponema socranskii* die größte Übereinstimmung aufweisen. Die größte Übereinstimmung lag mit 98,3 % zu dem oralen Stamm *Treponema* sp. 6:H:D15A-4 (Acc.Nr.: AY005083) vor. Mit *Treponema socranskii* ssp. '04' (Acc.Nr: AF033308) betrug die Übereinstimmung 97,1 % und mit *Treponema socranskii* ssp. *buccale* (Acc.Nr: AF033305) lag sie bei 97,0 %.

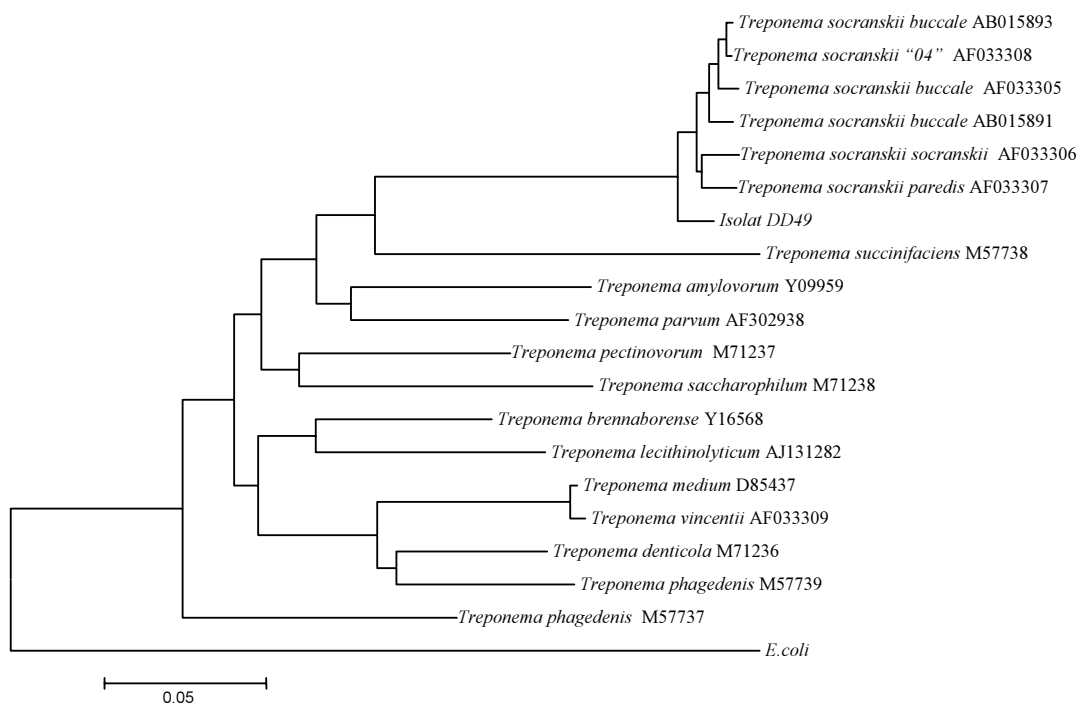


Abbildung 5: Dendrogramm zur Darstellung der phylogenetischen Verwandtschaft. Der phylogenetische Baum wurde nach der Neighbour-Joining Methode erstellt und nach JUKES und CANTOR korrigiert.

#### 4.2.4 Proteinchemische Charakterisierung mittels SDS-Page nach Lämmli

Die Proteinbandenmuster der Isolate sind wiederum untereinander identisch und unterscheiden sich aber geringfügig von den jeweiligen Proteinmustern von *Treponema socranskii socranskii*, *Treponema socranskii buccale* und *Treponema socranskii paretis*. Aufgetragen sind in Abb.7 Isolat DD 49/1, DD 52/7 und DD53/1. Im Bereich der 30 und 40 kDa-Region ist im Bandenmuster der jeweiligen Isolate eine stark hervortretende Hauptbande zu sehen, die bei den übrigen *Treponema socranskii*-Vertretern nicht zu sehen ist.

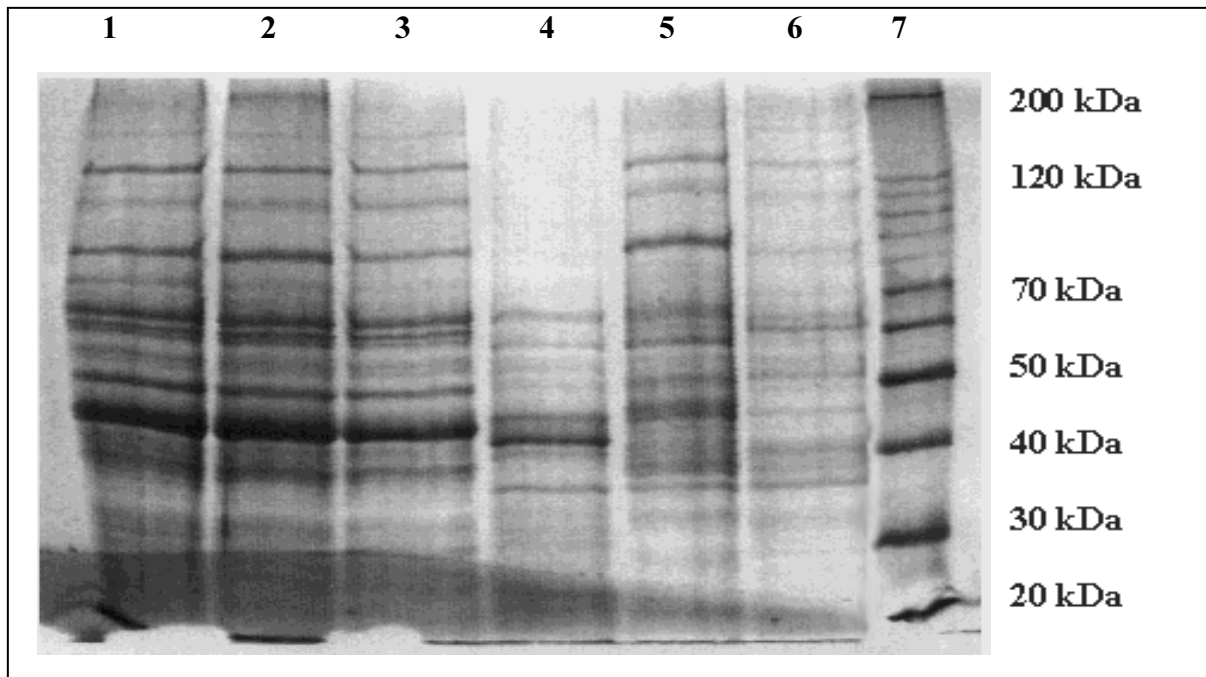


Abbildung 6: SDS-Page nach Lämmli

Isolat DD 49/1 (1), Isolat DD 52/7 (2), Isolat DD 53/1 (3), *Treponema socranskii socranskii*. (4), *Treponema socranskii buccale* (5), *Treponema socranskii paretis* (6), 10 kDa-Marker (7).

### 4.3 Auswahl einer geeigneten DNA-Extraktions-Methode

Um eine geeignete Methode für die DNA-Extraktion aus Pansen- und Kotproben zu ermitteln, wurden verschiedene DNA-Extraktionsmethoden ausgetestet.

Zunächst wurden bei Pansensaftproben folgende Extraktionsmethoden eingesetzt:

- High Pure PCR Template Preparation Kit - Boehringer Mannheim
- QIAamp Tissue Kit - Quiagen
- Master Pure Genomic DNA Purification Kit – Epicentre Technologies
- E.Z.N.A Bacterial DNA Kit – PEQLAB Biotechnologie GmbH
- NucleoSpin Tissue – Macherey & Nagel
- Invisorb Spin Stool DNA Kit – Invitex GmbH
- CTAB-Aufarbeitung
- Hitzelysis

Die gewonnene DNA wurde im Anschluss für eine Polymerase-Ketten-Reaktion eingesetzt, in welcher die Primer RTU8 und TPU1 Verwendung fanden, um ein ca. 1500 bp langes Fragment der 16S rDNA zu amplifizieren. Die mit Hilfe der oben angegebenen Methoden

gewonnene DNA wurde jeweils in den Verdünnungsstufen 1:1, 1:10 und 1:100 in der PCR-Reaktion eingesetzt. Die Ergebnisse der PCR-Reaktion wurden mit Hilfe einer Gelelektrophorese hinsichtlich der Intensität und des Vorkommens der korrekten Bande verifiziert. Die PCR-Ergebnisse zeigten, dass der NucleoSpin Tissue Kit und der Invisorb Spin Stool DNA Kit unter den ausgewählten Extraktionsmethoden die geeignetsten waren. Diese beiden Methoden wurden daher auch für die DNA-Extraktion aus Rinderkot überprüft. Zusätzlich wurde im Rahmen der DNA-Aufarbeitung aus Kotproben eine CTAB-Aufarbeitung und eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Die Ergebnisse der PCR zeigten, dass die Anwendung des NucleoSpin Tissue Kit und der Invisorb Spin Stool DNA Kit die geeignetsten Methoden waren.

## 4.4 Überprüfung der Nachweisempfindlichkeit

### 4.4.1 Zugabe definierter DNA-Mengen zu Kot- bzw. Pansensaftproben

Zu Kot- und Pansenproben wurden jeweils definierte DNA-Mengen zugesetzt und im Anschluss mit jeweils den beiden Extraktionskits, dem NucleoSpin Tissue Kit und dem Invisorb Spin Stool DNA Kit, aufgearbeitet. Eingesetzt wurde genomische DNA in folgenden Konzentrationen: 100 ng – 10 ng – 1ng – 100pg – 10 pg. Nach Aufarbeitung der genomischen DNA und Amplifikation eines 16S rRNA-Fragmentes wurden in darauffolgenden Dot blot-Hybridisierung beispielhaft die vier folgenden Sonden verwendet:

<i>Treponema</i> -Spezies	zugehörige Phylotypgruppe	verwendete Sonde
<i>T. vincentii</i>	TRE I	TRE I
<i>T. socranskii</i>	-----	TSOC
<i>T. brennaborensis</i>	-----	DDK 5/3
<i>T. lecithinolyticum</i>	TRE IV	TRE IV

Im Rahmen der Aufarbeitung mit dem *NucleoSpin Tissue Kit* erhielt man mit den Sonden TRE I, TRE IV und TSOC bis zu einer Zugabe von 100 ng positive Signale in der Hybridisierung. Mit der Sonde DD5/3 gab es ein positives Signal zusätzlich bei Zugabe von 10 ng spezifischer DNA. Bei der Verwendung des *Invisorb Spin Stool DNA Kit* ergaben sich positive Ergebnisse bei allen 4 Sonden nur bei Zugabe von 100 ng DNA (Tab.7).

Tabelle 7: eingesetzte DNA-Menge

<i>NucleoSpin Tissue Kit:</i>	TRE I	TRE IV	TSOC	DD 5/3
100 ng	+	+	+	+
10 ng	-	-	-	+
1 ng	-	-	-	-
100 pg	-	-	-	-
10 pg	-	-	-	-
<i>Invisorb Spin Stool DNA Kit</i>				
100 ng	+	+	+	+
10 ng	-	-	-	-
1 ng	-	-	-	-
100 pg	-	-	-	-
10 pg	-	-	-	-
1 pg	-	-	-	-

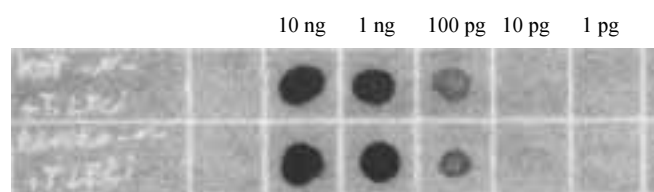
*Treponema denticola* als beispielhafter Vertreter hat eine Genomgröße von 3 Mbp (MACDOUGALL und SAINT-GIRONS, 1995). Bei einem Molekulargewicht eines Basenpaares von 660 g/mol entsprechen 100 ng genomische DNA einem Zelläquivalent von  $3,04 \times 10^7$  Zellen.

Für die genannten drei Sonden TRE I, TRE IV und TSOC in 250 mg Feces müssen daher mindestens  $3,04 \times 10^7$  Treponemen der zugehörigen Gruppe vorliegen, um ein positives Signal zu erhalten. Für die Sonde DD5/3 ist dabei eine etwas geringere Zellzahl von  $3,04 \times 10^6$  notwendig.

#### 4.4.2 Zugabe definierter DNA-Mengen zu einer Polymerase-Ketten Reaktion

Nach direkter Zugabe von spezifischer DNA von *Treponema lecithinolyticum* zu einer Polymerase-Kettenreaktion jeweils zusätzlich zu Kot- bzw. Pansensaft-DNA wurden die PCR-Produkte ebenfalls auf eine Nylonmembran getropft und mit den genannten Sonden hybridisiert. Die Verdünnungsstufen der genomischen DNA betrug 10 ng – 1 ng – 100 pg – 10 pg – 1 pg.

Abbildung 7: Dot-blot-Hybridisierung definierter DNA-Mengen von *T. lecithinolyticum* mit TRE IV.



In diesem Versuchsansatz ergaben sich positive Hybridisierungssignale bis zu einer Menge von 100 pg genomischer DNA pro Reaktionsansatz. Es wurden also pro PCR-Reaktion mindestens  $3,04 \times 10^4$  Zellen für ein positives Signal benötigt.

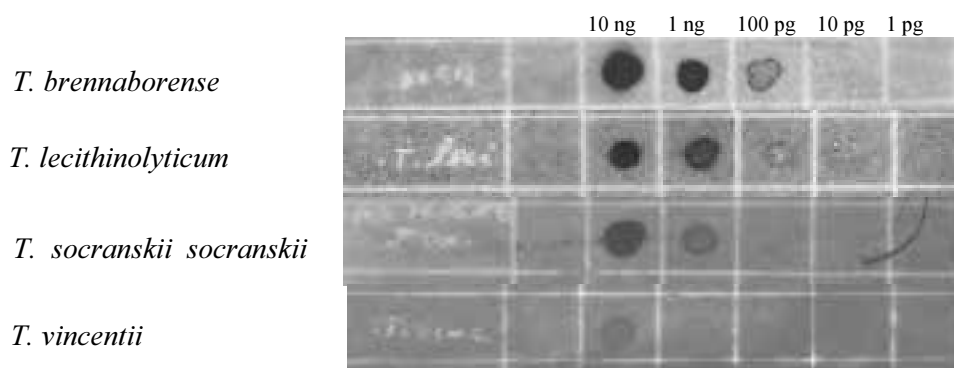
Dieses Ergebnis stützt auch die Ergebnisse aus den bereits erwähnten Hybridisierungsversuchen, in welchem 100 ng DNA zu Kot bzw. Pansensaft zugegeben wurde. Nach der Aufarbeitung der DNA wurde diese schließlich in 150 µl Volumen eluiert. Unter optimalen Bedingungen würde das bedeuten, dass eine Konzentration von 660 pg/µl spezifischer DNA von *Treponema lecithinolyticum* vorläge. Da natürlich bei Aufarbeitungen auch immer DNA verloren geht, dürfte die tatsächliche Konzentration an spezifischer DNA doch geringer sein und korreliert daher mit dem Ergebnis des zweiten Hybridisierungsversuches. Hier kam es zu positiven Hybridisierungsergebnissen bei Zugabe von mindestens 100 pg genomischer DNA von *Treponema lecithinolyticum*.

#### 4.4.3 Ermittlung der Detektionsgrenze der eingesetzten Digoxigenin-gelabelten Oligonukleotidsonden

Nach Aufreinigung amplifizierter 16S rDNA-Fragmente von *Treponema lecithinolyticum*, *Treponema brennaborensis*, *Treponema socranskii socranskii* und *Treponema vincentii* wurden Verdünnungsstufen dieser PCR-Produkte von 10 ng bis 100 fg auf eine Membran getropft und mit den genannten Sonden hybridisiert. Mit den Sonden DD 5/3 und TRE IV ergeben sich positive Hybridisierungssignale bis zu einer Verdünnungsstufe von 10 pg, während positive Signale bei den Sonden TSOC und TRE I bis zu einer Verdünnungsstufe von 100 pg vorhanden sind, wobei die Intensität der Sonde TRE I bei 100 pg jedoch relativ schwach ist.

Mit Hilfe einer PCR-Reaktion müssen also mindestens die genannten DNA-Mengen an spezifischer 16S rDNA amplifiziert werden, damit ein erfolgreicher Nachweis mit Hilfe dieser Oligonukleotidsonden erfolgen kann.

Abbildung 8: Dot blot-Ergebnisse der 16S rDNA-PCR-Produkte.





## 4.5 DNA-DNA-Hybridisierung mittels Dot blot

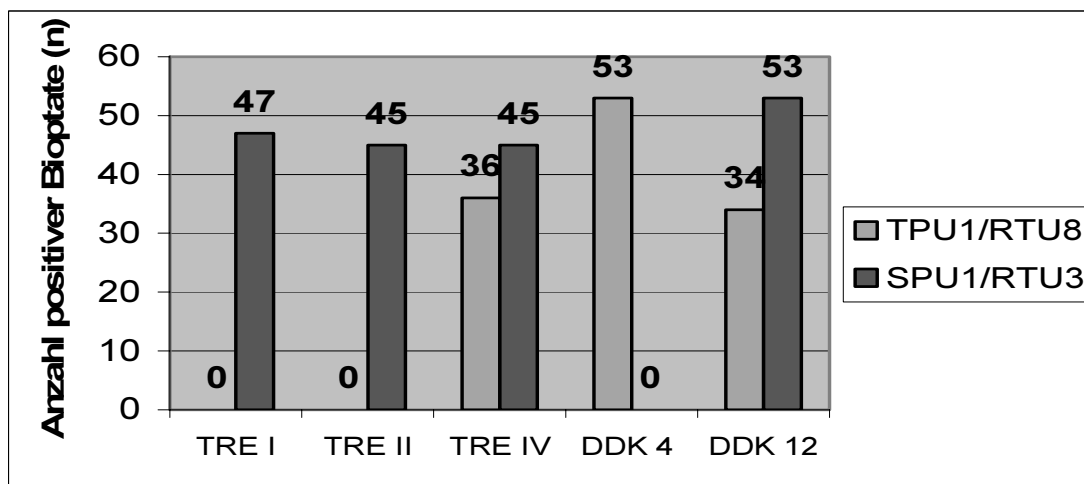
### 4.5.1 Dot blot-Hybridisierung gegen Bioplat-, Pansensaft- und Kotproben

Unter Verwendung der beiden Primerpaare SPU1/RTU3 und TPU1/RTU8 wurden von allen Kot-, Pansensaft- und Bioplatproben unterschiedliche Teilfragmente des 16S rRNA-Genes in einer Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert und auf eine Nylonmembran transferiert. Zur Detektion von *Treponema*-Phylotypen wurden die unter Tab. 4 aufgeführten Oligonukleotidsonden eingesetzt.

Bei den Kot- und Pansensaftproben konnten unter Verwendung keiner der beiden genannten Primerpaare Treponemen mit Hilfe dieser Sonden nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu stehen die Hybridisierungsergebnisse bei den Bioplaten. In den DD-Bioplatten konnten in absoluten Zahlen unter Verwendung des Oligonukleotidprimerpaar TPU1/RTU8 folgende Phylotypen bzw. -gruppen nachgewiesen werden: TRE IV, DDK4 und DDK 12.

Unter Verwendung des Primerpaares SPU1/RTU3 verlief zusätzlich der Nachweis für die Phylotypgruppen TRE I und TRE II positiv. Die absoluten Zahlen und Verteilungen sind in Abb. 8 unter Nennung der jeweiligen Oligonukleotidsonden dargestellt.

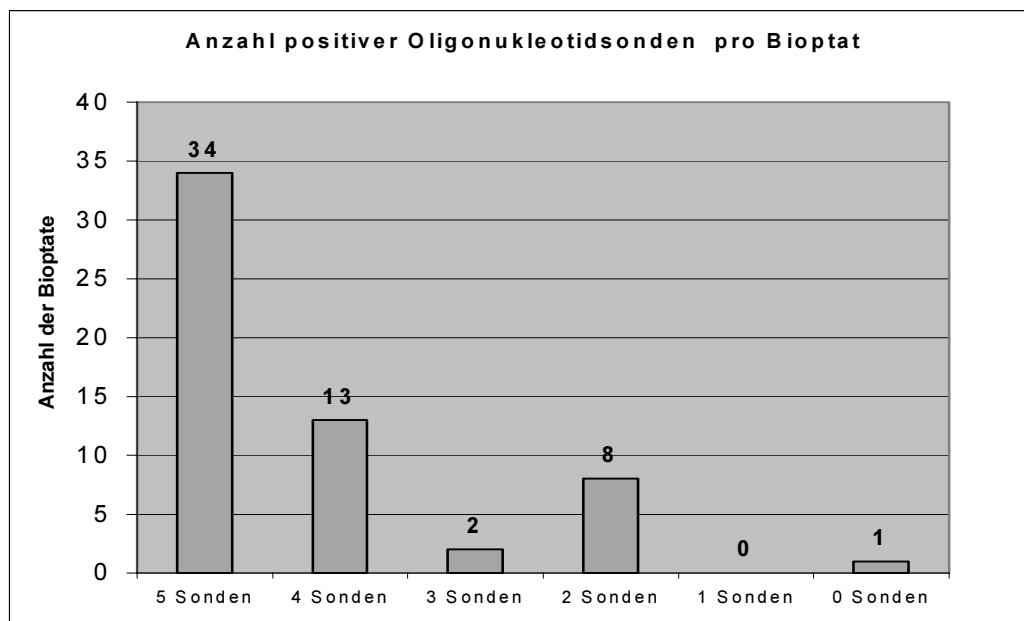
Abbildung 9: Dot blot-Ergebnisse in Abhängigkeit vom verwendeten Oligonukleotidprimerpaar.



Prozentual ausgedrückt bedeutet dies, dass die Phylotypgruppe TRE I in 81 % der Proben nachgewiesen werden konnte, die Phylotypgruppe TRE II in 77 %, die Phylotypgruppe TRE IV in 79 %, der Phylotyp DDK 4 in 96 % und der Phylotyp DDK 12 in 91 % der untersuchten Bioplatproben.

In Abb. 9 ist veranschaulicht, dass in den meisten Fällen mehrere Oligonukleotidsonden in demselben Bioplat positive Hybridisierungssignale ergaben.

Abbildung 10: Häufigkeit positiver Hybridisierungsergebnisse pro Bioplat.



Bei 1 Bioplatprobe blieb jede der eingesetzten Nachweissonden negativ. Bei den übrigen Proben ergaben dagegen immer mindestens 2 oder mehr der jeweiligen Phylotyp- bzw. Phylotypgruppensonden gleichzeitig in einer Probe positive Hybridisierungssignale.

#### 4.6 Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung

Von den 7 Bioplaten DD11, DD 14, DD 15, DD 16, DD 27, DD 31 und DD 34 wurden Gewebeschnitte für die Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierungen angefertigt und es wurden die oben genannten Oligonukleotidsonden verwendet. Bei den Sonden TRE I, IV und DDK 4 ergaben die Hybridisierungen deutlich positive Signale und es konnten Treponemen neben den Fluoreszenzsignalen auch anhand ihrer typischen Morphologie in den Gewebeschichten erkannt werden. In den nachfolgenden Abbildungen sind Gewebeschnitte dargestellt, die mit den entsprechenden *Treponema*-spezifischen Oligonukleotidsonden hybridisiert worden sind. Die *Treponema*-spezifischen Oligonukleotidsonden waren mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 gelabelt und ergaben gelbliche Fluoreszenzen, während die universelle bakterielle Oligonukleotidsonde EUB 338 mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat gelabelt war und grüne Fluoreszenzen ergab.

Abbildung 11: Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung mit TRE I und EUB 338, DD 14, 40-fache Vergrößerung.

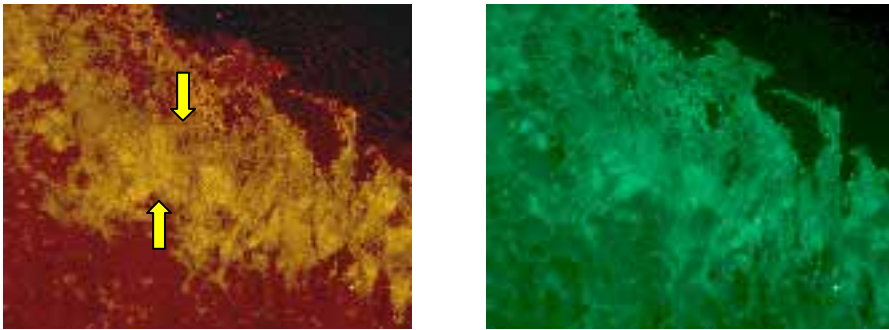


Abbildung 12: Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung mit TRE II und EUB 338, DD14, 40-fache Vergrößerung.

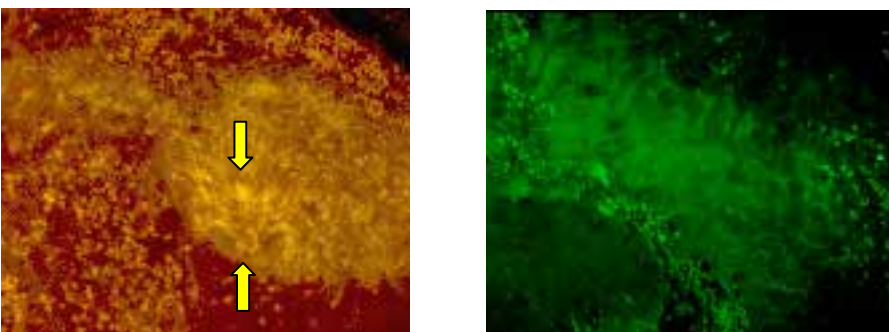


Abbildung 13: Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung mit TRE IV und EUB 338, DD14, 20-fache Vergrößerung.

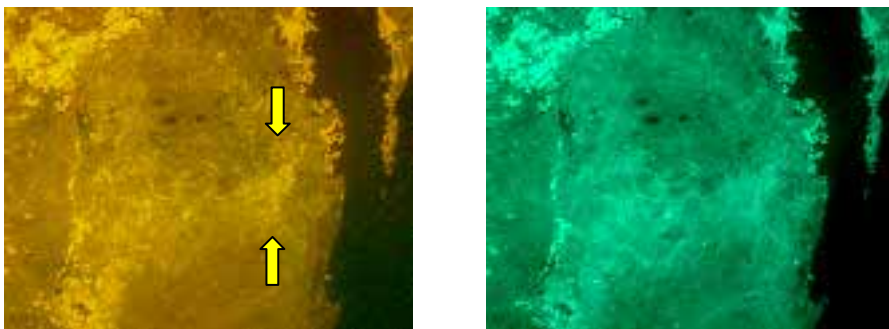
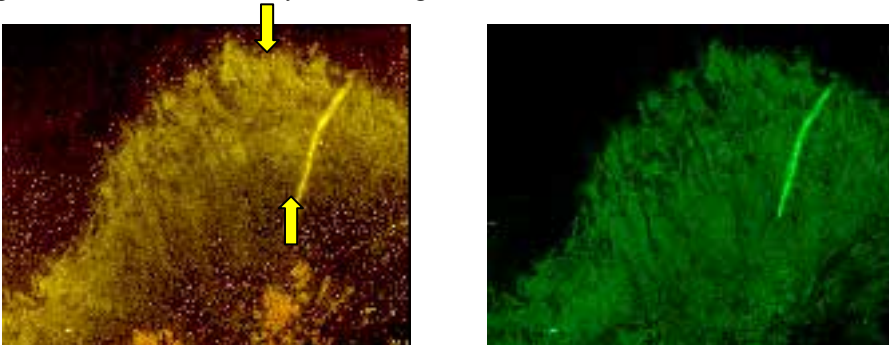


Abbildung 14: Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung mit DDK 4 und EUB 338, DD31, 40-fache Vergrößerung



Mit Hilfe der Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierungen konnten sehr deutlich Treponemen in den Gewebeschnitten nachgewiesen werden. So befanden sich Treponemen nicht nur oberflächlich, sondern gerade auch in tieferen Schichten der Epidermis.

Auch wird anhand der Gewebedarstellung deutlich, dass Treponemen in großer Anzahl in den betreffenden Gewebeabschnitten vorliegen. Bei der Verwendung der universellen Oligonukleotidsonde EUB 338 werden alle vorhandenen Bakterien mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert. So sind in der Darstellung mit der EUB-Sonde neben anderen Bakterien in großer Anzahl spiralförmige Bakterien sichtbar, die sich bei Verwendung spezifischer Sonden als Treponemen darstellen.

Auch kann anhand der Gewebebilder gezeigt werden, dass vor allem die Phylotypgruppen TRE I und DDK 4 sehr zahlreich sind während die Phylotypgruppe TRE II und TRE IV doch in wesentlich geringerer Anzahl vorliegt. Dabei konnten bei den verwendeten Gewebeschnitten die Phylotypgruppen TRE II und TRE IV zum Teil erst ab der 40-fachen Vergrößerungen deutlich aufgezeigt werden.

Bei Verwendung der Oligonukleotidsonde TRE II kam es bei der Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung zu gewissen Kreuzreaktionen mit *Treponema lecithinolyticum*. Diese Spezies gehört phylogenetisch zur Gruppe TRE IV. Diese Spezies diente neben *Treponema maltophilum* ebenfalls als Kontrolle. Gewisse Einschränkungen ergaben sich insofern, als dass sich *Treponema lecithinolyticum* bei Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierungen mit der Oligonukleotidsonde TRE II ebenfalls in gewissem Maß morphologisch darstellte. Um diese Kreuzreaktion zu minimieren, wurde statt der üblich verwendeten 20% Formamid die Konzentration bei Verwendung der Oligonukleotidsonde TRE II auf 25% erhöht, um die Stringenz der Hybridisierungsreaktion zu erhöhen. So war es möglich, Vertreter der Phylotypgruppe TRE II in den Gewebeschnitten von übrigen *Treponema*-Gruppen zu unterscheiden.