
Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
(Prof. Dr.med. U. Groß)
im Zentrum Hygiene und Humangenetik
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Epidemiologie Virulenz-assoziiierter Markergene
in *Campylobacter jejuni*-Subpopulationen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Carolin Ohk

aus

Salzwedel

Göttingen 2014

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. U. Groß

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. Schwörer

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2014

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Gattung <i>Campylobacter</i>	1
1.2	<i>Campylobacteriose des Menschen</i>	2
1.2.1	Infektionsquellen und Übertragungswege	2
1.2.2	Saisonalität der <i>Campylobacteriose</i>	3
1.3	Klinik der <i>Campylobacteriose</i> und assoziierte Erkrankungen	4
1.3.1	Klinisches Erscheinungsbild und Verlauf	4
1.3.2	Guillain-Barré-Syndrom	5
1.3.3	Therapie	5
1.4	Pathogenese der <i>C. jejuni</i> -Infektion	6
1.4.1	Virulenz-assoziierte Faktoren	7
1.4.1.1	Gencluster zur Flagellin-O-Glykolisierung	10
1.4.1.2	Lipooligosaccharid-Sialyltransferase-Marker	11
1.4.1.3	<i>Campylobacter</i> -Invasions-Antigen B	11
1.4.1.4	Zytolethales distendierendes Toxin (<i>Cytolethal Distending Toxin</i>)	11
1.4.1.5	Phospholipase A der äußeren Membran	12
1.4.1.6	Eisen-Akquirierung	12
1.4.1.7	Fucose-Verwertung	13
1.5	Zusammenhang verschiedener <i>C. jejuni</i> -Gruppen	14
1.6	Zielsetzung	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Untersuchungsgut und Materialien	18
2.1.1	Bakterienstämme	18
2.1.2	Charakterisierung der <i>C. jejuni</i> -Untergruppen	18
2.1.3	Nukleinsäuren-Längenstandards	22
2.1.4	Verwendete Enzyme	22
2.1.5	Puffer und Nährmedien	22
2.1.6	Weitere Chemikalien, Reagenzien, Verbrauchsmittel und Geräte	23
2.1.7	Software /Programme	25
2.2	Experimentelle Methoden	25
2.2.1	Anzucht und Lagerung von <i>Campylobacter jejuni</i>	26
2.2.2	Isolierung von Desoxyribonukleinsäure (DNS)	26
2.2.3	Konzentrationsbestimmung von DNS	27
2.2.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	27
2.2.5	Nachweis der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese	31
2.2.6	<i>Multilocus-Sequenz-Typing</i> (MLST)	32

3	Ergebnisse	34
3.1	<i>Überblick.....</i>	34
3.2	<i>Definition von Gruppen.....</i>	35
3.3	<i>Verteilung der Marker innerhalb der definierten Gruppen</i>	39
3.3.1	<i>Campylobacter-Invasions-Antigen und Zytolethales distendierendes Toxin... 40</i>	40
3.3.2	<i>Gencluster zur Flagellin-O-Glykolisierung</i>	40
3.3.3	<i>L-Fucose-Permease.....</i>	41
3.3.4	<i>Enterochelin-Aufnahmeprotein und Phospholipase A der äußeren Membran 42</i>	42
3.3.5	<i>Eisenaufnahmesysteme.....</i>	43
3.3.6	<i>Marker für die Lipooligosaccharid-Sialyltransferase</i>	44
3.4.	<i>Verteilung der Markergene nach Isolat-Ursprung</i>	48
3.5	<i>Verteilung der Marker innerhalb der Spezies</i>	49
3.6	<i>Hospitalisierung und blutiger Stuhl</i>	52
4	Diskussion	53
4.1	<i>Gencluster zur Flagellin-O-Glykolisierung</i>	53
4.2	<i>Fucose-Verstoffwechslung.....</i>	54
4.3	<i>Eisenverwertung.....</i>	56
4.4	<i>Zusammensetzung des Lipooligosaccharids</i>	57
4.5	<i>Campylobacter-Invasions-Antigen B</i>	58
4.6	<i>Zytolethales Distendierendes Toxin (CDT)</i>	59
4.7	<i>Phospholipase A der äußeren Membran.....</i>	59
4.8	<i>Schlussfolgerungen bezüglich der Marker-Verteilung.....</i>	59
4.9	<i>Saisonalität.....</i>	63
5	Zusammenfassung.....	64
6	Tabellenverzeichnis.....	66
7	Abbildungsverzeichnis	67
8	Anhang	68
8.1	<i>Verwendete C. jejuni –Stämme</i>	68
8.2	<i>Bisherige Veröffentlichungen der Ergebnisse.....</i>	77
9	Literaturverzeichnis.....	78

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
<i>ansB</i>	periplasmatische Asparaginase mit akzessorischem <i>sec</i> -Signal (Gen)
BFR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BHI-Medium	<i>Brain Heart Infusion</i> -Medium (Herz-Hirn-Bouillon)
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C.	<i>Campylobacter</i>
°C	Grad Celcius
CC	klonaler Komplex (eng. clonal complex)
CadF	<i>Campylobacter adhesion to fibronectin</i>
CDT	<i>cytolethal distending toxin</i>
<i>ceuE</i>	<i>campylobacter enterochelin uptake binding protein E</i> (Gen)
Cia	<i>Campylobacter</i> -Invasions-Antigen
konz.	konzentriert
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
<i>cstII/cstIII</i>	Gen für die Lipooligosaccharid- Sialyltransferase II bzw. III
<i>cj...</i>	Gen-Nummerierung basierend auf dem Genom des <i>Campylobacter jejuni</i> -Stamms NCTC 11168
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNA	Deoxyribonucleic Acid
<i>dmsA</i>	Dimethylsulfoxid-Oxidoreduktase-Untereinheit A (Gen)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
EP	<i>extracellular polysaccharide</i>
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (Glykolyse)
<i>fucP</i>	L-Fucose-Permease (Gen)
GBS	Guillain-Barré-Syndrom
<i>ggT</i>	γ -Glutamyl-Transpeptidase (Gen)
H ₂ O	Wasser
i.d.R.	in der Regel
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilodalton

l	Liter
LLC	LOS Locus Klasse
LOS	Lipooligosaccharid
μ	<i>mikro</i> (10 ⁶)
m	<i>milli</i> (10 ³); Meter
M	Molar
Mb	Mega-Basenpaare
MFS	Miller-Fischer-Syndrom
min	Minute
MLST	<i>multilocus sequence typing</i>
MM	Mastermix
N ₂	Stickstoff
O ₂	Sauerstoff
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
<i>pldA</i>	Phospholipase A (Gen)
RKI	Robert Koch-Institut
ssp.	Subspezies
ST	Sequenztyp
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>tlp7_{m+c}</i>	<i>transducer-like protein</i> (m-Membran, c-cytoplasmatisch)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UPGMA	<i>unweighted – pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
UV	ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
VBNC	<i>viable but non-culturable</i>
vgl.	vergleiche
(v/v)	% (v/v) entspricht Volumenprozent: Anteilsvolumen in Gesamtvolumen
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Die Gattung *Campylobacter*

Weltweit stellen *Campylobacter*-Infektionen die häufigste Ursache für bakterielle Magen-Darm-Erkrankungen dar und sind somit häufiger als Infektionen mit *Salmonella enterica* oder enteropathogenen *Escheria coli* (ALLOS 2001). Zur Gattung *Campylobacter* gehören 18 verschiedene Spezies (HUMPHREY et al. 2007). Mehr als 95 % der *Campylobacter*-Infektionen werden durch *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* verursacht und gehören damit zu den wichtigsten humanpathogenen *Campylobacter*-Arten (BUTZLER 2004).

Campylobacter jejuni sind gebogene, schlanke, s-förmig oder spiralgewundene gram-negative Stäbchenbakterien. Die Stäbchen sind 0,5-5 µm lang und 0,2-0,5 µm dick. Zudem sind die Bakterien monotrich oder amphotrich begeißelt, was zur typischen korkenzieherartigen Bewegung führt (VANDAMME und DE LEY 1991).

Das Bakterium *C. jejuni* gehört mit einem Wachstumsoptimum von 42 °C zu den thermophilen Arten. Unterhalb von 30 °C findet kein Wachstum mehr statt. Für ein optimales Wachstum benötigt *C. jejuni* eine mikroaero- und capnophile Atmosphäre mit 5 % Sauerstoff und 3-5 % Kohlenstoffdioxid (PARK 2002).

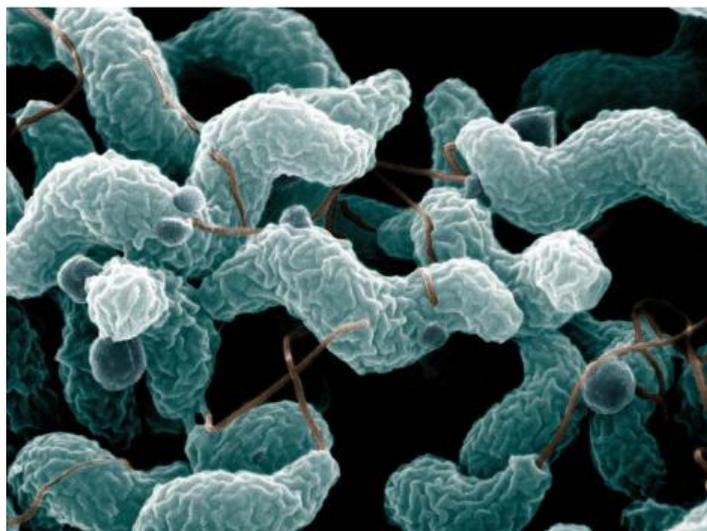


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Darstellung von *C. jejuni*
(Quelle: <http://www.wikipedia.de/Campylobacter/jejuni>; 03.01.09)

1.2 Campylobacteriose des Menschen

Infektionen durch Bakterien der Gattung *Campylobacter ssp.* sind weltweit verbreitet. Mit Inzidenzraten von mehr als 40/100.000 Einwohner/Jahr wird *C. jejuni* als häufigster bakterieller Durchfallerreger in Europa angegeben (EFSA 2010).

Wie in vielen anderen Ländern zeigt sich auch in Deutschland, dass *Campylobacter ssp.* und *S. enterica* die beiden häufigsten bakteriellen Enteritiserreger sind. Die Zahl der gemeldeten *Campylobacter*-Infektionen lag 2005 laut statistischen Angaben des RKI mit 62.129 gemeldeten Fällen erstmals über der Zahl der Salmonellosen von 52.257 (ANONYMUS 2006). Von den 2011 in Deutschland gemeldeten *Campylobacter*-Erkrankungen mit Angaben zur Spezies entfielen 69 % auf *C. jejuni*, 6 % auf *C. coli* und 24 % auf *C. coli/C. jejuni* (nicht differenziert). Die übrigen Spezies z.B. *C. lari*, *C. upsaliensis* bzw. *C. fetus* konnten in weniger als 1 % der Campylobacteriose-Fälle nachgewiesen werden (RKI 2011). Im Jahr 2012 wurden dem Robert Koch-Institut bis zur 49. Kalenderwoche 60.390 durch *Campylobacter*-Arten verursachte Enteriden gemeldet (ANONYMUS 2012).

Etwa 17 % der mit Lebensmittel-Infektionen assoziierten Krankenhausaufenthalte können auf *Campylobacter ssp.* zurückgeführt werden (MEAD *et al.* 1999).

Generell sind alle Altersgruppen von *Campylobacter*-Infektionen betroffen. Es zeigen sich jedoch 2 Inzidenzgifel, zum einen im Alter zwischen null und vier Jahren und zum anderen zwischen 15 und 44 Jahren (BUTZLER 2004).

1.2.1 Infektionsquellen und Übertragungswege

Die durch *Campylobacter* verursachte Infektion, die so genannte Campylobacteriose, ist wie die Salmonellose eine im Wesentlichen durch Nahrungsmittel übertragene Erkrankung.

Hauptinfektionsquelle für *Campylobacter*-Infektionen sind unzureichend erhitztes Geflügelfleisch und kreuzkontaminierte Nahrungsmittel sowie die daraus hergestellten Produkte (DEMING *et al.* 1987). Gerade die im Geflügelinterstitium vorherrschenden 42 °C bilden ein natürliches Reservoir und fördern die Vermehrung von *C. jejuni* (ALTEKRUSE *et al.* 1999). Auch Säugetiere tragen *C. jejuni* als Bestandteil der kommensalen Darmflora natürlicherweise in sich und stellen somit ein weiteres Erregerreservoir dar (BUTZLER 2004).

Der Erreger kann u.a. im Darmtrakt von Nutztieren wie Schweinen, Rindern oder Schafen vorkommen. Weitere Infektionsquellen sind der Verzehr von rohem Rinder- und Schweinehackfleisch sowie der Konsum von nicht-pasteurisierter Milch und kontaminiertem Trinkwasser. Darüber hinaus können nach dem Baden in kontaminierten Oberflächengewässern Infektionen auftreten (FRIEDMAN *et al.* 2000). Als Reservoir für *C. jejuni* wurden aber auch junge Hunde und Katzen identifiziert, vorrangig sind diese aber Überträger der thermophilen Art *Campylobacter upsaliensis* (ACKE *et al.* 2009).

Erstmalig wurde Anfang des 20. Jahrhunderts von *Campylobacter*-Infektionen bei Nutztieren berichtet. Um *Campylobacter*-Infektionen vorzubeugen, sollten lebensfähige *C. jejuni* durch gründliches Erhitzen abgetötet werden, insbesondere vor dem Verzehr von Geflügelfleisch. Daneben müssen Kreuzkontaminationen bei der Lebensmittelzubereitung vermieden werden, beispielsweise durch den Einsatz unterschiedlicher Schneidbretter zur Fleisch- und Rohkostzubereitung. Immungeschwächte Personen, Schwangere und ältere Personen sollten auf den Verzehr von Rohmilch verzichten.

Eine direkte Übertragung durch Schmierinfektion von Mensch zu Mensch ist möglich, hat aber nur eine geringe epidemiologische Bedeutung und beschränkt sich eher auf Kleinkinder und immunsupprimierte Personen (FRIEDMAN *et al.* 2000 , ALLOS 2001).

1.2.2 Saisonalität der Campylobacteriose

Ein typisches Charakteristikum der Epidemiologie der Campylobacteriose ist die ausgeprägte Saisonalität (HUMPHREY *et al.* 2007). LOUIS *et al.* demonstrierten 2005 - anhand statistischer Auswertungen von *Campylobacter*-Infektionen in England und Wales im Zeitraum von 1990-1999 im Zusammenhang mit den Wetterbedingungen- ein jährlich auftretendes saisonales Muster von *Campylobacter*-Infektionen mit Häufung in den Sommermonaten. Die deutlichsten saisonalen Muster wurden von LOUIS *et al.* für Kinder unter 5 Jahren erfasst, wie auch schon von BUTZLER beschrieben (LOUIS *et al.* 2005, BUTZLER 2004).

Auch die statistischen Erhebungen des RKI von 2011 zeigen einen saisonalen Verlauf mit den höchsten Fallzahlen in den Monaten Juni bis September (RKI 2011).

Das gehäufte Auftreten von *Campylobacter*-Infektionen in den Sommermonaten wird begünstigt durch eine höhere Besiedlung von Masthähnchen und anderen Nutztieren mit *C. jejuni* und damit erheblicheren Keimbelastungen von tierischen Lebensmitteln.

In den Sommermonaten herrscht dazu ein verändertes Freizeitverhalten (Grillen und Picknicken) vor. Temperaturbedingt verändern sich die Übertragungswege, zum Beispiel durch Wasseraktivitäten, dabei kann die orale Aufnahme von Oberflächenwasser zur Infektion führen (NICHOLS 2005, KONKEL *et al.* 2001).

1.3 Klinik der Campylobacteriose und assoziierte Erkrankungen

1.3.1 Klinisches Erscheinungsbild und Verlauf

Das klinische Spektrum der Campylobacteriose ist vielgestaltig und reicht vom asymptomatischen Verlauf bis zur schweren peripheren Neuropathie (BUTZLER 2004). Bereits eine geringe Infektionsdosis von ca. 500 Bakterien ist ausreichend, um eine Erkrankung auszulösen (BLACK *et al.* 1988).

Typischerweise äußern sich die meisten *Campylobacter*-Infektionen, nach einer Inkubationszeit von ein bis drei Tagen und einer unspezifischen Prodromalphase, in einer akuten unkomplizierten Enterokolitis mit wässrigen, später blutigen Diarrhöen. Weiterhin können krampfartige abdominale Schmerzen, Fieber, Übelkeit und Erbrechen im Rahmen der Erkrankung auftreten (BUTZLER 2004, WASSENAAR *et al.* 1999). Eine Unterscheidung zu anderen gastrointestinalen Infektionen beispielsweise durch *S. enterica* ist nur über eine Kultivierung der Erreger aus Stuhlproben möglich. Normalerweise findet sich *Campylobacter* bei gesunden Personen nur äußerst selten im Stuhl.

Abhängig von der Population sind bis zu 50 % der infizierten Personen bei Ausbruch asymptomatisch (ALLOS 2001). In Einzelfällen treten extraintestinale Manifestationen wie zum Beispiel das Guillain-Barré-Syndrom oder eine reaktive Arthritis auf (BUTZLER 2004).

1.3.2 Guillain-Barré-Syndrom

Eine äußerst schwerwiegende postinfektiöse Folgeerkrankung der Campylobacteriose ist das 1916 erstmals von Georges Guillain, Jean-Alexandre Barré und André Strohl als aufsteigende Lähmung beschriebene Guillain-Barré-Syndrom (GUILLAIN *et al.* 1916).

Es handelt sich hierbei um eine periphere, meist reversible Neuropathie, die etwa ein bis drei Wochen nach einer *Campylobacter*-Infektion auftreten kann. Dabei werden Antikörper insbesondere gegen die Sialinsäuregruppen des *Campylobacter*-Lipooligosaccharides (LOS) gebildet, die mit den Zuckerresten der Ganglioside peripherer Nerven kreuzreagieren (molekulare Mimikry), was nachfolgend eine Schädigung des Axons auslösen kann (GODSCHALK *et al.* 2004, YUKI *et al.* 2004). Die Möglichkeit ein GBS zu entwickeln ist dabei unabhängig vom Serotyp des Infektionsstammes (REES *et al.* 1995, ENDTZ *et al.* 2000).

Klinisch kommt es als Folge der Immunreaktion zur Zerstörung der Myelinscheide der peripheren Nerven mit Lähmungen der Arme und Beine (seltener der Atemmuskulatur) bis hin zu möglichen Hirnnervenschädigungen. Postinfektiöse Verläufe als Miller–Fisher-Syndrom oder Bickerstaff-Enzephalitis sind seltener (GODSCHALK *et al.* 2007).

Betrifft die Neuropathie nur das Gesicht mit Lähmung der Augenmuskeln, Ataxie und Areflexie, so spricht man vom Miller-Fischer-Syndrom, einer Variante des GBS. Die Erkrankung geht mit der Bildung von Autoantikörpern einher, die gegen das Gangliosid GQ1b gerichtet sind (CHIBA *et al.* 1993). Bei Patienten mit einer Bickerstaff-Enzephalitis sind zusätzlich zur Ophthalmoplegie und Ataxie noch Symptome wie Schläfrigkeit, Koma oder Hyperreflexie diagnostizierbar (ODAKA *et al.* 2003).

Zwar geht eine *Campylobacter*-Infektion mit einem erhöhten Risiko einher, ein Guillain-Barré-Syndrom zu entwickeln, dennoch entsteht nur bei jeder 1000. Campylobacteriose ein GBS als Spätfolge (SCHMIDT-OTT *et al.* 2006, HUMPHREY *et al.* 2007). Bei 32-45 % der Patienten konnte *C. jejuni* als Auslöser für GBS identifiziert werden (JACOBS *et al.* 1996, HAO *et al.* 1998).

1.3.3 Therapie

Campylobacter-Infektionen sind vorwiegend selbstlimitierend. Therapeutisch sind daher symptomatische Maßnahmen wie die Substitution von Flüssigkeit und Elektrolyten ausreichend. Eine antibiotische Behandlung ist im Allgemeinen nicht indiziert. Bei schweren

Verläufen mit hohem Fieber, blutigem Stuhl und anhaltendem Krankheitsverlauf sowie bei Rückfällen der Erkrankung sollte eine antibiotische Therapie in Erwägung gezogen werden. Als Risikopatienten gelten auch immungeschwächte Patienten wie HIV-Infizierte. Aber auch Schwangere gehören zur Risikogruppe. Antibiotika der Wahl sind dann Makrolide wie Erythromycin und Gyrasehemmer wie Ciprofloxacin (ALLOS 2001). Ein aufkommendes Problem sind Antibiotikaresistenzen bei *C. jejuni*. In Deutschland sind bereits mehr als 10 % der *C. jejuni*-Isolate resistent gegen Erythromycin. Noch gravierender ist die Resistenzlage bei dem Fluorchinolon Ciprofloxacin. Gegen dieses Antibiotikum sind bereits circa 30 % aller *Campylobacter*-Isolate resistent (TIETZE 2008).

1.4 Pathogenese der *C. jejuni*-Infektion

Von grundlegender Bedeutung für die Beurteilung einer Gesundheitsgefährdung durch *Campylobacter jejuni* ist die Kenntnis von Pathogenitäts- und Virulenzmerkmalen.

Nach der oralen Aufnahme von *C. jejuni* gelangen die Bakterien zunächst in den unteren Darmtrakt (Jejunum, Ileum und Kolon). Das kann zur asymptomatischen Kolonisierung oder Durchfallssymptomen führen (JANSSEN *et al.* 2008).

Initialer Schritt zur Kolonisierung ist die Überwindung der humanen Intestinalflora. Der menschliche Verdauungstrakt beherbergt eine Vielzahl kommensaler Bakterien, Archaeen und Eukaryoten, die zusammenfassend als Darmflora bezeichnet werden. Dieses komplexe bakterielle Ökosystem etabliert sich innerhalb der ersten Lebensjahre und bietet einen physiologischen Widerstand gegen pathogene Erreger. Im Zustand des mikrobiellen Gleichgewichts besteht die Intestinalflora zu über 90 % aus obligaten Anaerobiern. Vorherrschend sind Mitglieder der Gattungen *Bacteroides spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Eubacterium spp.*, *Fusobacterium spp.* sowie der Ordnungen Clostridiales und Lactobacillales. Im gesunden Zustand machen *Escherichia coli* und andere naheverwandte Enterobakterienarten nur einen geringen Teil der Flora aus (GUARNER und MALAGELADA 2003, LEY *et al.* 2008).

Physiologische Funktion der kommensalen Darmflora ist die Kolonisationsresistenz, die eine Besiedlung des Darms durch pathogene Bakterien verhindert (STECHEER und HARDT 2008). Genetische Prädisposition, Umweltfaktoren, fettreiche Ernährung oder antibiotische Behandlungen (PENDERS *et al.* 2006, LOZUPONE *et al.* 2012) können die Barrierefunktion

der Darmmukosa stören, so dass eine überschießende Entzündungsreaktion folgt und eine Kolonisierung mit *C. jejuni* erleichtert wird (BERESWILL *et al.* 2011). Die vorherrschenden Bedingungen im menschlichen Verdauungssystem stimulieren die Synthese von Virulenz-assoziierten Faktoren, die an der Entstehung einer Campylobacteriose beteiligt sind (MALIK-KALE *et al.* 2008, Konkel *et al.* 2001).

Die pathogenen Mechanismen der durch *C. jejuni* hervorgerufenen Vielfalt an klinischen Präsentationen sind trotz der enormen Bedeutung als Lebensmittel-assoziiertes Erreger noch wenig verstanden. Man geht davon aus, dass verschiedene Virulenz-assoziierte Faktoren zusammenwirken. Diese können aufgrund der hohen genetischen Variabilität der Isolate unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Zu den Pathogenitätsmerkmalen gehören die chemotaktisch gesteuerte Motilität, die Fähigkeit von *C. jejuni* zur Adhäsion und Invasion und die Produktion von Toxinen. Weitere beeinflussende Größen sind die Widerstandsfähigkeit gegenüber externen Stressoren, der Erwerb und die Verwertung von extrazellulärem Eisen sowie die Variabilität der Oberflächenantigene (WASSENAAR und BLASER 1999, KONKEL *et al.* 2001).

1.4.1 Virulenz-assoziierte Faktoren

Ungewöhnlich für Lebensmittel-assoziierte Erreger hat *C. jejuni* nur eingeschränkte Möglichkeiten, in der Umwelt zu überdauern. Dieses Phänomen findet seine Erklärung in der unzureichenden Aerotoleranz und einem sehr eng begrenztem Wachstumsbereich von 32 °C bis 42 °C (PARK 2002). Das sequenzierte Genom des *C. jejuni*-Isolates NCTC 11186 konnte zeigen, dass *C. jejuni* über keine Stationärphase-Regulatoren zur Erhöhung der Stressresistenz bei erschwerten Umwelteinflüssen verfügt (PARKHILL *et al.* 2000). Allerdings reagiert *C. jejuni* auf thermischen Stress und sinkende pH-Werte im umgebenden Medium durch Übergang in den sogenannten „viable but non-culturable“ (VBNC)-Zustand (ROLLINS und COLWILL 1986). Unter derartigen Stressbedingungen werden verstärkt Hitzeschockproteine gebildet, womit das Überleben des Erregers gesichert werden soll (DASTI *et al.* 2010).

Eine weitere erforderliche Voraussetzung zur Invasion der Darmschleimhaut schafft die Motilität und Chemotaxis von *C. jejuni*. Wie bereits unter Punkt 1.1 beschrieben, besitzen die Bakterien ein oder zwei polare Flagellen. Diese Geißeln sind aus *O*-glykosyliertem Flagellin

aufgebaut und besitzen eine wichtige Bedeutung in der Kolonisation des Interstitiums und verleihen *C. jejuni* eine hohe Motilität. *C. jejuni*-Mutanten mit einem inaktivierten Flagellum besitzen nur eine reduzierte Adhäsions- und Invasionsfähigkeit (WASSENAAR und BLASER 1999). Neben dem Antrieb von *C. jejuni* ermöglicht das Flagellum die Autoagglutination und Biofilmbildung, bedingt durch eine Schicht von Lipooligosacchariden (GUERRY 2007). Die Sequenzierung von NCTC 11168 führte zur Erkenntnis, dass das Flagellum aus über 50 verschiedenen Proteinen zusammengesetzt ist (PARKHILL *et al.* 2000). Die Flagellenproteine sind umfangreich glykolisiert und für den funktionellen Aufbau essentiell. Die Gencluster zur Glykolisierung der Flagellenproteine sind unter den verschiedenen Stämmen hoch variabel (GUERRY 2007).

C. jejuni verfügt, ähnlich wie *Yersinien* und *Salmonellen*, über ein flagellares Typ-III-homologes Sekretionssystem, welches die Virulenz vieler gramnegativer Erreger mitbestimmt. Über den flagellaren Typ-III-homologen Sekretionsapparat werden im Rahmen des Zell- und Gewebsinvasionsprozesses z.B. sogenannte Cia (*Campylobacter-Invasions-Antigene*) in die Wirtszelle injiziert (DASTI *et al.* 2010). Durch das Flagellen-Segment werden die Cia Kontakt- oder Stimulus-abhängig sezerniert und unterstützen die Wirtsinvasion einiger *C. jejuni*-Stämme (KONKEL *et al.* 2001).

Die Adhäsion von *C. jejuni* an die Oberfläche der Wirtsepithelzellen wird u.a. durch den Fibronektin-bindenden Faktor CadF (*Campylobacter adhesion to fibronectin, outer membrane fibronectin-binding protein, cj1478c*) vermittelt. Fibronektin wird von vielen Bakterien als Brückenmolekül zur initialen Anheftung an die Zielzellen genutzt. Das *cadF*-Gen ist ein ubiquitär bei allen *C. jejuni*-Stämmen vorkommendes 37 kDa großes Membranprotein (KONKEL *et al.* 1997).

Die Invasion und Schädigung des Darmepithels (zytopathischer Effekt) kann ferner durch das von *Campylobacter* produzierte Toxin CDT (*cytolethal distending toxin*) hervorgerufen werden, dessen Hauptfunktion jedoch auch in der Wirtszelladhäsion liegt. CDT wurde bisher als einziges „klassisches“ Toxin im *C. jejuni*-Genom identifiziert. Enterotoxine, wie sie sich bei anderen Enteritisserregern, wie z.B. bei *Vibrio cholerae* oder Shigellen, nachweisen lassen, fehlen (WASSENAAR 1997).

Weiterhin wird die Invasivität von *C. jejuni* durch die Zusammensetzung des Lipooligosaccharids (LOS) beeinflusst. Wie bei vielen anderen Krankheitserregern auch, entsteht durch die Lipooligosaccharide an der Zelloberfläche eine Antigenvariabilität innerhalb der Spezies. Dies spielt eine bedeutsame Rolle in der Interaktion zwischen

Bakterium und Wirt (PARKER *et al.* 2008). Während der Kolonisierung des Darms dienen die Lipooligosaccharide des Bakteriums als Adhäsine (MCSWEEGAN und WALKER 1986).

Mittels PCR erfolgt die Unterscheidung in sog. LOS-Klassen, diese Einteilung ist aufgrund der verschiedenen Lipooligosaccharid-Genloci (sog. LOS-Cluster) möglich (PARKER *et al.* 2005). Von PARKER *et al.* (2005 und 2008) wurden bislang 19 LOS-Klassen beschrieben:

A 1/2, B 1/2, C-S. Diese 19 LOS-Klassen können in zwei Gruppen geteilt werden. Ein Teil der Stämme besitzt eine *N*-Acetylneuraminsäure-Transferase und somit ein sialyliertes LOS. Die Stämme mit sialyliertem LOS besitzen eine deutlich höhere Zellinvasivität als die Stämme der anderen LOS-Klassen (LOUWEN *et al.* 2008). Da die sialylierten Lipooligosaccharide als Bestandteil der äußeren Membran Ähnlichkeit mit der Oberflächenstruktur peripherer Nerven und des Hirnstammes aufweisen, sind die sialylierten LOS-Klassen stärker mit neurologischen Störungen wie dem GBS assoziiert (GODSCHALK *et al.* 2004).

Wesentlich für das Wachstum von Bakterien ist Eisen. Eisen ist ein essentieller Bestandteil beispielsweise als Kofaktor bei der DNS-Synthese oder bei Elektronen-Transfer-Reaktionen und daher für die Vermehrung der Bakterien unverzichtbar (PALYADA *et al.* 2004). Ist Eisen nur mäßig verfügbar, wird das Wachstum eingeschränkt. Ein begrenztes Eisenangebot dient zudem als Signal, die Genexpression bestimmter Faktoren, z.B. von Hämolysinen oder Siderophoren zu verstärken (LITWIN und CALDERWOOD 1993). Auf der Gegenseite führt aber eine unkontrollierte Eisenaufnahme zu oxidativem Stress und zum Abbruch des Bakterienwachstums (TOUATI 2000). Unter physiologischen Bedingungen ist Eisen allerdings schlecht löslich. Die Bereitstellung von freiem Eisen im Menschen ist für Bakterien dementsprechend sehr gering. Somit bestimmt die Befähigung des Bakteriums, Eisen auch unter limitierten Voraussetzungen im Wirt zu akquirieren, dessen Virulenz und Überleben (GRANT *et al.* 1997). Da die Verfügbarkeit von freiem Eisen im Wirtsgewebe aufgrund von Komplexbildungen sehr gering ist, haben viele Bakterien ein spezielles Eisen-Akquirierungssystem entwickelt. Dieses besteht aus hochspezifischen Chelatoren für Eisen-Ionen, s.g. Siderophore, wodurch Eisen aus bestehenden Komplexen im Wirt gelöst werden kann (RATLEDGE und DOVER 2000). *C. jejuni* verfügt wie die meisten gramnegativen Bakterien über eine Vielzahl von Systemen zur Eisenaufnahme und -verwertung, von denen bisher allerdings nur einige näher charakterisiert worden sind. Das Genom von NCTC 11168 kodiert fünf Eisenaufnahme-Systeme, die hauptsächlich in Operonen organisiert sind: ein Enterochelin-

Aufnahme-Protein (*ceuBCDE*), ein Eisenaufnahmeprotein (*cfrA/cj0755*), ein Siderophore-Rezeptor der äußeren Membran (*cj0178*), ein System zur Hämin-Aufnahme (*chuABCD*) und *cj0173c-0175c*, eine an ein periplasmatisches Bindeprotein gekoppelte Komponente (PARKHILL *et al.* 2000).

Im Jahr 2000 wurde die komplette Genom-Sequenz des *C. jejuni*-Stammes NCTC 11168 publiziert (PARKHILL *et al.* 2000). Das Genom weist eine Größe von 1,64 Mb und einen G+C-Gehalt von 30,6% auf und kodiert insgesamt für 1,654 Proteine. Die kodierenden Sequenzen (CDS) entsprechen etwa 94,3% des Gesamtgenoms und machen es damit zum dichtesten bakteriellen Chromosom, das bisher sequenzanalysiert wurde. Eine außergewöhnliche Beobachtung im Genom von NCTC 11168 sind hypervariable Sequenzen, die häufig in Genen für Proteine der Biosynthese oder von Oberflächenstrukturen nachgewiesen wurden. Diese beträchtliche Variabilität innerhalb des Genomsequenz könnte ein wichtiger Bestandteil der Überlebensstrategie von *C. jejuni* sein. Die hypervariablen Regionen im *C. jejuni*-Chromosom treffen vornehmlich mit den Genclustern für LOS- und EP-Biosynthese sowie für die Modifikation der Flagellen zusammen (PARKHILL *et al.* 2000).

Im Folgenden werden die potentiellen Virulenz-assoziierten Faktoren bzw. die entsprechenden Gene: *cj1321-1326*, *ciaB*, *cdtB*, *fucP*, *cj0178*, *cj0755*, *ceuE*, *pldA* und *cstII/cstIII* genauer erläutert, da diese im Zuge der Arbeit näher analysiert werden sollen.

1.4.1.1 Gencluster zur Flagellin-O-Glykolisierung

CHAMPION *et al.* (2005) entdeckten, dass ein Cluster von sechs Genen *cj1321-1326* zur Flagellin-O-Glykolisierung überwiegend in Stämmen aus Nutztierbeständen auftritt. Sie stellten die Hypothese auf, dass dieser Sechs-Gen-Cluster eine spezielle Flagellin-Glykoform hauptsächlich in Stämmen von Nutztierbeständen kodiert und damit eine Rolle bei der Wirtszellinvasion spielt.

1.4.1.2 Lipooligosaccharid–Sialyltransferase-Marker

Ein weiterer Faktor, der das Invasionspotential eines *C. jejuni*-Isolates bestimmt, ist die Zusammensetzung des Lipooligosaccharids (LOS). Die *C. jejuni*-Stämme der unter Punkt 1.4.1 beschriebenen LOS-Klassen A1/2, B1/2, C, M und R besitzen Gene bzw. Enzyme für die Sialylierung des LOS. Zu diesen Genen gehören ein Homolog des *neuBCA*-Gens, das für eine Neuraminsäure-Synthase kodiert sowie ein Homolog des *cstII*-Gens (Tabelle1, Punkt 2.6.2), welches eine Sialinsäure-Transferase verschlüsselt (GILBERT *et al.* 2002).

Alle anderen, nicht neuraminsäurehaltigen LOS-Klassen besitzen dementsprechend nicht die erforderlichen *cst*-Gene für die Sialylierung des LOS (PARKER *et al.* 2008). Das *cstIII*-Gen (orf7c) findet sich bei LOS-Klasse C-Isolaten (PARKER *et al.* 2005), *cstII* (orf7ab) dagegen bei LOS-Klasse A und B-Isolaten (PARKER *et al.* 2005). PARKER *et al.* (2005) konnten in einer Studie von 123 getesteten *C. jejuni*-Isolaten durch PCR ableiten, dass mehr als 60,0 % der Isolate LOS-Klasse A, B oder C angehören.

Dass das Invasionspotential mit bestimmten LOS-Klassen korreliert, konnten bereits diverse Arbeiten belegen. So gehört die Mehrheit der hyperinvasiven Isolate der LOS-Klasse C, die wiederum mit dem MLST-CC 21 assoziiert ist, an (FEARNLEY *et al.* 2008).

1.4.1.3 *Campylobacter*-Invasions-Antigen B

Beim Invasionsprozess kommt auch dem sog. *Campylobacter*-Invasions-Antigen (Cia) eine besondere Bedeutung zu. Bisher wurden acht verschiedene Cia von KONKEL *et al.* 1999 nachgewiesen. Das *C. jejuni*-Protein CiaB (73kDa) ist für die Invasion von *C. jejuni* erforderlich und wird im Verlauf der Zellinvasion direkt in das Zytoplasma der Zielzelle injiziert, *ciaB*-Defektmutanten waren dazu nicht in der Lage. Die Sekretion der anderen Cia (CiaA; CiaC-CiaH) ist CiaB-abhängig (KONKEL *et al.* 1999).

1.4.1.4 Zytotoxales distendierendes Toxin (*Cytolethal Distending Toxin*)

Das Zytotoxin CDT besteht aus drei Untereinheiten (CdtA, CdtB und CdtC), von denen CdtB die aktive zytotoxische Komponente darstellt. Nach Bindung von CdtA und CdtC an die Wirtszelloberfläche kommt es zur Aktivierung von CdtB. Die B-Untereinheit wird ins

Zytoplasma der Wirtszelle transloziert und anschließend in den Zellkern geschleust. CdtB führt zum Zellzyklusarrest in der G2/M-Übergangsphase (KARLYSHEV und WREN 2001, PICKETT und WHITEHOUSE 1999). CDT induziert damit einen für *Campylobacter* typischen zytopathischen Effekt - ein Aufblähen und Anschwellen der Epithelzellen. Des Weiteren sterben vereinzelt Zellen ab (WHITEHOUSE *et al.* 1998). Daneben scheint das Toxin auch eine Rolle in der Modifikation der Immunantwort zu spielen (DASTI *et al.* 2010).

1.4.1.5 Phospholipase A der äußeren Membran

Ebenso wurde das Gen *pldA* in den Kreis der zu untersuchenden Virulenz-assoziierten Faktoren einbezogen.

Das Gen *pldA* kodiert für die Phospholipase A der äußeren *C. jejuni*-Membran. Dieses 35 kDa schwere Protein weist eine bedeutsame Ähnlichkeit zur Phospholipase der äußeren Membran von *E. coli* auf. Zahlreiche Bakterien nutzen Phospholipasen zur Lyse von Erythrozyten, beispielsweise *Helicobacter pylori* (ANSORG *et al.* 1993). Damit tragen Phospholipasen auch zum krankheitsregenden Potential der Bakterien bei (GRANT *et al.* 1997). GRANT *et al.* (1997) konnten zeigen, dass Phospholipase A auch bei *Campylobacter* zur zell-assoziierten hämolytischen Aktivität beiträgt und somit eine Bedeutung als Virulenz-assoziiertes-Faktor einnimmt.

1.4.1.6 Eisen-Akquirierung

Da das Spurenelement Eisen wie für nahezu alle lebenden Organismen auch für *C. jejuni* essentiell ist, wurden in den Betrachtungen die Gene dreier Eisenaufnahmesysteme berücksichtigt: ein Bindeprotein zur Enterochelin Aufnahme (*ceuE*), ein Siderophore-Rezeptor der äußeren Membran (*cj0178*) und ein Eisenaufnahmeprotein (*cj0755*).

Um Eisen aus bestehenden Komplexen im Wirt herauszulösen, haben Bakterien verschiedene Taktiken zur verbesserten Eiseneinlagerung wie Siderophore-vermittelte Eisenaufnahmesysteme entwickelt. *C. jejuni* ist selbst nicht in der Lage Siderophore zu produzieren (PICKETT *et al.* 1992), bzw. es wurden im Genom von NCTC 11168 keine Genhomologe für Siderophore gefunden (PARKHILL *et al.* 2000). Diese Tatsache legt nahe, dass *C. jejuni* in der Lage ist, exogene Siderophore, produziert von anderen Bakterien, zu

nutzen. Diese werden durch ein Transportsystem im Darmtrakt abgefangen (van VLIET *et al.* 2002). Durch *ceu* (campylobacter enterochelin uptake-binding-protein, *ceuBCDE*) werden Komponenten eines Bindungs-Protein-abhängigen Transportsystems speziell für Enterochelin kodiert (van VLIET *et al.* 2002).

Das Gen *ceuE* kodiert ein Lipoprotein (34,5 bis 36,2 kDa), welches als Bindungsprotein an der Aufnahme des Siderophores Enterochelin (auch bezeichnet als Enterobactin) beteiligt ist (RICHARDSON und PARK 1995).

Die Eisenverfügbarkeit hat Einfluss auf die Besiedlung des Magen-Darmtraktes während der Infektion mit *C. jejuni*, weswegen zwei weitere Gene in die Betrachtungen einbezogen wurden. Ebenso wie *ceuE* sind die Genprodukte von *cj0178* und *cj0755(cfrA)* an der bakteriellen Eisenaufnahme beteiligt. Das Gen *cj0178* kodiert einen Siderophore-Rezeptor der äußeren Membran und *cj0755* kodiert ein Eisenaufnahmeprotein.

1.4.1.7 Fucose-Verwertung

Die Stoffwechsellistung eines Organismus ist keine klassische Komponente, um Aussagen über dessen Virulenz zu treffen, gleichwohl ist die Verfügbarkeit von Nährstoffen ein essentieller Faktor, um im Wirt zu überleben und Krankheiten zu initiieren (MURAOKA und ZHANG 2011).

C. jejuni metabolisiert nur wenige Aminosäuren (Prolin, Serin) und hauptsächlich Intermediärprodukte des Tricarbonsäurezyklus (Zitratzyklus), z.B. durch Reduktion von Fumarat zu Succinat, als Energiequelle zum Wachstum und zur Wirtszellinvasion (LEE und NEWELL 2006, KELLY 2001). Die zusätzliche Metabolisation der Aminosäuren Glutamin und Gluthation wird für eine Gruppe von *C. jejuni*-Stämmen durch Expression von *ggt* ermöglicht. Außerdem konnten HOFREUTER *et al.* (2008) zeigen, dass *ansB*-positive Stämme Asparagin metabolisieren können. Assoziiert mit diesem erweiterten Aminosäure-Metabolismus, existiert ein alternativer anerobere Stoffwechselweg, dessen Leitenzym die Dimethyl-Sulfoxide-Oxidoreduktase (*dmsA-D*) ist (HOFREUTER *et al.* 2006 und 2008). Eine Schlüsselrolle in der Utilisation der Aminosäuren Glutamat und Aspartat spielt das ubiquitär bei allen *C. jejuni*-Stämmen vorkommende PEB1a-Transportsystem. Dieses periplasmatische Bindungsprotein PEB1a ist eine Komponente des ABC-Transporters PEB1 und unabdingbare

Vorraussetzung für die Nutzung der Aminosäuren Glutamat und Aspartat als Kohlenstoffquelle (PEI et al. 1991, PEI und BLASER 1993).

C. jejuni ist nicht in der Lage, Glukose als Kohlenstoffquelle zu nutzen, da dem Bakterium das Enzym Phosphofruktokinase fehlt (PARKHILL et al. 2000, VELAYUDHAN und KELLY 2002). Das NCTC 11168-Genom weist aufgrund einer Phosphofruktokinase-Absenz nur einen unvollständigen EMP-Weg auf (PARKHILL et al. 2000). Weshalb davon ausgegangen wird, dass das Wachstum im Wesentlichen von der Verfügbarkeit freier Amino- und Ketosäuren aus dem Stoffwechsel des Wirtsorganismus bzw. von dessen intestinaler Standortflora abhängt (LEE und NEWELL 2006). Dagegen konnten STAHL et al. 2011 zeigen, dass einige *C. jejuni*-Stämme in der Lage sind L-Fucose aufzunehmen und zu metabolisieren, da einzelne Stämme in ihrer Studie im Beisein von Fucose ein verstärktes Wachstum offenbarten. Fucose ist ein integraler Bestandteil der intestinalen Mucosa und kann während der Darmkolonisation des Wirts aufgenommen werden. Als Hauptquelle für Fucose dient der Wirt selbst. Ein Großteil der zelloberflächen-assoziierten Mucine ist fucolysiert. Auch der Wirt selbst sezerniert fucolysierte Glycane. Diese können als Kohlenstoffquelle von *C. jejuni* genutzt werden (STAHL et al. 2011).

MURAOKA und ZHANG identifizierten 2011 einen Genort, der für die Nutzung von Fucose als Substrat notwendig ist. Dieser Fucose-Phänotyp ist Stamm-spezifisch und kann die Anpassung an nährstoffreiche Umgebungen verbessern. Das Gen *fucP* ist ein Bestandteil dieser Genregion und kodiert eine Permease um L-Fucose ins Bakterium zu transportieren (STAHL et al. 2011).

Die Möglichkeit einzelner *C. jejuni*-Stämme, Fucose als Substrat zu nutzen, kann einen enormen Wettbewerbsvorteil bedeuten (MURAOKA und ZHANG 2011).

1.5 Zusammenhang verschiedener *C. jejuni*-Gruppen

Der Zusammenhang verschiedener *C. jejuni*-Gruppen verschiedener Herkunft wurde bereits 2011 entsprechend Stoffwechsel-assoziierten genetischer Marker beleuchtet. Dazu wurden diese Isolate auf das Vorhandensein sechs Metabolismus-assoziierten genetischer Marker überprüft um zu beurteilen, ob ihre Präsenz mit verschiedenen klonalen Komplexen von *C. jejuni* korreliert (ZAUTNER et al. 2011).

Metabolismus-assoziierte Marker:

- *ansB* (periplasmatische Asparaginase)
- *dmsA* (eine Untereinheit der Dimethylsulfoxid-Oxidoreduktase),
- *cj1585c* (Oxidoreduktase)
- *cjj81-176-1367/71* (Serin-Protease)
- *tlp7_{m+c}* (transducer-like Protein, zusammengesetzt aus *cj0951c* und *cj0952c*)
- *ggt* (periplasmatische γ -Glutamyl-Transpeptidase)

Group or subgroup	Most prevalent marker genes ^a						CC	Origin(s) ^b
	<i>cj1367</i>	<i>cj1585c</i>	<i>dtlp7</i>	<i>dmsA</i>	<i>ansB</i>	<i>ggt</i>		
1a	X	X	X				21	b
1b	X	X					21, 48, 49, 206, 446	h, c, b, t
2a	X			X	X	X	22, 42	h, c, b
2b				X	X	X	45, 283	h, c
3a	X	X					52, 353, 354, 443, 658, 828	h, c, t
3b	X	X	X				61	b
4				X			1034, 1332	t
5	X	X					None	c
6	X			X	X		257	h, t

^a *cj1367*, *cjj81176-1367/1371* gene (*cj1365c*), encoding a serine protease; *cj1585c*, gene encoding an oxidoreductase and replacing *dmsA* to *-D* in NCTC 11168; *dtlp7*, *cj0951c* and *cj0952c* genes, encoding the heterodimeric form of transducer-like protein 7; *dmsA*, gene encoding the dimethyl sulfoxide oxidoreductase subunit A; *ansB*, gene encoding an asparaginase with an accessory N-terminal *sec*-dependent secretion signal for periplasmic localization of the enzyme; *ggt*, gene encoding the-glutamyl-transpeptidase.

^b h, human; c, chicken; b, bovine; t, turkey.

Abb. 2: Verteilung gentischer *C. jejuni*-Marker, MLST-CC und Isolat-Herkunft

Abbildung übernommen von ZAUTNER *et al.* 2011,S.2361

(Übersetzung der Bildunterschrift: ^a prävalente Marker: *cj1367*, *cjj811-76-1367/71*(*cj1365c*) kodiert eine Serin-Protease, *cj1585c* (Oxidoreduktase), *tlp7_{m+c}* (dimeres Transducer-like-Protein), *dmsA* (kodiert eine Untereinheit der Dimethylsulfoxid-Oxidoreduktase A), *ansB* (eine periplasmatische Asparaginase) und *ggt* (eine periplasmatische γ -Glutamyl-Transpeptidase) ^b Ursprung(engl.origin) : h-Mensch, c-Huhn, b-Rind, t-Pute ; CC-klonaler Komplex Gruppe/ Untergruppe (engl.group or subgroup): Einteilung der 266 Isolate in Gruppen

Abbildung 2 gibt die Verteilung der Metabolismus-assoziierten genetischen Marker, die MLST-CC-Zugehörigkeit und die Isolat-Herkunft wieder. Zusammen mit den Ergebnissen der MLST-Typisierung konnten die 266 Isolate in 6 Haupt- und 9 Untergruppen unterteilt werden, was ebenfalls aus Abb. 2 ersichtlich wird. Die Gruppen zeigen nur eine mäßige Korrelation mit der Isolat-Herkunft (ZAUTNER *et al.* 2011).

Gruppe 1-Isolate sind positiv für *cjj811-76-1367/71* und *cj1585c*. Isolate dieser Gruppe gehören zu den MLST-CC 21, 48, 49, 206 oder 446. Die Isolate aus Gruppe 3 sind wie Gruppe 1 positiv für *cjj811-76-1367/71* und *cj1585c*. Allerdings gehören sie den MLST-CC 52, 353, 354, 443, 658 und 828 an. In Untergruppe 3b wurden *tlp7_{m+c}* positive Isolate detektiert.

Gruppe 2-Isolate sind überwiegend positiv für *dmsA*, *ansB* und *ggt* und gehören den MLST-CC 22, 42, 45 oder 283 an. Die Mehrheit der Gruppe 4-Isolate gehört zu den MLST-CC 1034 und 1332 und ist *ansB*⁺. Gruppe 5-Isolate sind positiv für *cjj811-76-1367/71* und *cj1585c*. Schließlich finden sich in Gruppe 6 MLST-CC 257- Isolate, die positiv für *cjj811-76-1367/71*, *dmsA* und *ansB*, aber nicht für *ggt* sind.

Zur Unterscheidung von MLST-CC 45 und 283- von MLST-CC 22 und 42 Isolaten, die zusätzlich *cjj811-76-1367/71* positiv sind, können die in Zusammenhang stehenden Marker *ansB*, *dmsA* und *ggt* betrachtet werden. Außerdem kann eine Differenzierung zwischen CC 21, CC 48 und CC 206 vorgenommen werden, da diese Isolate ausschließlich *cj1585c*- und *cjj811-76-1367/71*-positiv sind. Der aus zwei Genen zusammengesetzte Marker *tlp7_{m+c}* ist typisch für MLST-CC 21, 53 und 61 und korreliert stark mit bovinem Isolaturprung (ZAUTNER *et al.* 2011).

1.6 Zielsetzung

C. jejuni ist weltweit der häufigste bakterielle Enteritiserreger, deshalb besteht ein epidemiologisches Interesse daran, das gesundheitsgefährdende Potential verschiedener Stämme zu analysieren. Die Virulenz von *C. jejuni* wird, wie zuvor beschrieben, von unterschiedlichen Faktoren und Eigenschaften des Bakteriums bestimmt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die molekular-epidemiologische Untersuchung einer 266 Isolate umfassenden *C. jejuni*-Stammsammlung auf die Präsenz zehn weiterer Virulenz-assoziiierter Faktoren: *cj1321-1326* (ein sechs Gene umfassender Komplex zur Flagellin-O-Glykolisierung), *ciaB* (*Campylobacter-Invasions-Antigen B*), *cdtB* (kodiert die Untereinheit B des zytolethalen distendierenden Toxins - CDT), *fucP* (L-Fucose-Permease Gen), *cj0178/cj0755* (Eisentransporter), *ceuE* (ein Enterochelin-bindendes Aufnahme-Protein), *pldA* (Phospholipase A der äußeren Membran) und *cstII/cstIII* (die Lipooligosaccharid-Sialyltransferase-Isoenzyme II und III) um die bestehende Gruppendifinition zu überprüfen und anhand der neuen Marker weiter zu konkretisieren.

Außerdem sollten die klinischen Parameter Hospitalisierung und blutige Diarrhö für die Isolate, welche aus humanen Stuhlproben angezüchtet wurden, in die Untersuchungen einbezogen werden, um die Isolat-Gruppen mit der höchsten Virulenz zu identifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsgut und Materialien

2.1.1 Bakterienstämme

In der vorliegenden Arbeit wurden 266 *C. jejuni*-Isolate, davon 129 vom Menschen, 67 von Hühnern, 43 von Rindern und 27 von Puten untersucht. Diese wurden bereits in einer vorherigen Studie MLST typisiert (ZAUTNER *et al.* 2011). Eine Übersicht über alle verwendeten *C. jejuni*-Stämme gibt Tabelle 13 im Anhang. Als Referenzstamm dienten die Stämme NCTC 11168 und 81-176.

Von Herrn Prof. Dr. Thomas Alter (Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin) wurden freundlicherweise die Rinder-, Puten- und ein Teil der Hühner-Isolate bereitgestellt, weitere Hühner-Isolate stammen von Frau Dr. Ingrid Hänel vom Friedrich-Löffler-Institut in Jena.

Aus dem Stuhllabor des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der Universitätsmedizin Göttingen stammen die humanen Isolate, welche freundlicherweise von Frau Zimmermann an die *Campylobacter*-Arbeitsgruppe weitergegeben wurden.

Die Gattung wurde initial mittels API Campy (Biomerieux) identifiziert. Die Speziesdifferenzierung zwischen *C. coli* und *C. jejuni* erfolgte mittels Multiplex-PCR (nach VANDAMME *et al.* 1997) und MALDI-TOF MS mit dem Massenspektrometer Autoflex III TOF/TOF und BioTyper3.0-Software (Bruker Daltonics, Bremen).

Die Referenzstämme NCTC 11168 und 81-176 wurden von der ATCC (American Type Culture Collection) gekauft.

2.1.2 Charakterisierung der *C. jejuni* -Untergruppen

In einer vorrangigen Studie wurde bereits durch Kombination von MLST mit dem Nachweis von sechs Markergenen die Existenz von sechs *C. jejuni*- Untergruppen gezeigt (ZAUTNER *et al.* 2011).

Zur breiteren Charakterisierung wurden dieselben 266 Isolate auf das Vorhandensein zehn weiterer Markergene, sowie auf eine Assoziation mit den klinischen Parametern Hospitalisierung und Blut im Stuhl untersucht.

Von den 266 *C. jejuni*-Isolaten wurden über die Hälfte (129 Isolate) aus humaner Fäzes angezüchtet. Diese menschlichen Isolate stammen zum Teil aus Stuhlproben von in der Universitätsmedizin Göttingen hospitalisierten Patienten (40 %) und zum anderen Teil von ambulanten Patienten aus Arztpraxen in und um Göttingen (60 %). Für 104 der 129 Proben liegen Informationen über die Parameter wässriger Stuhl (85 % der Proben) und blutiger Stuhl (15 % der Proben) vor.

Virulenz-assoziierte Marker:

- *cj1321-cj1326* - ein Sechs-Gen-Komplex zur Flagellin-*O*-Glykolisierung
- *fuc* - das L-Fucose-Permease Gen
- *ceuE* - ein Enterochelin-bindendes Aufnahme-Protein
- *pldA* - Phospholipase A der äußeren Membran
- *cstII* und *cstIII* - Lipooligosaccharid- Sialyltransferase-Isoenzyme II und III
- *ciaB* - das *Campylobacter*- Invasions-Antigen B
- *cdtB* - kodiert die cytolethal distending toxin (CDT) Untereinheit B
- *cj0178* - Siderophore-Rezeptor der äußeren Membran
- *cj0755/cfrA* - ein Eisenaufnahmeprotein

Alle Primer für die Polymerasekettenreaktion sind in Tab.1 aufgeführt und wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

Vor Gebrauch sind die Primer entsprechend der Herstellerangaben mit Aqua bidest verdünnt und auf eine Konzentration von 100µM/ml (Stammlsg.)eingestellt worden .Nach der Herstellung einer 1:10-Verdünnung wurden die Stammlösungen und Verdünnungen bei -20 °C aufbewahrt.

Tabelle 1: Primer für die Amplifikation der Markergene

Gen	Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Annealing	Referenz
<i>cj1321</i>	CjNCTC11168-1321_f	AAAATGTCATCATCATAGGAGCG	60,0 °C	CHAMPION <i>et al.</i> 2005
	CjNCTC11168-1321_r	TCTAAGTTTACGCAAGGCAACA		
<i>cj1322</i>	CjNCTC11168-1322_f	GACTTTGGTTTAATGGGTAAGCA	59,6 °C	CHAMPION <i>et al.</i> 2005
	CjNCTC11168-1322_r	TTCCGGCGTTAAAATTAGAAAA		
<i>cj1323</i>	CjNCTC11168-1323_f	AGAACGATTTACCCCATGAAA	59,7 °C	CHAMPION <i>et al.</i> 2005
	CjNCTC11168-1323_r	ATTTGCTAAAGCTCCTCGATTG		
<i>cj1324</i>	CjNCTC11168-1324_f	TGCCGTAAGTGGAGGTAAAGAT	60,0 °C	CHAMPION <i>et al.</i> 2005
	CjNCTC11168-1324_r	TCTGCACACATTGTTCTATCCC		
<i>cj1325</i>	CjNCTC11168-1325_f	ACGGATTACTTTTTCCAGATGGT	60,0 °C	CHAMPION <i>et.al</i> 2005
	CjNCTC11168-1325_r	TTTGCTTTGAAAATACGCTGAA		
<i>cj1326</i>	CjNCTC11168-1326_f	TACATTTTCATCGATAAAGCCGA	59,7 °C	CHAMPION <i>et al.</i> 2005
	CjNCTC11168-1326_r	AAATATAATGGTGTGCCGATCC		
<i>fucP</i>	cj0486FWD	GATAGAGCATTAAATTGGGATG	52,0 °C	MURAOKA und ZHANG 2011
	cj0486REV	CCTATAAAGCCATACCAAGCC		
	rpoC	GAACTTGCTATTGCTGAGCC		
	rpsL	ACCCTAGTGCAAACCTCCCCT		
<i>ceuE</i>	ceuE-811-76F01	GATAGAGTCGCAGGCGTTCC	60,0 °C	diese Studie
	ceuE405F	GATAAAGTCGTTGGCGTTCC		
	ceuE405R	GCGAGATTGGAGGACCAAAGG		
<i>pldA</i>	pldA-81178F01	AAACTTATGCGTTTTT	45,0 °C	diese Studie
	pldA-84fwd	AGCTTATGCGTTTTT		
	pld-981rev	TATAAGGCTTTCTCCA		
				FEODOROFF <i>et al.</i> 2010

<i>cstII</i>	orf7ab	ACTACACTTTAAAACATTTAATC C AAAATCA	56,0 °C	PARKER <i>et al.</i> 2005
	orf7ab	CCATAAGCCTCACTAGAAGGTA TGAGTATA		
<i>cstIII</i>	orf7c	TTGAAGATAGATATTTTGTGGGT AAA	56,0 °C	PARKER <i>et al.</i> 2005
	orf7c	CTTTAAGTAGTGTTTTATGTCAC TTGG		
<i>ciaB</i>	ciaB-F	TCATGCGGTGGCATTAGAATGG G	57,5 °C	Tareen <i>et al.</i> 2011
	ciaB-R	CATCATTGGAACGACTTGAGCT GAGA		
<i>cdtB</i>	cgtB-F	TGCAAGGCTCATCCGCAGCC	59,0 °C	Tareen <i>et al.</i> 2011
	cgtB-R	TGGCGTCCTGTTGGAGTGGC		
<i>cj0178</i>	cj0178-F01	TGTAGGCGGGGGTGGCAAGA	54,0 °C	diese Studie
	cj0178-R01	ACGACCGCGAGCAGAATTGC		
<i>cj0755/</i> <i>cfrA</i>	<i>cj0755/cfrA</i> -F01 <i>cj0755/cfrA</i> -R01	ATGGCCGCGAAGTCGTAGGG AGCGATCTATTTGCCACTCGCCT	54,0 °C	diese Studie

2.1.3 Nukleinsäuren-Längenstandards

Um die Größe von DNS-Fragmenten zu ermitteln, wurden der Längenstandard „GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder“ (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) und der „Smart-Ladder“ (Eurogentec, Köln) verwendet.

Längenstandard „GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder“:

Fragmentgrößen in bp: 20000/10000/7000/5000/4000/3000/2000/1500/1000/700/
500/400/300/200/75

Längenstandard „SmartLadder“:

Fragmentgrößen in bp: 10000/8000/6000/5000/4000/3000/2500/2000/1500/1000/
800/600/400/200

2.1.4 Verwendete Enzyme

Tabelle 2: Enzyme

Enzym	Hersteller/Ort
Taq-DNS-Polymerase	Roche/ Basel, Schweiz
Proteinkinase K	QIAGEN/Venlo, Niederlande

2.1.5 Puffer und Nährmedien

Elektrophoresepuffer-Lösung	20ml TAE(50×) mit 980ml H ₂ O
TAE-Puffer (50×)	2M Tris 50mM EDTA (pH 7, 5-7, 8) 5,75 %(v/v) Essigsäure
BHI-Medium	MERCK KGaA/Darmstadt

Lysispuffer ATL und AL QIAGEN/Venlo, Niederlande

Elutionspuffer AE QIAGEN/Venlo, Niederlande

2.1.6 Weitere Chemikalien, Reagenzien, Verbrauchsmittel und Geräte

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller/Ort
6× DNA Loading Dye	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Agarose NEED Ultra-Qualität Roti@garose für die DNS/RNS-Elektrophorese	Carl Roth GmbH/Karlsruhe
Ethidiumbromid, ~95 % (HPLC)	SIGMA-ALDRICH®/St.Louis, USA
Nukleinsäuren-Längenstandard „GenRuler™ 1kb Plus DNA Ladder“	Fermentas GmbH/St.Leon-Rot
Nukleinsäuren-Längenstandard “SmartLadder”	Eurogentec/Köln
PCR Grade Nucleotide Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Roche/Basel, Schweiz
PCR reaction buffer, 10× konz.	Roche/Basel, Schweiz
Columbia –Agar (Basis)	MERCK KGaA/Darmstadt
Ethanol, absolut	MERCK KGaA/Darmstadt
Schafsblut, defibriniert	OXOID Ltd./Hampshire, England

Glycerin, etwa 87 % reinst

MERCK KGaA/Darmstadt

Aqua bidest

Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller/Ort
Entsorgungsbeutel	Labor-Brand/Gießen
Filter-Pipettenspitzen	SARSTEDT/Nümbrecht
Flächendesinfektionsmittel "Biguacid Liquid"	ANTISEPTICA/Pulheim/Brauweiler
Labortücher (Kimwipes)	Kimberly-Clark/Dallas,USA
Nitrilhandschuhe: "Nitro-TEX®EP"	Ansell/Brüssel,Belgien
PCR-Reagiergefäß 0,2 ml	Biozym/Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen (verschiedene Farben)	SARSTEDT/Nümbrecht
Pipettierhilfe : Pipetus®-Akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG/ Eberstadt
Reagiergefäß 0,5 ml	Eppendorf/Hamburg
Reagiergefäß 2,0 ml	SARSTEDT/Nümbrecht
Schutzhandschuhe	Microflex Corporation/Wien,Österreich
Campy Gen TM CN25	OXOID Ltd. /Hampshire, England
Einweg-Impfshlingen(1 µl u. 10 µl)	SARSTEDT/Nümbrecht
Wattetupfer	COPAN innovation/Brescia, Italien

Tabelle 5: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller/Ort
Digitaler Graphikdrucker Digital Graphic Printer UP-D890	Biometra/Göttingen
Elektrophoresekammer	Von Keutz/Reiskirchen
Feinwaage LP6200S	Sartorius AG/ Göttingen
Geldokumentationstation „Transilluminator BioDoc2™“	Biometra/Göttingen

diverse Glaswaren	SCHOTT AG/Mainz
Kamera Axio Cam	Carl Zeiss AG/Oberkochen
Kühlschrank	Liebherr/Bulle, Schweiz
Mikrowelle	Blomberg/Neu-Isenburg
Mini-Zentrifuge/vortex CombiSpin FVL-2400N	BIOSAN/Riga, Litauen
PCR-Gerät T3 Thermocycler	Biometra/Göttingen
Spannungsgerät „Biometra Standard Power Pack 25“	Biometra/Göttingen
Zentrifuge Centrifuge 5415 R	Eppendorf/Hamburg
NanoDrop ND-1000	Thermo SCIENTIFIC/Waltham, USA
Brutschrank (37 °C)	ThermoSCIENTIFIC/Waltham,USA
Thermomixer compact	Eppendorf/Hamburg

2.1.7 Software /Programme

Zur Konstruktion des (*Unweighted-pair Group Method with Arithmetic mean*) UPGMA-Dendogramms wurde die MEGA4 Software (www.megasoftware.net/mega4/mega.html) genutzt (KUMAR *et al.* 2008).

Außerdem wurde die von Keith Jolley und Man-Suen Chan entwickelte *C. jejuni* MLST-Website (<http://pubmlst.org/campylobacter/>) zur Bestimmung der klonalen Komplexe herangezogen.

Zur statistischen Analyse wurde die MS-Excel-Software eingesetzt. Mit dem Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test) wurden signifikante Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten der Markergene in den definierten Gruppen überprüft.

2.2 Experimentelle Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR in Kombination mit der Agarose-Gelelektrophorese genutzt, um das Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein der in Tab.1 aufgeführten Gene nachzuweisen.

Die zu amplifizierende DNS wurde aus den 266 *C. jejuni*-Isolaten extrahiert (siehe Punkt 2.1.1).

2.2.1 Anzucht und Lagerung von *Campylobacter jejuni*

Die Anzucht der Bakterienisolate erfolgte auf Columbia-Schafblutagarplatten mit 5 % Schafblutzusatz. Unter capno- und mikroaerophilen Bedingungen (5-10 % CO₂, 5 % O₂ und 85-90 % N₂) wurden die beimpften Agarplatten bei 42 °C für 24 Stunden vor der DNS-Isolierung inkubiert. Diese capno- und mikroaerophile Atmosphäre konnte durch Einsatz eines CampyGen™ CN25-Gasentwicklerbeutels pro 2,5 l Fassungsvermögen in einem Anaerobier-/Mikroaerophilentopf erzeugt werden.

Zur langfristigen Lagerung können die Bakterienstämme als Glycerinkulturen (20 % Glycerin in BHI) oder Microbank-Röhrchen (Pro-Lab Diagnostics, Toronto, Kanada) aufbewahrt werden. Mit einer Impföse bzw. einem Tupfer wurden dazu *Campylobacter*-Kolonien von der Columbia-Schafblutagarplatte entnommen und in das Glycerin-BHI-Gemisch bzw. in das Microbankröhrchen gegeben.

2.2.2 Isolierung von Desoxyribonukleinsäure (DNS)

Zur Gewinnung der genomischen DNS wurde das QIAamp®-DNA-Mini-Kit (QIAGEN/Venlo) entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Die Bakterien sind zuvor, wie in Punkt 2.2.1 beschrieben, angezüchtet worden. Die ausplattierten Bakterien wurden in 100 µl Puffer ATL resuspendiert und mit 20 µl Proteinase K bei 56 °C und 750 min⁻¹ 1-3 Stunden im Thermomixer inkubiert, bis die Bakterien vollständig lysiert waren. Die Proben wurden dann nach kurzem Zentrifugieren mit 200 µl Puffer AL versetzt. Zum Denaturieren der Proteinkinase K und zum Stopp der Reaktion sind die Proben anschließend für 10 min bei 70 °C inkubiert worden. Es folgte eine erneute Zentrifugation der Proben und die Zugabe von 200 µl 100 % Ethanol. Die kompletten Proben wurden anschließend auf den Membranfilter einer vorbereiteten QIAamp-Spinsäule gegeben und bei 8000 min⁻¹ für 1 min zentrifugiert.

Dieser Durchlauf konnte verworfen werden. Es folgten weitere Waschschrte bis die Spinsäule frei von Pufferresten war. Danach wurde die Spinsäule in ein sauberes 1,5 ml

Eppendorfgefäß gestellt. Zur Eluation der DNS von der Säule wurden 180 µl des vorgewärmten Elutionspuffers AE auf die Membran gegeben und bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. Die Proben sind dann bei 8000 min⁻¹ zentrifugiert worden. Die so gewonnene DNS wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNS

Mit Hilfe des NanoDrop-Photometers ND-1000 (ThermoScientific, Waltham, USA) wurde die Konzentration von DNS gemessen.

2.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine schnelle und effiziente Methode zur Amplifikation und zum Nachweis von DNS. Das Prinzip wurde 1971 durch Kjell Kleppe bzw. 1983 durch Kary Mullis entdeckt und beruht auf der Amplifikation eines spezifischen DNS-Abschnitts, welcher durch zwei Primer gegenläufiger Orientierung festgelegt wird. Während der PCR kommt es zu einer zyklischen Wiederholung von drei Schritten: Denaturierung, Annealing und Elongation. Diese drei Schritte sind durch einen zyklischen Wechsel der Reaktionstemperaturen für genau definierte Zeiten gekennzeichnet. Hierzu wird die PCR in einem dafür konzipierten Thermocycler durchgeführt, der die Temperatur für den jeweiligen Schritt präzise einstellt. Initial wird der Deckel des Gerätes auf 105 °C vorgeheizt und die DNS wird in einem Reaktionsschritt bei 95 °C denaturiert.

Im Anschluß folgten i.d.R. 30 Amplifikationszyklen. Aufgrund der zyklisch hohen Temperaturen von 95°C ist die Verwendung einer thermostabilen DNS-Polymerase notwendig. In dieser Arbeit wurde die 1965 durch Thomas Dale Brock isolierte Taq-DNS-Polymerase (Roche) eingesetzt.

Im Folgenden wird der Ablauf eines Amplifikationszyklus beschrieben:
(entsprechend Stufe 2 in Tab. 8)

1) Denaturierung

Auftrennung des zu amplifizierenden DNS-Doppelstrangs durch Erhöhung der Temperatur auf 95°C.

2) Annealing (Hybridisierung)

In dieser Phase binden die Primer durch sukzessives Herabsetzen der Reaktionstemperatur an den komplementären Bereich des jeweiligen DNS-Einzelstrangs. Es kann nur eine stabile Verbindung erzielt werden, wenn Primer und DNS-Abschnitt komplementär zueinander sind, d.h. sich zwischen ihren korrespondierenden Basen Wasserstoffbrücken ausbilden können. Die genaue Annealing-Temperatur ist abhängig von der Länge und der Basenzusammensetzung der Primer. Die jeweiligen Annealing-Temperaturen der verwendeten Primer -Paare finden sich in Tab.1.

Wird die Annealing-Temperatur zu niedrig gewählt, besteht eine erhöhte Wahrscheinlichkeit dafür, dass sich die Primer auch unspezifisch an nicht hundertprozentig komplementäre Regionen auf den DNS-Einzelsträngen anlagern und sogenannte „Geisterbanden“ durch unspezifische Produkte entstehen können. Bei zu hohen Annealing-Temperaturen besteht die Gefahr, dass sich die Primer gar nicht anlagern können und somit kein Amplifikat entsteht.

3) Elongation

In diesem Reaktionsschritt kommt es zur Ausbildung eines neuen DNS-Doppelstranges indem die hitzebeständige *Taq*-Polymerase in 5' → 3' freie Nukleotide an die Primer anfügt.

Zu Beginn jeder Versuchsreihe wurden die benötigten Mengen an Reagenzien für den PCR-Reaktionsansatz berechnet, und es wurde ein Mastermix gemäß diesen Berechnungen hergestellt. Dieser Mastermix ist dann auf 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße zu gleichen Teilen aufgeteilt worden, und in jedes Reaktionsgefäß wurden 1 µl DNS-Template hinzupipettiert. Anschließend wurden die Komponenten mit einem Vortexer nochmals vorsichtig vermischt.

Tabelle 6: PCR-Ansatz für eine Probe

Für die PCR wurde i.d.R. nur ein $\frac{1}{2}$ Mastermix hergestellt. Die Menge für einen ganzen Ansatz ist in der Spalte „Menge“ jeweils in Klammern angegeben.

Komponente	Konzentration	Menge in µl
10×PCR-Puffer	10×	2,5 (5)
dNTPs (dATP,sCTP,dGTP,dTTP)	jeweils 10 mM	0,5 (1)
Vorwärts-Primer	10 µM	0,5 (1)

Rückwärts-Primer	10 μ M	0,5 (1)
Taq-DNS-Polymerase	5 U / μ l	0,25 (0,5)
Template-DNS	50-150 ng / μ l	0,5 (1,0)
Aqua bidest	-	20,3 (40,5)
Gesamtvolumen		25 (50)

Bei den Polymerasenkettenreaktionen wurden generell eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle mitgeführt. Die Negativ-Kontrolle bestand aus einem kompletten Reaktionsansatz, jedoch ohne die zu amplifizierende Ziel-DNS. Bei einer positiven Negativkontrolle wurde der gesamte PCR-Ansatz wiederholt, da eine Verunreinigung des Reaktionsansatzes wahrscheinlich war.

Als Positiv-Kontrolle dienten die Genom-sequenzierten *C. jejuni*-Referenzstämme NCTC 11168 und 81-176, die in den jeweiligen Relationen als eindeutig positiv charakterisiert waren. Bei fehlender Positiv-Kontroll-Bande wurde die PCR ebenfalls wiederholt.

Tabelle 7: Thermocycler-Programm für die PCR

(Programm für die Multiplex-PCR entsprechend Tab. 9)

	Temperatur	Zeit	
Stufe 1	95,0 °C	1 min	
Anfangsdenaturierung			
Stufe 2			
Denaturierung	95,0 °C	} 34×	
Annealing	entsprechend Tab.1		30 sec
Elongation	72,0 °C		30 sec
Stufe 3			
Primer Extention	72,0 °C	5 min	
Stufe 4			
Kühlung	4,0 °C	∞	

Eine technische Ausnahme bildet der Nachweis des *fucP*-Gens, welcher in Form einer *Multiplex-PCR* erfolgte.

Die Multiplex-PCR ermöglicht den Nachweis mehrerer Gene in einem einzigen Reaktionsansatz. Eine wichtige Voraussetzung für die Anwendung der Multiplex-PCR ist die eindeutige Zuordnung der Amplifikate aufgrund unterschiedlicher Längen der PCR-Produkte. Die *fucP*-positiven Stämme produzieren Banden von 1,2 kb Fragmentgröße während die *fucP*-negativen Stämme aufgrund einer Deletion im Bereich dieses Genlocus ein Amplifikat von 446 bp Fragmentgröße aufweisen (MURAOKA und ZHANG 2011).

Tabelle 8: Ansatz für die Multiplex-PCR zum Nachweis von *fucP*

Die Angaben in Klammern stellen wieder die Menge für einen ganzen PCR-Ansatz dar. In der Arbeit wurde auch für den Fucose-Nachweis ein halber Ansatz verwendet.

Komponente	Menge in μl
<i>Aqua bidest</i>	17,3 (34,5)
10×PCR-Puffer	2,5 (5)
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0,5 (1)
cj0486FWD	1,0 (2)
cj0486REV	1,0 (2)
<i>rpoC</i>	1,0 (2)
<i>rpsL</i>	1,0 (2)
Taq-DNS-Polymerase	0,25 (0,5)
Template DNS	1,0
Gesamtvolumen	22,5 (45)

Tabelle 9: PCR-Programm für die Multiplex-PCR

(entsprechend MURAOKA u. ZHANG 2011)

	Temperatur	Zeit
Stufe 1		
Anfangsdenaturierung	95 °C	15 min
Stufe 2		
Denaturierung	95 °C	45 sec
Annealing	58 °C	45 sec
Elongation	72 °C	90 sec
	} 25×	
Stufe 3		
Primer Extention	72 °C	10 min
Stufe 4		
Kühlung	4 °C	∞

2.2.5 Nachweis der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese

In der vorliegenden Arbeit wurde die Agarose-Gelelektrophorese zur Darstellung der PCR-Produkte (aus 2.2.1) eingesetzt.

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von DNS-Molekülen entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld. Grundprinzip ist die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld. Die aufgrund der Phosphatgruppen negativ geladenen DNS-Moleküle wandern im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines DNS-Moleküls ist abhängig von dessen Ladung und Größe, der Porengröße des Gels und der angelegten elektrischen Spannung. Kleinere DNS-Moleküle können sich schneller durch die Poren bewegen als Größere. Es entsteht eine Art „Siebeffekt“. Durch Vergleich mit Standard-DNS bekannter Fragmentlänge kann die Größe der DNS-Fragmente nach ausreichender Auftrennung bestimmt werden. Die aufzutrennende DNS wurde vor dem

Auftragen in die Geltaschen mit Ladepuffer, welcher den Farbstoff Bromphenolblau enthält, versetzt. Dadurch wird eine Visualisierung des sonst nicht sichtbaren Gellaufs ermöglicht. Das dem Agarose-Gel zugesetzte Ethidiumbromid interkaliert mit einzelnen Basen der DNS und fluoresziert unter UV-Licht. Der Vorteil der Methode für die Studie liegt in der einfachen Herstellung der Gele, die nach individuellen Anforderungen hergestellt werden können. Allerdings ist dadurch auch ein höherer Zeitbedarf vorhanden.

Versuchsdurchführung

Zur elektrophoretischen Auftrennung der PCR - Produkte wurden 1 % Agarosegele in 1× TAE-Puffer verwendet. Dafür wurden 1,6 g Agarose und 160 ml 1×TAE-Puffer gemischt und in der Mikrowelle zu einer klaren Lösung aufgekocht. Zu dieser Lösung wurden nach Abkühlung 16 µl Ethidiumbromid zugesetzt. Anschließend ist die Lösung in eine Gelkammer mit Kämmen zur Formung der Probetaschen gegossen worden. Nach Auspolymerisation wurden die Kämmen entfernt und das Gel in die Elektrophoreseapparatur gelegt. Anschließend ist das Gel mit 1×TAE-Puffer bedeckt worden. In die Geltaschen wurde die mit Ladepuffer und Farbindikator versetzte DNS pipettiert. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurde zudem ein geeigneter Längenstandard in die erste Spur je Reihe geladen. Bei einer konstanten Spannung von ca. 150 V bei einer Laufzeit von etwa 45 min erfolgte dann die Elektrophorese. Nach ausreichender Auftrennung der Fragmente wurden die Banden unter dem UV-Tisch sichtbar gemacht und das Ergebnis photographisch dokumentiert.

2.2.6 *Multilocus-Sequenz-Typing (MLST)*

MLST ist ein molekularbiologisches Verfahren zur Typisierung von Bakterienstämmen oder anderen Mikroorganismen mittels Sequenzierung von internen Fragmenten verschiedener *Housekeeping*-Gene (MAIDEN *et al.* 1998). In erster Linie wurde MLST für weltweit vergleichbare epidemiologische Studien und zur epidemiologischen Überwachung entworfen. MLST ermöglicht Laboratorien eine einfache und schnelle Typisierung von Bakterienstämmen durch die Sequenzierung der *Housekeeping*-Gene und deren Vergleich mit bereits MLST-typisierten Referenzstämmen (URWIN und MAIDEN 2003).

Zur MLST-Typisierung von *C. jejuni* wählten DINGLE *et al.* (2001) nachfolgende sieben *Housekeeping*-Gene (Tabelle 2): *aspA* (Aspartat-Ammonium-Lyase), *glnA* (Glutaminsynthetase), *gltA* (Citrat-Synthetase), *glyA* (Serin-Hydroxy-Methyltransferase), *pgm* (Phosphoglycerat-Mutase), *tkt* (Transketolase) und *uncA* (ATP-Synthase).

Die untersuchten Genloci sind weitestgehend konservierte Regionen, weisen aber dennoch eine gewisse Variabilität auf. Diese Sequenzvarianten dienen zur Unterscheidung verschiedener Isolate auf Subspeziesebene und können bestimmten Sequenztypen bzw. sogenannten klonalen Komplexen (CC) zugeordnet werden. Je nach Sequenz des Gen-Abschnittes wird jedem Genlocus eine Allelnummer zugeordnet. Auf diese Weise erhält ein typisiertes Isolat gemäß der Kombination der Allelnummern der 7 Genloci einen Sequenztyp.

Auf der Onlinedatenbank: <http://pubmlst.org/campylobacter>, entwickelt von Keith Jolley und Man-Suen Chan, erfolgt zentral die Vergabe von Allelnummern für spezifische Sequenzen und deren Zuordnung zu spezifischen Sequenztypen.

Tabelle 10: Primer für die Sequenzierung zur *C. jejuni*-MLST-Typisierung

(als Referenz diente die Publikation von DINGLE *et al.* 2001)

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
<i>aspA-F-S</i>	CCA ACT GCA AGA TGC TGT ACC
<i>aspA-R-S</i>	TTA ATT TGC GGT AAT ACC ATC
<i>glnA-F-S</i>	CAT GCA ATC AAT GAA GAA AC
<i>glnA-R-S</i>	TTC CAT AAG CTC ATA TGA AC
<i>gltA-F-S</i>	GTG GCT ATC CTA TAG AGT GGC
<i>gltA-R-S</i>	CCA AAG CGC ACC AAT ACC TG
<i>glyA-F-S</i>	AGC TAA TCA AGG TGT TTA TGC GG
<i>glyA-R-S</i>	AGG TGA TTA TCC GTT CCA TCG C
<i>pgm-F-S</i>	GGT TTT AGA TGT GGC TCA TG
<i>pgm-R-S</i>	TCC AGA ATA GCG AAA TAA GG
<i>tkt-F-S</i>	GCT TAG CAG ATA TTT TAA GTG
<i>tkt-R-S</i>	ACT TCT TCA CCC AAA GGT GCG
<i>uncA-F-S</i>	TGT TGC AAT TGG TCA AAA GC
<i>uncA-R-S</i>	TGC CTC ATC TAA ATC ACT AGC

3 Ergebnisse

3.1 Überblick

Im Zuge dieser Arbeit wurden 266 *C. jejuni*-Isolate (Tab. 13 Anhang) durch Screening auf die Präsenz von zehn Virulenz-assoziierten Markergenen: *cj1321-1326*, *ciaB*, *cdtB*, *fucP*, *cj0178/cj0755*, *ceuE*, *pldA* und *cstII/cstIII* charakterisiert.

Bei Betrachtung der Ergebnisse lässt sich feststellen, dass *ciaB* in 100 % der Isolate präsent und somit auch der häufigste Genmarker innerhalb der 266 Isolate ist. Gefolgt von *cdtB* mit 99,6 % (265 / 266).

Den Sechs-Gen-Komplex *cj1321-1326* zur Flagellin-*O*-Glykolisierung findet man in 63,9 % (170/266), *fucP* in 57,9 % (154 / 266), *cj0178* in 76,7% (204 / 266) und *cj0755* in 78,2 % (208 / 266) der Isolate. Des Weiteren wurde in 87,2 % (232 / 266) *ceuE* nachgewiesen und in 86,1 % (229 / 266) *pldA*. Die Ergebnisse für *pldA* und *ceuE* beziehen sich hier ausschließlich auf die Nutzung von Primern basierend auf der Genomsequenz von *C. jejuni* NCTC 11168. In den für NCTC 11168-Primer-negativen Isolaten sind *pldA* und *ceuE* jedoch mit Primern basierend auf der Genomsequenz von *C. jejuni* 81-176 detektierbar, so dass hier also nur das in NCTC 11168 vorkommende Allel erfasst wurde. Die Marker für die Lipooligosaccharid-Sialyltransferase *cstII* sind in 53,4 % (142 / 266) und für *cst III* in 30,8 % (82 / 266) der Isolate präsent.

Abbildung 3 veranschaulicht die Ergebnisse zur Häufigkeitsverteilung der Markergene innerhalb der Isolatsammlung. Die Ergebnisse sind außerdem in Tabelle 11 dokumentiert.

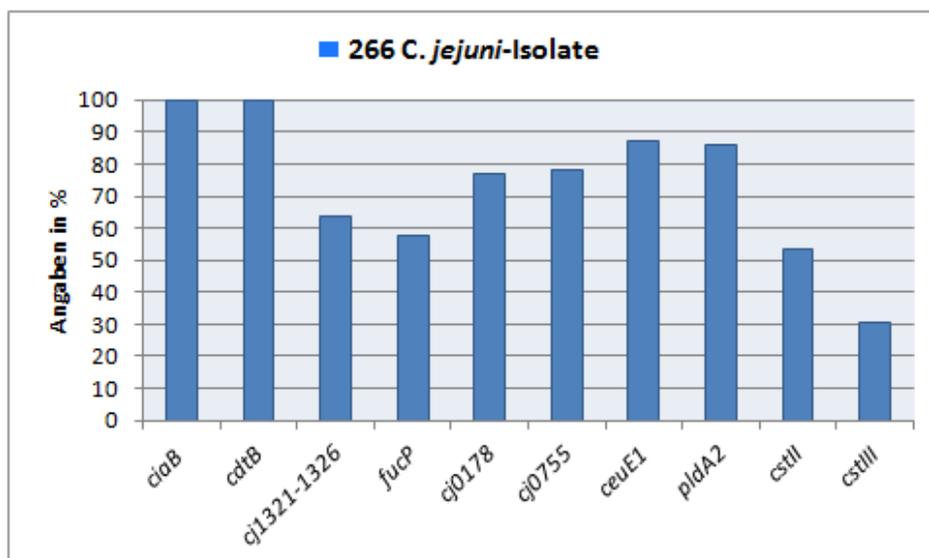


Abb. 3: Verteilung der 10 genetischen Marker

Innerhalb aller untersuchten 266 *C. jejuni*-Isolate.

*ceuE*¹ basierend auf der Genomsequenz von Stamm NCTC 11168

*pldA*² basierend auf der Genomsequenz von Stamm NCTC 11168

3.2 Definition von Gruppen

Bereits 2011 wurde die Existenz von sechs *C. jejuni*-Gruppen (neun Untergruppen) durch Kombination von MLST mit sechs genetischen Markern demonstriert (ZAUTNER *et al.* 2011). Nach dem PCR-Test auf weitere zehn, zuvor in dieser Arbeit beschriebene, genetische Marker fällt insgesamt auf, dass zwei große *C. jejuni*-Gruppen unterschieden werden können. Vor allem die genetischen Marker *cj1321-1326*; *fucP*; *cj0178* und *cj0755* splitten die Testpopulation in 2 Hauptgruppen (Gruppe 1 und 2) und 7 Untergruppen.

Die erste Gruppe besteht aus Isolaten, die positiv für die Gene *cj1321-1326*, *fucP*, *cj0178* und *cj0755* sind. Diese vier Gene sind weitestgehend miteinander assoziiert. Diese erste große Gruppe setzt sich aus den Untergruppen 1a und 1b zusammen. Innerhalb der Teilgruppe 1b lassen sich noch 3 Untergruppen differenzieren (1b^{*}, 1b^{**}, 1b^{***}).

Gruppe 1b^{*} und 1b^{**} unterscheiden sich im Auftreten der Gene *cstII* und *cstIII*. Während 1b^{*} zu 84,1 % *cstIII*-positive Isolate einschließt, finden sich in Gruppe 1b^{**} zu 97,4 % nur *cstII*-positive Isolate (Tabelle 11). Untergruppe 1b^{***} zeichnet sich dadurch aus, dass im Vergleich zu Gruppe 1b^{*} und 1b^{**} deutlich weniger Isolate PCR-positiv auf *cj1321-1326* und *fucP*

getestet wurden (Tab.11). Die überwiegenden MLST-CC in Gruppe 1 sind CC 21, 206 und 48. Mit 135 der gesamt 266 getesteten Isolate enthält diese Gruppe auch die größte Anzahl an Isolaten.

Die zweite große Isolatgruppe zeigt sich negativ für die Gene *cj1321-1326*, *fucP*, *cj0178* und *cj0755*. In dieser 51 Isolate umfassenden Gruppe finden sich nur Isolate aus den MLST-CC 22, 42, 45 und 283. Allerdings überwiegt MLST-CC 45 mit 58,8 %.

Die Gruppe kann in die Untergruppen 2a und 2b gespalten werden. Die Unterteilung ergibt sich aus der Beobachtung, dass in Gruppe 2a 94,1 % (16/17) der Isolate *cstIII*-positiv sind, während in Gruppe 2b 86,0 % der Isolate keine Lipooligosaccharid-Sialyltransferase besitzen. Folglich sind nur 14,0 % (5/34) der Isolate *cstIII*-positiv und alle 34 Isolate aus Gruppe 2b *cstIII*-negativ.

Gruppe 3 setzt sich aus 52 Isolaten zusammen, die größtenteils den MLST-CC 61, 52, 443 und 353 angehören. Die Isolate dieser Gruppe sind mehrheitlich *cstIII*-positiv (Tab.11). Ein Teil der Gruppe 3a-Isolate ist zwar *cj1321-1326*-positiv, aber im Gegensatz zu Gruppe 1 zu 90,0 % *fucP*-negativ. Anhand der *fucP*-Präsenz erfolgt eine Untergliederung der Gruppe 3a in die Untergruppen 3a* (*fucP*⁺) und 3a** (*fucP*⁻, Tab.11).

Die Gruppen 4, 5 und 6 bestehen aus maximal 9 Isolaten und sind damit vergleichsweise klein (Tabelle 11). Auffallend ist, dass alle 3 Gruppen zu 100 % *cstIII*-negativ getestet wurden. Zudem ist auch weniger als die Hälfte der Isolate (42,9 %) *cstIII*-positiv. Somit ist der Großteil der 21 Isolate aus Gruppe 4, 5 und 6 für die Lipooligosaccharid- Sialyltransferase-Isoenzyme II und III negativ.

Gruppe 6 imponiert innerhalb dieser 3 kleineren Gruppen dadurch, dass alle 9 Isolate (CC 257) *fucP*⁺ getestet wurden, wohingegen nur 33,3 % dieser Isolate für den Gencluster *cj1321-1326* positiv getestet worden sind.

Zusammenfassend lassen sich alle 266 Isolate je nach An- und Abwesenheit der zehn genetischen Marker in 9 Gruppen unterteilen: 1a; 1b; 2a; 2b; 3a; 3b; 4; 5 und 6. Das heißt sechs Hauptgruppen (1, 2, 3, 4, 5, 6) und neun Untergruppen (1a, 1b*, 1b**, 1b***, 2a, 2b, 3a*, 3a** und 3b). Die mit Asterisk (*) markierten Gruppen stellen Untergruppen dar, die aufgrund der An- oder Abwesenheit einzelner Marker eine weitere Unterteilung sinnvoll erscheinen

lassen. Unter Einbeziehung der mit Asterisk gekennzeichneten Gruppen ergeben sich dadurch zwölf Gruppen: 1a, 1b*, 1b**, 1b***, 2a, 2b, 3a*, 3a**, 3b, 4, 5 und 6.

Tabelle 11 dokumentiert die Resultate der PCRs und die Verteilung der genetischen Marker, sowie LLC- und MLST-CC- Zugehörigkeit entsprechend der Gruppen. Überdies ist in der letzten Spalte der Anteil an menschlichen Isolaten innerhalb der Gruppe dargestellt.

Abbildung 4 verbildlicht mittels einer Gesamtübersicht über die Verteilung der genetischen Marker - innerhalb der definierten Gruppen - die Ergebnisse.

Unter- gruppe	<i>genetische Marker</i>									Herkunft ^b
	<i>cj1321-1326</i>	<i>fucP</i>	<i>cj0178</i>	<i>cj0755</i>	<i>ceuE</i> ¹	<i>pldA</i> ²	<i>cstII</i>	<i>cstIII</i>	CC ^a	
1a	X	X	X	X	X	X		X	21	m;h;p;r
1b*	X	X	X	X	X	X		X	21, 206	m;h;p;r
1b**	X	X	X	X	X	X	X		48, 206	m;h;p;r
1b***			X	X	X	X			49, 446	m;p;h
2a							X		22, 42	m;h;r
2b									45, 283	m;h;p;r
3a*	X	X	X	X			X		52, 443, 828	m;p;h
3a**	X		X	X	X		X		353, 354,	m;p;h
3b			X	X	X		X		61	m;p;r
4					X		X		1034, 1332	m;p;h
5			X	X	X	X			none	m;h
6		X	X	X	X	X			257	m;p;h

Abb. 4: Verteilung der genetischen Marker, MLST-CC-Zuordnung und Isolat-Herkunft

Innerhalb der zuvor definierten sechs Haupt- und neun Untergruppen.

„x“ symbolisiert ein überdurchschnittliches Vorhandensein des genetischen Markers

^a CC-klonaler Komplex, ^b m-Mensch, h-Huhn, p-Pute, r-Rind

¹ basierend auf Primern der Genom-Sequenz von NCTC 11168

² basierend auf Primern der Genom-Sequenz von NCTC 11168

Die Gruppen 2, 3 und 4 umfassen signifikant weniger positive Isolate für die Gene *pldA* und *ceuE*, die sich mit den Primerpaaren, basierend auf der NCTC 11168-Genomsequenz, amplifizieren ließen, und sind darum nicht mit einem X gekennzeichnet. Mit Primern, basierend auf der *C. jejuni*-81-176-Genomsequenz, waren *pldA* und *ceuE* allerdings auch in den 11168-Primer-PCR-negativen Isolaten nachweisbar. *CiaB* und *cdtB* wurden ubiquitär in allen Isolaten nachgewiesen und sind deshalb zur besseren Übersicht in Abb. 4 nicht aufgeführt.

Tabelle 11: Verteilung der genetischen Marker, LLC und MLST-CC ⁺

Untergruppe	<i>ciaB</i>	<i>cdtB</i>	<i>cj1321-1326</i>	<i>fulP</i>	<i>cj0178</i>	<i>cj0755</i>	<i>ceuE</i> ¹	<i>pldA</i> ²	<i>cstII</i>	<i>cstIII</i>	LLC ³	CC ⁴	Mensch
1a	38/38 █(100)	38/38 █(100)	38/38 [#] █(100)	13/38 [°] (34.2)	33/38 [#] (86.4)	C/A	21	16/38(42,1)					
1b*	44/44 █(100)	44/44 █(100)	43/44 [#] (97.7)	44/44 [#] █(100)	44/44 [#] █(100)	44/44 [#] █(100)	42/44 [°] (95.5)	41/44 (93.2)	16/44 [°] (36.4)	37/44 [#] (84.1)	C/A/B	21, 206	19/44(42,2)
1b**	38/38 █(100)	38/38 █(100)	38/38 [#] █(100)	36/38 [#] (94.7)	37/38 [#] (97.4)	38/38 [#] █(100)	35/38 (92.1)	37/38 [°] (97.4)	37/38 [#] (97.4)	2/38 [#] (5.3)	B2	48, 206	19/38(50,0)
1b***	15/15 █(100)	15/15 █(100)	7/15 (46.7)	5/15 [°] (33.3)	15/15 [#] █(100)	15/15 [#] █(100)	14/15 [#] (93.3)	15/15 [#] █(100)	6/15 (40.0)	0/15 [#] (0.0)	B, D	49, 446	9/15(60)
2a	17/17 █(100)	17/17 █(100)	2/17 [#] (11.8)	0/17 [#] (0.0)	0/17 [#] (0.0)	3/17 [#] (17.6)	12/17 (70.6)	14/17 (82.4)	16/17 [#] (94.1)	1/17 [#] (5.9)	A1/B	22, 42	8/17(47,1)
2b	34/34 █(100)	34/34 █(100)	3/34 [#] (8.8)	1/34 [#] (2.9)	1/34 [#] (2.9)	1/34 [#] (2.9)	26/34 [°] (76.5)	29/34 (85.3)	5/34 [#] (14.7)	0/34 [#] (0.0)	D/E/H/U	45, 283	22/34[°](64,7)
3a*	22/22 █(100)	21/22 (95.5)	15/22 (68.2)	18/22 [°] (81.8)	22/22 [#] █(100)	22/22 [#] █(100)	18/22 (81.8)	18/22 (81.8)	18/22 [#] (81.8)	1/22 [#] (4.5)	-	52, 443, 828	15/22[°](68,2)
3a**	19/19 █(100)	19/19 █(100)	16/19 [°] (84.2)	2/19 [#] (10.5)	19/19 [#] █(100)	19/19 [#] █(100)	18/19 [#] (94.7)	11/19 (57.9)	12/19 (63.2)	7/19 (36.8)	E	353, 354,	4/19 [°] (21,1)
3b	11/11 █(100)	11/11 █(100)	2/11 [°] (18.2)	0/11 [#] (0.0)	11/11 [#] █(100)	11/11 [#] █(100)	10/11 (90.9)	8/11 (72.7)	10/11 [°] (90.9)	1/11 [°] (9.1)	-	61	3/11(27,3)
4	8/8 █(100)	8/8 █(100)	3/8 (37.5)	0/8 [#] (0.0)	1/8 [#] (12.5)	0/8 [#] (0.0)	7/8 (87.5)	6/8 (75.0)	5/8 (62.5)	0/8 [#] (0.0)	-	1034, 1332	2/8(25,0)
5	4/4 █(100)	4/4 █(100)	0/4 [#] (0.0)	1/4 (25.0)	4/4 [#] █(100)	4/4 [#] █(100)	4/4 [#] █(100)	4/4 [#] █(100)	2/4 (50.0)	0/4 [#] (0.0)	-	none	1/4(25,0)
6	9/9 █(100)	9/9 █(100)	3/9 (33.3)	9/9 [#] █(100)	9/9 [#] █(100)	9/9 [#] █(100)	8/9 (88.8)	8/9 (88.8)	2/9 [°] (22.2)	0/9 [#] (0.0)	A/D	257	7/9(77,8)
alle	266/266 █(100)	265/266 (99.6)	170/266 (63.9)	154/266 (57.9)	204/266 (76.7)	208/266 (78.2)	232/266 (87.2)	229/266 (86.1)	142/266 (53.4)	82/266 (30.8)	all	all	128/266(48,1)

⁺ innerhalb der definierten Gruppen

¹ negative Isolate nachweisbar mit dem Vorwärtsprimer basierend auf der Genom-Frequenz von 81-176: 5'-GATAGAGTCGCAGGCGTTCC -3'

² negative Isolate nachweisbar mit dem Vorwärtsprimer basierend auf der Genom-Frequenz von 81-176: 5'-AAACTTATGCGTTTTT -3'

³ Lipooligosaccharid Locus Klasse (LOS) entsprechend HABIB *et al.* 2009, HOTTER *et al.* 2010, REVEZ *et al.* 2011

⁴ Klonale Komplexe (CC) nach MLST-Typisierung entsprechend ZAUTNER *et al.* 2011

[°] p<0,05 / [#] p<0,001 im Vergleich zu den Isolaten, die nicht zur entsprechenden Gruppe gehören

Die letzte Spalte der Tabelle gibt an, wie viele Isolate der entsprechenden Gruppe menschlichen Ursprungs sind, in Klammern Angaben in Prozent.

3.3 Verteilung der Marker innerhalb der definierten Gruppen

Alle zehn geprüften genetischen Marker (Tab.1, Kapitel 2.1.2), abgesehen vom genetischen Marker *pldA*, zeigen in ihrer Verteilung innerhalb der Gruppen signifikante Unterschiede.

Die Signifikanz innerhalb der Gruppen wurde im Vergleich zu den Isolaten, die nicht zur entsprechenden Gruppe gehören, mittels t-Test ermittelt. Innerhalb der Gruppen zeigen sich vereinzelte nicht signifikante Unterschiede, aber der Großteil der Isolate hat eine signifikante Verteilung innerhalb der Gruppen. Die ermittelten p-Werte sind in Tabelle 12 zusammengestellt.

Tabelle 12 : Ergebnisse des t-Test

Ermittelt durch einen t-Test zur Bestimmung der Signifikanz der genetischen Marker innerhalb der Gruppen im Vergleich zu den nicht zur Gruppe gehörigen Isolaten. Felder ohne farbige Markierung entsprechen $p > 0,05$ (kein signifikanter Unterschied), grüne Felder $p < 0,05$ (signifikanter Unterschied) und hellblaue Felder $p < 0,001$ (hoch signifikanter Unterschied).

	cj1321/26	fucP	ceuE	pldA	cstII	cstIII	cj0178	cj0755
1a	0,00000	0,00000	0,00001	0,00000	0,00543	0,00000	0,00000	0,00000
1b*	0,00000	0,00000	0,03534	0,54285	0,00655	0,00000	0,00000	0,00000
1b**	0,00000	0,00000	0,92702	0,02655	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
1b***	0,16596	0,05236	0,00001	0,00000	0,24747	0,00000	0,00000	0,00000
2a	0,00000	0,00000	0,05814	0,35506	0,00000	0,00044	0,00000	0,00000
2b	0,00000	0,00000	0,04455	0,43026	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
3a*	0,77849	0,01013	0,00001	0,52005	0,00333	0,00000	0,00000	0,00000
3a**	0,03673	0,00000	0,00001	0,09266	0,47935	0,58713	0,00000	0,00000
3b	0,00229	0,00000	0,86244	0,20851	0,00208	0,03485	0,00000	0,00000
4	0,16230	0,00000	0,69549	0,34952	0,69902	0,00000	0,00098	0,00000
5	0,00000	0,26132	0,00001	0,00000	0,86546	0,00000	0,00000	0,00000
6	0,08327	0,00000	0,74875	0,00000	0,04971	0,00000	0,00000	0,00000

Nachfolgend wird die Verteilung der genetischen Marker *ciaB*, *cdtB*, *cj1321-1326*, *fucP*, *cj0178*, *cj0755*, *ceuE*, *pldA* und *cstII/cstIII* innerhalb der definierten Gruppen detaillierter dargestellt.

3.3.1 *Campylobacter*-Invasions-Antigen und Zytolethales distendierendes Toxin

Die Gene *ciaB* und *cdtB* werden innerhalb der Testpoulation als ubiquitär betrachtet.

Während *ciaB* in allen Subpopulationen gefunden wurde, fehlte *cdtB* nur in einem einzigen Isolat der Gruppe 3a*. Demzufolge sind 100 % der 266 Isolate *ciaB*-positiv und 99,6 % der Isolate *cdtB*-positiv.

3.3.2 Gencluster zur Flagellin-*O*-Glykolisierung

Der Gencluster zur Flagellin-*O*-Glykolisierung konnte in der Mehrzahl der Isolate der Gruppen 1a, 1b und 3a detektiert werden.

Jedoch sind in der 15 Isolate umfassenden Untergruppe 1b*** (CC 49 und 446) nur 7 von 15 Isolaten (46,7 %) positiv für diesen Marker. Darüber hinaus ist ein Teil der Isolate aus Gruppe 4 (37,5 % ,3/8) und aus Gruppe 6 (33,3 % ,3/9) *cj1321-1326* PCR-positiv.

In Gruppe 5 sind alle vier zugehörigen Isolate negativ für diesen Gencluster. Insgesamt konnte der Marker in den Gruppen 2a, 2b, 3b und 5 signifikant seltener eruiert werden als in den Gruppen 1a, 1b und 3a. Lediglich in den Gruppen 1b***; 3a*; 4 und 6 sind die Unterschiede nicht signifikant ($p > 0,05$, Abb.5).

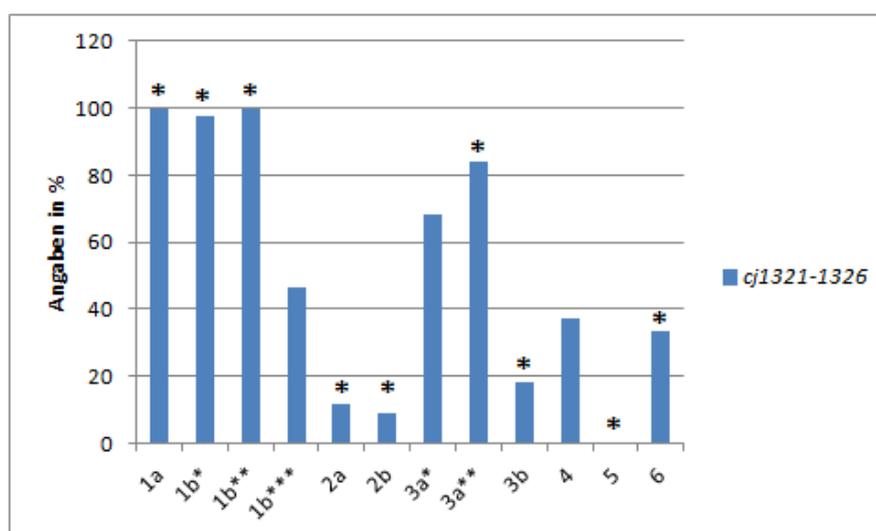


Abb. 5: Verteilung des genetischen Markers *cj1321-1326* innerhalb der definierten Gruppen,* Ergebnis signifikant ($p < 0,05$)

3.3.3 L-Fucose-Permease

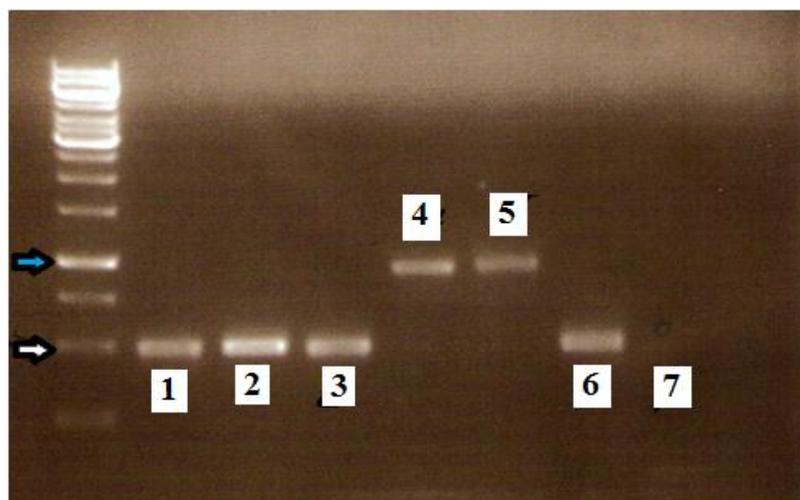


Abb. 6: Photographische Dokumentation einer Gel-Elektrophorese

Darstellung der Multiplex-PCR-Produkte einer Testreihe. Auf der linken Seite der Abbildung sieht man die Auftrennung des Nukleinsäuren-Längenstandards ("GenRuler™ 1kb Plus DNA Ladder"). Der weiße Pfeil markiert eine Fragmentgröße von 500 bp und der blaue Pfeil von 1000bp. Die Zahlen markieren die aufgetrennte DNS verschiedener Isolate: 1- BfR3551, 2- bovC246, 3-BfR3885, 4-bovC539, 5-bovC405, 6-A28, 7-negativ Kontrolle (Isolate entsprechend ihrer Bezeichnung in Tabelle 12; siehe Anhang). Da zum Nachweis des *fucP*-Gens eine Multiplex-PCR eingesetzt wurde, weisen die Banden unterschiedlich große, aber eindeutig zuordenbare, Amplifikatlängen auf. Die *fucP*-positiven Stämme produzieren Banden von 1,2kb Fragmentgröße, während die *fucP*-negativen Stämme, entsprechend einer Deletion des Genclusters, Amplifikte von 446bp aufweisen (MURAOKA und ZHANG 2011). Demzufolge ist die aufgetrennte DNS der Isolate 4 und 5 auf der Abbildung *fucP*-positiv (Banden oberhalb einer Höhe von 1000bp) und die anderen *fucP*-negativ.

Für das L-Fucose-Permease-Gen *fucP* konnte ein vergleichbares Verteilungsmuster unter den Subgruppen wie für den Marker zur Flagellin-*O*-Glykolisierung aufgezeigt werden (Abb.7). Die Isolate der Gruppen 1a, 1b* und 6 sind zu 100 % positiv für *fucP*. Nur in Gruppe 6 sind 100 % der Isolate für *fucP* positiv, aber lediglich 33,3 % für *cj1321-1326* (wie zuvor beschrieben). In der Gruppe 1b** sind 94,7 % (36/38) positiv für *fucP*, d.h. nur 2 der 38 Isolate sind im PCR-Test *fucP*-negativ. Die kleine Untergruppe 1b***, bestehend aus CC 49- und CC 446- Isolaten, bildet auch hier eine Ausnahme. Lediglich 5 der 15 Isolate (33,3 %) dieser Gruppe sind *fucP*-positiv. Zudem fehlt das Gen fast durchgängig in den Gruppen 2a/b, 3a**(2/19); 3b; 4 und 5.

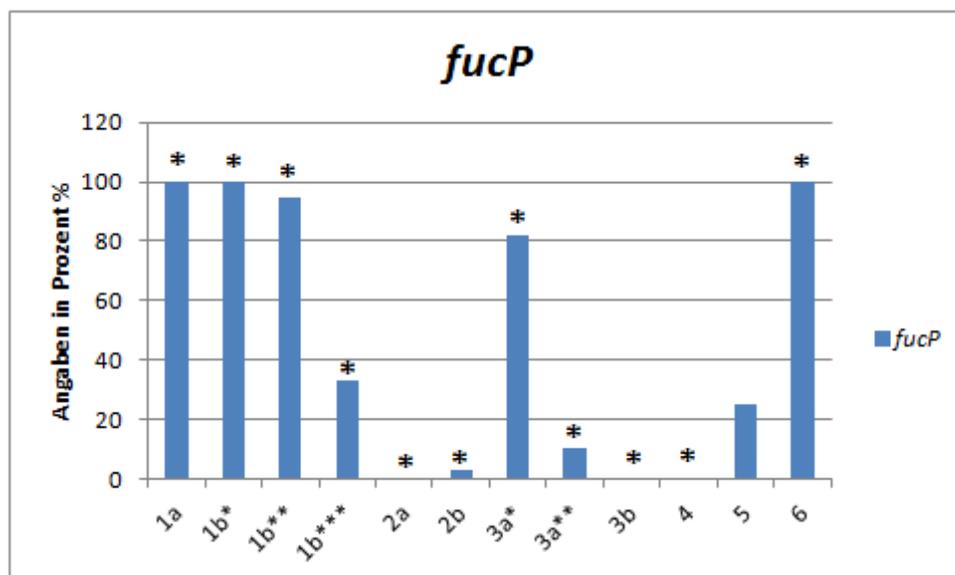


Abb. 7: Darstellung der Verteilung des L-Fucose-Permease-Gens *fucP*

innerhalb der *C. jejuni*-Gruppen, * Ergebnis signifikant ($p < 0,05$)

3.3.4 Enterochelin-Aufnahmeprotein und Phospholipase A der äußeren Membran

Ebenfalls wurde in der Arbeit die Präsenz der Gene *ceuE* und *pldA* mittels Polymerasenkettenreaktion überprüft. Zunächst wurden die Isolate mit *ceuE*-Primern und *pldA*-Primern, basierend auf der *C. jejuni*-NCTC 11168 Genomsequenz, wie in der Arbeit von FEODOROFF *et al.* (2010) dargestellt, untersucht (siehe 2.1.2, Tab. 1).

In den Subpopulationen 1a und 5 waren jeweils 100 % der Isolate *ceuE*-positiv und in den Gruppen 1b***, 3a*, 3b, 4 und 6 wurde die 100 % *ceuE*-Positivitätsrate aufgrund jeweils einzelner *ceuE*-negativer Isolate verfehlt. Nur in Gruppe 2 waren signifikant deutlich mehr Isolate negativ für *ceuE*, bei ausschließlicher Nutzung des Primerpaares basierend auf der NCTC 11168-Genomsequenz..

In der Subpopulation 2a waren 70,6 % (12/17) der Isolate für diesen Marker positiv. In Gruppe 2b fand sich eine ähnliche Verteilung mit 76,5 % positiven Isolaten (26/34). In Gruppe 3a* waren mehr Isolate positiv als in Gruppe 2 (18/22). Dennoch fanden sich hier mit 81,8 % weniger *ceuE*-positive Isolate als in den Gruppen 1, 3a**, 3b, 4, 5 und 6.

Für das Markergen *pldA* konnten nur in den Gruppen 1a, 1b^{***} und in Gruppe 5 zu 100 % positive Isolate nachgewiesen werden. In den anderen Subpopulationen blieben immer einige Isolate mit den vom NCTC 11168-Genom abgeleiteten Primern negativ (Tabelle 11).

Die mit den von NCTC 11168-abgeleiteten Primern *ceuE*- und *pldA*-negativen Isolate wurden zusätzlich mit den jeweiligen Primerpaaren basierend auf dem *C. jejuni* 81-176-Genom untersucht. In allen diesen Isolaten, die i.d.R. eine phylogenetisch größere Nähe zu *C. jejuni* 81-176 aufweisen als zu *C. jejuni* NCTC 11168, konnten unter Nutzung dieser Methode beide Markergene nachgewiesen werden.

D. h. unter ausschließlichem Gebrauch der NCTC 11168-Primer konnte nur für die Gruppe 2-Isolate eine signifikant (24,0 %, $p < 0,002$) geringere Präsenz des NCTC-11168-*ceuE*-Allels festgestellt werden.

Allerdings konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Isolate-Gruppen bezüglich der *pldA*-Allele festgestellt werden.

3.3.5 Eisenaufnahmesysteme

Des Weiteren wurde die Präsenz der Markergene *cj0178* (kodiert einen Siderophore-Rezeptor der äußeren Membran) und *cj0755* (ein Eisenaufnahmeprotein) in der Testpopulation untersucht.

Grundsätzlich konnten beide Gene in mehr als 76 % der Isolate nachgewiesen werden, meist in Assoziation miteinander. In den Gruppen 1a, 1b^{*}, 3a^{*}, 3a^{**}, 3b, 5 und 6 waren 100 % der Isolate für beide Gene positiv. Ähnliches gilt für die Gruppe 1b^{*}, in der nur ein Isolat von 38 Isolaten für *cj0178* negativ war, während für *cj0755* 38 von 38 Isolaten (100 %) positiv getestet worden.

In Gruppe 2a sind alle Isolate für den Marker *cj0178* negativ, während 3 von 17 Isolaten *cj0755*-positiv waren. In Gruppe 2b sind bis auf ein *cj0178*⁺/*cj0755*⁺-Isolat alle Isolate negativ auf beide genetischen Marker.

Ähnlich ist die Verteilung in Gruppe 4. Dort ist lediglich ein Isolat (von insgesamt acht) *cj0178*-positiv, wobei alle Gruppe 4-Isolate negativ für *cj0755* sind.

In den Gruppen 2a, 2b und 4 wurden die Eisenaufnahme-Marker nur vereinzelt gefunden. Allerdings waren etwa 100 % der Isolate der übrigen Gruppen positiv für beide Gene.

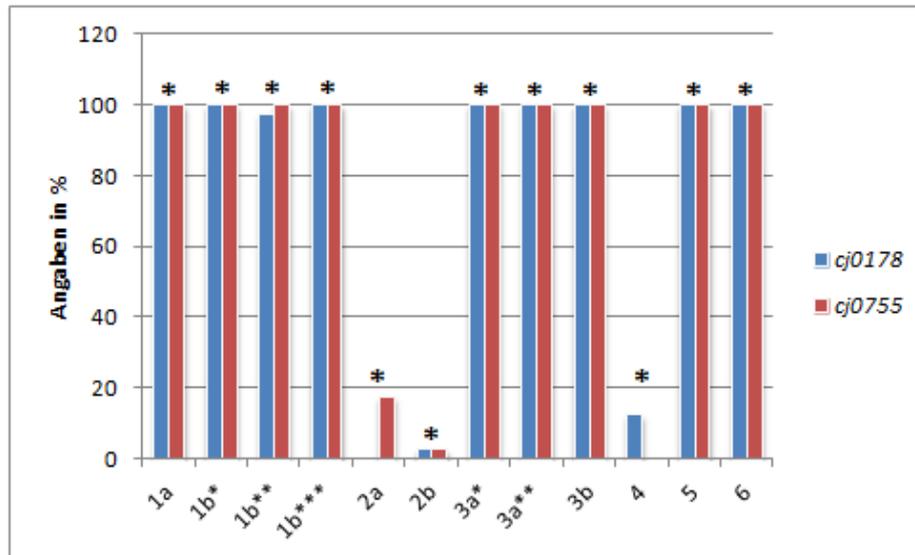


Abb. 8: Verteilung der Marker *cj0178* und *cj0755*

innerhalb der *C. jejuni*-Gruppen, * Ergebnis signifikant ($p < 0,05$)

3.3.6 Marker für die Lipooligosaccharid-Sialyltransferase

Vor dem Hintergrund Isolate mit sialyliertem LOS von solchen ohne sialyliertem LOS zu unterscheiden, wurden die Gene *cstII* und *cstIII* in das Markergenpanel eingeschlossen. Es gibt bereits detaillierte Studien (HABIB *et al.* 2009, HOTTER *et al.* 2010, REVEZ *et al.* 2011) die MLST-CC mit verschiedenen LOS-Klassen assoziieren. Dass ermöglicht eine Verbindung zwischen einer bestimmten Isolat-Gruppe mit einer spezifischen LOS-Klasse, allein basierend auf MLST-CC und der Information über die Ab- oder Anwesenheit von *cstII* und *cstIII* (Gruppe und zugeordnetes LLC finden sich in Tabelle 11) zu ziehen.

Isolate der Gruppe 1a und 1b* konnten mehrheitlich positiv auf *cstIII* getestet werden, aber auch *cstII*-positive Isolate finden sich in den beiden Gruppen. Die Untergruppe 1b**, die CC 48 und CC 206 Isolate beinhaltet, ist fast ausschließlich *cstII*-positiv (37/38). Lediglich 2 von 38 Isolaten dieser Gruppe sind *cstIII*-positiv. In der kleinen Untergruppe 1b*** (beinhaltet 15 Isolate der klonalen Komplexe CC 44 und CC 446) finden wir zu 40 % *cstII*-positive aber durchgängig *cstIII*-negative Isolate. Unter den Gruppe 3-Isolaten befinden sich mehr *cstII*-positive als *cst III*-positive Isolate.

Die Gruppen 4, 5 und 6 sind zum größten Teil für beide Marker negativ getestet worden.

23 Isolate der insgesamt 266 Isolate umfassenden Testpopulation konnten auf beide genetischen Marker positiv getestet werden. Die Mehrheit der doppelt-positiven Isolate befindet sich in Gruppe 1 (15 %, 20/135) und gehört dem klonalen Komplex CC 21 an.

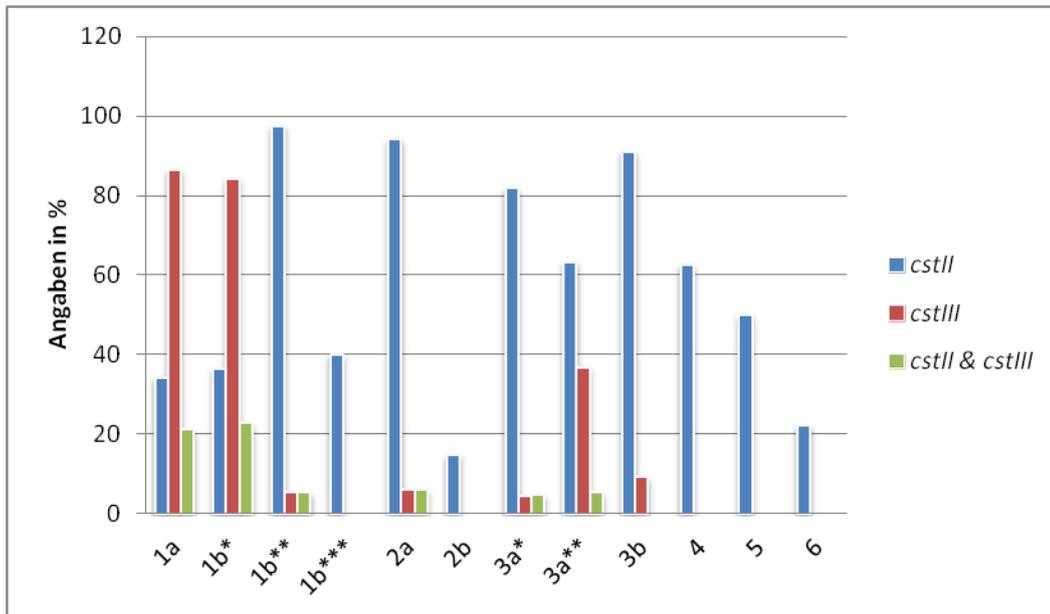


Abb. 9: Verteilung von *cstII*, *cstIII* & *cstII/cstIII* innerhalb der Gruppen

Häufigkeitsverteilung unter den verschiedenen *C. jejuni*-Isolate-Gruppen.

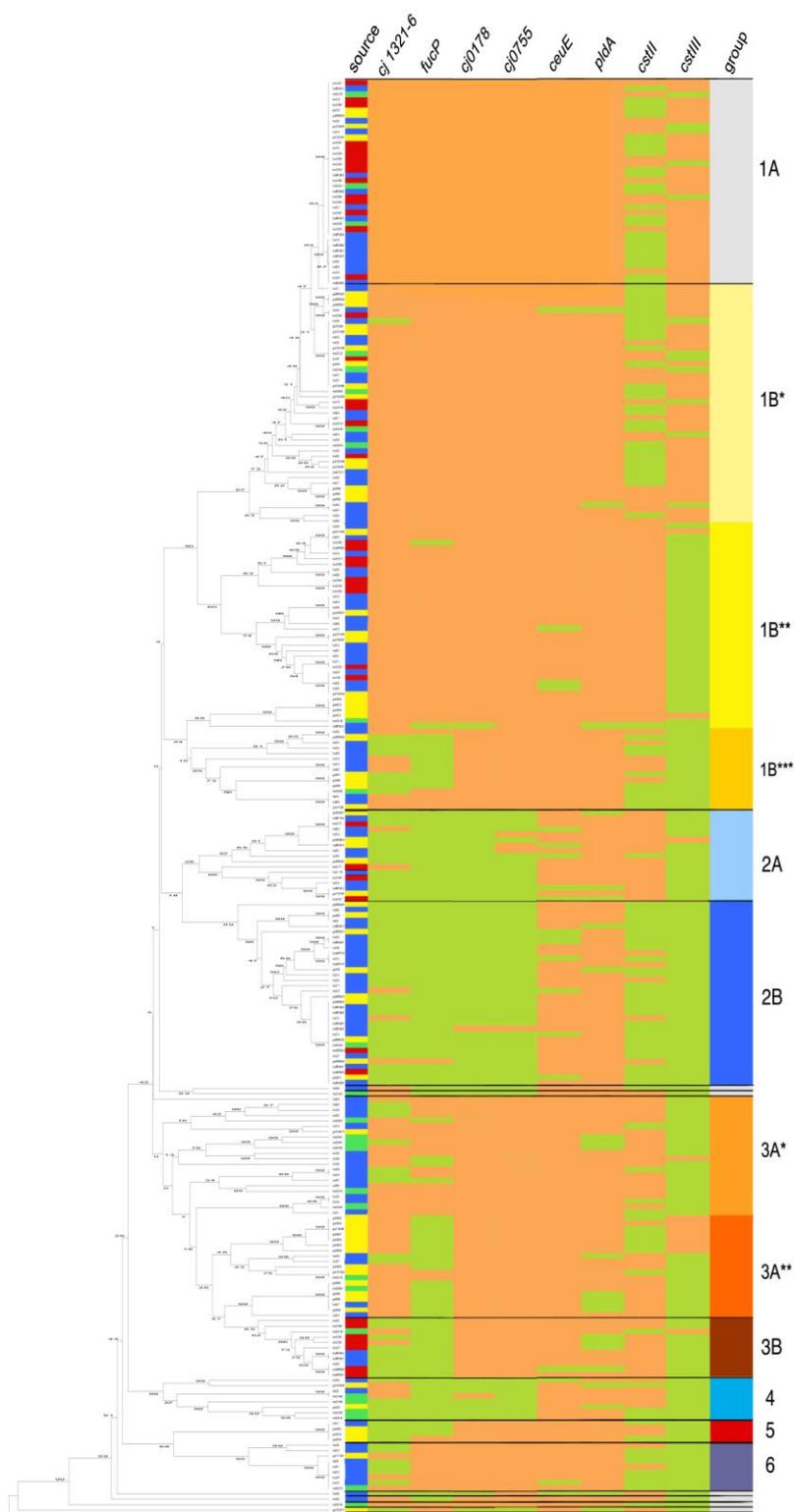


Abb. 10: MLST-sequenzbasierter UPGMA-Baum (Erläuterung Folgeseite kursiv)

Verteilung der acht Markergene innerhalb der sechs festgelegten Gruppen (zwölf Untergruppen).

Auf der linken Seite wird der MLST-sequenzbasierte UPGMA-Baum der 266 Isolate abgebildet. Die Nummern an den Zweigen des Baumes geben die phylogenetische Verwandtschaft an. Auf der rechten Seite der Tabelle sind alle Isolate entsprechend Isolat-Quelle, An- oder Abwesenheit des genetischen Markers und Zugehörigkeit zu einer der definierten Gruppen dargestellt.

Quelle (eng. source): Isolate vom Mensch sind blau markiert; Hühner-Isolate gelb; Rinder rot und Puten-Isolate grün. Markergene: Die Anwesenheit des genetischen Markers ist mit hellroten Schattierungen markiert und die Abwesenheit des Markers mit hellgrünen Schattierungen. Die Marker von rechts nach links sind: cj1321-6, fucP, cj0178, cj0755(cfrA), ceuE, pldA, cstII und cstIII.

Die letzte Spalte gibt die Gruppen-Zugehörigkeit entsprechend Tabelle 11 wieder: hellgrau(1A), hellgelb (1b^{}), intensives gelb (1b^{**}), ockergelb (1b^{***}), hellblau (2a), dunkelblau (2b), orange (3a^{*}), orangerot (3a^{**}), rostrot (3b), türkis (4), rot (5), kobaltblau (6), weiß (vereinzelt, nicht zuordenbare Isolate)*

3.4. Verteilung der Markergene nach Isolat-Ursprung

Fortführend wurden die Isolate innerhalb der 9 Gruppen in Hinblick auf ihren Ursprung (Menschen, Hühner, Puten und Rinder) ausgewertet und in Relation zur Gesamtanzahl innerhalb der 266 Gesamt-Isolate gesetzt.

Beim Vergleich der 9 Gruppen zeigt sich, dass humane Isolate als einzige in allen Gruppen vertreten sind. In den Gruppen 2 und 6 sind Menschen-Isolate, im Gegensatz zu den Isolaten anderen Ursprungs, am häufigsten existent. Humane Isolate machen mit 48,5 % den Großteil der 266 Isolate aus, gefolgt von Hühner-Isolaten (25,2 %), bovinen Isolaten (16,2 %) und letztlich Puten-Isolaten mit einem Anteil von 10,2 % an der Gesamtzahl von 266 Isolaten.

Bei genauerer Betrachtung der 2 großen *C. jejuni*-Isolatgruppen 1 und 2 fällt auf, dass in Gruppe 1 mit 69,8 % am häufigsten bovine Isolate vertreten sind, wenngleich die humanen Isolate mit 48,8 % als zweites folgen. Insgesamt gesehen stellen aber in Gruppe 1 Isolate tierischen Ursprungs (Huhn, Rind, Pute) im Vergleich zu den menschlichen Isolaten den größeren Anteil (72/135 Isolaten). Der Anteil an bovinen Isolaten ist in Gruppe 1a mit 34,9 % (15/43) fast dreimal so hoch wie der Anteil menschlicher Isolate 12,4 % (16/129).

In der 51 Isolate umfassenden Gruppe 2 treten Menschen-Isolate prozentual am zahlreichsten auf 23,3 % (30/129). Gruppe 2b umfasst deutlich mehr humane Isolate 17,1 % (22/129) wie Hühner-Isolate 13,4 % (9/67), die anteilig als zweites folgen. Ähnlich verhält sich Gruppe 6, hier sind 7 der 9 Isolate menschlicher Herkunft.

Puten-Isolate sind Spitzenreiter in Gruppe 3 und 4. Gruppe 5 enthält fast ausschließlich Hühner-Isolate 75% (3/4). Rinder-Isolate fehlen gänzlich in den Gruppen 4, 5 und 6.

Eine graphische Darstellung der Isolatverteilung, gemäß ihrem Ursprung innerhalb der 9 Gruppen, bietet Abbildung 11.

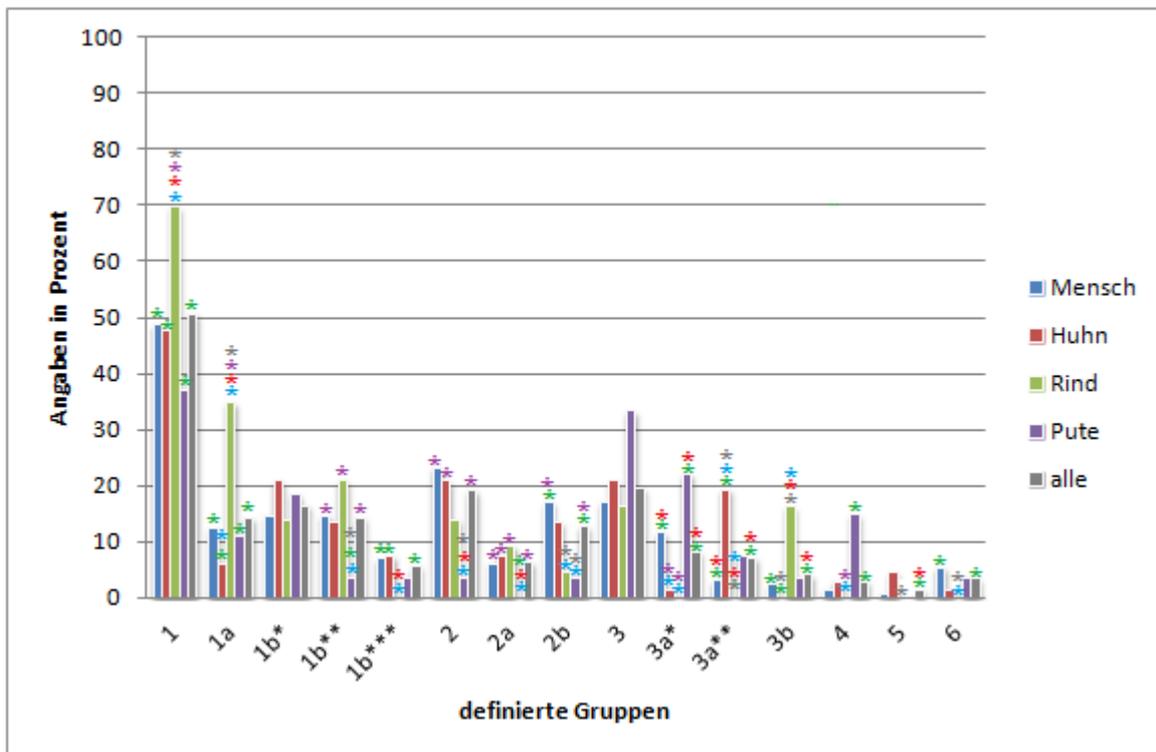


Abb. 11: Relative Häufigkeit der *C. jejuni*-Isolat-Ursprünge in Isolatgruppen

Relative Verteilung der Isolate nach Isolat-Ursprung innerhalb der neun, entsprechend der Markergen-Verteilung definierten Gruppen. Signifikant unterschiedliche Werte ($p < 0,05$) sind durch einen Asterisk in der Farbe des Vergleichswertes markiert (z.B. roter Asterisk beim Vergleich mit der von Hühnern isolierten Subpopulation). Bei fehlendem Asterisk liegen demnach keine signifikanten ($p > 0,05$) Unterschiede vor.

3.5 Verteilung der Marker innerhalb der Spezies

In die Untersuchung wurde außerdem die Korrelation zwischen genetischem Marker und Isolat-Ursprung einbezogen. Von den 266 Isolaten der Testpopulation sind 129 humanen Ursprungs, 67 stammen von Hühnern, 43 haben bovinen Ursprung und 27 Isolate wurden aus Puten isoliert.

Der sechs Gene umfassende Cluster zur Flagellin-O-Glykolisierung *cj1321-1326* wurde in 63,9 % (174/266) der Isolate detektiert. Der Gencluster ist in Isolaten menschlichen Ursprungs am schwächsten vertreten (59,7 %), jedoch in der überwiegenden Mehrheit der Puten- (77,8 %) und Rinder-Isolate (74,4 %) zu finden. Ein ähnliches Verteilungsmuster präsentiert das L-Fucose-Permease-Gen *fucP*. Es konnte in 59,0 % der Isolate nachgewiesen

werden, primär in Rinder- und Puten-Isolaten. Allerdings ist diese heterogene Verteilung zwischen den verschiedenen Wirtsarten nicht signifikant, wie in Abbildung 12 veranschaulicht.

Bezüglich der Lipooligosaccharid-Sialyltransferase-Gene *cstII* und *cstIII* konnte festgestellt werden, dass *cstII* in der Mehrzahl der 266 Isolate auftritt (55,3 %), *cstIII* hingegen nur in 30,8 % der Isolate. Begutachtet man vorzugsweise die Isolate menschlichen Ursprungs fällt auf, dass 55,0 % *cstII*⁺ sind (71/129) und nur 24,8 % (32/129) der Isolate *cstIII*⁺. Insgesamt identifiziert man *cstII* mit 69,8 % am häufigsten in Rinder-Isolaten und *cstIII* am zahlreichsten in Hühner-Isolaten 40,3 % (27/67). 23 Isolate sind sowohl für *cstII* als auch für *cstIII* positiv. Die Kombination aus beiden tritt am häufigsten in bovinen Isolaten (14,0 %) auf. Abbildung 12 dokumentiert die relative Häufigkeit der Markergene nach Wirtsspezies.

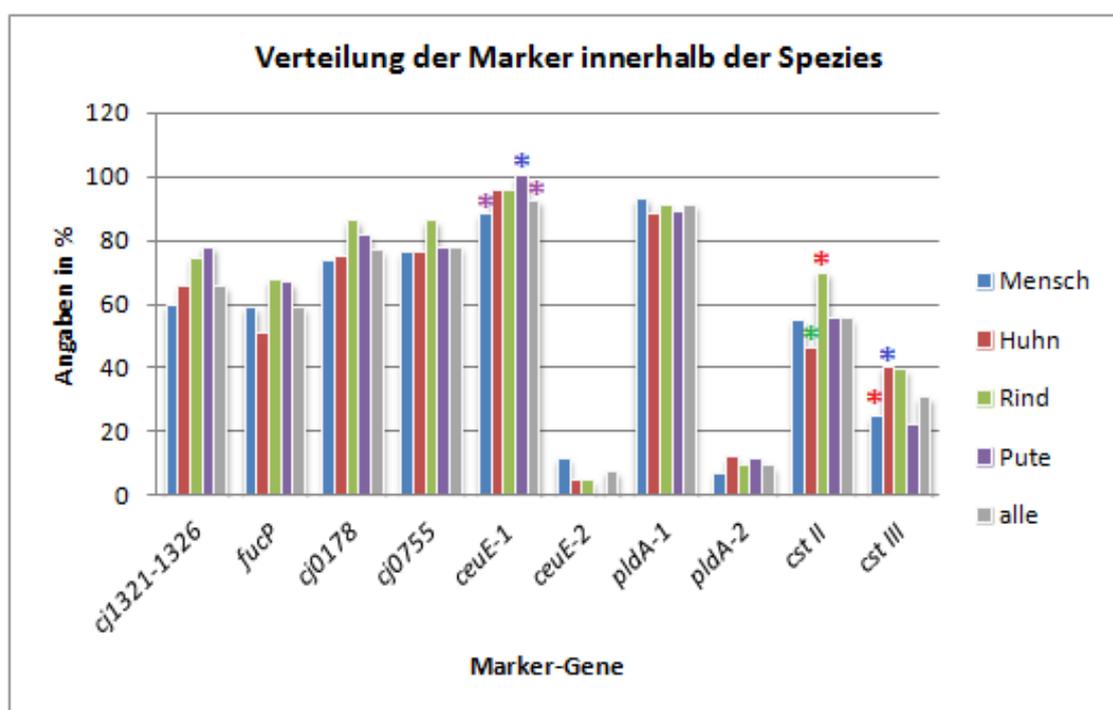


Abb. 12 : Relative Häufigkeit der Markergene nach Wirtsspezies

Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind durch Asteriske in den Farben des Vergleichswert (z.B. roter Asterisk, wenn mit Huhn verglichen) markiert. Fehlende Asteriske markieren nicht signifikante ($p > 0,05$) Unterschiede.

¹ Ergebnisse basieren auf dem NCTC 11168-abgeleiteten Primern

² Ergebnisse basieren auf den 81-176-abgeleiteten Primern

In den Kreis der Betrachtungen wurden außerdem einige Markergen-Kombinationen: *cj1321-26 / fucP*; *cj0178/cj0755*; *cj1321-26 / fucP/cj0178/cj0755* mit einbezogen.

Die Gene *cj1321-1326* und *fucP* sind in 140 der 266 Isolate (d.h. 52,6 %) miteinander assoziiert. Die genetischen Marker *cj0178* und *cj0755* treten in 76,0 % (202/266) der Isolate zusammen auf. Betrachtet man die Verknüpfung zwischen allen vier Genen (*cj1321-26/fucP/cj0178/cj0755*), erkennt man, dass etwa die Hälfte der Isolate(132/266) positiv für alle vier Gene getestet wurde.

Diese „4-Gen-Kombination“ findet sich innerhalb der Rinder-Isolate (67,4 %) am häufigsten. Vergleichsweise sind nur 49,6 % der Menschen-Isolate positiv für alle vier Gene.

Die Assoziation der Gene *cj1321-1326* und *fucP* dominiert mit 67,4 % in den Rinder-Isolaten. Jedoch waren die meisten dieser Verteilungsunterschiede innerhalb der Menschen-, Hühner, Rinder und Puten-Isolate nicht signifikant, Abbildung 13.

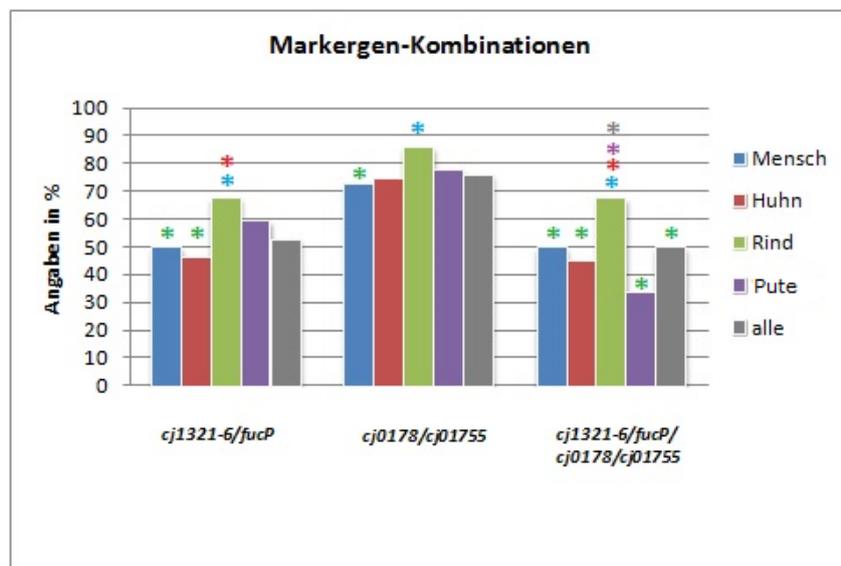


Abb. 13 : Verteilung der Markergen-Kombinationen

Innerhalb der verschiedenen *C. jejuni*-Gruppen gemäß Isolat-Ursprung.

Vergleich der Markergen-Kombinationen *cj1321-1326/ fucP*; *cj0178/cj01755* und *cj1321-26/fucP/cj0178/cj01755* nach Isolat-Ursprung (Mensch, Huhn, Rind, Pute). Signifikant unterschiedliche Werte ($p < 0,05$) sind durch Asteriske in den Farben des Vergleichswerts markiert. Fehlende Asteriske markieren nicht signifikante ($p > 0,05$) Unterschiede.

3.6 Hospitalisierung und blutiger Stuhl

Zuletzt wurden die klinischen Parameter: (I) Hospitalisierung und (II) Blut im Stuhl innerhalb der menschlichen Isolate in die Überlegungen einbezogen. Etwa die Hälfte (129 Isolate) der 266 untersuchten Isolate stammen vom Menschen. Die relative Häufigkeit humaner Isolate liefert daher Aussagen über die klinische Relevanz einer bestimmten Isolat-Gruppe.

Von 104 der 129 untersuchten humanen Isolate liegen Informationen über die klinischen Parameter Hospitalisierung und Blut im Stuhl vor (Tabelle 13 Anhang).

Zwischen den verschiedenen Isolatgruppen konnten wenige signifikante Unterschiede bezüglich der beiden untersuchten klinischen Parameter ermittelt werden. Nur die Isolate der Gruppe 1b** besaßen im Vergleich zu den nicht 1b**-Isolaten eine signifikant geringere Hospitalisierungs-Rate ($p = 0,01374$), während in Gruppe 6 signifikant ($p = 0,01215$) mehr Hospitalisierungen zu verzeichnen waren.

Signifikant ($p = 0,00020$) weniger Blut im Stuhl konnte für die Isolate der Gruppe 3a* demonstriert werden.

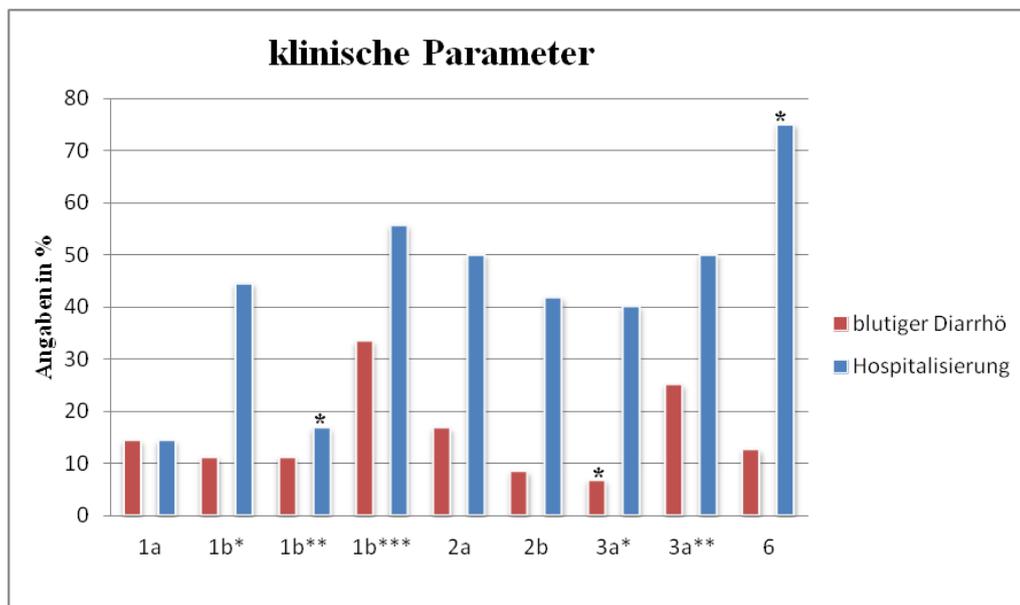


Abb. 14 : Relative Häufigkeit von klinischen Parametern in Isolatgruppen

Relative Verteilung von blutiger Diarrhö und Hospitalisierung nach Isolat-Ursprung innerhalb der signifikanten Gruppen. Signifikanzen wurden im Vergleich zu den nicht zur Gruppe gehörigen humanen Isolaten ermittelt. Signifikante Werte ($p < 0,05$) sind durch einen Asterisk gekennzeichnet. Gruppe 4, 5 & 6 fehlen wegen mangelnder Aussagekraft in der Statistik (jeweils nur ein Isolat mit klinischer Information).

4 Diskussion

C. jejuni-Infektionen gehören weltweit zu den häufigsten bakteriellen Ursachen für Gastroenteritis (SCHMIDT-OTT *et al.* 2006). Allein 2012 wurden dem RKI bis zur 49. Kalenderwoche 60.390 durch *Campylobacter ssp.* verursachte Enteriden gemeldet (RKI 2012).

Hauptinfektionsquelle ist der Verzehr von kontaminiertem Geflügelfleisch und die Zubereitung kreuzkontaminierter Nahrung. Aber auch der Konsum von Rindfleisch und das Trinken unpasteurisierter Milch können zur Infektion führen (FRIEDMAN *et al.* 2000). Klinische Symptome der Gastroenteritis reichen von milden, nicht entzündlichen, selbst limitierenden Durchfällen bis zu schwereren, entzündlichen, blutigen Durchfällen (WASSEN-AAR und BLASER 1999). Postinfektiöse Komplikationen wie GBS oder reaktive Arthritis können in seltenen Fällen auftreten (BUTZLER 2004). Daraus wird die Bedeutung von *Campylobacter* als zunehmendes Problem der öffentlichen Gesundheit deutlich.

Im Zuge dieser Arbeit wurden 266 Isolate verschiedener Herkunft (Mensch, Huhn, Rind, Pute) mittels PCR auf das Vorhandensein von zehn Virulenz-assoziierten Markern überprüft, um die Stämme mit dem höchsten gesundheitsgefährdenden Potential zu ermitteln.

4.1 Gencluster zur Flagellin-O-Glykolisierung

Auf der Suche nach Möglichkeiten, Stämme von verschiedenen Ursprungsquellen zu unterscheiden, identifizierten CHAMPION *et al.* 2005 einen Cluster von sechs Genen, *cj1321-cj1326*, zur Flagellin-O-Glykolisierung. Der Cluster kommt vorwiegend in Stämmen aus Nutztierbeständen vor (PARKHILL *et al.* 2000).

Die Autoren der Studie fanden heraus, dass die Mehrheit (55,7 %) ihrer untersuchten klinischen Isolate nicht zu den Stämmen gehört, die von Nutztieren stammen, d.h. sie waren negativ für den Gencluster *cj1321-1326*. Die *cj1321-6*-negativen Stämme sind überwiegend bei asymptomatischen Trägern isoliert worden oder es handelte sich um Umweltisolate. Diese Untersuchungsergebnisse führten zu der Hypothese, dass die meisten *Campylobacteriosen* durch „Umweltquellen“ und nicht durch den Verzehr von Nutztierfleisch hervorgerufen werden (CHAMPION *et al.* 2005).

Der Gencluster zur Flagellin-*O*-Glykolisierung könnte ebenfalls eine Rolle in der Wirtsbesiedlung und Zellinvasion spielen und das Überleben im humanen Wirt von *C. jejuni* durch Umgehung des Immunsystems verbessern (CHAMPION *et al.* 2005).

Das Vorkommen des Sechs-Gen-Clusters in 63,9 % (170/266) der untersuchten Isolate legt einen Isolat-Ursprung in Nutztierbeständen für diese Subpopulation nahe.

Wie schon bei CHAMPION *et al.* 2005 konnte der Marker am geringsten in klinischen Isolaten nachgewiesen werden. Die Mehrheit der Positivproben des Markers *cj1321-1326* stammt von Puten (77,8 %) und Rindern (74,4 %) (entsprechend Abb. 12).

Prüft man die Verteilung des genetischen Markers innerhalb der definierten Gruppen, erkennt man, dass Gruppe 1 mehrheitlich positiv für den Gencluster zur Flagellin-*O*-Glykolisierung getestet wurde, Gruppe 2-Isolate dagegen fast ausschließlich negativ für diesen Marker. Diese Ergebnisse bedeuten gemäß der Studie von CHAMPION *et al.* (2005), dass Gruppe 2 vornehmlich nicht aus Nutztierbestands-Stämmen zusammengesetzt ist und die 53-Isolate umfassende Gruppe 1 zum größten Teil aus Nutztier-assoziierten Stämmen.

Die Umwelt-adaptierte Gruppe 2b (*cj1321-1326*⁻) ist signifikant öfter mit Isolaten humaner Herkunft assoziiert (64,7 %, 22/34). Somit besitzen die Stämme der Gruppe 2 statistisch ein deutlich größeres pathogenes Potenzial für den Menschen als Isolate, die positiv für den mit Nutztierbeständen-assoziierten Marker *cj1321-1326* getestet worden.

4.2 Fuco-Verstoffwechslung

Aufgrund der Abwesenheit der Phosphofruktokinase ist *C. jejuni* nicht in der Lage, exogene Glukose zu verwerten (PARKHILL *et al.* 2000, VELAYUDHAN und KELLY 2002). Indes konnten MURAOKA und ZHANG (2011) eine Genregion identifizieren, welche einigen *C. jejuni*-Stämmen die Fuco-Nutzung ermöglicht und ihre Anpassung an nährstoffarme Umgebungen verbessert.

Nach den vorliegenden Ergebnissen der Multiplex-PCR über An-oder Abwesenheit des *fucP*-Gens, dessen Expression durch Fuco induziert wird (MURAOKA und ZHANG 2010), sind über die Hälfte (57,9 %) der insgesamt 266 untersuchten Isolate *fucP*-positiv und dementsprechend in der Lage, L-Fucose zu verstoffwechseln.

Bei der statistischen Auswertung zum Verteilungsmuster des Virulenz-asoziierten Markers *fucP* konnten signifikante Unterschiede innerhalb der definierten Gruppen ermittelt werden. So fehlt das Gen *fucP* in den Isolaten der Gruppe 2. Folglich sind Gruppe 2-Isolate nicht in der Lage, Fucose zum Wachstum zu nutzen. Zur Energiegewinnung metabolisieren sie hauptsächlich Carbonsäuren wie Fumarat und Crotonat (KELLY 2001). Demgegenüber konnte im Großteil der Gruppe 1-Isolate und in allen Isolaten aus Gruppe 6 *fucP* signifikant bewiesen werden, infolgedessen die Isolate dieser Gruppen Fucose verstoffwechseln können und besser an Fucose-haltige Umgebungen angepasst sind. Allerdings kann die Mehrheit der Gruppe 2-Isolate zusätzlich einen erweiterten Aminosäurestoffwechsel (*ggt*⁺, *ansB*⁺) und einen alternativen anaeroben Stoffwechselweg (*dmsA*⁺) zur Energiegewinnung heranziehen (HOFREUTER et al. 2006 und 2008).

Es wurde gezeigt, dass *fucP* ausschließlich in γ -Glutamyl-Transpeptidase (*ggt*)-negativen Isolaten auftritt (MURAOKA und ZHANG 2011). Das periplasmatische Enzym *ggt* kommt sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten vor und hat eine wichtige Funktion im Abbau von Glutamin und Glutathion im Gamma-Glutamat-Zyklus. Der Zyklus reguliert die Aufnahme von Aminosäuren in die Zellen (TATE und MEISTER 1981, HOFREUTER et al. 2008). Die in einigen *C. jejuni*-Stämmen vorkommende GGT ermöglicht die Metabolisation von Glutamin und Glutathion. Außerdem wird durch die Expression der γ -Glutamyl-Transpeptidase die Fähigkeit zur Kolonisation des murinen Intestinums verbessert (HOFREUTER et al. 2008).

Die in dieser Arbeit überprüfte Testpopulation wurde auf das Vorhandensein von *ggt* überprüft. Dabei wurde ersichtlich, dass die hauptsächlich aus CC 22 und CC 45 bestehende Isolat-Gruppe 2 *ggt*⁺ ist (ZAUTNER et al. 2011).

Die Ergebnisse stehen zusammen mit den aktuellen Testergebnissen zum Vorhandensein von *fucP* im Einklang mit Erkenntnissen von MURAOKA und ZHANG (2011).

Gruppe 2 ist *fucP*-negativ, aber *ggt*-positiv. In Gruppe 1 hingegen (v.a. Stämme vom Typ CC 21) sind die meisten Isolate *fucP*⁺, aber für *ggt*-negativ getestet worden (Übersicht in Abbildung 15). Interessanterweise sind die Isolate der Gruppe 6 alle in der Lage, L-Fucose zu verstoffwechseln (*fucP*-positiv), aber auch positiv für die mit *ggt*-assoziierten Marker *ansB* und *dmsA*, allerdings nicht für *ggt*.

Das Verteilungsmuster von *fucP* ähnelt dem in Nutztierbeständen prominenten Marker *cj1321-1326* und der Serin-Protease *cj1365* (ZAUTNER *et al.* 2011). Somit hat die Fucose-Permease ebenfalls eine bedeutende Rolle in der Besiedlung der Darmmukosa, indem sie es ermöglicht, Fucose aus der intestinalen Flora als Substrat zu nutzen.

4.3 Eisenverwertung

Die Fähigkeit, Eisen zu erwerben, ist eine wesentliche Voraussetzung zur bakteriellen Replikation und damit, v.a. in eisenarmen Umgebungen, ein wichtiger Virulenz-assoziiertes Faktor (PICKET *et al.* 1992, van VLIET *et al.* 2002).

Es konnte eine Subpopulation von *C. jejuni*-Isolaten identifiziert werden, die mit höheren Raten von blutigen Stühlen und Hospitalisierungen einhergeht. Diese Isolat-Gruppe ist *ggt*-positiv. Aber *ceuE*, welches ein bindendes Protein zur Enterochelin-Aufnahme kodiert, konnte bei ausschließlicher Nutzung des Primers, basierend auf der Genomsequenz vom Stamm NCTC 11168, nicht nachgewiesen werden (FEODOROFF *et al.* 2010).

Die von den Autoren beschriebene Subpopulation korreliert mit Gruppe 2 der vorliegenden Arbeit. Tabelle 11 verdeutlicht, dass in dieser Gruppe überdurchschnittlich viele Isolate signifikant weniger das NCTC 11168-*ceuE*-Allel besitzen als in den anderen definierten Gruppen. Hier konnte jedoch das 81-176-*ceuE*-Allel nachgewiesen werden. In der Isolat-Gruppe 2 konnten die Komponenten zur Eisenaufnahme *cj0178* und *cfrA* kaum nachgewiesen werden (Tabelle 11). Die beiden von FEODOROFF *et al.* (2010) identifizierten Gruppen, die zum einen durch signifikant mehr blutige Stühle bei vorhandenem *ggt* und zum anderen mit höheren Hospitalisierungsraten bei *ceuE*₁₁₁₆₈-Negativität charakterisiert waren, stimmen dem Markergenprofil zufolge mit Gruppe 2b der vorliegenden Arbeit überein.

Es besteht eine Umkehrbeziehung zwischen der Anzahl an funktionsfähigen Eisenaufnahme-Systemen und einer erhöhten Wahrscheinlichkeit von blutigen Durchfällen. Neben *ceuE* und *ggt* sind die Komponenten zur Eisenaufnahme *cj0178* und *cfrA/0755* somit auch als Marker für klinische Verläufe nützlich.

4.4 Zusammensetzung des Lipooligosaccharids

Sialylierte LOS sind an der Entstehung der beiden Neuropathien GBS und MFS beteiligt. Diese Autoimmunerkrankungen können infolge einer Campylobacteriose durch molekulare Mimikry zwischen *C. jejuni*-LOS und humanen Gangliosiden entstehen. Am häufigsten lassen sich bei GBS-Patienten Antikörper gegen das gleichfalls sialylierte GM1-Gangliosid, nachweisen (GODSCHALK *et al.* 2004, YUKI *et al.* 2004). Das Schlüsselenzym der Sialylierung ist die Sialin- oder Neuraminsäuresynthase *neuBCA* (VIMR *et al.* 1989).

In Anlehnung an die Organisation des LOS-Locus wurden von PARKER *et al.* (2005 und 2008) verschiedene LOS-Locus-Klassen (LLC) definiert. Die LLC A, B, C, M und R enthalten die Sialinsäuresynthase *neuBCA* und mindestens eine von zwei klassen-spezifischen Sialintransferasen, die zum einen vom *cstII*-Gen, welches man verstärkt in LLC A, B, M und R findet, und zum anderen vom *cstIII*-Gen, das überwiegend in LLC C vorkommt, kodiert werden (PARKER *et al.* 2005 und 2008). Die aufgeführten LOS-Klassen verschlüsseln Enzyme um ein sialyliertes LOS zu synthetisieren. Den LOS-Klassen D-H fehlt eine Sialintransferase (PARKER *et al.* 2008).

In dieser Arbeit wurden nur die Schlüsselenzyme zur LOS-Sialylierung *cstII* und *cstIII* untersucht. Da bereits detaillierte Studien (HABIB *et al.* 2009, HOTTER *et al.* 2010, REVEZ *et al.* 2011) über den Zusammenhang von MLST-CC und LLC existieren, kann basierend auf der Kenntnis von MLST-CC und der An- oder Abwesenheit von *cstII/cstIII*, die spezifische LLC abgeleitet werden. Das Gen *cstIII* (orf7c) findet sich verstärkt in LLC C (PARKER *et al.* 2005), *cstII* (orf7ab) dagegen in LLC A und B (PARKER *et al.* 2005).

Abgesehen von 23 doppelt-positiven Isolaten, überwiegend in Gruppe 1, konnten die meisten Isolate der Studien-Population entweder *cstII*- oder *cstIII*- positiv getestet werden.

In den Gruppen 1a und 1b* befinden sich überdurchschnittlich viele *cstIII*-positive Isolate (86,4 % in Gruppe 1a und 84,1 % in Gruppe 1b*). Gruppe 1a und 1b* bestehen aus Isolaten, die zum CC 21 gehören. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von HABIB *et al.* überein, da CC 21 Stämme entweder der LLC C oder LLC A angehören (HABIB *et al.* 2009).

Die Untergruppe 1b**, setzt sich aus CC 206 und CC 48 Isolaten zusammen, und ist fast ausschließlich *cstII*-positiv (97,4 %), nur 2 der 38 Isolate dieser Gruppe sind *cstIII*-positiv.

Demzufolge sind die 1b^{**}-Isolate der LLC B zugehörig (HABIB *et al.* 2009, HOTTER *et al.* 2010).

Ein Teil der CC 49- und CC 446-Isolate -beinhaltenden Gruppe 1b^{***} ist *cstII*-positiv (6/15), während die verbleibenden 60,0 % sowohl *cstII*- als auch *cstIII*-negativ sind. Demnach setzt sich die Isolatgruppe 1b^{***} aus LLC B und D Isolaten zusammen (HABIB *et al.* 2009).

Die 94,1 % (16/17) der Isolate aus Gruppe 2a wurden positiv auf *cstII* getestet. Nur ein Isolat war *cstIII*-positiv. Dieses Ergebnis korreliert mit LLC A1 und B (HABIB *et al.* 2009, REVEZ *et al.* 2011). Im Kontrast dazu ist der Großteil der Isolate aus Gruppe 2b *cstII*- und *cstIII*-negativ und gehört damit LLC D und E(H) an (HABIB *et al.* 2009).

Die Mehrheit der Isolate aus Gruppe 3 besitzt *cstII*. Nur einige Isolate der Untergruppe 3a^{**} konnten positiv für *cstIII* getestet werden. Diese 7 von 19 *cstIII*⁺-Isolate aus 3a^{**} gehören zum CC 353 und zur LLC C. Da alle Isolate aus Gruppe 4, 5 und 6 *cstIII*- und auch größtenteils *cstII*-negativ sind, besitzen diese Isolate Lipooligosaccharide, die nicht-sialyliert sind.

Von HOTTER *et al.* wurden LLC D und E-Isolate, welche den Gruppe 2b-Isolaten der gegenwärtigen Studie entsprechen, mit einer erhöhten Hospitalisierungsrate in Zusammenhang gebracht (HOTTER *et al.* 2010). Diese Beobachtung passt zu den Ergebnissen von FEODOROFF *et al.* (2010), die für *ggt*-positive und *ceuE*₁₁₁₆₈-negative Gruppen erhöhte Hospitalisierungs-Raten feststellten. Auch die Prävalenzraten der Isolate menschlichen Ursprungs aus der gegenwärtigen Studie stützen dieses Ergebnis.

HOTTER *et al.* (2010) assoziierten LLC B und C mit mehr blutigen Stühlen. LLC B und C korrelieren in dieser Analyse mit dem größten Teil von Gruppe 1-Isolaten, aber auch mit einem Teil von Gruppe 2a-Isolaten. In diesen Gruppen konnten jedoch nur nicht signifikant mehr blutige Stühle innerhalb der klinischen Isolate festgestellt werden (Punkt 3.5 im Ergebnisteil).

4.5 *Campylobacter-Invasions-Antigen B*

Aktuellen Studien zufolge spielt das *ciaB*-Genprodukt eine ausschlaggebende Rolle bei der Wirtszellinvasion. Demzufolge stellt es einen bedeutenden Faktor für *C. jejuni*-induzierte Darmentzündungen dar (KONKEL *et al.* 1999, RIVERA-AMILL *et al.* 2001).

Alle 266 Isolate dieser Studie sind positiv für *ciaB* getestet worden. Dieses Ergebniss deckt sich mit den Berichten vorangegangener Studien (FEODOROFF *et al.* 2010, DATTA *et al.* 2003, TALUKDER *et al.* 2008).

4.6 Zytolethales Distendierendes Toxin (CDT)

Ähnlich wie bei *ciaB* wurde auch für das Zytoxin *cdt* das ubiquitäre Vorkommen innerhalb der Testpopulation nachgewiesen. Unabhängig von dem ubiquitären Vorkommen der *cdtABC*-Gene konnten jedoch Unterschiede in der Genexpression, d.h. der Toxinproduktion auf dem phänotypischen Level in einem auf CHO-K1-Zellen basierenden *in vitro*-Modell demonstriert werden (HÄNEL *et al.* 2007).

Demzufolge läßt sich mit dem molekularbiologischen Nachweis der ubiquitären Gene *ciaB* und *cdtB* kein Rückschluss auf die unterschiedliche Virulenz der einzelnen *C. jejuni*-Isolate oder Isolat-Gruppen ziehen.

4.7 Phospholipase A der äußeren Membran

Phospholipase A besitzt eine zell-assoziierte hämolytische Aktivität und hat damit eine Bedeutung als Virulenzfaktor. Ähnlich wie schon bei *ceuE* ist ein Teil der Isolate unter ausschließlicher Nutzung eines Primers basierend auf der Genomsequenz von *C. jejuni* NCTC 11168 negativ für diesen Marker. Anders als bei *ceuE* waren die Ergebnisse nach Nutzung eines Vorwärts-Primers basierend auf der Genomsequenz von 811-76 aber nicht signifikant.

4.8 Schlussfolgerungen bezüglich der Marker-Verteilung

Die Anordnung der zehn Virulenz-assoziierten Marker konkretisiert und ergänzt die vorherige Definition der Subgruppen anhand von Metabolismus-assoziierten genetischen Markern durch ZAUTNER *et al.* 2011 (kurz zusammengefasst unter Punkt 1.5).

Abbildung 15 bietet eine Gesamtübersicht über die Verteilung der Metabolismus- sowie der Virulenz-assoziierten genetischen Marker, die in der vorliegenden Arbeit betrachtet wurden. Dadurch lässt sich die Konkretisierung und Ergänzung der vorherigen Gruppendifinition besser veranschaulichen.

Gruppe ^a	<i>cj1321-1326</i>	<i>fucP</i>	<i>cj0178</i>	<i>cj0755</i>	<i>ceuE</i> ¹	<i>pldA</i> ²	<i>cstII</i>	<i>cstIII</i>	Gruppe ^b	<i>cjj1367/71</i>	<i>cj1585c</i>	<i>dTLP7</i>	<i>dmsA</i>	<i>ansB</i>	<i>ggt</i>	CC	LLC
1a	X	X	X	X	X	X		X	1a	X	X	X				21	C,A
1b*	X	X	X	X	X	X		X								21, 206	C,A,B
1b**	X	X	X	X	X	X	X		1b	X	X					48, 206	B2
1b***			X	X	X	X										49, 446	B,D
2a							X		2a	X			X	X	X	22, 42	A1,B
2b									2b				X	X	X	45, 283	D,E,H,U
3a*	X	X	X	X			X		3a	X	X					52, 443, 828	
3a**	X		X	X	X		X									353, 354,	E
3b			X	X	X		X		3b	X	X	X				61	
4					X		X		4				X			1034, 1332	
5			X	X	X	X			5	X	X					none	
6		X	X	X	X	X			6	X			X	X		257	A,D

Abb. 15 : Überblick zur Verteilung der genetischen Marker

Auf der linken Seite der Abbildung unter Gruppe^a finden sich die Ergebnisse der aktuellen Arbeit zu den Virulenz-assoziierten Markern: *cj1321-1326*, *fucP*, *cj0178*, *cj0755* sowie *cstII/cstIII*, entsprechend der aktualisierten Gruppendifinition. *CiaB* und *cdtB* sind ubiquitär und deshalb zur besseren Übersicht in der Abb. nicht aufgeführt.

Auf der rechten Seite unter Gruppe^b finden sich die Ergebnisse der Arbeit von ZAUTNER *et al.* 2011 für die Metabolismus-assoziierten Marker: *cjj1367*, *cjj811-76-1367/71* (*cj1365c*) kodiert eine Serin-Protease, *cj1585c* (Oxidoreduktase), *tlp7_{m+c}* (transducer-like Protein heterodimere Form vs. monomere Form), *dmsA* (kodiert eine Untereinheit der Dimethylsulfoxid-Oxidoreduktase A), *ansB* (eine periplasmatische Asparaginase) und *ggt* (γ -Glutamyl-Transpeptidase).

CC-klonaler Komplex , LLC-zugehörige LOS-Klasse

Betrachtet man alle detektierten Virulenz-assoziierten Faktoren der vorliegenden Studie sowie die Metabolismus-assoziierten Markergene, können 2 Hauptgruppen von Markergenkombinationen, repräsentiert durch Gruppe 1a und 2b, beschrieben werden. Alle anderen Gruppen stellen einen sukzessiven evolutionären Übergang an Markergen-Kombinationen zwischen Gruppe 1a und 2b dar. Der Hauptfokus der Betrachtungen richtet sich daher an diese beiden Gruppen.

Eine herausstechende Population wird von den Gruppen 1a und 1b sowie von Gruppe 3a geformt. Die Isolate dieser Subgruppen sind in der Lage, L-Fucose zu verwerten. Zudem scheinen diese Stämme aufgrund der Anwesenheit von *cj1321-cj1326* besonders an Nutztiere angepasst zu sein. Überdies sind diese Gruppen positiv für die Marker *cj1365c* (ZAUTNER *et al.* 2011) und *cstII/cstIII*, außerdem besitzen die Untergruppen alle 5 Eisentransportsysteme. Das sialylierte LOS (da *cstII* u./o. *cstIII* positiv) in Kombination mit *cj1321-1326* fördert eine effizientere Wirtsepithelzellinvasion und besitzt das Potential, GBS zu induzieren. Die Stämme der drei aufgeführten Gruppen verfügen nicht über die Gene des erweiterten Aminosäure-Metabolismus, *ansB* und *ggt*. Auch die Gene des alternativen anaeroben Stoffwechselweges (*dmsA*-negativ) sind nicht nachweisbar. Aufgrund ihrer Adaptation zu Nutztierbeständen sind diese Stämme mit weniger schweren Campylobacteriosen assoziiert. Im Gegensatz dazu besitzen die Isolate der Gruppe 2 einen erweiterten Aminosäure-Metabolismus basierend auf dem Vorhandensein von *ansB*, und *ggt* sowie einen alternativen anaeroben Stoffwechselweg (*dmsA*-positiv) (ZAUTNER *et al.* 2011, entsprechend Abb.15). Alle Isolate der Gruppe 2 besitzen kein *fucP* und sind damit nicht in der Lage, L-Fucose zu metabolisieren. Daneben verfügen die Isolate nur über 3 der insgesamt 5 Eisenaufnahmesysteme.

Die Gruppe 2 teilt sich in 2 Untergruppen: 2a und 2b. Die Untergruppe 2b ist negativ für die Marker *cj1365c*, *cj1321-1326* sowie *cstII/cstIII* und demzufolge stärker Umwelt-adaptiert. Im Gegensatz dazu ist Gruppe 2a positiv für *cj1365c* und *cstII*, während *cj1321-1326* gleichermaßen nicht nachweisbar ist. Zusätzlich wird die Untergruppe 2a durch die Präsenz des vom Flagellum ausgeschiedenen nicht-flagellaren Proteins A1 FSPA1 charakterisiert (DE HAAN *et al.* 2010). 100 % der ST-22-Stämme, welche in Gruppe 2a vorkommen, wurden positiv für *fspA1* getestet (DE HAAN *et al.* 2010). *FspA1* schützt nach Auseinandersetzung mit heterologen Stämmen vor einer Erkrankung (BAQAR *et al.* 2008).

Die übrigen Gruppen zeigen eher einen sukzessiven evolutionären Übergang an Markergen-Kombinationen verglichen mit 1a und 2b. In dieser Hinsicht scheint Gruppe 6 bemerkenswert. Die entsprechenden Isolate sind, wie es für Gruppe 2-Isolate typisch ist, positiv auf *ansB* und *dmsA* sowie positiv für *fucP*, *cj0178*, *cj0755* und *cj1365c*, typisch für Gruppe 1-Isolate. Allerdings ist der Großteil der Isolate negativ für *ggt* und *cj1321-1326*. Dazu besitzt nur die Hälfte der Isolate aus Gruppe 6 ein sialyliertes LOS.

In der hochvirulenten Isolat-Gruppe von MORTENSEN *et al.* werden LLC D und E mit einer höheren Hospitalisierungsrates in Verbindung gebracht (MORTENSEN *et al.* 2009). In der Untersuchung von FEODOROFF *et al.* (2010) werden schwerere Campylobacteriosen und blutige Durchfälle mit *ggt*-positiven und *ceuE₁₁₁₆₈*-negativen *C. jejuni*-Isolaten assoziiert. Überträgt man diese Ergebnisse auf die Gruppen der vorliegenden Studie, besitzt Gruppe 2 das höchste krankheitserregende Potential, d.h. die höchste Virulenz für den Menschen, denn Gruppe 2 beinhaltet Isolate vom Typ LLC D und E, zudem finden sich in dieser Gruppe die meisten *ceuE₁₁₁₆₈*-negativen Isolate (vgl. Tab.11). Die nicht mit Nutztieren assoziierten Stämme, d.h. Umweltisolate nach CHAMPION *et al.* (2005), und Stämme mit nicht-sialyisiertem LOS dominieren diese höher virulente Gruppe 2.

Die *tlp7_{m+c}* Gene, kodierend für einen Ameisensäurerezeptor, assoziieren stark mit bovinem Isolat-Ursprung und können damit als Indikator für bovinen Ursprung dienen (ZAUTNER *et al.* 2011). In unserer aktuellen Studie können keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der zehn Genmarker nach Isolat-Ursprung ermittelt werden.

Beim Vergleich der 9 Untergruppen nach Isolat-Herkunft sind die Unterschiede signifikanter. Betrachtet man die beiden hauptfokussierten Gruppen 1a und 2b kann festgestellt werden, dass Gruppe 1a signifikant ($p = 0,00625$) mehr Isolate vom Rind als vom Mensch aufweist. Und Gruppe 2b signifikant ($p = 0,00861$) mehr humane Isolate (17,1 %) als Isolate vom Rind (3,7 %).

4.9 Saisonalität

Humane Campylobacteriosen zeigen eine auffällige Saisonalität mit Häufung in den Sommermonaten (LOUIS *et al.* 2005). Die Faktoren für diese jahreszeitlichen Unterschiede sind noch wenig verstanden. So unterscheidet sich auch die jahreszeitliche Prävalenz von CC 21- und CC 45 –Komplexen, den beiden häufigsten MLST-CC bei *C. jejuni*-Isolaten vom Menschen (DINGLE *et al.* 2002, SOPWITH *et al.* 2006).

Von HABIB *et al.* (2010) wurden unter den zu MLST- CC 21- und CC 45- gehörigen Isolaten unterschiedliche Stressreaktionen beobachtet. Während CC 21- Stämme toleranter gegenüber extremen Temperaturen sind, zeigen CC 45- Stämme höhere Überlebensraten unter oxidativem Stress und Temperaturen unter dem Gefrierpunkt. CC 45- Stämme sind stärker daran angepasst, auch außerhalb des Wirts zu überleben als andere CC-Typen (SOPWITH *et al.* 2008).

Diese Beobachtung wird durch die Feststellung gestützt, dass Campylobacteriose-Fälle durch CC 21- bzw. CC 45-Stämme unterschiedliche Peaks in ihrer jahreszeitlichen Verteilung aufweisen, Campylobacteriosen, die durch Typ CC 45-Stämme ausgelöst werden, zeigen einen jahreszeitlichen Peak im Frühsommer (ca.17.-38. Kalenderwoche) und sind auch der prävalenteste *C. jejuni*-Typ in Oberflächenwasserproben. In den Kalenderwochen vor und nach dem Frühsommer sind CC 45-Stämme eher schwach vertreten. Isolate mit dem Sequenztyp 45 finden sich in der *ggt*⁺ - und *fucP*⁻-Gruppe 2b. Diese ist auch für den Nutztierbestandmarker *cj1321-1326* negativ. Die mit schweren Campylobacteriosen in Zusammenhang gebrachte Gruppe 2b ist demnach v.a. im Frühsommer nachweisbar.

Eine zweite von SOPWITH *et al.* (2008) beschriebene Gruppe mit CC 21-Isolaten entspricht in der vorliegenden Arbeit der Untergruppe 1a. Campylobacteriosen durch CC 21-Stämme werden stetig das ganze Jahr über gemeldet, mit einer Häufung im Spätsommer (SOPWITH *et al.* 2008). Die Subgruppe 1a ist in der Lage, L-Fucose zu verstoffwechseln. Die Isolate dieser Gruppe exprimieren den Nutztier-assoziierten-Marker *cj1321-1326*. Krankheitsfälle durch infizierte Rinder stehen im klarem Zusammenhang mit CC 21- Stämmen (CLARK *et al.* 2003 und 2005). Die Gruppe 1a enthält mit 34,9 % (15/43) Rinder-Isolaten sogar fast dreimal so viele bovine wie humane Isolate (nur 12,4%, 16/129).

5 Zusammenfassung

Thermophile *C. jejuni* gehören weltweit zu den häufigsten Erregern bakterieller Gastroenteritiden beim Menschen. Der Erreger wird hauptsächlich durch kreuzkontaminierte Lebensmittel, zumeist ausgehend von Geflügelprodukten, übertragen. *C. jejuni* zeigt außerdem eine hohe genetische Vielfalt unter seinen Isolaten.

Mit dem Ziel herauszufinden, ob das Auftreten gewisser Markergene mit bestimmten klonalen Komplexen von *C. jejuni* korreliert, wurden im Rahmen dieser Arbeit 266 *C. jejuni*-Isolate unterschiedlicher Herkunft (Mensch, Rind, Huhn, Pute) molekularbiologisch auf das Vorhandensein von zehn Virulenz-assoziierten Faktoren: *cj1321-1326* (Sechs-Gen-Komplex zur Flagellin-O-Glykolisierung), *ciaB* (*Campylobacter-Invasions-Antigen B*), *cdtB* (cytolethal distending toxin, CDT) Untereinheit B, *fucP* (L-Fucose-Permease Gen), *cj0178/cj0755* (Eisentransporter), *ceuE* (ein bindendes Protein zur Enterochelin-Aufnahme), *pldA* (Phospholipase A der äußeren Membran) und *cstII/cstIII* (Lipooligosaccharid-Sialyltransferase) überprüft.

In einer vorangegangenen Studie von ZAUTNER *et al.* 2011 wurden bereits 266 *C. jejuni*-Isolate durch Kombination von MLST und den sechs genetischen Metabolismus-assoziierten Markern: *ansB* (periplasmatische Asparaginase), *dmsA* (eine Untereinheit der Dimethylsulfoxid-Oxidoreduktase), *ggt* (γ -Glutamyl-Transpeptidase), *cj1585c* (Oxidoreduktase), *cjj811-76-1367/71* (Serin-Protease) und *tlp7_{m+c}* (transducer-like Protein, zusammengesetzt aus *cj0951c* und *cj0952c*) in sechs Gruppen unterteilt.

Zur Konkretisierung dieser bestehenden Gruppendifinition und Kennzeichnung der Gruppen mit dem höchsten gesundheitsgefährdenden Potential wurden dieselben 266 Isolate nun weiter charakterisiert.

Vor allem die genetischen Marker *cj1321-1326*; *fucP*; *cj0178* und *cj0755* sind weitestgehend miteinander assoziiert und splitten die Testpopulation in 2 Hauptgruppen und 7 Untergruppen und stützen damit die alte Gruppendifinition.

Abgesehen vom Virulenz-assoziierten Marker *pldA* zeigen alle ermittelten genetischen Marker signifikante Unterschiede unter den verschiedenen MLST-basierten Gruppen.

Basierend auf den Daten der Arbeit konnte ein Biotyp von *C. jejuni*-Isolaten, der durch die Präsenz von *ansB*, *dmsA*, *ggt* und die Absenz von *cj1321-1326*; *fucP*; *cj0178*, *cj0755*, *cj1365c*, *cj1585c* sowie *cstII/cstIII* charakterisiert ist, bestimmt werden. Isolate dieser Gruppe gehören hauptsächlich den MLST-CC 22, 42, 45, 283 an und sind eher an eine Persistenz in der Umwelt-adaptiert. Zum Wachstum nutzen die Stämme dieser Gruppe einen erweiterten Aminosäurestoffwechsel sowie einen alternativen anaeroben Stoffwechselweg (*dmsA*-positiv). Hingegen kann aufgrund des fehlenden *fucP* keine L-Fucose verstoffwechselt werden. Außerdem sind die Stämme dieser Gruppe toleranter gegen oxidativen Stress und besser frostbeständig. Die jahreszeitliche Prävalenz ist am stärksten im Frühsommer.

Dieser Umwelt- aber schlechter Wirts-adaptierte Biotyp wird mit mehr Campylobacteriosen beim Menschen in Verbindung gebracht, äußert sich mit mehr blutigen Stühlen und Hospitalisierungen und ist somit hochgradiger virulent für den Menschen.

Im Gegensatz dazu ist die zweite Hauptgruppe stärker an tierische Wirte adaptiert und in der Lage, L-Fucose aus Mucosa oder Milch zu metabolisieren. Isolate dieses Biotyps tolerieren für *C. jejuni* extreme Temperaturen besser und zeigen eine relativ gleichmäßige Prävalenz im Jahresverlauf. Alle fünf bekannten *C. jejuni*-Eisentransportsysteme sind detektierbar, ebenso die Marker *cj1321-1326*, *cj1365c*, *cj1585c* und *cstII* und/oder *cstIII*. Die vorherrschenden MLST-CC sind CC 21, 48, 61 und 20. Dieser besser Wirt-sadaptierte Biotyp wird mit weniger schweren Campylobacteriosen in Zusammenhang gebracht.

Alle anderen Gruppen stellen einen sukzessiven evolutionären Übergang an Markergen-Kombinationen zwischen diesen beiden Hauptgruppen dar.

6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Primer für die Amplifikation der Markergene	20
Tabelle 2:	Enzyme	23
Tabelle 3:	Chemikalien und Reagenzien	23
Tabelle 4:	Verwendete Verbrauchsmaterialien	24
Tabelle 5:	Verwendete Geräte.....	24
Tabelle 6:	PCR-Ansatz für eine Probe	28
Tabelle 7:	Thermocycler-Programm für die PCR.....	29
Tabelle 8:	Ansatz für die Multiplex-PCR zum Nachweis von <i>fucP</i>	30
Tabelle 9:	PCR-Programm für die Multiplex-PCR.....	31
Tabelle 10:	Primer für die Sequenzierung zur <i>C. jejuni</i> -MLST-Typisierung.....	33
Tabelle 11:	Verteilung der genetischen Marker, LLC und MLST-CC ⁺	38
Tabelle 12 :	Ergebnisse des t-Test	39
Tabelle 13:	Bezeichnung, Herkunft und sonstige Charakteristika.....	68

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Elektronenmikroskopische Darstellung von <i>Campylobacter jejuni</i>	1
Abb. 2:	Verteilung gentischer <i>C. jejuni</i> -Marker, MLST-CC und Isolat-Herkunft.....	15
Abb. 3:	Verteilung der 10 genetischen Marker	35
Abb. 4:	Verteilung der genetischen Marker, MLST-CC-Zuordnung und Isolat-Herkunft	37
Abb. 5:	Verteilung des genetischen Markers <i>cj1321-1326</i>	40
Abb. 6:	Photographische Dokumentation einer Gel-Elektrophorese	41
Abb. 7:	Darstellung der Verteilung des L-Fucose-Permease-Gens <i>fucP</i>	42
Abb. 8:	Verteilung der Marker <i>cj0178</i> und <i>cj0755</i>	44
Abb. 9:	Verteilung von <i>cstII</i> , <i>cstIII</i> & <i>cstII/cstIII</i> innerhalb der Gruppen.....	45
Abb. 10:	MLST-sequenzbasierter UPGMA-Baum	46
Abb. 11:	Relative Häufigkeit der <i>C. jejuni</i> -Isolat-Ursprünge in Isolatgruppen	49
Abb. 12 :	Relative Häufigkeit der Markergene nach Wirtsspezies	50
Abb. 13 :	Verteilung der Markergen-Kombinationen	51
Abb. 14 :	Relative Häufigkeit von klinischen Parametern in Isolatgruppen.....	52
Abb. 15 :	Überblick zur Verteilung der genetischen Marker	60

8 Anhang

8.1 Verwendete *C. jejuni* –Stämme

Tabelle 13: Bezeichnung, Herkunft und sonstige Charakteristika

Die Tabelle sortiert die in dieser Arbeit verwendeten *C. jejuni*- Isolate nach ihrem Ursprung. Für die Isolate menschlicher Herkunft gibt die letzte Spalte Auskunft über die Parameter Hospitalisierung und blutiger Stuhl. *CiaB* und *cdtB* sind ubiquitär in allen Isolaten und deshalb nicht aufgeführt.

Kürzel: human-Mensch, cow-Rind, chicken-Huhn, turkey-Pute, MLST-ST-Sequenztyp, MLST-CC-klonaler Komplex

ceuE und *pldA* beziehen sich auf Primer basierend auf dem Genom von NCTC 11168; durch zusätzliche Nutzung von Primern basierend auf der Sequenz von 81-176 konnten aber auch die negativen Isolate positiv für *ceuE* und *pldA* getestet werden.

Nr.	Name	Her- kunft	MLST-ST	MLST-CC	<i>cj1321-6</i>	<i>Fucose</i>	<i>cj0178</i>	<i>cj0755</i>	<i>ceuE</i>	<i>pldA</i>	<i>cstII</i>	<i>cstIII</i>	Gruppe	blutiger/wäss- riger Stuhl	Hospitali- sierung
1	huBfr3943	human	60	61	0	0	1	1	1	1	1	0	3B	no data	no data
2	huBfr3947	human	60	61	0	0	1	1	1	1	1	0	3B	no data	no data
5	huE04	human	48	48	1	1	1	1	1	1	1	0	1B**	0	1
6	huB18	human	122	206	1	1	1	1	1	1	1	0	1B**	0	0
7	huB24	human	4639	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1B*	0	0
8	huB14	human	4635	21	1	1	1	1	1	1	1	0	1B*	0	1
9	huC02	human	760	21	1	1	1	1	1	1	1	1	1B*	0	1
10	huB10	human	48	48	1	1	1	1	1	1	1	0	1B**	0	0
11	huC14	human	4645	48	1	1	1	1	1	1	1	0	1B**	0	0
12	huE05	human	4591	48	1	1	1	1	1	1	1	0	1B**	0	1
13	huE06	human	4591	48	1	1	1	1	1	1	1	0	1B**	1	0
14	huA10	human	122	206	1	1	1	1	1	1	1	0	1B**	0	0
15	huA28	human	122	206	1	1	1	1	1	1	1	0	1B**	1	0
16	huA35	human	122	206	1	1	1	1	1	1	1	0	1B**	0	0

Nr.	Name	Her- kunft	MLST-ST	MLST-CC	<i>cj1321-6</i>	<i>Fucose</i>	<i>cj0178</i>	<i>cj0755</i>	<i>ceuE</i>	<i>pIdA</i>	<i>cstII</i>	<i>cstIII</i>	Gruppe	<i>blutiger/wäss- riger Stuhl</i>	<i>Hospitali- sierung</i>
17	huB08	human	4633	206	1	1	1	1	1	1	1	0	1B**	0	0
18	huA13	human	3188	206	1	1	1	1	0	1	1	0	1B**	0	0
19	huE16	human	4654	none	1	1	1	1	1	1	1	0	1B**	0	0
20	huE13	human	4652	206	1	1	1	1	1	1	1	0	1B**	0	0
21	huC17	human	4647	48	1	1	1	1	1	1	1	0	1B**	0	0
22	huA34	human	572	206	1	1	1	1	1	1	1	0	1B**	0	0
23	huA26	human	572	206	1	1	1	1	0	1	1	0	1B**	0	0
24	huA20	human	572	206	1	1	1	1	0	1	1	0	1B**	0	0
25	huC11	human	2845	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1B*	0	0
26	huA24	human	19	21	1	1	1	1	0	0	0	1	1B*	0	1
27	huC06	human	50	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1B*	0	0
28	huB15	human	50	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1B*	0	0
29	huC23	human	50	21	1	1	1	1	1	1	1	1	1B*	0	0
30	huA31	human	50	21	1	1	1	1	1	1	1	1	1B*	1	1
31	huC01	human	50	21	1	1	1	1	1	1	1	1	1B*	1	1
32	huB17	human	1823	21	1	1	1	1	1	1	1	1	1B*	0	0
33	huC03	human	4640	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1B*	0	1
34	huNCTC11168	human	43	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1B*	no data	no data
35	huA05	human	507	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1B*	0	0
36	huA17	human	221	206	1	1	1	1	1	1	0	1	1B*	0	0
37	huA02	human	4588	21	1	1	1	1	1	0	1	0	1B*	0	1
38	huA21	human	4588	21	1	1	1	1	1	1	1	1	1B*	0	0
39	huA03	human	1519	21	1	1	1	1	1	0	0	1	1B*	0	0
40	huB09	human	4286	21	1	1	1	1	1	1	1	1	1B*	0	1
41	huBfR4012	human	21	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1A	data	no data
42	huC26	human	21	21	1	1	1	1	0	1	1	1	1A	0	0
43	huA18	human	21	21	1	1	1	0	1	1	1	0	1A	0	1
44	huBfR3883	human	21	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1A	no data	no data
45	huBfR3869	human	21	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1A	no data	no data
46	huE01	human	21	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1A	0	0
47	huBfR3872	human	21	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1A	no data	no data
48	huBfR3898	human	21	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1A	no data	no data

Nr.	Name	Her- kunft	MLST-ST	MLST-CC	<i>cj1321-6</i>	<i>Fucose</i>	<i>cj0178</i>	<i>cj0755</i>	<i>ceuE</i>	<i>pIdA</i>	<i>cstII</i>	<i>cstIII</i>	Gruppe	<i>blutiger/wäss- riger Stuhl</i>	<i>Hospitali- sierung</i>
49	huC19	human	4648	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1A	1	0
50	huBfR3866	human	53	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1A	no data	no data
51	huBfR3881	human	53	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1A	no data	no data
52	huBfR3876	human	53	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1A	no data	no data
53	huB02	human	53	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1A	0	0
54	huB25	human	53	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1A	0	0
55	huBfR3865	human	53	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1A	no data	no data
56	huC10	human	4644	none	1	1	1	1	1	1	0	0	3A*	0	1
57	huC04	human	4641	607	1	1	1	1	1	1	1	0	3A*	0	0
58	huB03	human	535	460	1	1	1	1	1	1	1	0	3A*	0	1
59	huC20	human	51	443	1	1	1	1	1	1	1	0	3A*	0	0
60	huC24	human	51	443	1	1	1	1	1	1	0	0	3A*	0	1
61	huA11	human	2034	443	1	1	1	1	1	1	0	0	3A*	0	0
62	huE02	human	49	49	1	1	1	1	1	1	1	0	1B***	0	0
63	huE12	human	450	446	1	1	1	1	1	1	0	0	1B***	1	0
64	huB06	human	4631	446	1	1	1	1	1	1	0	0	1B***	0	0
65	huB07	human	4632	206	1	1	1	1	1	1	1	0	1B**	0	1
66	huC18	human	53	21	1	1	1	1	1	1	1	1	1A	0	0
67	huB04	human	475	48	1	1	1	1	1	1	1	0	3A*	0	1
68	huC28	human	257	257	1	1	1	1	1	1	0	0	6	0	1
69	huA16	human	257	257	0	1	1	1	0	1	0	0	6	1	1
70	huB20	human	4637	52	0	1	1	1	1	1	1	0	3A*	0	0
71	huC25	human	775	52	0	1	1	1	1	1	1	0	3A*	0	0
72	huA22	human	4630	52	0	1	1	1	1	1	1	0	3A*	0	1
73	huA09	human	354	354	0	1	1	1	1	1	0	0	3A*	0	0
74	huB16	human	354	354	0	1	1	1	1	1	1	0	3A*	0	0
75	huC21	human	4649	354	0	1	1	1	1	1	1	0	singleton	0	1
76	huC22	human	584	257	0	1	1	1	1	1	1	0	6	0	1
77	huE15	human	4571	257	0	1	1	1	1	1	0	0	6	0	1
78	huE23	human	257	257	0	1	1	1	1	1	0	0	6	0	1
79	huB11	human	257	257	0	1	1	1	1	1	1	0	6	0	1
80	huB13	human	257	257	0	1	1	1	1	1	0	0	6	0	0

Nr.	Name	Her- kunft	MLST-ST	MLST-CC	<i>cj1321-6</i>	<i>Fucose</i>	<i>cj0178</i>	<i>cj0755</i>	<i>ceuE</i>	<i>pIdA</i>	<i>cstII</i>	<i>cstIII</i>	Gruppe	<i>blutiger/wäss- riger Stuhl</i>	<i>Hospitali- sierung</i>
81	huB19	human	4636	none	1	0	1	1	1	1	1	0	3A**	1	1
82	huA27	human	464	none	1	0	1	1	1	0	1	0	3A**	0	0
83	huC05	human	4642	353	1	0	1	1	1	1	1	1	3A*	0	0
84	huC16	human	4646	460	1	0	1	1	1	1	1	0	1B***	1	1
85	huA14	human	380	none	1	0	1	1	1	1	1	0	1B***	0	1
86	huB22	human	380	none	1	0	1	1	1	1	1	0	1B***	0	1
87	huA25	human	4589	52	1	0	1	1	1	1	1	0	singleton	0	0
88	huC09	human	1287	1287	1	0	1	1	1	1	1	0	3A*	0	1
89	huE03	human	61	61	0	0	1	1	1	1	1	0	3B	1	0
90	huA29	human	658	658	0	0	1	1	1	0	1	0	3A**	0	1
91	huC07	human	4643	658	0	0	1	1	1	1	1	0	3A**	0	0
92	huE07	human	4650	354	0	0	1	1	1	1	1	0	3A*	0	0
93	huB12	human	4634	49	0	0	1	1	1	1	1	0	1B***	1	1
94	huA33	human	4590	49	0	0	1	1	1	1	0	0	1B***	0	0
95	huA06	human	4587	49	0	0	1	1	1	1	0	0	1B***	0	1
96	huE11	human	4651	none	0	0	1	1	1	1	0	0	5	0	1
97	huBfR3895	human	45	45	0	0	1	1	1	1	0	0	2B	no data	no data
98	huBfR3933	human	563	177	1	0	0	1	1	0	0	0	1B**	no data	no data
99	huE19	human	22	22	0	0	0	1	1	1	1	0	2A	0	0
100	huB21	human	4638	22	0	0	0	1	1	1	1	0	2A	0	0
101	huA08	human	677	677	0	0	0	1	0	0	1	0	singleton	0	0
102	huB23	human	22	22	1	0	0	0	0	1	1	0	2A	0	1
103	huA19	human	11	45	1	0	0	0	0	1	0	0	2B	0	0
104	huE08	human	4625	none	1	0	0	0	1	1	0	0	singleton	0	0
105	huC12	human	45	45	1	0	0	0	1	1	1	0	2B	0	0
106	huE22	human	696	1332	1	0	0	0	1	1	1	0	4	0	0
107	huE14	human	4653	45	0	0	0	0	1	1	0	0	2B	0	1
108	hu81-176	human	913	42	0	0	0	0	1	1	1	0	2A	1	1
109	huBfR3918	human	42	42	0	0	0	0	0	0	1	0	2A	no data	no data
110	huE17	human	4655	45	0	0	0	0	1	1	0	0	2B	0	0
111	huA30	human	447	42	0	0	0	0	0	1	0	0	2A	0	1
112	huE18	human	4592	42	0	0	0	0	1	1	1	0	2A	0	0

Nr.	Name	Her- kunft	MLST-ST	MLST-CC	<i>cj1321-6</i>	<i>Fucose</i>	<i>cj0178</i>	<i>cj0755</i>	<i>ceuE</i>	<i>pIdA</i>	<i>cstII</i>	<i>cstIII</i>	Gruppe	<i>blutiger/wäss- riger Stuhl</i>	<i>Hospitali- sierung</i>
113	huB05	human	137	45	0	0	0	0	1	1	0	0	2B	0	0
114	huE21	human	137	45	0	0	0	0	1	0	0	0	2B	0	0
115	huA23	human	267	283	0	0	0	0	0	1	0	0	2B	0	0
116	huBfR3907	human	267	283	0	0	0	0	0	1	0	0	2B	no data	no data
117	huC08	human	383	283	0	0	0	0	1	1	0	0	2B	0	1
118	huBfR1780	human	583	45	0	0	0	0	1	1	1	0	2B	no data	no data
119	huBfR1781	human	583	45	0	0	0	0	1	1	1	0	2B	no data	no data
120	huA32	human	538	45	0	0	0	0	1	1	1	0	2B	1	1
121	huBfR3868	human	45	45	0	0	0	0	1	1	0	0	2B	no data	no data
122	huBfR3880	human	45	45	0	0	0	0	1	1	0	0	2B	no data	no data
123	huBfR3867	human	45	45	0	0	0	0	1	1	0	0	2B	no data	no data
124	huC27	human	45	45	0	0	0	0	1	1	0	0	2B	0	1
125	huBfR4007	human	45	45	0	0	0	0	1	1	0	0	2B	no data	no data
126	huBfR1764	human	22	22	0	0	0	0	1	1	1	0	2A	no data	no data
127	huBfR4010	human	483	45	0	0	0	0	1	1	0	0	2B	no data	no data
128	huC15	human	45	45	0	0	0	0	0	1	0	0	2B	0	1
129	huC13	human	583	45	0	0	0	0	0	1	0	0	2B	0	0
130	huBfR3894	human	45	45	0	0	0	0	1	1	0	0	2B	no data	no data
131	huA04	human	4626	1034	0	0	0	0	0	1	1	0	4	0	0
132	bovC486	cow	21	21	1	1	1	1	1	1	1	1	1A		
133	bovC397	cow	21	21	1	1	1	1	1	1	1	1	1A		
134	bovBfR3885	cow	48	48	1	1	1	1	1	1	1	0	1B**		
135	bovC0111	cow	3158	48	1	1	1	1	1	1	1	0	1B**		
136	bovC090	cow	3203	48	1	1	1	1	1	1	1	0	1B**		
137	bovC539	cow	38	48	1	1	1	1	1	1	1	0	1B**		
138	bovC405	cow	38	48	1	1	1	1	1	1	1	0	1B**		
139	bovC323	cow	4647	48	1	1	1	1	1	1	1	0	1B**		
140	bov159	cow	572	206	1	1	1	1	1	1	1	0	1B**		
141	bovC508	cow	19	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1B*		
142	bov55	cow	50	21	1	1	1	1	1	1	1	0	1B*		
143	bov127	cow	262	21	1	1	1	1	1	1	1	0	1B*		
144	bovC0148	cow	1704	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1B*		

Nr.	Name	Her- kunft	MLST-ST	MLST-CC	<i>cj1321-6</i>	<i>Fucose</i>	<i>cj0178</i>	<i>cj0755</i>	<i>ceuE</i>	<i>pIdA</i>	<i>cstII</i>	<i>cstIII</i>	Gruppe	blutiger/wäss- riger Stuhl	Hospitali- sierung
145	bovC0172	cow	1823	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1B*		
146	bov66	cow	4664	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1B*		
147	bov137	cow	21	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1A		
148	bovC086	cow	21	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1A		
149	bovC567	cow	21	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1A		
150	bov79	cow	21	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1A		
151	bovC404	cow	21	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1A		
152	bovC536	cow	21	21	1	1	1	1	1	1	1	1	1A		
153	bovC403	cow	4667	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1A		
154	bov207	cow	53	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1A		
155	bovC248	cow	21	21	1	1	1	1	1	1	1	0	1A		
156	bovC399	cow	21	21	1	1	1	1	1	1	1	0	1A		
157	bovC540	cow	38	48	1	1	1	1	1	1	1	0	1B**		
158	bovC401	cow	21	21	1	1	1	1	1	1	1	1	1A		
159	bovC402	cow	21	21	1	1	1	1	1	1	1	1	1A		
160	bovC250	cow	21	21	1	1	1	1	1	1	1	1	1A		
161	bovC246	cow	48	48	1	0	1	1	1	1	1	0	1B**		
162	bovC325	cow	628	61	1	0	1	1	1	0	1	0	3B		
163	bov60	cow	4665	61	0	0	1	1	1	1	1	0	3B		
164	bovC406	cow	4668	61	0	0	1	1	1	1	1	0	3B		
165	bovC535	cow	4666	61	0	0	1	1	1	0	1	0	3B		
166	bov277	cow	352	61	0	0	1	1	1	0	1	0	3B		
167	bovBfR3889	cow	61	61	0	0	1	1	0	1	1	0	3B		
168	bovBfR3912	cow	61	61	0	0	1	1	1	1	1	0	3B		
169	bovC171	cow	4669	none	1	0	0	0	1	1	1	0	2A		
170	bovC537	cow	42	42	0	0	0	0	0	0	1	0	2A		
171	bovC117	cow	22	22	0	0	0	0	1	1	1	0	2A		
172	bovC084	cow	4670	42	0	0	0	0	1	1	1	0	2A		
173	bovBfR3929	cow	45	45	0	0	0	0	1	1	0	0	2B		
174	bovBfR3899	cow	45	45	0	0	0	0	1	1	0	0	2B		
175	gal245	chicken	50	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1B*		
176	gal7073HE	chicken	48	48	1	1	1	1	1	1	1	1	1B**		

Nr.	Name	Her- kunft	MLST-ST	MLST-CC	<i>cj1321-6</i>	<i>Fucose</i>	<i>cj0178</i>	<i>cj0755</i>	<i>ceuE</i>	<i>pIdA</i>	<i>cstII</i>	<i>cstIII</i>	Gruppe	blutiger/wäss- riger Stuhl	Hospitali- sierung
177	galZH0097	chicken	122	206	1	1	1	1	1	1	1	0	1B**		
178	gal7275RP	chicken	4662	48	1	1	1	1	1	1	1	0	1B**		
179	gal7289BY	chicken	4662	48	1	1	1	1	1	1	1	0	1B**		
180	gal7060SN	chicken	572	206	1	1	1	1	1	1	1	0	1B**		
181	galHS06	chicken	4657	none	1	1	1	1	1	1	1	0	1B**		
182	galHS13	chicken	3529	none	1	1	1	1	1	1	1	0	1B**		
183	galHS04	chicken	3529	none	1	1	1	1	1	1	1	0	1B**		
184	galHS12	chicken	3529	none	1	1	1	1	1	1	1	1	1B**		
185	galBfR3922	chicken	46	206	1	1	1	1	1	1	0	1	1B*		
186	galBfR3926	chicken	46	206	1	1	1	1	1	1	0	1	1B*		
187	galBfR3951	chicken	46	206	1	1	1	1	1	1	0	1	1B*		
188	gal7252NI	chicken	50	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1B*		
189	gal7278BB	chicken	50	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1B*		
190	gal7297BB	chicken	50	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1B*		
191	gal7292BB	chicken	50	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1B*		
192	gal7240BW	chicken	4660	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1B*		
193	gal7267BB	chicken	4661	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1B*		
194	gal7280BY	chicken	4663	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1B*		
195	galHW6	chicken	2192	206	1	1	1	1	1	1	1	1	1B*		
196	galHW1	chicken	2192	206	1	1	1	1	1	1	1	1	1B*		
197	galHW5	chicken	2192	206	1	1	1	1	1	1	1	1	1B*		
198	gal518	chicken	21	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1A		
199	galBfR3935	chicken	21	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1A		
200	gal7089RP	chicken	21	21	1	1	1	1	1	1	1	0	1A		
201	gal7255BY	chicken	21	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1A		
202	gal7090TH	chicken	2274	none	1	1	1	1	1	1	1	0	3A*		
203	gal4116NI	chicken	450	446	1	1	1	1	1	1	0	0	1B***		
204	gal7111BY	chicken	990	257	1	1	1	1	1	1	0	0	6		
205	gal7270BW	chicken	2288	354	0	1	1	1	1	1	0	0	3A**		
206	galHS16	chicken	4659	none	0	1	1	1	1	1	0	0	5		
207	galHS03	chicken	4656	353	1	0	1	1	1	1	0	1	3A**		
208	galHS02	chicken	353	353	1	0	1	1	1	1	0	1	3A**		

Nr.	Name	Her- kunft	MLST-ST	MLST-CC	<i>cj1321-6</i>	<i>Fucose</i>	<i>cj0178</i>	<i>cj0755</i>	<i>ceuE</i>	<i>pIdA</i>	<i>cstII</i>	<i>cstIII</i>	Gruppe	blutiger/wäss- riger Stuhl	Hospitali- sierung
209	galHS14	chicken	353	353	1	0	1	1	1	1	1	1	3A**		
210	gal7126RP	chicken	353	353	1	0	1	1	1	1	0	1	3A**		
211	galHS07	chicken	353	353	1	0	1	1	1	1	0	1	3A**		
212	galHS09	chicken	353	353	1	0	1	1	1	1	0	1	3A**		
213	galHS08	chicken	4658	353	1	0	1	1	1	1	0	1	3A**		
214	galHS05	chicken	1900	658	1	0	1	1	1	1	1	0	3A**		
215	galHW4	chicken	464	none	1	0	1	1	1	1	1	0	3A**		
216	galHW7	chicken	464	none	1	0	1	1	1	0	1	0	3A**		
217	galHW3	chicken	464	none	1	0	1	1	1	0	1	0	3A**		
218	galHW2	chicken	464	none	1	0	1	1	1	0	1	0	3A**		
219	galHS10	chicken	877	none	0	0	1	1	1	1	1	0	5		
220	galBfR3948	chicken	49	49	0	0	1	1	1	1	0	0	1B***		
221	galHR1	chicken	2897	none	0	0	1	1	1	1	0	0	1B***		
222	galHR5	chicken	2897	none	0	0	1	1	1	1	1	0	1B***		
223	galHR4	chicken	2897	none	0	0	1	1	1	1	0	0	1B***		
224	galHS01	chicken	877	none	0	0	1	1	1	1	1	0	5		
225	galBfR3874	chicken	1739	22	0	0	0	1	0	1	1	0	2A		
226	galBfR3949	chicken	45	45	1	1	0	0	1	1	1	0	2B		
227	gal7258TH	chicken	4676	none	0	1	0	0	1	0	1	0	singleton		
228	gal7085NW	chicken	2367	none	1	0	0	0	1	0	0	0	4		
229	gal08B5018	chicken	22	22	0	0	0	0	1	0	1	0	2A		
230	gal356	chicken	230	45	0	0	0	0	1	0	0	0	2B		
231	galHS11	chicken	45	45	0	0	0	0	0	1	0	0	2B		
232	gal08B5020	chicken	22	22	0	0	0	0	1	1	1	1	2A		
233	gal7107BY	chicken	42	42	0	0	0	0	1	1	1	0	2A		
234	galBfR3950	chicken	564	283	0	0	0	0	1	1	0	0	2B		
235	galHB7	chicken	4593	45	0	0	0	0	1	1	0	0	2B		
236	galBfR3914	chicken	295	45	0	0	0	0	0	1	0	0	2B		
237	galBfR4009	chicken	3036	45	0	0	0	0	1	1	0	0	2B		
238	galBfR4232	chicken	45	45	0	0	0	0	1	1	0	0	2B		
239	galBfR3944	chicken	45	45	0	0	0	0	1	1	0	0	2B		
240	galBfR4327	chicken	1003	45	0	0	0	0	1	1	1	0	2A		

Nr.	Name	Her- kunft	MLST-ST	MLST-CC	<i>cj1321-6</i>	<i>Fucose</i>	<i>cj0178</i>	<i>cj0755</i>	<i>ceuE</i>	<i>pIdA</i>	<i>cstII</i>	<i>cstIII</i>	Gruppe	blutiger/wäss- riger Stuhl	Hospitali- sierung
241	gal509	chicken	977	1034	0	0	0	0	1	0	1	0	4		
242	meC0128	turkey	2175	none	1	1	1	1	1	1	1	0	1B**		
243	meC0133	turkey	50	21	1	1	1	1	1	1	1	0	1B*		
244	meC0340	turkey	50	21	1	1	1	1	1	1	1	0	1B*		
245	meC0999	turkey	4673	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1B*		
246	meC0318	turkey	21	21	1	1	1	1	1	1	1	0	1A		
247	meC0287	turkey	21	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1A		
248	meC0130	turkey	2288	354	1	1	1	1	1	1	1	0	3A**		
249	meC0374	turkey	824	257	1	1	1	1	1	1	1	0	3A*		
250	meC0149	turkey	4675	443	1	1	1	1	1	1	0	0	singleton		
251	meC0438	turkey	1823	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1B*		
252	meC0450	turkey	4672	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1B*		
253	meC0001-1	turkey	21	21	1	1	1	1	1	1	0	1	1A		
254	meC0281	turkey	828	828	1	1	1	1	1	0	1	0	3A*		
255	meC0280	turkey	828	828	1	1	1	1	1	0	1	0	3A*		
256	meC0475	turkey	257	257	1	1	1	1	1	1	0	0	6		
257	meC0283	turkey	443	443	1	1	1	1	1	1	1	0	3A*		
258	meC0467	turkey	828	828	0	1	1	1	1	0	1	0	3A*		
259	meC0282	turkey	450	446	0	1	1	1	1	1	0	0	1B***		
260	meC0129	turkey	1348	61	1	0	1	1	1	1	0	1	3B		
261	meC0680	turkey	464	none	1	0	1	1	1	1	1	0	3A**		
262	meC0847	turkey	2091	52	1	0	1	1	1	1	1	0	3A*		
263	meC1466	turkey	696	1332	1	0	1	0	1	1	1	0	4		
264	meC1541	turkey	4430	none	1	0	0	0	1	1	1	0	singleton		
265	meC0306	turkey	4671	1034	0	0	0	0	1	1	0	0	4		
266	meC0408	turkey	45	45	0	0	0	0	1	1	0	0	2B		
267	meC1496	turkey	4674	1034	0	0	0	0	1	1	1	0	4		
268	meC0816	turkey	1709	1034	0	0	0	0	1	1	0	0	4		

8.2 Bisherige Veröffentlichungen der Ergebnisse

Zautner AE, Ohk C, Tareen AM, Lugert R, Groß U (2012): Epidemiological association of *Campylobacter jejuni* groups with pathogenicity-associated genetic markers. BMC Microbiol. 12: 171

9 Literaturverzeichnis

Acke E, McGill K, Golden O, Jones BR, Fanning S, Whyte P (2009): Prevalence of thermophilic *Campylobacter species* in household cats and dogs in Ireland. *Vet Rec* 164, 44-47

Allos BM (2001): *Campylobacter jejuni* Infections: update on emerging issues and trends. *Clin Infect Des* 32, 201-206

Altekruse SF, Stern NJ, Fields PI, und Swerdlow DL (1999): *Campylobacter jejuni*-an emerging foodborne pathogen. *Emerg Infect Dis* 5, 28-35

Anonymus (2006): Aktuelle Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten.
Epidemiologisches Bulletin Nr. 3. Robert Koch-Institut

Anonymus (2012): Aktuelle Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten.
Epidemiologisches Bulletin Nr. 50. Robert Koch-Institut

Ansorg R, Rein R, Spies A, von Recklinghausen G (1993): Cell-associated hemolytic activity of *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 12, 98–104

Baqar S, Applebee LA, Gilliland TC, Lee Jr. LE, Porter CK, Guerry P. 2008. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant *Campylobacter jejuni* flagellum-secreted proteins in mice. *Infect Immun* 76, 3170–3175

Bereswill S, Plickert R, Fischer A, Kahl AA, Loddenkemper C, Batra A, Siegmund B, Göbel UB, Heimesaat MM (2011): What you eat is what you get: Novel *Campylobacter* models in the quadrangle relationship between nutrition, obesity, microbiota and susceptibility to infection. *European Journal of Microbiology and Immunology* 1, 237–248

Black RE, Levine MM, Clements ML, Hughes TP, Blaser MJ (1988): Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J Infect Dis* 157, 472–479

Butzler JP (2004): *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clin Microbiol Infect* 10, 868–876

Champion OL, Gaunt MW, Gundogdu O, Elmi A, Witney AA, Hinds J, Dorrell N, Wren BW (2005): Comparative phylogenomics of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals genetic markers predictive of infection source. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 16043–16048

Chiba A, Kusunoki S, Obata H, Machinami R, Kanazawa I (1993): Serum anti-GQ1b IgG antibody is associated with ophthalmoplegia in Miller Fisher syndrome and Guillain-Barre' syndrome: clinical and immunohistochemical studies. *Neurology* 43, 1911–1917

Clark CG, Price L, Ahmed R, Woodward DL, Melito PL, Rodgers FG, Jamieson F, Ciebin B, Li A, Ellis A (2003): Characterization of waterborne outbreak-associated *Campylobacter jejuni*, Walkerton, Ontario. *Emerg Infect Dis* 9, 1232–41

Clark CG, Bryden L, Cuff WR, Johnson PL, Jamieson F, Ciebin B, Wang G (2005): Use of the Oxford Multilocus Sequence Typing Protocol and Sequencing of the Flagellin Short Variable Region To Characterize Isolates from a Large Outbreak of Waterborne *Campylobacter sp.* Strains in Walkerton, Ontario, Canada. *J Clin Microbiol* 43, 2080–2091

Dasti JI, Tareen AM, Lugert R, Zautner A, Groß U (2010): *Campylobacter jejuni*: a brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *Int J Med Microbiol* 300, 456–461

Datta S, Niwa H, Itoh K (2003): Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. J Med Microbiol 52, 345-348

de Haan CP, Kivistö R, Hänninen ML (2010) : Association of *Campylobacter jejuni* Cj0859c gene (*fspA*) variants with different *C. jejuni* multilocus sequence types. Appl Environ Microbiol 76 , 6942-6943

Deming MS, Tauxe RV, Blake PA, Dixon SE, Fowler BS, Jones TS, Lockamy EA, Patton CM, Sikes RO (1987): *Campylobacter* enteritis at an university: transmission from eating chicken and from cats. Am J Epidemiol 126, 526- 534

Dingle KE, Colles FM, Wareing DRA, Ure R, Fox AJ, Bolton FE, Bootsma HJ, Willems RJJ, Urwin R, Maiden MCJ (2001): Multilocus Sequence Typing System for *Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol 39, 14–23

Dingle KE, Colles FM, Ure R, Wagenaar JA, Duim B, Bolton FJ, Fox AJ, Wareing DR, Maiden MC (2002): Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* clones: a basis for epidemiologic investigation. Emerg Infect Dis 8, 949-955

EFSA (2010): The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. EFSA J 8, 1496

Endtz HP, Ang CW, van Den Braak N, Duim B, Rigter A, Price LJ, Woodward DL, Rodgers FG, Johnson WM, Wagenaar JA, Jacobs BC, Verbrugh HA, van Belkum A (2000): Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* from patients with Guillain-Barre and Miller Fisher syndromes. J Clin Microbiol 38, 2297-2301

Fearnley C, Manning G, Bagnall M, Javed MA, Wassenaar TM, Newell DG (2008): Identification of hyperinvasive *Campylobacter jejuni* strains isolated from poultry and human clinical sources. *J Med Microbiol* 57, 570-580

Feodoroff B, Ellström P, Hytiäinen H, Sarna S, Hänninen M, Rautelin H (2010): *Campylobacter jejuni* isolates in Finnish patients differ according to the origin of infection. *Gut Pathog* 2, 22

Friedman CR, Neimann J, Wegener HC, Tauxe RV: Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. In: *Campylobacter*. Hrsg. v. Nachamkin I, Blaser MJ, 2nd ed., ASM Press, Washington DC, 2000, 121-138

Gilbert M, Karwaski MF, Bernatchez S, Young NM, Taboada E, Michniewicz J, Cunningham AM, Wakarchuk WW (2002): The genetic basis for the variation in the lipo-oligosaccharide of the mucosal pathogen, *Campylobacter jejuni*. Biosynthesis of sialylated ganglioside mimics in the core oligosaccharide. *J Biol Chem* 277, 327–337

Godschalk PC, Heikema AP, Gilbert M, Komagamine T, Ang CW, Glerum J, Brochu D, Li J, Yuki N, Jacobs BC *et al.* (2004): The crucial role of *Campylobacter jejuni* genes in anti-ganglioside antibody induction in Guillain-Barre syndrome. *J Clin Invest* 114, 1659-1665

Godschalk PC, Kuijff ML, Li J, Michael FS, Ang CW, Jacobs BC, Karwaski MF, Brochu D, Motesased A, Endtz HP *et al.* (2007): Structural Characterization of *Campylobacter jejuni* Lipooligosaccharide Outer Cores Associated with Guillain-Barre' and Miller Fisher Syndromes. *Infect Immun* 75, 1245-1254

Grant KA, Belandia IU, Dekker N, Richardson PT, Park SF (1997): Molecular characterization of *pldA*, the structural gene for a phospholipase A from *Campylobacter coli*, and its contribution to cell-associated hemolysis. *Infect Immun* 65, 1172-1180

Guarner F, Malagelada JR(2003): Gut flora in health and disease. *Lancet* 361,512-19

- Guerry P (2007): *Campylobacter* flagella: not just for motility. Trends Microbiol 15, 456-461
- Guillain G, Barre JA, Strohl A (1916): Sur un syndrome de radiculonévrite avec hyperalbuminose du liquide céphalo-rachidien sans réaction cellulaire. Remarques sur les caractères cliniques et graphiques des réflexes tendineux. Bull Soc Med Hop Paris 40, 1462-1470
- Habib I, Uyttendaele M, De Zutter L (2010): Survival of poultry-derived *Campylobacter jejuni* of multilocus sequence type clonal complexes 21 and 45 under freeze, chill, oxidative, acid and heat stresses. Food Microbiol 27, 829-34
- Hao Q, Saida T, Kuroki S, Nishimura M, Nukina M, Obayashi H, Saida K(1998): Antibodies to gangliosides and galactocerebroside in patients with Guillain-Barre syndrome with preceding *Campylobacter jejuni* and other identified infections. J Neuroimmunol 81,116-126
- Hänel I, Borrmann E, Müller J, Alter T (2007): Relationships between bacterial genotypes and in vitro virulence properties of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from turkeys. J Appl Microbiol 102,433-441
- Hofreuter D, Tsai J, Watson RO,Novik V,Altman B,Benitez M,Clark C, Perbost C,Jarvie T,Du L (2006): Unique Features of a Highly Pathogenic *Campylobacter jejuni* Strain.Infect Immun 74,4694-4707
- Hofreuter D, Novik V, Galán JE(2008): Metabolic diversity in *Campylobacter jejuni* enhances specific tissue colonization. Cell Host Microbe 4, 425-33
- Hotter GS, Li IH, French NP (2010): Binary genotyping using lipooligosaccharide biosynthesis genes distinguishes between *Campylobacter jejuni* isolates within poultry-associated multilocus sequence types. Epidemiol Infect 138, 992-1003

Humphrey T, O'Brien S, Madsen M (2007): *Campylobacters* as zoonotic pathogens: A food production perspective. *Int J Food Microbiol* 117, 237-257

Jacobs BC, van Doorn PA, Schmitz PI, Tio-Gillen AP, Herbrink P, Visser LH, Hooijkass H, van der Meche FG (1996): *Campylobacter jejuni* infections and anti-GM1 antibodies in Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol* 40,181-187

Janssen R, Krogfelt KA, Cawthraw SA, van PW Wagenaar JA, Owen R J(2008): Host-pathogen interactions in *Campylobacter* infections: the host perspective. *Clin Microbiol Rev* 21, 505-518

Karlyshev AV, Wren BW (2001): Detection and initial characterization of novel capsular polysaccharide among diverse *Campylobacter jejuni* strains using alcian blue dye. *J Clin Microbiol* 39,279-284

Kelly DJ (2001): The physiology and metabolism of *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*. *J Appl Microbiol* 90,16S-24S

Konkel ME, Garvis SG, Tipton SL, Anderson DE Jr, Cieplak W Jr (1997): Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol* 24, 953-63

Konkel ME, Kim BJ, Rivera-Amill V, Garvis SG (1999): Bacterial secreted proteins are required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. *Mol Microbiol* 32, 691-701

Konkel ME, Monteville MR, Rivera-Amill V, Joens LA (2001): The pathogenesis of *Campylobacter jejuni*-mediated enteritis. *Curr Issues Intest Microbiol* 2, 55-71

Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K (2008): MEGA: a biologistcentric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform* 9, 299–306

Lee MD, Newell DG (2006): *Campylobacter* in poultry: filling an ecological niche. Avian Dis 50, 1–9

Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Ramey RR, Bircher JS, Schlegel ML, Tucker TA, Schrenzel MD, Knight R, Gordon JI (2008) : Evolution of mammals and their gut microbes. Science 320, 1647-1651

Litwin CM, Calderwood SB (1993): Role of iron in regulation of virulence genes. Clin Microbiol Rev 6, 137-149

Louis VR, Gillespie IA, O'Brien SJ, Russek-Cohen E, Pearson AD, Colwell RR (2005): Temperature-driven *Campylobacter* seasonality in England and Wales. Appl Environ Microbiol 71, 85–92

Louwen R, Heikema A, van Belkum A, Ott A, Gilbert M, Ang W, Endtz HP, Bergman MP, Nieuwenhuis EE (2008): The sialylated lipooligosaccharide outer core in *Campylobacter jejuni* is an important determinant for epithelial cell invasion. Infect Immun 76, 4431-4438

Lozupone CA, Stombaugh J I, Gordon JI, Jansson JK, Knight R(2012): Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. Nature 489, 220-230

Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG (1998): Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci USA 95, 3140-3145

Malik-Kale P, Parker CT, Konkel ME (2008): Culture of *Campylobacter jejuni* with sodium deoxycholate induces virulence gene expression. Journal of bacteriology 190, 2286-2297

McSweegan E, Walker RI (1986): Identification and characterization of two *Campylobacter jejuni* adhesins for cellular and mucous substrates. Infect Immun 53, 141-148

Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV (1999) : In vivo tracking of *Campylobacter jejuni* by using a novel recombinant expressing green fluorescent protein. *Appl Environ Microbiology* 149,153-165

Mortensen NP, Kuijf ML, Ang CW, Schiellerup P, Krogfelt KA, Jacobs BC, van Belkum A, Endtz HP, Bergmann MP (2009): Sialylation of *Campylobacter jejuni* lipo-oligosaccharides is associated with severe gastro-enteritis and reactive arthritis. *Microbes Infect* 11, 988-994

Muraoka WT, Zhang Q (2011): Phenotypic and Genotypic Evidence for L-Fucose Utilization by *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol* 193, 1065–1075

Nichols GL (2005): Fly transmission of *Campylobacter*. *Emerg Infect Dis* 11, 361-364

Odaka M, Yuki N, Yamada M, Koga M, Takemi T, Hirata K, Kuwabara S (2003): Bickerstaff's brainstem encephalitis: clinical features of 62 cases and a subgroup associated with Guillain-Barré syndrome. *Advanced Access publication* 126, 2279-2290

Palyada K, Threadgill D, Stintzi A (2004): Iron Acquisition and Regulation in *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol* 186, 4714–4729

Park SF (2002): The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol* 74, 177-188

Parker CT , Horn ST, Gilbert M, Miller WG, Woodward DL, Mandrell RE (2005): Comparison of *Campylobacter jejuni* Lipooligosaccharide Biosynthesis Loci from a Variety of Sources. *J Clin Microbiol* 43, 2771–2781

Parker CT, Gilbert M, Yuki N, Endtz HP, Mandrell RE (2008): Characterization of lipooligosaccharide-biosynthetic loci of *Campylobacter jejuni* reveals new lipooligosaccharide classes: evidence of mosaic organizations. *J Bacteriol* 190, 5681-5689

Parkhill J, Wren BW, Mungall K, Ketley JM, Churcher C, Basham D (2000): The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* 403, 665-668.

Pei ZH, Ellison RT 3rd, Blaser MJ (1991): Identification, purification, and characterization of major antigenic proteins of *Campylobacter jejuni*. *J Biol Chem* 266, 16363-69

Pei ZH, Blaser MJ (1993): PEB1, the major cell-binding factor of *Campylobacter jejuni*, is a homolog of the binding component in gram-negative nutrient transport systems. *J Biol Chem* 268, 18717-25

Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, van den Brandt PA, Stobberingh EE (2006): Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 118, 511-521

Pickett CL, Auffenberg T, Pesci EC, Sheen VL, Jusuf SS (1992): Iron acquisition and hemolysin production by *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* 60:3872–3877.

Pickett CL, Whitehouse CA (1999): The cytolethal distending toxin family. *Trends Microbiol* 7, 292-297

Ratledge C und Dover LG (2000): Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* 54, 881-941

Rees JH, Soudain SE, Gregson NA, Hughes RA (1995): *Campylobacter jejuni* infection And Guillain-Barre syndrome. *N Engl J Med* 333, 1374-1379

Revez J, Rossi M, Ellström P, de Haan C, Rautelin H, Hänninen ML (2011): Finnish *Campylobacter jejuni* Strains of Multilocus Sequence Type ST-22 Complex Have Two Lineages with Different Characteristics. *PLoS One* 6, 26880

Richardson PT, Park SF (1995): Enterochelin acquisition in *Campylobacter coli*: characterization of components of a binding-protein-dependent transport system. *Microbiology* 141, 3181-3191

Rivera-Amill V, Kim BJ, Seshu J, Konkel ME (2001): Secretion of the virulence-associated *Campylobacter* invasion antigens from *Campylobacter jejuni* requires a stimulatory signal. *J Infect Dis* 183, 1607-1616

Robert Koch-Institut: Infektionsepidemiologisches Jahrbuch für 2011, Berlin 2012

Rollins DM, Colwill RR (1986): Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Appl Environ Microbiol* 52, 531-538

Schmidt-Ott R, Schmidt H, Feldmann S, Brass F, Krone B, Gross U (2006): Improved Serological Diagnosis Stresses the Major Role of *Campylobacter jejuni* in Triggering Guillain-Barré Syndrome. *Clin Vaccine Immunol* 13, 779-783

Sopwith W, Birtles A, Matthews M, Fox A, Gee S, Painter M, Regan M, Syed Q, Bolton E (2006): *Campylobacter jejuni* multilocus sequence types in humans, northwest England, 2003-2004. *Emerg Infect Dis* 12, 1500-7

Sopwith W, Birtles A, Matthews M, Fox A, Gee S, Painter M, Regan M, Syed Q, Bolton E (2008): Identification of potential environmentally adapted *Campylobacter jejuni* strain, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 14, 1769-73

Stahl M, Friis LM, Nothaft H, Liu X, Lic J, Szymanski CM, Stintzi A (2011): L-Fucose utilization provides *Campylobacter jejuni* with a competitive advantage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 7194-7199

Stecher B, Hardt WD (2008): The role of microbiota in infectious disease. *Trends Microbiol* 16, 107-114

Talukder KA, Aslam M, Islam Z, Azmi IJ, Dutta DK, Hossain S, Nur-E-Kamal A, Nair GB, Cravioto A, Sack DA, Endtz HP (2008): Prevalence of virulence genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheal patients in Bangladesh. 46 diarrheal patients in Bangladesh. J Clin Microbiol 46, 1485-1488

Tareen AM, Dasti JI, Zautner AE, Groß U, Lugert R (2011): Sulphite: cytochrome oxidoreductase deficiency in *Campylobacter jejuni* reduces motility, host cell adherence and invasion. Microbiology 157, 1776-1785

Tate SS, Meister A (1981): Gamma-glutamyl transpeptidase: catalytic, structural and functional aspects. Mol Cell Biochem 39, 357-68

Tietze E (2008): *Campylobacter jejuni/ Campylobacter coli*. in: GERMAP 2008-Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch, hrsg. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. und Infektiologie Freiburg, 1. Auflage, Antiinfectives Intelligence Gesellschaft für klinisch-mikrobiologische Forschung und Kommunikation mbH, Rheinbach 2008, 77-78

Touati, D (2000): Iron and oxidative stress in bacteria. Arch Biochem Biophys 373, 1-6

Urwin R, Maiden MC (2003): Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. Trends Microbiol 11, 479-487

Vandamme P, De Ley J (1991): Proposal for a new family, Campylobacteraceae. Int J Syst Bacteriol 41, 451-455

Vandamme P, Van Doorn LJ, al Rashid ST, Quint WG, van der Plas J, Chan VL, On SL (1997): *Campylobacter hyoilei* Alderton *et al.* 1995 and *Campylobacter coli* Véron and Chatelain 1973 are subjective synonyms. Int J Syst Bacteriol 47, 1055-1060

van Vliet AH, Ketley JM, Park SF, Penn CW (2002): The role of iron in *Campylobacter* gene regulation, metabolism and oxidative stress defense. *FEMS Microbiol Rev* 26,173–186

Velayudhan J, Kelly DJ (2002): Analysis of gluconeogenic and anaplerotic enzymes in *Campylobacter jejuni*: an essential role for phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Microbiology* 148, 685–694

Vimr ER, Aaronson W, Silver RP (1989): Genetic analysis of chromosomal mutations in the polysialic acid gene cluster of *Escherichia coli* K1. *J Bacteriol* 171, 1106-1117

Wassenaar TM (1997): Toxin production by *Campylobacter spp.* *Clin Microbiol Rev* 10, 466-476

Wassenaar TM, Blaser MJ (1999): Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* infections of humans. *Microbes Infect* 1, 1023-1033

Whitehouse CA, Balbo PB, Pesci EC, Cottle DL, Mirabito PM, Pickett CL (1998): *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin causes a G2-phase cell cycle block. *Infect Immun* 66, 1934-1940

Yuki N, Susuki K, Koga M, Nishimoto Y, Odaka M, Hirata K, Taguchi K, Miyatake T, Furukawa K, Kobata T *et al.* (2004): Carbohydrate mimicry between human ganglioside GM1 and *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharide causes Guillain-Barre syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 11404-11409

Zautner AE, Herrmann S, Corso J, Tareen AM, Alter T, Gross U (2011): Epidemiological Association of Different *Campylobacter jejuni* Groups with Metabolism-Associated Genetic Markers. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 2359–2365

Danksagung:

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Uwe Groß für die Vergabe der Doktorarbeit und Übernahme der Erstbegutachtung.

Ich möchte meinem Betreuer Dr. med. Andreas E. Zautner dafür danken, dass er mir die Anfertigung dieser interessanten Doktorarbeit ermöglicht hat. Für seine sehr gute und engagierte Betreuung der praktischen und auch theoretischen Arbeit sowie die kontinuierliche Unterstützung bin ich sehr dankbar.

Für die immer sehr gute und nette Hilfestellung beim Erlernen einiger Methoden und bei der Durchführung verschiedener Experimente danke ich Abdul Malik Tareen. Außerdem danke ich Sahra Herrmann für die Unterstützung bei der MLST-Typisierung der *C. jejuni*-Stämme.

Desweiteren danke ich allen Kollegen aus dem Labor für ihre Hilfe und die nette Atmosphäre.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinem Onkel Dr. Hartmut Pollack bedanken, der mir mit tatkräftiger Unterstützung und zahlreichen Tipps die Arbeit am Computer und damit die Fertigstellung der Dissertation unendlich erleichterte.