

Aus dem Institut für medizinische Mikrobiologie und Virologie
(Prof. Dr. med. U. Groß)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Detektion und Differenzierung von
Campylobacter fetus Subspezies mittels
Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung und
Massenspektrometriebasierter
Proteotypisierung**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Moritz Matti Karg

aus

Braunschweig

Göttingen 2023

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in: Prof. Dr. med. habil. A. E. Zautner

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. med. habil. T. Buhl

Prüfungskommission

Referent/in:

Ko-Referent/in:

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Detektion und Differenzierung von *Campylobacter fetus* Subspezies mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung und Massenspektrometrie-basierter Proteotypisierung" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den
.....
(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert.

Karg MM, Frickmann H, Hotzel H, Lugert R, Groß U, Hagen RM, Tomaso H, Poppert S, Zautner AE (2018): Identification of *Campylobacter fetus* by fluorescence in situ hybridization (FISH). *J Microbiol Methods* 151, 44–4

Emele MF, Karg MM, Hotzel H, Bloois LG, Groß U, Bader O, Zautner AE (2019a): Differentiation of *Campylobacter fetus* Subspecies by Proteotyping. *Eur J Microbiol Immunol* 9, 62–71

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Historischer Hintergrund zum Genus <i>Campylobacter</i> und zu <i>Campylobacter fetus</i> und seiner Subspezies.....	1
1.2	Aktuelle medizinische und wirtschaftsökonomische Bedeutung von <i>Campylobacter fetus</i> 4	
1.3	Klinische Aspekte der Campylobacteriose	5
1.3.1	Blutstrominfektion mit <i>Campylobacter fetus</i>	6
1.3.2	Bovine Genitalcampylobacteriose	7
1.4	Biologische Abgrenzung von <i>Campylobacter fetus</i> zu anderen <i>Campylobacter</i> subspezies	7
1.5	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	9
1.6	Massenspektrometrie-basierte Proteotypisierung.....	10
1.7	Zielsetzung dieser Dissertation.....	11
2	Material und Methoden	13
2.1	Allgemein.....	13
2.2	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	18
2.2.1	<i>C. fetus</i> Stämme.....	18
2.2.2	Sonden	20
2.2.3	Puffer	20
2.2.4	Hybridisierung.....	22
2.2.5	Mikroskopie.....	25
2.3	Massenspektrometrie-basierte Proteotypisierung.....	25
2.3.1	Allgemein.....	25
2.3.2	Posttranslationale Modifikationen.....	28
2.3.3	<i>C. fetus</i> -Stämme.....	29
2.3.4	Sequenzierung	29
2.3.5	Matrix-Lösung.....	30
2.3.6	MALDI-TOF Massenspektrometrie.....	30
2.3.7	Biomarker in ICMS Spektren.....	30
2.3.8	Multilocus Sequence Typing (MLST)	31
2.3.9	Phylogenetische und Phyloproteomische Analyse.....	32
2.3.10	UPGMA-Dendrogramme	32
3	Ergebnisse	34
3.1	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	34
3.2	Massenspektrometrie-basierte Proteotypisierung.....	37
4	Diskussion	45
5	Zusammenfassung	49
6	Anhang	51
7	Literaturverzeichnis	54

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema für die Anordnung der Fluoreszenz-Objektträger.....	23
Abbildung 2: Kurzzusammenfassung der einzelnen Schritte bei der Durchführung der Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung.....	24
Abbildung 3: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte bei der Massenspektrometrie-basierten Proteotypisierung.....	28
Abbildung 4: Beispielhafte grafische Darstellung eines MLST-basierten-UPGMA- Dendrogramms für die zur Verfügung stehenden <i>Campylobacter-fetus</i> -Isolate.....	33
Abbildung 5: Beispielhafte Darstellung des durchschnittlichen Ergebnis der Fluoreszenz- <i>in</i> - <i>situ</i> -Hybridisierungsuntersuchung.....	36
Abbildung 6: Massenspektrogramme der einzelnen für die Proteotypisierung verwendeten Biomarker.....	42
Abbildung 7: Gegenüberstellung des MLST-basierten und des Proteotypisierungs-basierten UPGMA-Dendrogramms für <i>C. fetus</i>	43

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Historische Nomenklaturen des Genus <i>Campylobacter</i>	2
Tabelle 2: Morphologische und biochemische Unterschiede zwischen <i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i> und <i>C. fetus</i> ssp. <i>fetus</i> . Die Angaben entsprechen dem Wachstum unter dem genannten Faktor in Prozent (Schulze et al. 2006).	8
Tabelle 3: Aminosäuren und ihre durchschnittliche Massen in Da	11
Tabelle 4: Materialliste.....	17
Tabelle 5: Verwendete <i>Campylobacter fetus</i> Stämme und ihre Herkunft	19
Tabelle 6: Verwandte Fluoreszenzsonden.....	20
Tabelle 7: Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers für die Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	21
Tabelle 8: Zusammensetzung des Waschpuffers für die Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	21
Tabelle 9: Definition der Fluoreszenzstärke	25
Tabelle 10: Posttranslationale Modifikationen.....	29
Tabelle 11: Verwendete Biomarker mit den errechneten molekularen Massen für spezifische posttranslationale Modifikationen	31
Tabelle 12: Mismatches der FISH-Sonden.....	35
Tabelle 13: kumuliertes Ergebnis aller untersuchten Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierungsproben	37
Tabelle 14: Liste der verwendeten Biomarker und ihrer Massen.....	38
Tabelle 15: Aminosäuresequenzen der massenspektrometrisch bestimmaren Auflistung der Isoformen-Profile der einzelnen Testisolat gemäß Tabelle 16.....	40
Tabelle 16: Legende zu Tabelle 15 - vollständige Aminosäuresequenzen	41

Abkürzungsverzeichnis

DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>C.</i>	<i>Campylobacter</i>
ssp.	Subspezies
<i>Cfv</i>	<i>Campylobacter fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>
<i>Cff</i>	<i>Campylobacter fetus</i> ssp. <i>fetus</i>
<i>Cft</i>	<i>Campylobacter fetus</i> ssp. <i>testudinum</i>
RFLP	Restriktions-Längenpolymorphismus
H ₂ S	Dihydrogensulfid
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
Da	Dalton
PCR	Polymerasekettenreaktion
BCCM	Belgian Coordinated Collections of Microorganisms
LMG	Laboratory of Microbiology, Departement of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Sciences of Ghent University
RNA	Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
SDS	Natriumdodecylsulfat
MALDI	Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation
TOF	Time of Flight
UPGMA	ungewichtete Paargruppenanalyse mit arithmetischen Mitteln
NCBI	National Center for Biotechnology Information
HCCA	α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure
ICMS	Intact Cell Mass Spectrometry
MLST	Multilokus-Sequenztypisierung
MBT	MALDI Biotyper
ExpASy	Expert Protein Analysis System
ST	Sequenztyp
AFLP	amplified fragment length polymorphism

1 Einleitung

1.1 Historischer Hintergrund zum Genus *Campylobacter* und zu *Campylobacter fetus* und seiner Subspezies

Darmpathogene Keime spielen seit Jahrtausenden eine bedeutende Rolle für alle Lebewesen und insbesondere im Leben der Menschen. Durch mutmaßlich darmpathogene Erreger hervorgerufene Erkrankungen wurden bereits lange vor der Entwicklung eines wissenschaftlichen Verständnisses ihrer Genese beschrieben. So kam es beispielsweise bereits im Jahr 600 v. Chr. zu lokalen Choleraausbrüchen im Gangesdelta (Alcades, 2009). Gerade die Bevölkerungsexplosion und die weitreichende Urbanisierung bei gleichzeitig mangelhafter hygienischer Versorgung führte zu multiplen Cholera- oder auch Typhusepidemien. Hinzu kam ein sich entwickelndes, aber noch nicht ausreichend ausgeformtes, Verständnis der mikrobiologischen Grundlagen. Aus dieser Ausgangslage heraus kam es zur Erstbeschreibung zahlreicher darmpathogener Erreger als Urheber bereits bekannter Krankheiten. Einer dieser, besonders in jüngerer Historie ebenfalls regelmäßig auftretender, darmpathogener Erreger ist *Campylobacter*.

Im Folgenden wird eine inhaltliche Zusammenfassung der historischen Entwicklung in der *Campylobacter*-Forschung gegeben; aufbauend auf der von Stiller bereits zusammengetragenen Übersicht (Stiller 1998). Besonderes Augenmerk wird hierbei auf die Beschreibung der Subspezies *Campylobacter fetus* gelegt, welcher Gegenstand dieser Arbeit ist.

McFadyean und Stockman beschrieben 1909 im Rahmen des seuchenbedingten Keulens von Schafen einen vibrioähnlichen Erreger. Dies wird gemeinhin als Erstbeschreibung von *Campylobacter fetus ssp. fetus* angesehen (McFadyean und Stockman 1913; Stiller 1998).

Beim, durch Infektion mit Darmpathogenen bedingten, Abort von Rindern konnte 1918 über die Isolierung von ähnlichen Bakterien berichtet werden (Smith 1918). Beschrieben wurde dieser Erreger initial als *Vibrio fetus* (Smith und Taylor 1919; Stiller 1998)

Bisher war dieser neu entdeckte Erreger nur bei Schafen und Rindern nachweisbar gewesen. 1946 gelang Levy in Stuhl- und Blutproben von an Enteritis erkrankten Menschen der Nachweis von nicht anzüchtbaren Vibrionen. Wegen der morphologischen Ähnlichkeit ordnete er sie der Gattung *Vibrio fetus* zu (Levy 1946). Folglich handelte es sich bei dem Erregermaterial um eine Anthroponose, also wechselseitig von Mensch auf Tier und umgekehrt übertragbare Krankheitserreger.

Der nächste Schritt in der Beschreibung des Genus *Campylobacter* gelang durch die Isolierung des beschriebenen *Vibrio fetus* aus dem Blut dreier schwangerer Frauen 1947 (Vinzent et al. 1947; Stiller 1998).

Das Spektrum der später als *Campylobacter*-Genus zusammengefassten Erreger und Erregeruntergruppen erweiterte sich 1957 durch von King aus dem Blut enteritiserkrankter Patienten isolierter Vibrionen. Diese wurden, mit den von Vinzent beschriebenen, als verwandt aber nicht übereinstimmend beschrieben (King 1957; Stiller 1998).

Basierend auf dem Cytosin- und Guanin-Gehalt der DNA wurden einige der vorbeschriebenen *Vibrio fetus* Stämme unter dem Namen *Campylobacter* zusammengefasst (Sebald und Veron 1963).

Die erste Isolierung von *Campylobacter* aus Stuhlproben folgte im Jahr 1972 (Dekeyser et al. 1972).

Erst durch die Entwicklung und Nutzung von antibiotikahaltigen Selektivnährböden nach Skirrow wurde eine Isolierung der zur *Campylobacter* Gruppe gehörenden Erreger, sowie eine systematische Forschung möglich (Butzler 1973).

Eine grundlegende Beschreibung und Systematik von *Campylobacter* schloss sich unmittelbar an (Véron und Chatelain 1973).

Eine Zeit lang existierten mit der Beschreibung von Véron und Chatelain sowie Smibert 1974 zwei konkurrierende Systematiken von *Campylobacter* (Levine 1975). Hierbei setzte sich die Beschreibung von Véron und Chatelain durch (Bergey 1984; Stiller 1998).

In Tabelle 1 sind verschiedene Nomenklaturen der *Campylobacter*-Gruppe dargestellt (Karmali und Fleming 1979).

Nomenklatur des Genus <i>Campylobacter</i>		
King, 1957	Véron und Chatelain, 1973	Smibert, 1974
<i>Vibrio fetus</i> („related vibrios“)	<i>Campylobacter fetus</i> ssp. <i>fetus</i>	<i>Campylobacter fetus</i> ssp. <i>intestinalis</i>
	<i>Campylobacter fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>	<i>Campylobacter fetus</i> ssp. <i>fetus</i>
	<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	<i>Campylobacter fetus</i> ssp. <i>jejuni</i>
	<i>Campylobacter sputorium</i>	<i>Campylobacter sputorium</i>

Tabelle 1: Historische Nomenklaturen des Genus *Campylobacter* (Stiller 1998)

Von den hier dargestellten Nomenklaturvorschlägen hat sich die Einteilung nach Véron und Chatelain von 1973 durchgesetzt.

Ein Nachweis von *Campylobacter* gelang im historischen Verlauf nun auch in verschiedenen Reptilienspezies (Wang et al. 2013). Zu den kolonisierten Spezies zählten eine Carolina-Dosenschildkröte (*Terrapene carolina*) (Harvey und Greenwood 1985), ein schwarzgelber

Blauzungenskink (*Tiliqua nigrolutea*) und eine westliche Hakennasennatter (*Heterodon nasicus*). (Dingle et al. 2010)

Aufgrund phänotypischer Unterschiede dieser in Reptilien nachgewiesenen Erreger erfolgte 2014 in Abgrenzung zu *Campylobacter fetus* ssp. *fetus* sowie *Campylobacter fetus* ssp. *venerealis* die Definition einer neuen Subspezies unter dem Namen *Campylobacter fetus* ssp. *testudinum* (Fitzgerald et al. 2014). Somit existieren nach aktuellem Stand der Forschung drei bekannte Subspezies der mikrobiellen Spezies *Campylobacter fetus*. Alle drei Subspezies sind dabei medizinisch durch ihr anthroponotisches Potential medizinisch von Bedeutung.

1.2 Aktuelle medizinische und wirtschaftsökonomische Bedeutung von *Campylobacter fetus*

Campylobacter induzierte Infektionen gehören zu den häufigsten Infektionserkrankungen. Besonders auch in subtropischen oder tropischen Gebieten gehört *Campylobacter* zu den wichtigsten Erregern. In aktuellen Studien konnte bei einer Gruppe von 16.817 Reisenden und 977 Immigranten aus den Tropen oder Subtropen *Campylobacter* als dritthäufigster nachgewiesener Erreger festgestellt werden, wobei es zu einer Gesamtzahl von 556 Nachweisen kam (Herbinger et al. 2016). Die Untersuchungen der Geosentinel Database zeigten die Campylobacteriose als vierthäufigst identifizierte Infektionserkrankung in Reiserückkehrern im Zeitraum von 2000 bis 2010 (Leder et al. 2013b). Zusätzlich ist *Campylobacter spp.* unter den drei am häufigsten diagnostizierten Erregern in Reiserückkehrern mit gastrointestinalen Infektionserkrankungen in allen untersuchten Regionen (Leder et al. 2013a).

In Deutschland ist die *Campylobacter*-Infektion mit einer Inzidenz von 53,4-81,4/100.000 Einwohner ebenfalls eine vergleichsweise häufige Erkrankung (Hauri et al. 2013).

Zusätzlich zu den klinischen Aspekten, die *Campylobacter fetus* mit seinen verwandten Spezies teilt, wird *Campylobacter fetus* mit veterinärmedizinischen Infektionserkrankungen assoziiert. Hierdurch ergibt sich nicht nur ein weites Feld an relevanten Anwendungen; es besteht auch ein hohes zoonotisches Potential. *Campylobacter fetus* teilt sich dabei in drei unterschiedliche Subspezies auf. *C. fetus ssp. fetus* ist gemeinhin mit zoonotischen Aborten insbesondere bei Schafen und Bakteriämien im Menschen assoziiert (Campero et al. 2005). *C. fetus ssp. venerealis* hingegen verursacht typischerweise die bovine Genitalcampylobacteriose, welche zu Fertilitätsstörungen und damit zu signifikanten ökonomischen Verlusten in der Viehzucht führt (Weersink et al. 2002). Insbesondere in der kostenintensiven Rinderzucht kann dies zum Problem werden. 2014 kam, wie zuvor beschrieben, eine dritte Subspezies hinzu *Campylobacter ssp. testudinum* trat dabei als Kolonisateur von Reptilien und in menschlichen Blutkulturen auf (Fitzgerald et al. 2014). Eine Infektion des Menschen tritt hier gehäuft bei Reptilienzüchtern oder in Zoohandlungen auf. Das oben genannte Spektrum an potentiell betroffenen Nutztierarten zeigt deutlich, dass *Campylobacter fetus* eng mit dem Menschen und menschlicher Landwirtschaft verknüpft ist. Je enger die Beziehung zwischen Mensch und Nutztier desto höher ist auch das anthroozoonotische Potential und die wechselseitige Übertragung des Erregers auf die jeweils andere Wirtspezies. Zu beachten ist hierbei, dass durch diese enge Beziehung natürlich nicht nur das Risiko einer individuellen Ansteckung steigt, insbesondere bei geringen Hygienestandards, sondern auch das Risiko für die Entstehung von Mutationen des Erregers.

1.3 Klinische Aspekte der Campylobacteriose

Die Inkubationszeit einer *Campylobacter*-Enteritis beträgt zwischen zwei und sieben Tagen (Black et al. 1988). Für einen Ausbruch der Erkrankung im Menschen reicht hierfür bereits eine geringe Bakterienlast von 500-800 Erregern (Black et al. 1988). Die Campylobacteriose zeigt sich dabei klinisch vornehmlich als Gastroenteritis. *Campylobacter* ist sogar der häufigste Erreger einer akuten bakteriellen Gastroenteritis im europäischen Raum (The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. 2010). Klinisch zeigt sich eine akute Campylobacteriose mit blutigen Diarrhoen, Fieber, Oberbauchschmerzen und Übelkeit. In den meisten Fällen ist eine Campylobacteriose selbstlimitierend und bedarf keiner kausalen Therapie. Eine symptomatische Therapie mit Flüssigkeitssubstitution und Elektrolytkontrolle ist aber in jedem Fall sinnvoll. Eine antimikrobielle Therapie kann bei schweren Verläufen, Komplikationen, bei Schwangeren oder immunsupprimierten Patienten sinnvoll sein (Allos 2001). Die Letalität der Campylobacteriose liegt bei 0,05 pro 1000 Infektionen (Allos 2001). Als Folge einer Campylobacteriose treten in einigen Fällen Athralgien oder das Guillain-Barré-Syndrom als Spätfolgen auf.

Infektiös bedingte Athralgien beruhen entweder auf entzündlich-immunologischen Gelenkprozessen oder auf septisch-infektiösen Gelenkentzündungen mit Erregerpersistenz. Diese gehen mit schmerzhaften Gelenkschmerzen nach hämatogener Streuung des Ursprungserregers einher.

Das Guillain-Barré-Syndrom ist aktuell eine wichtige Ursache für akute generalisierte Lähmungen (van Doorn et al. 2008) *Campylobacter jejuni* ist hierbei der am häufigsten nachgewiesene Erreger dieser Erkrankung. Gleichzeitig geht eine zuvor durchgemachte Infektion mit *C. jejuni* mit einem schweren Verlauf und einer schlechteren Prognose des Guillain-Barré-Syndroms einher (Allos 1997). Bei diesen schweren Verläufen kommt es zur Tetraplegie mit Atemlähmung sowie zur Lähmung der Pharynx- und Larynxmuskulatur. Häufig sind hierbei Fazialisparesen oder Schluckbeschwerden. Hinzu kommen in Fallbeschreibungen Augenmuskel- und Hypoglossusparesen (Yamagami et al. 2016). Als Variante des Guillain-Barré-Syndroms tritt in seltenen Fällen das sogenannte Miller-Fisher-Syndrom auf. Hierbei ist vor allem die Trias aus Ophthalmoplegie, Ataxie und Areflexie diagnostisch wegweisend. Lähmungen der Rumpf- und Extremitätenmuskulatur sind hierbei, im Gegensatz zum Guillain-Barré-Syndrom, nachrangig (Fisher 1956).

Weitere mögliche Folgeerkrankungen einer *Campylobacter*-Infektion beinhalten Hirnabszesse, Meningitis, reaktive Arthritis und Periodontitis (Kaakoush et al. 2015).

Obwohl *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* die am häufigsten humanpathogen auftretenden Campylobacterspezies sind, können auch andere *Campylobacter* Spezies wie beispielsweise *C. fetus*, *C. lari* oder *C. upsaliensis* Campylobacter-assozierte Erkrankungen

hervorrufen, wobei *C. fetus* hierbei eher bei extraintestinalen Erkrankungen in Erscheinung tritt (Wagenaar et al. 2014).

Diese Zusammenstellung der möglichen Komplikationen einer *Campylobacter*-Infektion verdeutlicht, dass es sich keinesfalls um eine zu verharmlosende "Magen-Darm-Grippe" handelt. Vielmehr zeigt sich das Potential von *Campylobacter* und seiner Subspezies in Einzelfällen zu schweren und selten auch letalen Krankheitsverläufen zu führen. Besonders gefährdet sind generell immungeschwächte Patienten wie beispielsweise onkologische Patienten.

1.3.1 Blutstrominfektion mit *Campylobacter fetus*

Die Humanmedizinische Bedeutung von *Campylobacter fetus* lässt sich gut darstellen anhand von Fallberichten in denen es zu Blutstrominfektion bei Menschen gekommen ist. Da dies im Falle von *Campylobacter fetus* dennoch selten auftritt beziehungsweise beschrieben wird stützt sich diese Beobachtung in der Regel auf beschriebene Einzelfälle. Beispielsweise kam es in diesem Zusammenhang bereits 2016 zur Hospitalisierung einer 50-jährigen, nierentransplantierten und somit immungeschwächten, Frau. Die Hospitalisierung erfolgte bei Bakteriämie, Fieber und Ileocolitis mit Diarrhoen. Im Verlauf zeigten sich multiple Milzabszesse, woraufhin Blutkulturen abgenommen wurden und eine antibiotische Therapie mit Piperacillin/Tazobactam und Fluconazol eingeleitet wurde. Im Verlauf entwickelte die Patientin eine Polyarthrit. Die Blutkulturen zeigten einen Nachweis von *Campylobacter fetus*. Es wurde eine *Campylobacter fetus*-Bakteriämie mit Milzabszessen, reaktiver Arthritis, Erythema nodosa und bakteriell induzierter Hepatitis diagnostiziert. Unter kalkulierter Therapie mit Amoxicillin/Clavulansäure beziehungsweise Azithromycin zeigte sich die *Campylobacter fetus*-Bakteriämie gut behandelbar (Coustillères et al. 2022). Coustillères et al. führten keine Bestimmung des Erregers auf Subspezies-Ebene durch.

Ein anderer Fallbericht beschreibt einen 28-jährigen männlichen Patienten mit bekanntem Alkoholabusus, welcher bei Schwäche des linken Arms und positiven Meningismuszeichen hospitalisiert wurde. Im Verlauf bestätigte sich der Verdacht einer Meningitis mit Nachweis von *Campylobacter fetus* in der Blutkultur. Es erfolgte eine genauere Erregerbestimmung und *Campylobacter fetus* ssp. *venerealis* konnte als Ursache der Meningitis festgestellt werden. Als wahrscheinlichste Infektionsquelle wurde der Haushund des Patienten identifiziert. Die Studie von Seong et. al legt nahe, dass auch eine Infektion von anderen Tieren als den in der Literatur bis dahin beschriebenen Nutztieren möglich ist (Seong et al. 2021). Zwei ähnliche Fälle von *Campylobacter fetus* induzierter Meningitis werden ebenfalls von van Samkar beschrieben (van Samkar et al. 2016).

Beide oben kurz zusammengefassten Fallberichte lassen sich durch viele weitere ergänzen. Beispielsweise beschreiben Patrick et al. mehrere Blutstrominfektionen mit *Campylobacter fetus* ssp. *testudinum* (Patrick et al. 2013). Shigematsu und Shigue beschreiben einen Fall von *Campylobacter fetus* ssp. *fetus* induzierter Perikarditis bei einem 60-jährigen Mann (Shigematsu

und Shibue 2023). Eine andere Arbeitsgruppe wiederum berichtet von einem Fall pyogener Arthritis von hervorgerufen durch *Campylobacter fetus* ssp. *fetus* (Nishiguchi et al. 2017).

Alle aufgeführten Fälle verdichten das Bild von *Campylobacter fetus* als einen Erreger welcher als Anthroozoonose vor allem bei immunsupprimierten Patienten schwere Schäden auslösen kann, welcher aber als Blutstrominfektion nachzuweisen und grundsätzlich antibiotisch zu therapieren ist.

1.3.2 Bovine Genitalcampylobacteriose

Die Bovine Genitalcampylobacteriose ist eine veterinärmedizinisch relevante, durch *Campylobacter fetus* hervorgerufene Erkrankung bei Rindern. Sie zählt zu den sogenannten Deckseuchen, da sie beim Deckakt übertragen werden kann. Eine Übertragung ist jedoch auch durch kontaminierte Gerätschaften in Besamungsstationen möglich. Bullen sind hierbei häufig die asymptomatischen Träger und Überträger der Erkrankung; die Weibchen werden in der Regel beim Paarungsakt infiziert (Silveira et al. 2018). Der Erreger nistet sich bei den Weibchen in der Vaginalschleimhaut ein und kann in der Folge zu Infertilität und zu Aborten führen. Eine weitere Möglichkeit der Infektion findet über den fäkal-oralen Weg statt, wobei dies vor allem zur Bakteriämie führen kann. In trächtigen Weibchen kann der Erreger in die Plazenta einwandern und dort zu Plazentitis und Abort führen (Maxie 2015). Die Bovine Genitalcampylobacteriose ist eine wichtige Ursache von Reproduktionsversagen und Infertilität bei Kühen und Kälbern. Kälber sind hierbei aufgrund des noch nicht vollständig ausgeprägten Immunsystems für die Infektion anfälliger (Jimenez et al. 2011; Silveira et al. 2018).

Erkrankungen des Reproduktionstraktes von Nutztvieh, welche wie die Bovine Genitalcampylobacteriose zu Infertilität und Aborten führen können, gehen mit signifikanten wirtschaftsökonomischen Verlusten in der Landwirtschaft einher (Weersink et al. 2002). Eine Impfung gegen die bovine Campylobacteriose steht seit 1983 zur Verfügung (Vasquez et al. 1983).

1.4 Biologische Abgrenzung von *Campylobacter fetus* zu anderen *Campylobacter* subspezies

Die biologische und phänotypische Differenzierung der verschiedenen *Campylobacter* Subspezies basiert auf verschiedenen Ansätzen. Zum einen ist das Kolonisierungsverhalten zu berücksichtigen. *Campylobacter fetus* ssp. *fetus* tritt als Kolonisator diverser Spezies in Erscheinung. Zu den Bekannten zählen Rinder, Schweine und Schafe. *Campylobacter fetus* ssp. *venerealis* tritt vor allem als Kolonisator von Rindern in Erscheinung bei denen er zur bovinen Genitalcampylobacteriose führen kann, welche Infertilität zur Folge haben kann. Dies ist, wie oben beschrieben, gerade auch als wirtschaftlicher Aspekt für die Rinderzucht ein zu berücksichtigender Faktor. *Campylobacter fetus* ssp. *testudinum*, die neuste entdeckte Subspezies,

kolonisiert vornehmlich den Magendarmtrakt von Reptilien. Eine Infektion mit *C. fetus* ssp. *testudinum* des Menschen ist im Rahmen einer Bakteriämie möglich. Von Schulze et al. wurden 2006 bereits die phänotypischen Eigenschaften von *C. fetus* ssp. *fetus* und ssp. *venerealis* zusammenfassend untersucht (Schulze et al. 2006). Die Ergebnisse dieser Studie sind in Tabelle 2 dargestellt.

Berücksichtigt wurde hierbei unter anderem der 1% Glycintoleranztest (Véron, R. und Chatelain 1973). Dieser Test hat jedoch wie von van Bergen *et al.* nachgewiesen eine geringe Reproduzierbarkeit (van Bergen et al. 2005). Eine weitere bekannte Testmöglichkeit ist der Hydrogensulfit-Test, bei welchem sich *Campylobacter fetus* ssp. *fetus* H₂S-positiv und *Campylobacter fetus* ssp. *venerealis* H₂S-negativ zeigt (Véron, R. und Chatelain 1973). Jedoch ist dieser Test ebenfalls nicht ausreichend geeignet, da er *Campylobacter fetus* ssp. *venerealis* *biovar intermedius* Stämme nicht berücksichtigt (van Bergen et al. 2005).

Vor der Implementation von PCR-Diagnostik durch diverse Arbeitsgruppen (Oyarzabal et al. 1997; Inglis und Kalischuk 2003; Chaban et al. 2010; van der Graaf-van Bloois et al. 2013) existierten in der Literatur zahlreiche Ansätze für ein molekulares Assay zur Identifikation und beziehungsweise oder zur Differenzierung von *Campylobacter fetus* ssp.. Hierzu zählen Pulsfeld-Gelelektrophorese (Salama et al. 1992; Vargas et al. 2003), Restriktions-Längenpolymorphismus (RFLP) (Cardarelli-Leite et al. 1996) 16S-Sequenzierungen (Gorkiewicz et al. 2003) und Hybridisierung (Wesley et al. 1991; Blom et al. 1995; Casadémont et al. 2000).

Hierbei zeigt sich eine Unterscheidbarkeit von *C. fetus* ssp. *venerealis* und *C. fetus* ssp. *fetus* insbesondere über die Glycinintoleranz des erstgenannten sowie die Selenite-Reduktion und die Widerstandsfähigkeit der Organismen gegenüber ausgewählten Antibiotikaklassen.

Subspezies	Glycintoleranz	Selenite-Reduktion	Antibiotikaresistenz		Wachstum bei 42°	PCR
			Metronidazol	Cefoperazone		
<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>	intolerant	-(100)	-(100)	-(100)	-(90,1)	+(100)
<i>C. fetus</i> ssp. <i>fetus</i>	tolerant	+(81,8)	+(40,9)	+(86,4)	+(81,8)	+(100)

Tabelle 2: Morphologische und biochemische Unterschiede zwischen *C. fetus* ssp. *venerealis* und *C. fetus* ssp. *fetus*. Die Angaben entsprechen dem Wachstum unter dem genannten Faktor in Prozent (Schulze et al. 2006).

In Tabelle 2 sind verschiedene morphologische und biochemische Eigenschaften aufgeführt, die *C. fetus* ssp. *venerealis* und *C. fetus* ssp. *fetus* voneinander unterscheiden; basierend auf (Schulze et al. 2006).

Es folgte eine weitere Untersuchung unter Berücksichtigung von *Campylobacter fetus* ssp. *testudinum* zur phänotypischen und genotypischen Unterscheidung der *Campylobacter fetus*

Subspezies (Fitzgerald et al. 2014). Desweiteren konnten van der Graaf-van Bloois zeigen, dass alle drei Subspezies Gram negativ waren. Die Oxidase-Negativität und Glycintoleranz war in dieser Versuchsreihe nur für *C. fetus* ssp. *fetus* eindeutig nachweisbar. *C. fetus* ssp. *testudinum* zeigte wie *C. fetus* ssp. *fetus* eine Glycintoleranz. Die H₂S-Produktion war bei *C. fetus* ssp. *fetus* und bei *C. fetus* ssp. *testudinum* gegeben, nicht jedoch bei allen *C. fetus* ssp. *venerealis*-Isolaten (van der Graaf-van Bloois et al. 2016). Van der Graaf-van Bloois beschrieben zusätzlich 2014 eine Nutzbarkeit für die Differenzierung der Subspezies auf einem phänotypischen Level (van der Graaf-van Bloois et al. 2013; Bloois et al. 2014). Eine Differenzierung der *Campylobacter fetus* ssp. ist demnach über die biochemischen Eigenschaften grundsätzlich möglich. Diese Art der Unterscheidung basiert dabei allerdings auf indirekten Methoden. Es wird das biochemische Verhalten und die Abbauprodukte des Erregers untersucht ohne einen direkten Nachweis am Erreger selbst zu erbringen.

1.5 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung, kurz FISH, ist eine etablierte Methode zur mikrobiologischen Diagnostik und Differenzierung. Das Prinzip der *in-situ*-Hybridisierung wurde erstmals durch Pardue und Gall 1969 beschrieben (Pardue und Gall 1969) und hat sich seither stetig weiterentwickelt. Das Grundprinzip basiert auf eigens entwickelten Fluoreszenz-Sonden, die ausschließlich an einen spezifischen Bereichen des Genoms binden können. Man kann sich so die genomischen Unterschiede der zu untersuchenden Objekte zunutze machen und diese spezifisch zur Darstellung bringen. Zum besseren Verständnis folgt hier eine kurz zusammengefasste Darstellung der Funktionsweise dieser Methode. Eine genauere Erklärung wird im Methodenteil dieser Arbeit gegeben.

Zur Herstellung von Präparaten für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung wird eine mikrobiologische Bakteriensuspension auf einen Objektträger gegeben und dort chemisch bzw. physikalisch fixiert. Anschließend erfolgt das Auftragen eines Puffers mit enthaltenden Fluoreszenz-Sonden und die Hybridisierung der Proben. Nach Abwaschen der chemischen Reststände entsteht ein Präparat, welches dazu geeignet ist fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet zu werden.

Eine Schwierigkeit bei der Anwendung der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung besteht darin, dass es auch ohne direkte Bindung im Rahmen der Hybridisierung zu fälschlicher Fluoreszenz kommen kann. Insbesondere die Akkumulation von freiem Fluoreszenzsondenmaterial in der umgebenen Materie und die Überlagerung vieler Zellen bei Proben minderer Ausstrichqualität sind hier zu nennen. Daher ist die genaue Definition von als positiv zu wertenden Präparaten vorab notwendig. Eine weitere Schwierigkeit stellt die hohe Lichtempfindlichkeit und geringe Haltbarkeit von fluoreszierendem Material dar. Bei der Arbeit mit Fluoreszenzsonden muss daher auf einen geringen Störlichteinfall geachtet werden. Dies gilt insbesondere auch für den Herstellungsprozess und die Lieferkette. Fertig erstellte Fluoreszenzsonden können bei niedrigen Temperaturen (ca. 8°C) gelagert werden.

Allerdings nimmt die Fluoreszenz mit dem Abbau des Fluoreszenzfarbstoffes mit der Zeit ab. Eine eindeutige Beurteilbarkeit ist in der Regel innerhalb der ersten drei Tage nach Hybridisierung gegeben. Eine Beurteilbarkeit und Vergleichbarkeit darüber hinaus ist mindestens fragwürdig und sollte vermieden werden, da die Fluoreszenz konstant abnimmt. Solche Fehlerquellen gilt es zu erkennen und vor der Untersuchung durch den Versuchsaufbau auszuschließen.

In der aktuelleren Forschung wurde von Poppert *et al.* bereits ein Sonden-Setup zur schnellen Differenzierung thermotoleranter *Campylobacter* spp. Isolate entwickelt, nachdem die Wachstumsbedingungen in Kultur für die mikrobiologische diagnostische Routine beschrieben wurde. (Poppert et al. 2008) In diese Untersuchungen konnte *Campylobacter fetus* bisher jedoch nicht eingeordnet werden, da hierfür nicht ausreichend gut beschriebene Isolate als Kontrolle zur Verfügung standen.

1.6 Massenspektrometrie-basierte Proteotypisierung

Die Massenspektrometrie-basierte Proteotypisierung wurde erstmals von A. Zautner und O. Bader an *Campylobacter jejuni* beschrieben und basiert auf der spezifischen Masse von Proteinen (Zautner et al. 2015). Diese unterscheidet sich dabei bedingt durch Unterschiede und Mutationen im Genom. Jede Mutation im Genom, bzw. jede Abweichung vom Referenzstamm, kann eine abweichende Folge in der Aminosäurekette nach sich ziehen. Aufgrund der unterschiedlichen chemischen Zusammensetzung der Aminosäuren besitzt wiederum jede Aminosäure ein unterschiedliches Molekulargewicht (Tabelle 3). Daher besitzt jede mikrobielle Spezies ein charakteristisches Profil in der Ganzzellmassenspektrometrie, das größtenteils auf ribosomale Proteine zurückzuführen ist, deren Masse jeweils voneinander divergiert, da durch Mutationen andere, unterschiedlich schwere, Aminosäureketten in die Genomsequenz eingebaut werden. Die Proteotypisierung macht sich dieses Faktum zunutze, da abhängig von der Ladung fast jedes Protein eine spezifische Masse besitzt und dementsprechend auch spezifische zuordenbare Peaks im Massenspektrum. Treten nun bei unterschiedlichen Spezies Massenshifts der einzelnen Biomarker im Rahmen eines Aminosäureaustausches auf lässt sich diese Verschiebung als Peakverschiebung im Massenspektrum verzeichnen. Umgekehrt lässt sich anhand eines Massenspektrogramms auf ein bestimmtes Set an Proteinen schließen, welches für einen bestimmten Ursprungsorganismus spezifisch ist. Die Proteotypisierung lässt sich somit grundsätzlich diagnostisch nutzen.

Aminosäure	Abk.		Formel	durchschnittliche Masse in Da
Alanin	A	Ala	C_3H_5NO	71,0779
Cystein	C	Cys	C_3H_5NOS	103,1429
Aspartat	D	Asp	$C_4H_5NO_3$	115,0874
Glutamat	E	Glu	$C_5H_7NO_3$	129,1140
Phenylalanin	F	Phe	C_9H_9NO	147,1739
Glycin	G	Gly	C_2H_3NO	57,0513
Histidin	H	His	$C_6H_7N_3O$	137,1393
Isoleucin	I	Ile	$C_6H_{11}NO$	113,1576
Lysin	K	Lys	$C_6H_{12}N_2O$	128,1723
Leucin	L	Leu	$C_6H_{11}NO$	113,1576
Methionin	M	Met	C_5H_9NOS	131,1961
Asparagin	N	Asn	$C_4H_6N_2O_2$	114,1026
Pyrrolysin	O	Pyl	$C_{12}H_{19}N_3O_2$	237,2982
Prolin	P	Pro	C_5H_7NO	97,1152
Glutamin	Q	Gln	$C_5H_8N_2O_2$	128,1292
Arginin	R	Arg	$C_6H_{12}N_4O$	156,1857
Serin	S	Ser	$C_3H_5NO_2$	87,0773
Threonin	T	Thr	$C_4H_7NO_2$	101,1039
Selenocystein	U	Sec	C_3H_5NOSe	150,0489
Valin	V	Val	C_5H_9NO	99,1311
Tryptophan	W	Trp	$C_{11}H_{10}N_2O$	186,2099
Tyrosin	Y	Tyr	$C_9H_9NO_2$	163,1733

Tabelle 3: Aminosäuren und ihre durchschnittliche Massen in Da (The University of Washington's Proteomics Ressource (UWPR) 2023)

In Tabelle 3 ist eine Liste der Aminosäuren mit ihren durchschnittlichen Massen in Da aufgeführt, um zu verdeutlichen wie signifikant diese Massenunterschiede jeweils sind.

1.7 Zielsetzung dieser Dissertation

Im Rahmen dieser Dissertation wird die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung angewandt um eine praktische Grundlage zur Unterscheidung von *Campylobacter fetus* zu den anderen häufigen *Campylobacter* Spezies zu liefern. Ziel ist es zu ergründen, ob sich die Fluoreszenz-

in-situ-Hybridisierung für diesen Zweck prinzipiell eignet. Dabei werden Fluoreszenzsonden entwickelt und angewandt, die in der Lage sind die Abgrenzung zu den Spezies der Gattung *Campylobacter* fluoreszenzmikroskopisch signifikant darzustellen. *Campylobacter fetus* wird dabei unter Anwendung dieser Sonden mit folgenden *Campylobacter*-Spezies verglichen: *Campylobacter jejuni* ssp. *jejuni*, *Campylobacter jejuni* ssp. *doylei* und *Campylobacter coli*.

Der nächstlogische Schritt ist die weitere Unterscheidung innerhalb der drei *Campylobacter fetus* Subspezies. Ziel ist es hierbei die Massenspektrometriebasierte Proteotypisierung auf die drei Subspezies *Campylobacter fetus* ssp. *fetus*, *Campylobacter fetus* ssp. *venerealis* und *Campylobacter fetus* ssp. *testudinum* anzuwenden. Es soll untersucht werden, ob dies eine Unterscheidung zueinander oder die Unterscheidung verschiedener Sequenztypen zueinander ermöglicht. Im Zuge dessen soll die bereits bestehende Sequenzdatenbank zu *Campylobacter* um die untersuchten Stämme erweitert werden. Abschließendes Ziel der Arbeit ist es zu diskutieren in welcher Art und Weise beide Untersuchungstechniken diesen Zielvorgaben gerecht werden. Außerdem wird die Frage beantwortet werden ob eine Technik der jeweils anderen überlegen ist oder ob ein kombiniertes Anwenden beider Techniken zielführend wäre. Die im Rahmen dieser Untersuchung notwendigen Versuchsreihen und ihre Ergebnisse wurden vom Autor bereits vorab veröffentlicht. Im European Journal of Microbiology and Immunology 9(2019)2.pp. 62-71 wurde die Versuchsreihe zur Mass-Spectrometry based PhyloProteomics veröffentlicht (Emele et al. 2019a) und im Journal of Microbiological Methods Volume 151, August 2018, Pages 44-47 wurde die Versuchsreihe zur Fluorescence-*in-situ*-Hybridisation veröffentlicht (Karg et al. 2018). Zu beachten ist, dass im Verlauf nach der Erstveröffentlichung eine Umbenennung von "Mass spectrometry based PhyloProteomics" in "Massenspektrometriebasierte Proteotypisierung" zur besseren Unterscheidung von anderen Arbeiten stattfand. Diese Arbeit stellt nun den Kern beider vom Autor durchgeführten Versuchsreihen dar und setzt sie in einen inhaltlichen Zusammenhang mit abschließender Vergleichsbeurteilung.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemein

Im Folgenden werden in Tabelle 4 alle verwandten Materialien aufgelistet. Alle Materialien wurden vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Georg-August Universität Göttingen zur Verfügung gestellt.

Reinraum-Handschuhe, Critical Nitrile G3	Ansell, Brüssel, Belgien
Labormantel	
Handdesinfektionsmittel, Sterillium® classic pure	BODE Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Labortücher (Kimwipes)	Kimberly-Clark, Dallas, USA
Mehrzweckbeutel	Labor-Brand/Gießen
Ständer für Entsorgungsbeutel - aus beschichtetem Stahldraht mit Gummifüßen	NeoLab, Heidelberg, Baden-Württemberg
Reagiergefäß 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Reagiergefäß 1,5 ml	SARSTEDT, Nümbrecht
Reagiergefäß 2,0 ml	SARSTEDT, Nümbrecht
Sarstedt-(Flacon-)Röhrchen (15 ml und 50 ml)	SARSTEDT, Nümbrecht
Wattetupfer	COPAN innovation/Brescia, Italien
Laborabzugssystem	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH/ Sonnenbühl-Genkingen
Erlenmeyerkolben, Eng- und Weithals mit Bördelrand Borosilikatglas 3.3- 100 ml/250 ml	VWR International GmbH, Darmstadt, Hessen
Reagenzgläser mit geradem Rand Durchmesser: 12 mm Wandstärke 1 mm	VWR International GmbH, Darmstadt, Hessen
Microwtube® Röhrchen aus PP, Schraubverschluss mit Lippendichtung	Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Reaktionsgefäß-Ständer	SARSTEDT, Nümbrecht
Reagenzglas-Ständer	Biorapid GmbH, Umkirch, Baden-Württemberg
Bechergläser, niedrige Form Borosilikatglas 3.3. mit Ausguß; Diverse Größen	VWR International GmbH, Darmstadt, Hessen

Bechergläser, hohe Form Borosilikatglas 3.3. mit Ausguß; Diverse Größen	VWR International GmbH, Darmstadt, Hessen
Becher, niedrige Form	PP, hochtransparent
Laborflaschen, Klarglas, Enghals, mit Gewinde 100 ml/500 ml/1000 ml/2000 ml	Steiner GmbH, Siegen Eiserfeld
Schraubverschlusskappen PP, farbig mit Lippendichtung	Steiner GmbH, Siegen Eiserfeld
Enghalsflaschen mit Schraubverschluss -PE-LD, naturfarbig, 100 ml	Mollenkopf, Stuttgart
Spritzverschlüsse für Enghalsflaschen - PE-LD, naturfarbig	Mollenkopf, Stuttgart
Drahtkörbe, eckig - Edelstahl; Diverse Größen: 200x200x200 mm - 200x400x200 mm	NeoLab, Heidelberg, Baden Württemberg
Mikro-Doppelspatel - Edelstahl, Länge: 150 mm	VWR International GmbH, Darmstadt, Hessen
Laborlöffel - Edelstahl, Länge 200 mm	VWR International GmbH, Darmstadt, Hessen
Pinzette - Edelstahl, PTFE-beschichtet	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Baden Württemberg
Schraubendreher mit Bithalter-Magazin	Obi Group Holding SE & Co. KGaA, Wermelskirchen, Nordrhein-Westfalen
Aluminiumfolie - Reinaluminium 99, weich	Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Swabs - Holz/Baumwolle	VWR International GmbH, Darmstadt, Hessen
Zahnstocher	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Baden Württemberg
Brutschrank (37°C)	Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Petrischalen - Kalk-Soda-Glas	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Baden Württemberg
Impfösen, hart Einweg	Sarstedt/Nümbrecht
Impfösen, flexibel Einweg	Sarstedt/Nümbrecht

96-Well Platten, ABgene®	Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Magnetrührer mit Heizplatte, RCT classic IKAMAG®safety control	VWR International GmbH, Darmstadt, Hessen
Magnetrührstab, zylindrisch - PTFE-ummantelt	Heidolph, Schwabach
Magnetrührstäbchen-Entferner - PTFE-ummantelt	Heidolph, Schwabach
Reagenzglasschüttler, Vortex-Genie®	VWR International GmbH, Darmstadt, Hessen
Thermomixer, compact	Eppendorf, Hamburg
Wechselblock für 4 Objektträger für Hybridisierungsexperimente	Eppendorf, Hamburg
Bunsenbrenner	Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Mikrowelle	Blomberg/Neu-Isenburg
Wasserbad, Ecotherm E11	Dinkelberg analytics GmbH/Gablingen
Universal-Kühlschrank	Liebherr/Bulle, Schweiz
Professionelle Gefrierschränke, ohne Umluftkühlung	Liebherr/Bulle, Schweiz
Professionelle Gefriertruhe, ohne Umluftkühlung	Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Cryoröhrchen mit Außengewinde -Diverse Größen	Labor-Brand/Gießen
Cryoboxen - Karton mit Rastereinsätzen	GLW Storing Systems GmbH, Würzburg, Bayern
Cryoboxen - PP, autoklavierbar	GLW Storing Systems GmbH, Würzburg, Bayern
Gestelle für Cryoboxen - Edelstahl	VWR International GmbH, Darmstadt, Hessen
Sterilisations-Klebebänder	Medikbedarf Michael Fischer, Neuwied, Rheinland Pfalz
Zentrifugaleinheiten - Diverse Größen	Eppendorf, Hamburg
Mikrozentrifuge, gekühlt, 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugen- und Reaktionsgefäße mit Schraubverschluss, PP	NeoLab, Heidelberg, Baden Württemberg
Zentrifugenröhrchen PP, mit Schraubdeckel	NeoLab, Heidelberg, Baden Württemberg

Gestell für Zentrifugenröhrchen PP, autoklavierbar	Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Digitale Stoppuhr	TeeGschwendner GmbH, Meckenheim, Nordrhein Westfalen
Feinwaage LP6200S	Sartorius AG, Göttingen
Einweg-Wägeschiffchen PS, quadratisch	VWR International GmbH, Darmstadt, Hessen
Messzylinder DURAN®, hohe Form 100ml	Mollenkopf, Stuttgart, Baden Württemberg
Messzylinder PP, durchscheinend, hohe Form (100 ml, 500 ml, 1000 ml)	Mollenkopf, Stuttgart, Baden Württemberg
Messpipetten AR-Glas® Klasse AS (5 ml, 10 ml, 20 ml, 50 ml)	Labor-Brand/Gießen
Pasteur-Pipetten	WU Mainz/Bamberg
Pipettierhilfe: Pipetus®-Akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG/ Eberstadt
Pipettenbüchsen Edelstahl, zylindrisch und quadratisch	WU Mainz/Bamberg
Einkanalpipetten, mechanisch, Reference® (10 µl, 20 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen - PP 10 µl-Spitzen, Kristall-Farbe, dünn 200 µl-Spitzen, gelb 1000 µl-Spitzen, blau	Sarstedt, Nümbrecht
Filter-Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Farbig sortierte, nachfüllbare Boxen/Gestelle PP	Sarstedt, Nümbrecht
Objektträger Epoxy (10 Kammern Ø 6,7 mm)	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig
Deckgläser, rechteckig	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig
Färbeküvetten nach Hellendahl - Wheaton „810“ Borosilikatglas	VWR International GmbH, Darmstadt, Hessen
Mappen für Objektträger	Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Küvetten, Einweg, für Spektralphotometrie	Labor-Brand/Gießen

pH-Meter, tragbar	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co./Berlin
Mueller-Hinton-Agar mit 5% Schafblut	BioMérieux/Nürtingen
Columbia-Agar mit Schafblut	BioMérieux/Nürtingen
Horizontales Gel-Elektrophoresesystem	Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
PCR-Platten	Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Taq-DNA-Polymerase	Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
dNTP Mix	Jena Bioscience GmbH, Jena, Thüringen
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten
EDTA (Ethyldiaminotetraessigsäure)	Biochrom AG/Berlin
Formamid	Merck KGaA, Darmstadt, Hessen
TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Merck KGaA, Darmstadt, Hessen
Molekularbiologisch reines Wasser	
96-Well- und 384-Well-Mikrotiterplatten	VWR International GmbH, Darmstadt, Hessen
Laborstifte Permanent	VWR International GmbH, Darmstadt, Hessen
FISH-Hybrite	Vysis HYBrite, Abbott Diagnostics, Abbott Park, Illinois, USA
Fluoreszenzmikroskop	Leica DMR HC, Leica Microsystems/Wetzlar
Abzug	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH/Sonnenbühl-Genkingen
Anaerobiertopf "Anaerocult®"	Merck KGaA/Darmstadt
Brutschrank (37° C)	Thermo SCIENTIFIC/Waltham, USA
Feinwaage LP6200S	Sartorius AG/Göttingen
Kamera Acio Cam	Carl Zeiss AG/Oberkochen
PCR-Gerät Thermocycler	Biometra/Göttingen
Glaswaren, diverse	SCHOTT AG/Mainz
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen GmbH Germany/Hilden
MBT MALDI Biotyper	Bruker Daltonic GmbH, Bremen

Tabelle 4: Materialliste

2.2 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Im Folgenden wird die Durchführung einer *in-vitro* Untersuchung der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) zur Identifikation und Differenzierung von *Campylobacter fetus* Isolaten beschrieben. Durchführung und Ergebnis der nun näher beschriebenen Versuchsreihe entsprechen den in J. Microbiol. Methods 151 vom gleichen Autor publizierten Daten (Karg et al. 2018) und werden hier aufgegriffen und in einen größeren Kontext gesetzt.

2.2.1 *C. fetus* Stämme

Die in den Versuchen untersuchten Bakterienstämme wurden durch das Friedrich-Löffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Jena, Deutschland, das Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin Hamburg, Deutschland, das Institut für medizinische Mikrobiologie und Virologie der Universitätsmedizin Göttingen, Deutschland, die Belgian coordinated collection of micro-organisms (BCCM)/Laboratory of Microbiology University of Gent (LMG), Belgien und das WHO Collaborating Centre for *Campylobacter*/OIE Reference Laboratory for Campylobacteriosis, Utrecht, Niederlande, bereitgestellt. Insgesamt standen 20 *C. fetus* spp. *fetus* Isolate, 14 *C. fetus* spp. *venerealis* Isolate und 7 *C. fetus* spp. *testudinum* Isolate als Positivkontrollen, sowie 10 *C. jejuni* spp. *jejuni* Isolate, 4 *C. jejuni* ssp. *doylei* Isolate und 14 *C. coli* Isolate als Negativkontrollen zur Verfügung. Die *C. fetus* Isolate entstammten aus kolonisiertem Rind (n=9), Genitalabstrichen von Rindern (n=13), Abortmaterial von Kälbern (n=3), Abortmaterial von Schafen (n=1), kolonisierten Schweinen (n=1), Reptilien (n=3), sowie menschlichem Blut (n=11). Alle in Form von Kryokulturen, zur Verfügung stehenden Stämme wurden auf Müller-Hinton-Agarplatten bei 38°C über mindestens 2 bis maximal 3 Tage angezüchtet. Anschließend wurde das Wachstum auf Verunreinigungen oder Fehlbesiedelung kontrolliert. Die hierbei auffälligen Nährmedienplatten wurden verworfen. Jedes Isolat wurde jeweils vierfach auf unterschiedlichen Agarplatten angezüchtet, um verunreinigte Platten verwerfen zu können. Anschließend erfolgte die Isolierung der DNA aus den Kulturen mittels eines DNA-Isolations-Kit (QIAamp DNA Mini Kit).

Isolat	Ursprung	Region	Datum	Bezeichnung in Stammsammlungen	in anderen	MLST-ST
<i>Cfi0018</i>	Vorhautspülung, Rind	Niedersachsen	28.04.2009			4
<i>Cfi145/05</i>	Vorhautspülung, Rind	Südbayern	02.08.2005			4
<i>Cfi0114</i>	Vaginalprobe Rind	Niedersachsen	19.12.2006			4
<i>Cfi151/05</i>	Vorhautspülung, Rind	Südbayern	10.08.2005			4
<i>Cfi93/05</i>	Vorhautspülung, Rind	Thüringen	10.05.2005			6
<i>Cfi94/05</i>	Vorhautspülung, Rind	Thüringen	12.05.2005			6
<i>Cfi96/05</i>	Vorhautspülung, Rind	Thüringen	12.05.2005			4
<i>Cfi225/04</i>	Kalbfetus	Thüringen	16.12.2004			3

<i>Cjf512/99</i>	Kalb Mageninhalt	Thüringen	24.09.1999		5
<i>Cjf63/05</i>	Vorhautspülung, Rind	Nordbayern	06.03.2005		4
<i>Cjf11/05</i>	Vorhautspülung, Rind	Nordbayern	21.01.2005		4
<i>CjfBS122/05</i>	Kalbfetus	Baden-W.	14.06.2005		4
<i>Cjf07BS0007</i>	Vorhautspülung, Rind	Baden-W.	26.09.2007		4
<i>Cjf134/65</i>	Kalbfetus	Südbayern	12.07.2005		4
<i>Cjf201/05</i>	-	Thüringen	23.11.2005		2
<i>Cjf91/05</i>	Vorhautspülung, Rind	Thüringen	12.05.2005		6
<i>Cjf155/60s</i>	Vorhautspülung, Rind	Baden-W.	07.09.2006		6
<i>Cjf222/04</i>	Sperma, Rind	Sachsen	16.12.2004		2
<i>Cjf45361</i>	menschliche Blutkultur	Deutschland			3
<i>Cjf169361</i>	menschliche Blutkultur	Deutschland			3
<i>Cjf148/5361</i>	menschliche Blutkultur	Deutschland			3
<i>CfiLMG6443</i>	Vaginalschleimhaut, Rind	United Kingdom	1962	ATCC 19438; CCUG 538; CIP 68.29; JCM 2528; NCDO 1876; NCTC 10354; Park X/161/5	4
<i>CfiLMG6442</i>	Lammfetus Gehirn	Göteborg, Schweden	1972	ATCC 27374; CCTM La3023; CCUG 6823A; CECT 564; CIP 53.96; JCM 2527; LMG 8849; NCTC 10842; NIAH 1049; Vinzent strain Mouton 1	3
<i>CfiLMG6570</i>	Rind	Belgien	1985	CCUG 7477; CIP 53.105; Florent 483; NIDO 483	4
<i>Cjf71721</i>	menschliche Blutkultur	Duderstadt, Deutschland	2016		3
<i>Cjf82014</i>	menschliche Blutkultur	Herzberg am Harz, Deutschland	2015		68
<i>CfiLMG27499</i>	menschliche Blutkultur	New York, USA	2003	ATCC BAA-2539; Blaser 03-427	15
<i>CfiLMG06569</i>	Kalbfetus	Belgien	1985	CCUG 17693; CIP 68.8; Florent 7572; NIDO 7572	11
<i>CfiLMG06571</i>	Genitalabstrich Rind	Belgien	1985	CCUG 17694; De Keyser 2125/4; NIDO 2125/4	3
<i>CfiLMG06727</i>	-	Belgien	1985	CCUG 17695A; LMG 6628 t1	2

Tabelle 5: Verwendete *Campylobacter fetus* Stämme und ihre Herkunft

In Tabelle 5 werden alle verwendeten *C. fetus* Stämme aufgeführt. Es ist außerdem angegeben woher das Probenmaterial geographisch und biologisch stammte; sowie das Jahr der Probenentnahme. In der rechten Spalte ist außerdem der jeweilig zugehörige Sequenzierungstyp dargestellt. Die in der ersten Spalte mit LMG (Laboratory of Microbiology, Departement of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Sciences of Ghent University) gekennzeichneten Proben entstammen aus der Datenbank der Belgian Coordinated Collections of Microorganisms.

2.2.2 Sonden

Die Sulfoindocyanin-(Cy3-)markierten Sonden wurden mit Hilfe der ARB Software (Ludwig et al. 2004; Kumar et al. 2006) entwickelt. Die *Campylobacter fetus* spezifischen Sonden wurden mit einem 16S rRNA-Targeting von *Campylobacter fetus* entwickelt (C_fetus_1: 5'- Cy3 – GAG – ATT – AGT – TGG – ATA – TCA – AGC – CC – 3', sowie C_fetus_16s_1027: 5'- Cy3 – CCT – GTC – TCA – ACT – TTC – TAG – CAA – GC – 3'). Zur Untersuchung standen somit fünf Sonden zur Verfügung. Sonde 1 und 2 wurden als spezifische *Campylobacter fetus* – Sonden entwickelt. Sonde 3 ist spezifisch für alle Eubakterien und diente somit auch als Kontrollsonde. (Amann et al. 1990) Sonde 4 ist spezifisch für alle *Campylobacter* Spezies. Sonde 5 ist sowohl für *Campylobacter* als auch für *Arcobacter* spezifisch. Abschließend wurden die Sonden unter Verwendung der Software probeCheck (<http://www.microbial-ecology.net/probecheck>) (Loy et al. 2008) *in silico* auf Kreuzreaktionen evaluiert; in Referenz zur SILVA LSU Datenbank (Pruesse et al. 2007). Die Sonden wurden von Sequence Laboratories (SeqLab) Göttingen GmbH, Göttingen, Deutschland synthetisiert.

Die zu untersuchenden Proben wurden jeweils mit der zu testenden Sonde sowie der Eubakteriensonde als interner Kontrolle kombiniert aufgetragen, um eine direkte Qualitätsprüfung zu ermöglichen.

Fluoreszenzsonde	Spezifität	Sequenz
<i>C. fetus</i> 1	<i>C. fetus</i>	5'-GAG ATT AGT TGG ATA TCAAGC CC-3'
<i>C. fetus</i> 16S 1027	<i>C. fetus</i>	5'-CCT GTC TCA ACT TTC TAG CAA GC-3'
EUB338	Eubakterien	5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'
Camp 16S 414	<i>Campylobacter</i>	5'-TTT ACG CTC CGA AAA GTG TCA-3'
CampArc 23S 1620	<i>Campylobacter/Arcobacter</i>	5'-GAA TAC TCA TCC CAC CCA CC-3'

Tabelle 6: Verwandte Fluoreszenzsonden

2.2.3 Puffer

Für die Durchführung der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung sind zwei verschiedene Puffer notwendig. Ein Hybridisierungspuffer stellt das optimale Milieu zur DNA-Strang-Hybridisierung dar während ein Waschpuffer den Objektträger am Ende des Hybridisierungsvorganges von dem verwendeten Formamid wieder reinigt. Die optimale Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer wurde bei 46°C von 10% bis 50% wie bereits beschrieben etabliert (Moter und Göbel 2000; Frickmann et al. 2017). Die Zusammensetzung der Puffer wird in Tabelle 7 und 8 näher aufgeführt. Wichtig ist hierbei,

dass der Waschpuffer in seiner Zusammensetzung mit der, im Hybridisierungspuffer zur Verwendung gekommenen, Formamidkonzentration korreliert. Die Puffer wurden in einem handelsüblichen Laborkühlschrank bei 8°C gelagert.

Hybridisierungspuffer auf 100 ml

Formamidkonzentration in %	5 M NaCl in ml	1 M TRIS HCl in ml	Formamid in ml	Aqua bidest in ml	10% SDS in ml
10	18	2	10	70	0,1
20	18	2	20	60	0,1
30	18	2	30	50	0,1
32	18	2	32	48	0,1
34	18	2	34	46	0,1
36	18	2	36	44	0,1
38	18	2	38	42	0,1
40	18	2	40	40	0,1
50	18	2	50	30	0,1

Tabelle 7: Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Waschpuffer in Korrelation zum verwendeten Hybridisierungspuffer (500 ml)

Formamidkonzentration im entsprechenden Hybridisierungspuffer %	5 M NaCl in ml	1 M TRIS HCl in ml	0,5 M EDTA in ml	Aqua bidest in ml	10% SDS in ml
10	45	10	0	444,5	0,5
20	21,5	10	5	463,0	0,5
30	10,2	10	5	474,3	0,5
32	9,1	10	5	475,4	0,5
34	7,9	10	5	476,6	0,5
36	6,8	10	5	477,7	0,5
38	5,7	10	5	478,8	0,5
40	4,6	10	5	479,9	0,5
50	1,8	10	5	482,7	0,5

Tabelle 8: Zusammensetzung des Waschpuffers für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Beide Tabellen 7-8 stellen in Kurzfassung die Zusammensetzung der verwandten Wasch- und Hybridisierungspuffer dar. Markiert ist der jeweils nach genauer Evaluation letztlich verwendete Puffer.

Im Folgenden wurde eine Evaluierung der optimalen Formamidkonzentration durchgeführt. Generell gilt es zu beachten, dass eine zu hohe Konzentration von Formamid im Hybridisierungspuffer dazu führt, dass sich die DNA-Stränge nicht adäquat hybridisieren lassen und die Fluoreszenzstärke nachlässt. Eine zu niedrige Konzentration führt im Gegenteil zu einer geminderten Spezifität und zu einer Fluoreszenz unabhängig von der SONDENSPEZIFITÄT. Dabei wurde zuerst in 10%-Schritten die Formamidkonzentration erhöht und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop evaluiert. Hier zeigte sich, dass die optimale Formamidkonzentration um eine adäquate Bindung zu gewährleisten ohne die Spezifität zu stark zu mindern zwischen 30-40% lag. In einer zweiten Formamidreihe, beginnend bei 30% und aufsteigend um jeweils 2% bis zu 40%, konnte gezeigt werden, dass diese Konzentration bei 38% liegt. Dies weicht von den von Poppert et. al. (Poppert et al. 2008) verwendeten 30% ab, zeigte sich jedoch als für die Versuche in jeder Hinsicht suffizient.

2.2.4 Hybridisierung

Der Schritt der Hybridisierung erfolgte mit Hilfe eines FISH-Hybrite (Vysis HYBrite, Abbott Diagnostics, Abbott Park, Illinois, USA). Die optimale Hybridisierungstemperatur wurde aus der Literatur übernommen (Moter und Göbel 2000; Frickmann et al. 2017). Die verwendeten Objektträger bestanden aus je zwei mal fünf Auslassungen. Dementsprechend konnte jede Probe in doppelter Ausführung angefertigt werden um Fehler beim Ausstreichen der Bakteriensuspension zu minimieren. Die Aufteilung richtete sich dabei stets nach dem in Abbildung 1 beschriebenen Muster.

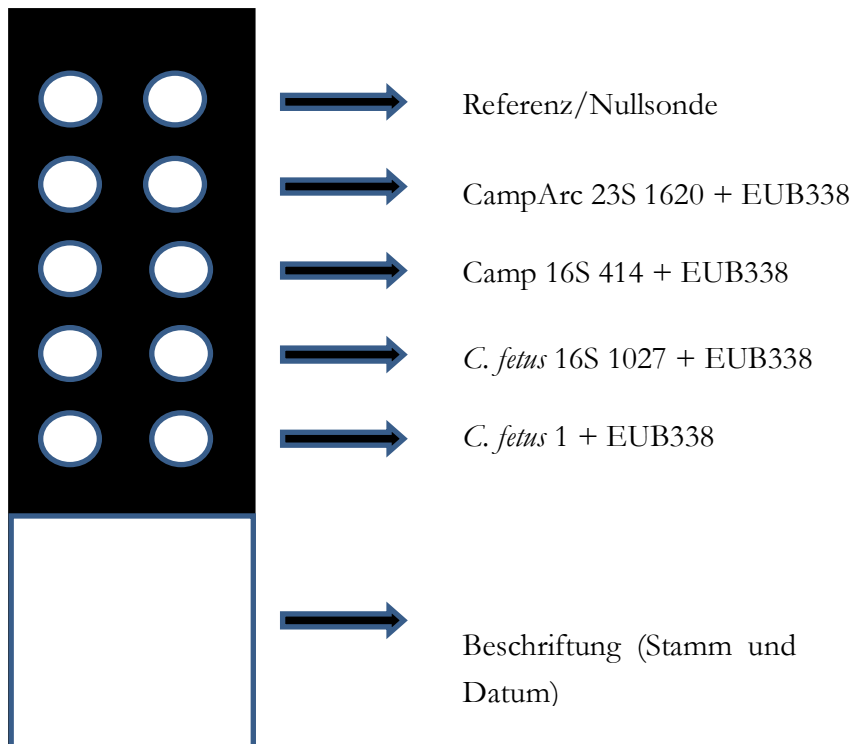


Abbildung 1: Schema für die Anordnung der Fluoreszenz-Objektträger

In jeden Spot des Objektträgers wurden 15 μ l 5M NaCl eingesetzt. Nun konnte mit Hilfe eines sterilen Stäbchens eine kleine Probe aus der Kultur entnommen werden und manuell im Tropfen zur Suspension gebracht werden. Hierbei galt es zu beachten nicht zu viel Biomaterial im Tropfen zu suspendieren, da es ansonsten unter dem Mikroskop zu Überlagerungsartefakten gekommen wäre. Diese Proben wären dann nicht verwertbar gewesen. Sobald jeder der zehn Tropfen suspendiert war wurde eine Hitzefixation durchgeführt. Hierbei wurde der Objektträger mit Hilfe einer Pinzette mehrfach so durch die Flamme des Bunsenbrenners gezogen, bis die Flüssigkeit vollständig verdunstete und nur noch die festen Bestandteile am Objektträger haften blieben. Nun erfolgte der nächste Schritt zur Fixierung der Proben, indem die Objektträger für zehn Minuten in ein Bad aus 99,9% Methanol gestellt wurden. Innerhalb dieser zehn Minuten wurde die Hybridisierungslösung vorbereitet. Hierbei wurde eine Menge je nach Anzahl der zu hybridisierenden Objektträger hergestellt. Die Hybridisierungslösung bestand zu 10% aus konzentrierter Sondenlösung sowie zu 90% aus dem zuvor angesetzten Hybridisierungspuffer. Sobald die Sondenlösung zur Weiterverarbeitung aus dem Kühlschrank genommen wurde, wurde der Lichteinfall auf ein Minimum reduziert, um die Qualität der Fluoreszenz nicht zu mindern. Nach Beendigung der Methanolfixierung wurden die Objektträger aus ihrem Bad entfernt. Auf jeden Spot wurden nun 10 μ l der entsprechenden Hybridisierungslösung aufgesetzt. Es war darauf zu achten, dass sich die Lösung gleichmäßig auf dem Spot verteilte.

Für die Hybridisierung wurde ein FISH-Hybrite (Vysis HYBrite, Abbott Diagnostics, Abbott Park, Illinois, USA) verwendet. Der Hybrite-Objektträgerinkubator wurde in dieser Zeit auf 45°C vorgeheizt, damit die Proben jederzeit der gleichen Wärmezufuhr ausgesetzt waren. Nun wurden die Proben in den Hybrit-Objektträgerinkubator gesetzt und der Deckel geschlossen. Die Hybridisierungszeit betrug 90 Minuten. Diese Zeit wurde genutzt, um ein Wasserbad mit einer Temperatur von 38°C anzusetzen. Es galt zu beachten das Wasserbad nicht zu spät anzusetzen, da der Waschpuffer in einem gläsernen Objektträgerbad dort hinein gesetzt wurde, um ihn ebenfalls auf 38°C aufzuheizen. Nach Ablauf der 90 Minuten mussten die fertig hybridisierten Proben noch gewaschen werden. Sie wurden in den angewärmten Waschpuffer gesetzt und verblieben darin 20 Minuten. Es ist zu empfehlen, falls kein Wasserbad mit lichtundurchlässigem Deckel zur Verfügung steht, den gläsernen Objektträgerständer in Aluminiumfolie einzuwickeln, um ihn möglichst vor Lichtstrahlung zu schützen. Nach dem Waschvorgang musste nun noch der Waschpuffer selbst abgewaschen werden. Dies erfolge einzeln mit destilliertem Wasser aus einer Spritzflasche. Anschließend wurde jeder Spot auf dem Objektträger noch mit einem Tropfen *DAPI* VectaShield Mounting Medium (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, USA) benetzt und ein Deckgläschen aufgesetzt.

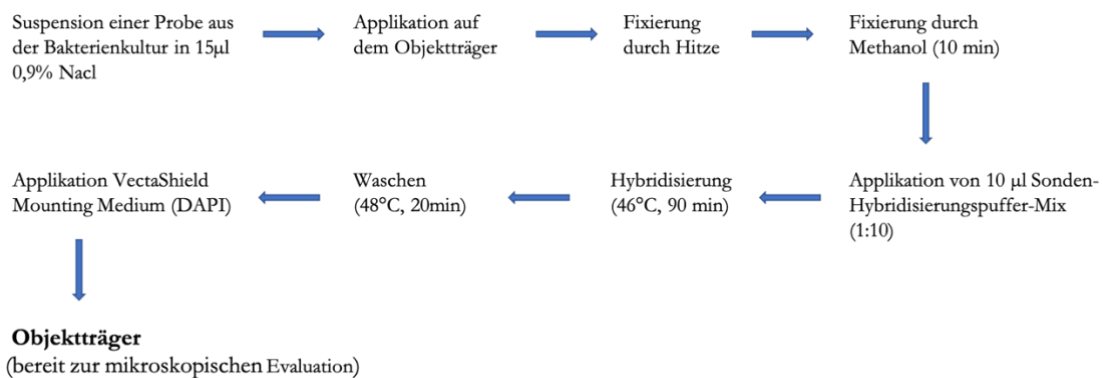


Abbildung 2: Kurzzusammenfassung der einzelnen Schritte bei der Durchführung der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung.

Idealerweise erfolgte die mikroskopische Untersuchung sofort. Wenn dies nicht möglich war konnten die Proben bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden. Auch bis zu drei Tage nach Anfertigung der Proben waren noch vergleichbar gute Ergebnisse zu erzielen. Danach galt es zu berücksichtigen, dass die Fluoreszenzintensität durch die Abnahme des Fluoreszenzfarbstoffes mit der Zeit nachlässt, sodass diese Proben nicht mehr zur Primärdatenerhebung verwendet wurden.

2.2.5 Mikroskopie

Die hybridisierten Objektträger wurden nun mit Hilfe eines Leica DMR HC Fluoreszenzmikroskops untersucht und nach dem Schema aus Tabelle 9 eingeteilt. Hierbei war erneut darauf zu achten, dass das Raumlicht in einem abgedunkelten Labor auf ein Minimum reduziert wurde. Dies diente nicht nur dem Schutz der Proben sondern auch der Minimierung von Störlicht bei der Bewertung und Einteilung des Fluoreszenzgrades der Proben. Jede Probe wurde einzeln ausgewertet. Proben, die nicht dem angesetzten Qualitätsanspruch entsprachen oder beschädigt waren, wurden verworfen und erneut angefertigt, bis ein auswertbares Ergebnis erreicht werden konnte. Beispielhaft wurden Bilder angefertigt um die Ergebnisse zusätzlich optisch festzuhalten.

In Tabelle 9 wird die festgelegte Definition der Fluoreszenzgrade dargestellt, um zu differenzieren ab wann eine Probe eine signifikante Fluoreszenz aufweist. 0-2 sind hierbei nicht signifikant, 3-5 werden als signifikante Fluoreszenz gewertet.

Fluoreszenzstärke	Beschreibung
0	keine signifikante Fluoreszenz, Zellen sind nicht sichtbar
1	keine signifikante Fluoreszenz, Zellen sind grenzwertig sichtbar
2	keine signifikante Fluoreszenz, Zellen sind sichtbar und abgrenzbar
3	signifikante Fluoreszenz
4	starke Fluoreszenz
5	maximale Fluoreszenz

Tabelle 9: Definition der Fluoreszenzstärke

2.3 Massenspektrometrie-basierte Proteotypisierung

2.3.1 Allgemein

In den vergangenen Jahren etablierte sich die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI-TOF) – Massenspektrometrie als Standard zur Differenzierung und Identifikation mikrobieller Spezies im klinischen Setting (Murray 2010; Lartigue 2013). Conway et. al. konnten zeigen, dass sich die MALDI-TOF – Massenspektrometrie ebenfalls zur Klassifikation unbekannter mikrobieller Isolate eignet (Conway et al. 2001). Dies basiert auf der Erkennung von Ähnlichkeiten in den Massenspektren unbekannter Isolate im Vergleich mit denen in bekannten Datenbanken. Dieses Verfahren wird als Proteotypisierung bezeichnet (Conway et al. 2001). Der

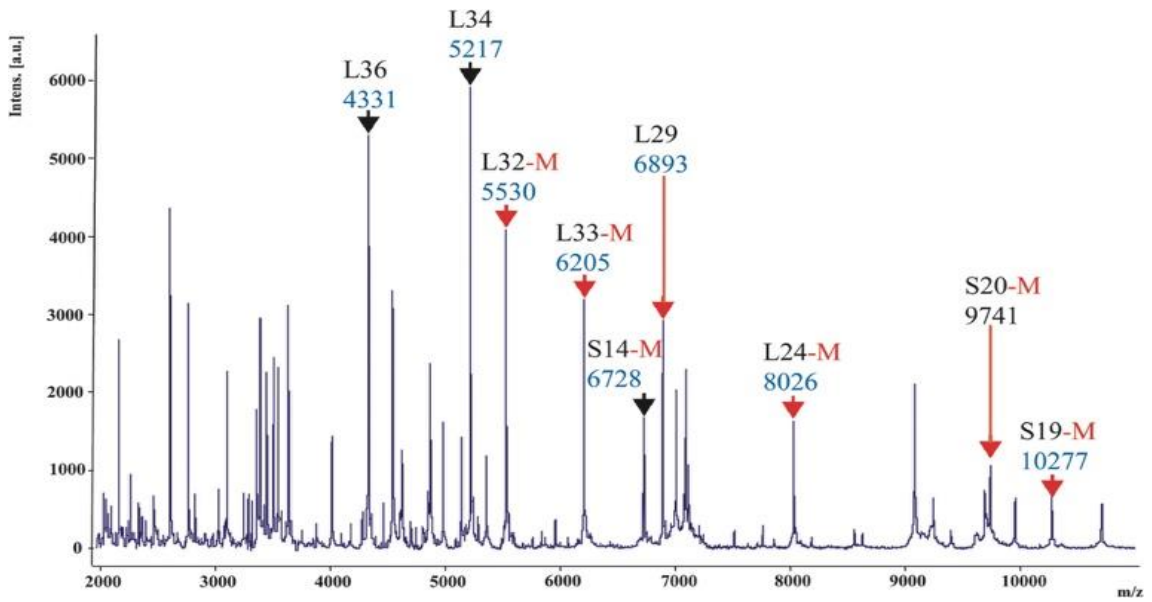
Grundgedanke ist dabei mittels spezifisch zuordenbarer Primer für bestimmte Spezies, Proteine oder sonstige organische Klassen ein spezifisches Massenspektrogramm zu erzeugen. Zautner und Bader entwickelten diese Methodik weiter und wendeten sie bereits für *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter doylei*, *C. coli* sowie für *Clostridioides difficile* an. Diese Arbeit setzt nun mit *Campylobacter fetus* und seinen Subspezies bei einem bisher nicht untersuchten Organismus der Campylobactergruppe an, um diese Methodik auszubauen (Zautner et al. 2013; Zautner et al. 2015).

Die Massenspektrometriebasierte Proteotypisierung ist eine Methodik zur Unterscheidung von Biomarkerprofilen und zur Identifikation der damit assoziierten Untergruppen innerhalb einer Bakterienspezies. Im Rahmen dieser Versuchsreihe wird hierzu das Massenspektrogramm des Referenzstammes Cff LMG 6442 (NCTC 10842) bestimmt. Die Massenspektren der weiteren Stämme können nun zu dem Referenzstamm in Relation gesetzt werden. Diese spezifischen Sequenztypen zuordenbaren Massenspektren können dann genutzt werden um eine Datenbank von Isoformen zu erstellen.

Diese Isoformen basieren wiederum auf der genomischen Unterscheidung der unterschiedlichen Stämme unter der Berücksichtigung eventueller posttranslationaler Modifikationen, welche hierbei als Störfaktor zu erwarten sind. Durch Massendifferenzen infolge nicht-stummer Mutationen ergeben sich dann spezifische Aminosäurefolgen. Es kann nun für jeden Sequenztyp eine spezifische Aminosäuresequenz abgeleitet werden, aus welcher sich umgekehrt wiederum der spezifische Sequenztyp ableiten lässt.

Innerhalb der Spezies und Subspezies kann dann zum Beispiel mittels der MEGA X - Software ein UPGMA-Dendrogramm zur genaueren Phylogenie erstellt werden (Kumar et al. 2018; Emele et al. 2019a). Diese methodische Vorgehensweise wird in Abbildung 3 zur schematischen Darstellung gebracht.

Schritt 1: Bestimmung des Massenspektrums der Testkohorte sowie des Referenzstammes CFF LMG 6442 (NCTC 10842)



Schritt 2: Isoformenliste der Kohorte zum Referenzstamm basierend auf der NCBI-Datenbank

Stamm XYZ	Primer A (z.B. L36)	Isoform 1
		Isoform 2
		Isoform 3
	Primer B (z.B. L34)	Isoform 1
		Isoform 2
		Isoform 3

L36 Referenz R	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]
L36 Isoform 1	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Yellow Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]
L36 Isoform 2	[Green Cell]	[Green Cell]	[Red Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Blue Cell]	[Green Cell]
L36 Isoform 3	[Green Cell]	[Black Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]
L36 Isoform ...	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]	[Green Cell]

Schritt 3: Aneinanderreihung der stammspezifischen Amminosäuresequenzen zu einer einzigen - Bestimmung des Sequenztyp

Im Beispiel:
 L36(1) - L34(4) - L33(2) - L35(R)- ...

Schritt 4: Berechnung und Darstellung eines auf Proteotyping beruhendem UPGMA-Dendrogramms mittels MEGA X - Software

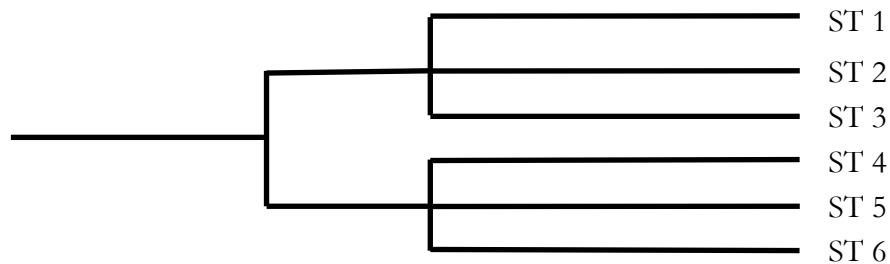


Abbildung 3: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte bei der Massenspektrometrie-basierten Proteotypisierung

2.3.2 Posttranslationale Modifikationen

Posttranslationale Modifikationen sind Änderungen der Proteine, die im Anschluss an den Prozess der Translation auftreten können (Voet et al. 2016). Die Art der Veränderung reicht von zusätzlichen organischen oder anorganischen Gruppen bis zur Bildung von Disulfidbrücken (Eichler und Adams 2005). Im Falle des Genus *Campylobacter* sind mögliche posttranslationale Modifikationen Methylierung, Demethionisierung, Phosphorylierung und Formylierung. Hierbei ist die Entfernung des initialen Methions die häufigste posttranslationale Modifikation bei *Campylobacter* (Gonzales und Robert-Baudouy 1996; Varland et al. 2015). Eine posttranslationale Modifikation verändert natürlich auch die molekulare Masse eines Proteins, sodass die theoretisch errechnete molekulare Masse von der tatsächlich gemessenen abweicht, bzw. die posttranslationale Modifikation mit eingerechnet werden muss. Dies ist insbesondere bei Verfahren relevant, die die genaue Massebestimmung zum Ziel haben wie in unserem Beispiel die Massenspektrometrie-basierte Proteotypisierung. Um in dieser Versuchsanordnung im Massenspektrum die entstandenen Peaks korrekt zuzuordnen war daher die vorherige Kenntnis möglicher posttranslatinaler Modifikationen wie Methylierung, Demethionisierung, Phosphorylierung und Formylierung erforderlich. Eine entsprechende Berechnung der jeweiligen molekularen Masse erfolgte in Tabelle 11.

Posttranslationale Modifikation	Beschreibung
Glycosylierung	z.B. N-Glycosylierung, O-Glycosylierung
Lipid-Modifikation	z.B. Lipoproteine, Isoprenylierung, Acylierung
Phosphorylierung	z.B. Phosphoaspartate, Phosphohistidine, Phosphoserine, Phosphothreonine, Phosphotyrosine
Disulfidbrücken	Zytosolische Proteine

Proteolyse	z.B. Amino-terminale und Carboxy-terminale Maturation
Methylierung	z.B. Methylarginin, Methylcysteine, Methylglutamine, Methylhistidine, Methyllysine
Acetylierung	
Aminosäuremodifikation	z.B. Thiolierung, Demethionisierung

Tabelle 10: Posttranslationale Modifikationen

Tabelle 10 zeigt beispielhaft einige mögliche Arten von posttranslationalen Modifikationen in Archaen wie von Eichler und Adams beschrieben (Eichler und Adams 2005). Die hierin beschriebenen Veränderungen am Ursprungsmaterial haben jeweils unterschiedliche Massenveränderungen zur Folge.

2.3.3 *C. fetus*-Stämme

Zur Evaluation wurden dieselben *Campylobacter fetus* ssp. *fetus*, *Campylobacter fetus* ssp. *venerealis* und *Campylobacter fetus* ssp. *testudinum* Stämme verwendet wie bei den oben beschriebenen Fluoreszenz-*in-situ*-Untersuchungen, um eine möglichst gute Vergleichbarkeit der beiden Methoden zu erzielen. Die zu untersuchenden *Campylobacter*-Stämme wurden auf die gleiche Weise kultiviert wie in den FISH-Experimenten zuvor. Müller-Hinton-Pferdeblutagar diente dabei als Medium und die Agarplatten wurden zwei bis drei Tage bei 38°C im Brutschrank bebrütet. Entscheidend hierbei war es ein ausreichendes Wachstum zu erhalten ohne durch zu langes Bebrüten eine Verunreinigung zu provozieren. Jede Kultur wurde in vierfacher Zahl angezchtet um etwaige Verunreinigungen verwerfen zu können. Die herangewachsenen Kulturen wurden dann mit Hilfe von sterilisierten angespitzten Holzstäbchen auf die markierten Spots einer Trägerscheibe aufgebracht wurden.

2.3.4 Sequenzierung

Vor der eigentlichen massenspektrometrischen Untersuchung war es notwendig einen Satz von Primern der ribosomalen Proteinen zu entwickeln, um eine Referenz für die Biomarkersequenzen zu haben, die dann in der Massenspektrometrie nachgewiesen werden konnten. Die verwendeten Primer mussten dabei drei Hauptqualitätskriterien erfüllen. Es mussten Primer sein, die auf allen untersuchten Stämmen zu finden wären, es musste für jeden Stamm eine Amplifizierung und Sequenzierung dieses spezifischen Abschnittes möglich sein und die Zielgene (Biomarker) mussten in der Massenspektrometrie signifikant in mindestens zwei Isoformen unterscheidbar sein, um eine Interpretation zuzulassen. Wenn eines dieser Kriterien nicht gegeben war musste ein zuvor bei den anderen *Campylobacter* Spezies herangezogener Primer vollständig verworfen werden. Als Grundstock an Primern dienten die bereits in der vorangehenden Studie von A. Zautner und O. Bader (Zautner et al. 2015) verwendeten. Der Vorteil dieser Primer gegenüber neu entwickelten bestand darin, dass sie für diesen Zweck bereits für die verwandten Arten *Campylobacter jejuni* und

Campylobacter doylei erprobt worden waren und ein ähnlich gutes Diskriminationsvermögen daher auch für *Campylobacter fetus* zu erwarten war.

2.3.5 Matrix-Lösung

α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure (HCCA) (gelöst in Acetonitril, Trifluoressigsäure und destilliertem Wasser) wurde als Matrix-Basissubstanz (Bruker Daltonics, Bremen) verwendet. Hierin erfolgte die Lösung von reinem Humaninsulin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) als interner Kalibrator. Die genaue Masse des Insulinindex wurde bei ($m/z=5806,1$) bestimmt. Somit war eine genaue Vergleichbarkeit der verschiedenen auf diesen Kalibrationspeak kalibrierten Massenspektren möglich. (Emele et al. 2019a)

2.3.6 MALDI-TOF Massenspektrometrie

MALDI-TOF (Matrix-assistierte-Laser-Desorptions-Ionisierung mit Flugzeitanalyse) ist ein Verfahren zur Massenanalyse chemischer und biochemischer Verbindungen. Hierbei erfolgt die Flugzeitanalyse von Ionen, welche mittels Laser aus der Matrix freigesetzt werden. Diese "Time of Flight" (TOF) wird mit einem Massenspektrometer detektiert und visualisiert. Durchführung und Vorbereitung der Proben erfolgte nach dem bereits beschriebenen Schema (Zautner et al. 2015). Die Messung erfolgte in 100-Schuss-Salven, wobei insgesamt 600 Massenspektren pro Targetsport in einem Bereich von 2-20 kDa aufgezeichnet wurden. Bei einer Identifikation der Biomarker ≥ 2 wurden die Ergebnisse als korrekt gewertet (Emele et al. 2019a).

2.3.7 Biomarker in ICMS Spektren

Für die Auswertung der Massenspektren wurden Standardalgorithmen von FlexAnalysis (Bruker Daltonics, Bremen) verwendet. Für die Analyse wurden die Spektren dem Insulinpeak entsprechend geeicht und mittels MBT-Standard-FAMS-Method geglättet. Alle zur Untersuchung bereit stehenden Aminosäuresequenzen wurden einzeln in das ExpASy Bioinformatics Resource Portal (https://web.expasy.org/compute_pi/) hochgeladen. Hier konnte mittels Molekulargewichtsberechnungssoftware die exakte Biomasse der jeweiligen Biomarker-Aminosäuresequenz berechnet werden, was als Grundlage für die Identifikation der korrespondierenden Peaks im Massenspektrum diente (Emele et al. 2019a). In einigen Fällen kommt es zusätzlich zu posttranslationalen Modifikationen, die neben der Aminosäuresequenz bei der Berechnung der Biomarkermasse berücksichtigt werden müssen (Voet et al. 2016). Das bedeutet, dass solche Modifikationen bei der Suche nach

korrespondierenden Peaks im Massenspektrum dazu führen können, dass die tatsächliche Biomasse von der theoretisch berechneten abweicht. Aus diesem Grund wurden alternative Positionen im Massenspektrum berechnet bei denen die posttranslationalen Modifikationen z.B. Abspaltung des *N*-terminalen Methionins, Acetylierungen, Phosphorylierungen, Formylierungen und Methylierungen berücksichtigt wurden.

Als Referenzstamm zur Identifikation von Massenshifts wurde LMG 6442 (NCTC 10842) verwendet. Alle Biomarkermassenshifts, die vom Spektrum dieses Referenzstammes abweichen wurden als vom *C. fetus* Referenzgenom abweichende Isoformen bezeichnet.

Die Biomarkergene jedes der oben beschriebenen zu testenden Isolate wurde mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Die hierzu verwendeten Biomarker mit ihren erwarteten Massen, abhängig von der Art der posttranslationalen Modifikationen, wurden in Tabelle 11 dargestellt. Es folgte die Sequenzierung durch Microsynth Seqlab, Göttingen. (Emele et al. 2019a)

Biomarker	methyliert methioniert	methyliert demethioniert	phosphoryliert demethioniert	nicht modifiziert	formyliert
L36	4197 Da	4211 Da	4277 Da	4332 Da	4360 Da
L34	5083 Da	5097 Da	5163 Da	5218 Da	5246 Da
L32-M	5527 Da	5541 Da	5607 Da	5662 Da	5690 Da
L33-M	6202 Da	6216 Da	6282 Da	6337 Da	6365 Da
S14-M	6725 Da	6739 Da	6805 Da	6860 Da	6888 Da
L29	6759 Da	6773 Da	6839 Da	6894 Da	6922 Da
L24-M	8023 Da	8037 Da	8103 Da	8158 Da	8186 Da
S20-M	9738 Da	9752 Da	9818 Da	9873 Da	9901 Da
S19-M	10274 Da	10288 Da	10354 Da	10409 Da	10437 Da

Tabelle 11: Verwendete Biomarker mit den errechneten molekularen Massen für spezifische posttranslationale Modifikationen

2.3.8 Multilocus Sequence Typing (MLST)

Multilocus Sequence Typing (MLST) wurde erstmals 1998 von Maiden et al. an *Neisseria meningitidis* entwickelt (Maiden et al. 1998). Die Etablierung dieser Methode für *Campylobacter* ssp. erfolgte kurz darauf (Dingle et al. 2001). Die Multilocus Sequenztypisierung stellt eine Möglichkeit dar phylogenetische und taxonomische Verwandtschaftsgrade in der Biologie zu bestimmen. Bei nah miteinander verwandten mikrobiologischen Stämmen kann hier ein Sequenztyp bestimmt werden, der bei taxonomischen Unterschieden abweicht. Basierend auf diesen Daten kann dann für keine eng miteinander verwandte Organismengruppe ein

Stammbaum in Form eines UPGMA-Dendrogramms erstellt werden. Grundlage hierfür ist die DNA-Sequenzierung spezifischer Haushaltsgene der jeweiligen Organismen. Diese Methode entwickelte sich seit ihrer Erstbeschreibung 1998 zu einer Standardmethode der medizinischen Mikrobiologie. Das originale MLST-Schema (Dingle et al. 2001; van Bergen et al. 2005) wurde für diese Versuche etwas modifiziert. Die Annealing-Temperatur wurde von 48° auf 47° reduziert und der glyA2-Primer wurde durch den glyS4 Primer ersetzt (Emele et al. 2019a). Anschließend wurde mittels MEGA X-Software ein MLST basiertes UPGMA-Dendrogramm erstellt (Kumar et al. 2018; Emele et al. 2019a).

2.3.9 Phylogenetische und Phyloproteomische Analyse

Alle verwendeten Biomarker wurden mit jeweiligen Isoformen unter Berücksichtigung der möglichen posttranslationalen Modifikationen in einer Tabelle zusammengetragen (Tabelle A1). Dies konnte genutzt werden um gemessene Peaks in den Massenspektren einer bestimmten Aminosäuresequenz zuzuordnen.

Äquivalent zum oben für das Multilocus Sequence Typing beschriebenen Vorgehen wurde mittels MEGA X-Software (Kumar et al. 2018; Emele et al. 2019a) ein Massenspektrometriebasiertes Proteotypisierung-UPGMA Dendrogramm erstellt.

2.3.10 UPGMA-Dendrogramme

UPGMA steht für "unweighted pair group method with arithmetic means", was sich übersetzen lässt in "ungewichtete Paargruppenanalyse mit arithmetischen Mitteln". Diese Methode entspricht einer hierarchischen Clusteranalyse zur Erstellung phylogenetischer Stammbäume. Die angewandte Methode entspricht der Beschreibung von Sokal 1958 (Sokal und Michener 1958), wobei die Berechnung heutzutage standardmäßig mit elektronischen Hilfsmitteln beispielsweise, wie in dieser Arbeit geschehen, über die MEGA X Software erfolgt (Kumar et al. 2018; Emele et al. 2019a). Nachdem zwei taxonomischen Dendrogramme wie in diesem Versuch mittels getrennt erhobener Daten erstellt wurden können diese dann gegenübergestellt werden und Unterschiede differenziert und visualisiert werden.

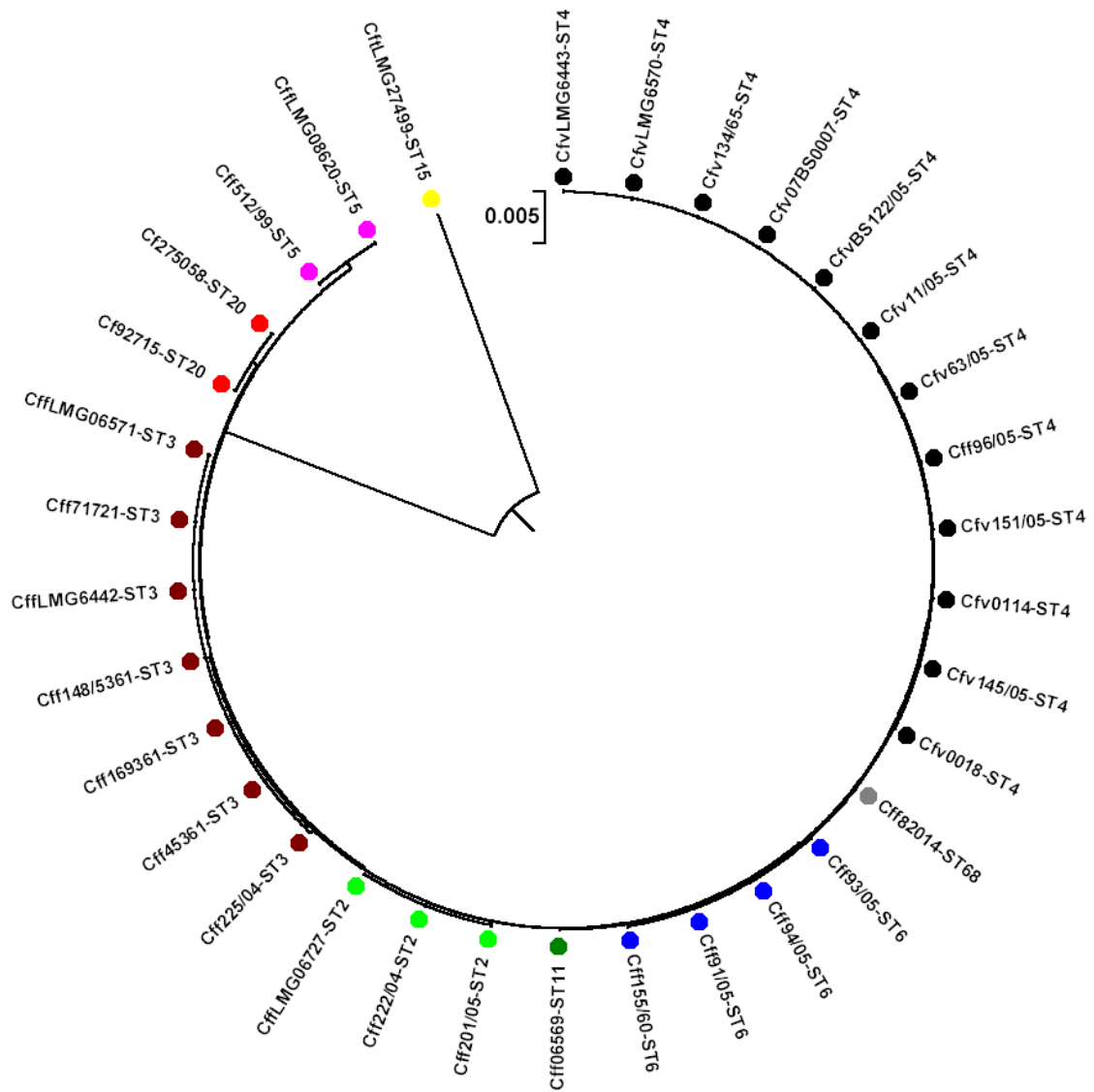


Abbildung 4: Beispielhafte grafische Darstellung eines MLST-basierten-UPGMA-Dendrograms für die zur Verfügung stehenden *Campylobacter fetus*-Isolate.

3 Ergebnisse

3.1 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Die 2016 durchgeführte *in-silico* Untersuchung der verwendeten Sonden zeigte, wie in Tabelle 12 dargestellt, die Basenpaar-Mismatches. Im Bereich von 1 Basenpaar-Mismatch war vor Allem die Sonde *C. fetus* 16s 1027 mit mehreren *Campylobacter* spezies auffällig. Eine Streuung auf andere *Campylobacter* Spezies als die Untersuchten war bei Sonde *C. fetus* 1 erst bei einem Basenpaar-Mismatch von 2 der Fall. Dies legte im Vorfeld nahe, dass im Vergleich beider Sonden eine höhere Spezifität von Sonde *C. fetus* 1 zu erwarten war (Karg et al. 2018).

Anzahl der Mis-Matches	Ribosomale RNA-Sequenz (zur Sonde passend)	Übereinstimmung mit bekannten Sequenzen (Anzahl der Einträge)
Sonde <i>C. fetus</i> 1: 5'-GAG ATT AGT TGG ATA TCA AGC CC-3'		
0	GGG-CUU-GAU-AUC-CAA-CUA-AUC-UC	<i>Campylobacter fetus</i> (15), <i>Campylobacter fetus</i> ssp. <i>fetus</i> (16), <i>Campylobacter fetus</i> ssp. <i>veneralis</i> (7)
2	GGG-CUU-GAU-AUC-CAA- <u>UGA</u> -AUC-UC <u>AGG</u> -CUU-GAU-AUC-CAA- <u>CAA</u> -AUC-UC	<i>uncultured bacterium</i> (5) <i>Campylobacter hyointestinalis</i> (1) <i>uncultured rumen bacterium</i> (8)
Sonde <i>C. fetus</i> 16s 1027: 5'-CCT GTC TCA ACT TTC TAG-3'		
0	CUA-GAA-AGU-UGA-GAC-AGG	<i>Campylobacter fetus</i> (14), <i>Campylobacter fetus</i> ssp. <i>fetus</i> (17), <i>Campylobacter fetus</i> ssp. <i>veneralis</i> (7), <i>Campylobacter avium</i> (3)
1	CUA-GAA- <u>UGU</u> -UGA-GAC-AGG	<i>Campylobacter upsaliensis</i> (20), <i>Campylobacter hyointestinalis</i> (1), <i>Campylobacter mucosalis</i> (8), <i>Campylobacter helveticus</i> (1), <i>Campylobacter troglodytis</i> (3), <i>uncultured bacterium</i> (4), <i>uncultured rumen bacterium</i> (10), <i>Campylobacter mucosalis-like-bacterium</i> (1)
	CUA-GAA- <u>CGU</u> -UGA-GAC-AGG	<i>Campylobacter</i> sp. 0402576-C0066 (1), <i>Campylobacter</i> sp. 0401536-C0027
2	<u>UUG</u> -GAA-AGU-UGA-GAC-AGG	<i>uncultured bacterium</i> (1)

	CGG -GAA-AGU-UGA-GAC-AGG	<i>Paenibacillus</i> (1), uncultured bacterium (4), rumen bacterium (1)
	GUG -GAA-AGU-UGA-GAC-AGG	uncultured bacterium (5)
	GG A-GAA-AGU-UGA-GAC-AGG	uncultured <i>Dehalobacter</i> (1), uncultured bacterium (1)
	CUA-GAG- CGU -UGA-GAC-AGG	uncultured bacterium (1)
	CUA- GAA-AGU-UGA-GAG- CGG	uncultured bacterium (1), uncultured marine bacterium (1)

Tabelle 12: Missmatches der FISH-Sonden

Tabelle 12 zeigt die Ergebnisse der *in-silico*-Untersuchung der Sondenspezifität. Hierbei ist die Anzahl der Missmatches der jeweiligen RNA-Sequenz und die dazu zuordenbaren Organismen aufgetragen.

Abbildung 5 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung wie bereits publiziert (Karg et al. 2018). Exemplarisch sieht man hier eine stets positive Eubakteriensonde EUB338. Für die Sonden *C. fetus* 1 und *C. fetus* 16S 1027 sind hier ebenfalls positive Befunde dargestellt. Alle anderen Ergebnisse sind hier als Negativbefunde dargestellt.

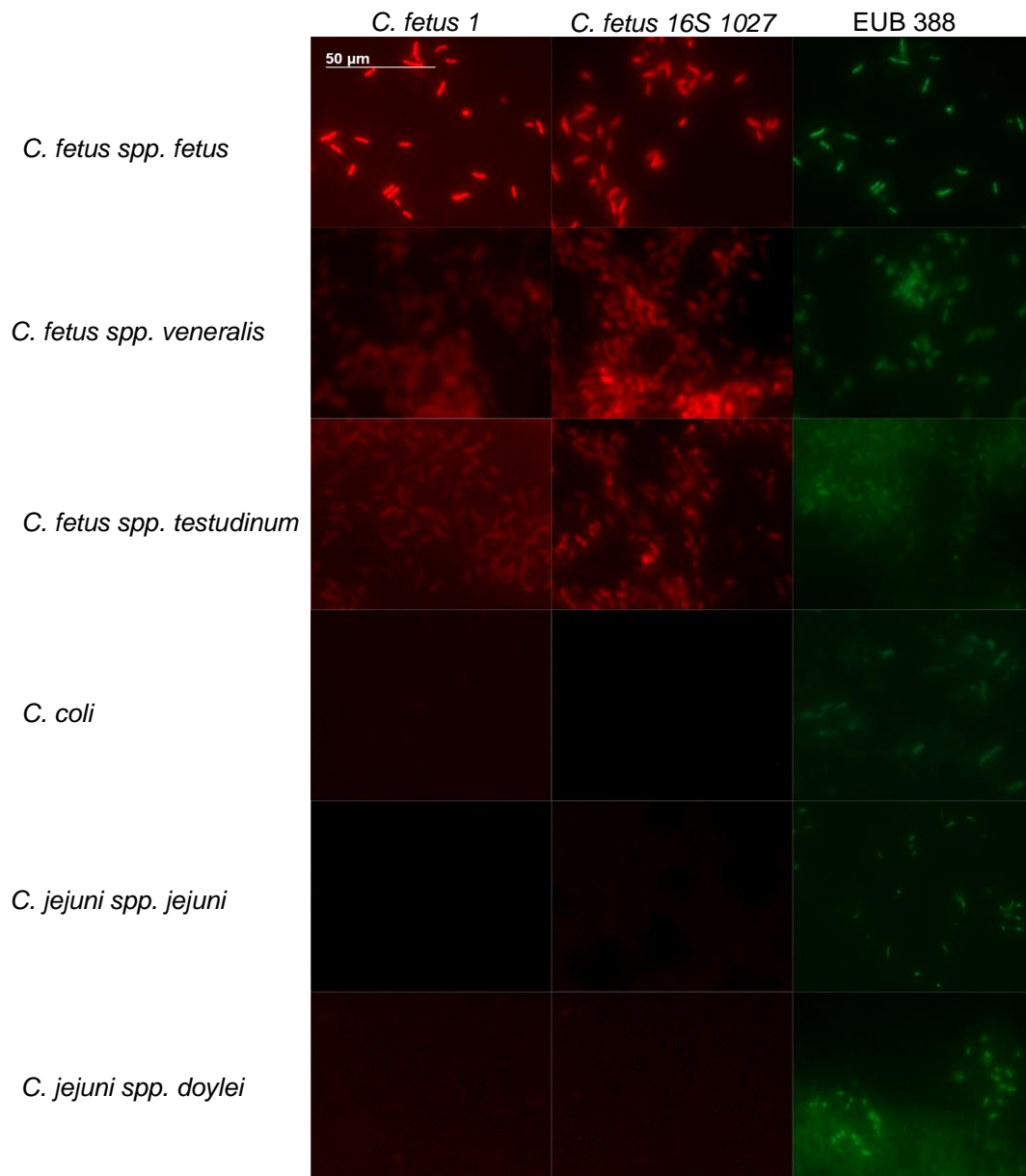


Abbildung 5: Beispielhafte Darstellung des durchschnittlichen Ergebnis der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungsuntersuchung

Abbildung 5 zeigt eine beispielhafte Darstellung des durchschnittlichen Ergebnisses der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungsuntersuchung. Als positiv zu bewerten sind hierbei alle Eubakterienproben. Außerdem die Proben für *C. fetus* spp. *fetus*, *C. fetus* spp. *veneralis* und *C. fetus* spp. *testudinum*. Eindeutig negativ zu werten sind die Ergebnisse von *C. coli*, *C. jejuni* spp. *jejuni* und *C. jejuni* spp. *doylei* in Kombination mit den beiden untersuchten Sonden *C. fetus* 1 und *C. fetus* 16S 1027.

Aus den in Tabelle 13 aufgeführten Ergebnissen der fluoreszenzmikroskopischen Analyse konnten nun die Sensitivität und Spezifität für die Sonden *C. fetus*_1 und *C. fetus*_16S_1027 ermittelt werden. Für *C. fetus*_1 konnte dabei eine Sensitivität von 90,2% (37/40)

nachgewiesen werden ohne dabei Kreuzreaktionen mit den 28 *C. jejuni* ssp. *jejuni*, *C. jejuni* ssp. *doylei* und *C. coli* Isolaten, die als negative Kontrollen dienten, einzugehen. Dementsprechend gilt für die Negativkontrollen eine Spezifität von 100% (0/28). Für die Sonde wurde bei einem der 20 *C. fetus* ssp. *fetus* Isolaten und bei dreien der 14 *C. fetus* ssp. *venerealis* Isolaten keine signifikante Fluoreszenz beobachtet. Im Gegensatz dazu war die Sensitivität der Sonde für die *C. fetus* ssp. *testudinum* Isolate 100% bei 7 getesteten Isolaten. Die Sonde *C.fetus_16s_1027* zeigte eine Kreuzreaktion mit einem einzelnen *C. coli*-Isolat. Die berechnete Spezifität liegt somit bei 96,4% (1/28) bei einer positiven Reaktion in der Negativkontrolle. Die *C. fetus*-Isolate aller drei Subspezies waren positiv mit einer Sensitivität von 100% (41/41).

Die Evaluation beider neu entwickelten *C. fetus*-FISH-Sonden zeigten eine sehr gute Sensitivität bei leicht geminderter Spezifität für die Sonde *C. fetus_16S_1027*. Dieses Ergebnis entspricht einer Eignung zur Verwendung der Sonde als Screening Option. Die Sonde *C. fetus_1* zeigte im Gegensatz dazu eine reduzierte Sensitivität bei guter Spezifität für die klinisch relevanten Spezies *C. jejuni* ssp. *jejuni*, *C. jejuni* ssp. *doylei* und *C. coli*. Daher ist sie besser geeignet zur Bestätigung eines Tests (Karg et al. 2018).

Spezies	<i>C. fetus_1</i>	<i>C. fetus_16S_1027</i>
<i>C. fetus</i> ssp. <i>fetus</i>	19/20	20/20
<i>C. fetus</i> ssp. <i>venerealis</i>	11/14	14/14
<i>C. fetus</i> ssp. <i>testudinum</i>	7/7	7/7
<i>C. jejuni</i> ssp. <i>jejuni</i>	0/10	0/10
<i>C. jejuni</i> ssp. <i>doylei</i>	0/4	0/4
<i>C. coli</i>	0/14	1/14

Tabelle 13: kumuliertes Ergebnis aller untersuchten Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungsproben

3.2 Massenspektrometrie-basierte Proteotypisierung

Die Arbeitsgruppe um A. Zautner hat 2015 ein neues Proteotyping Schema für *Campylobacter* etabliert anhand dessen die Differenzierung verschiedener Mikroorganismen unterhalb der Spezies-Ebene anhand ihrer typischen Massenspektren möglich wurde (Zautner et al. 2015). Diese Versuchsreihe ergänzt die bisher hierfür untersuchten Mikroorganismen um *Campylobacter fetus* und seine Subspezies. Dem oben genannten Schema entsprechend wurden die detektierten Massenpeaks im Spektrum des Referenzstamms *Cff* LMG 6442 (NCTC 10842) analysiert und entsprechenden Aminosäuresequenzen zugeordnet. Eine Sammlung aller 67 in der NCBI-Datenbank zur Verfügung stehenden *Campylobacter fetus* Biomarker-Nukleotidsequenzen wurde zu einer Tabelle zusammengetragen (Emele et al. 2019a). Im Rahmen der Auswertung der zur Verfügung stehenden Massenspektren wurden diese mit

dem Referenzstamm überlagert, um etwaige Massenverschiebungen durch Isoformen zu verdeutlichen. Nun konnten die entstandenen Shifts mit den in Tabelle 12 dargestellten Massen verglichen werden und Aminosäuresequenzvarianten so zur Darstellung gebracht werden. Basierend auf diesen mittels Proteotypisierung gewonnenen Daten konnte ein UPGMA-Dendrogramm erzeugt werden und dieses anschließend mit dem aus den MLST Datensätzen gewonnenen UPGMA-Dendrogramm zu verglichen werden (Abbildung 7).

Biomarker	Molekularmasse	De-Methionisation
L36	4331,35 Da	nein
L34	4217,26 Da	nein
L32-M	5530,47 Da	ja
L33-M	6205,31 Da	ja
S14-M	6728,11 Da	ja
L29	6893,22 Da	nein
L24-M	8026,59 Da	ja
S20-M	9741,33 Da	ja
S19-M	10277,10 Da	ja

Tabelle 14: Liste der verwendeten Biomarker und ihrer Massen

Im Vergleich mit den vorherigen Studien mit *Campylobacter jejuni* ssp. *jejuni* (Zautner et al. 2015), *C. jejuni* ssp. *doylei* (Zautner et al. 2016) und *Campylobacter coli* (Emele et al. 2019b) sind einige Unterschiede ersichtlich. Bei diesen mikrobiellen Spezies handelt es sich um einen deutlich besser erforschte Mikroorganismen, für die mehr Genomsequenzen in den Datenbanken hinterlegt sind. Hier konnten für die Subspezies *Campylobacter jejuni* ssp. *jejuni*, *C. jejuni* ssp. *doylei* sowie *Campylobacter coli* deutlich mehr spezifische Biomarker identifiziert werden.

Besonders auffällig war der Unterschied zwischen *C. jejuni* ssp. *jejuni* (n=19) und *C. fetus* (n=9). Hier bestand eine Differenz um den Faktor 2,1. In Bezug auf die posttranslationalen Modifikationen bestätigte sich die Annahme von Fagerquist et al., dass diese sich subspeziespezifisch unterschiedlich ausprägen können, aber nicht Stamm-spezifisch. Hierzu kann angeführt werden, dass im Falle des Primers *C. fetus* L33-M eine posttranslationale De-Methionisation erfolgte, dies aber für den gleichen Biomarker bei den mikrobiellen Spezies *C. jejuni* ssp. *jejuni*, *C. jejuni* ssp. *doylei* und *C. coli* nicht der Fall war. Bei diesen bestand keine posttranslationale Entfernung des initialen Methionins (Emele et al. 2019a).

Die Aminosäure- und Gensequenzen der Biomarker gemäß aller 67 in der NCBI-Datenbank zur Verfügung stehenden *C. fetus*-Isolate wurden ihren Isoformen entsprechend tabellarisch

sortiert. Die Anzahl der hierbei zuordenbaren Isoformen variierte je Biomarker von minimal 1 bis maximal 6 (Emele et al. 2019a). Die Häufigkeit des Auftretens bestimmter Biomarker-Isoformen innerhalb der 67 Genome umfassenden Datenbank unterschied sich ebenfalls. Bei nur einmalig nachgewiesenen Isoformen ist hier gegebenenfalls auch ein Fehler im Sequenzierungsprozess denkbar. Von den untersuchten Biomarkern konnten mit Ausnahme von Biomarker L36 für alle Biomarker mindestens 3 verschiedene Isoformen nachgewiesen werden. Eine Eignung für die Typisierung und Analyse von *C. fetus* mit dieser Methode war somit gegeben.

Zur Schaffung einer Vergleichbarkeit zwischen MLST und Massenspektrometriebasierter Proteotypisierung wurden die zu untersuchenden Stämme so ausgewählt, dass jede bekannte *C. fetus*-Subspezies vertreten war. Die MLST-Sequenzen schlüsselten sich nach Sequenztyp folgendermaßen auf: ST 2 (3 Isolate), ST 3 (7 Isolate), ST 4 (14 Isolate), ST 5 (2 Isolate), ST 6 (4 Isolate), ST 11 (1 Isolat), ST 15 (2 Isolate), ST 16 (1 Isolat), ST 20 (2 Isolate), ST 27 (1 Isolat), ST 30 (1 Isolat), ST 31 (1 Isolat), ST 66 (1 Isolat) und ST 68 (1 Isolat) (Emele et al. 2019a).

Bei der Proteotypisierung stellten sich vier verschiedenen Typen dar (Tab. 15). Typ A bestand vornehmlich aus *C. fetus ssp. fetus* und *C. fetus ssp. venerealis* Isolaten (31/41). Hierunter fielen 3 MLST-ST 2 Isolate, 7 MLST-ST 3 Isolate, 14 MLST-ST 4 Isolate, 4 MLST-ST 6 Isolate, ein MLST-ST 11 Isolat und ein MLST-ST 68 Isolat. Der zweite Typ B bestand ausschließlich aus den beiden *Cff* MLST-ST 20 Isolaten. Der dritte Typ C beinhaltete ein einziges Isolat: *Cff* MLST-ST 5. Die größte Aussagekraft hatte im Vergleich der vierte Typ D. Hierunter fielen ausschließlich und exklusiv *Cft* Isolate. Diese waren bisher auch von keinem anderen Typ erfasst worden. Die zugehörigen MLST-Sequenztypen für Proteotypisierungs-Typ D waren 16 (1 Isolat), 15 (2 Isolate), 27 (1 Isolat), 30 (1 Isolat), 31 (1 Isolat) und 61 (1 Isolat).

Auffällig ist hierbei, dass es sich bei *C. fetus ssp. testudinum* um eine Subspezies handelt, die sich in der MLST-Untersuchung mit sehr diversen Sequenztypen darstellt, bei der Proteotypisierungs-Untersuchung jedoch unter einem einzigen Typen vereint werden kann (Emele et al. 2019a).

	L36	L34	L32	L33	L24	S20	L29	S19	S14
Ref: <i>Cff</i> 84-40	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Cft</i> 0018	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Cft</i> 145/05	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Cft</i> 0114	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Cft</i> 151/05	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Cff</i> 93/05	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Cff</i> 94/05	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Cft</i> 96/05	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Cff</i> 225/04	A	B	C	D	E	F	G	H	I

<i>Cjf</i> 512/99	A	B	C	D1	E1	F	G	H	I
<i>Cjf</i> 63/05	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Cjf</i> 11/05	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Cjf</i> BS122/05	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Cjf</i> 07BS0007	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Cjf</i> 134/65	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Cjf</i> 201/05	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Cjf</i> 91/05	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Cjf</i> 155/60s	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Cjf</i> 222/04	A	B	C	D2	E	F	G	H	I
<i>Cjf</i> 45361	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Cjf</i> 169361	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Cjf</i> 148/5361	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Cjf</i> LMG6443	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Cjf</i> LMG6442	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Cjf</i> LMG6570	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Cjf</i> 1721	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Cjf</i> 82014	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Cjf</i> LMG27499	A	B	C	D3	E1	F1	G1	H1	I
<i>Cjf</i> 06569	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Cjf</i> LMG06571	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Cjf</i> LMG06727	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Cjf</i> LMG08620	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Cjf</i> 92715	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Cjf</i> 275058	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Cft</i> reptile 1	A	B	C1	D3	E1	F1	G1	H1	I
<i>Cft</i> reptile 2	A	B	C1	D3	E1	F1	G1	H1	I
<i>Cft</i> reptile 3	A	B	C	D3	E1	F1	G1	H1	I
<i>Cft</i> human 1	A	B	C	D3	E1	F1	G1	H1	I
<i>Cft</i> human 2	A	B	C	D3	E1	F1	G1	H1	I
<i>Cft</i> human 3	A	B	C	D3	E1	F1	G1	H1	I
<i>Cfi</i> 03/2gs	A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>Cfi</i> Z65	A	B	C	D	E	F	G	H	I

Tabelle 15: Aminosäuresequenzen der massenspektrometrisch bestimmaren Auflistung der Isoformen-Profile der einzelnen Testisolate gemäß Tabelle 16.

Code	Sequenz
A	MKVRPSVKKMCDKCKIVKRKGIVHVICENPKHKQRQG
B	MKRTYQPHKTPKCRTHGFRGRMKTKNRGRKVINARRAKGRKRLAA
C	MAVPKRRVSHTRAARRRTHYKVTLMPVKDKDKGSKWMPHRINKTTGEY
C1	MAVPKRRVSHTRAARRRTHYKITLMPVKDKDKGSKWMPHRINKTTGEY
D	MASANRVKIGLKCAECNDINYYTTTKNSKTTTEKLELKKYCPRLKKHTVHKEVKLK
D1	MASANRVKIGLKCAECNDINYYTTTKNSKTTTEKSELKKYCPRLKKHTVHKEVKLK
D2	MASSNRVKIGLKCAECNDINYYTTTKNSKTTTEKLELKKYCPRLKKHTVHKEVKLK
D3	MASANRVKIGLKCAECNDINYYTTTKNSKTTTEKLELKKYCPRLKKHTVHKEVKLK
E	MAVKYKIKKGGDEVKVIAGDDKGGKVAKVIAPLPPKGGQVIVEGVKVAKKAVKPTDKNPNGGFISKEMPIDISNV AKVEG
E1	MAVKYKIKKGGDEVKVIAGDDKGGKVAKVIAPLPPKGGQVIVEGVKVAKKAVKPTDKNPNGGFISKEMPIDISNV AKVEG
F	MANHKSAAEKRRARQTIKRTERNRFYRTRLKNLTKAVRVAVASGDKAALVALKDANKNFHSFVSKGFLKKETA SRKVSRLAKLVSTLAA
F1	MANHKSAAEKRRARQTIKRTERNRFYRTRLKNLTKAVRVAVTSGDKAALLALKDVNKNFHSFVSKGFLKKETAS RKVSRLAKLVSTLAA
G	MKYIDISAKSMSELNALLKEKKVLLFTRLRQKLKTMQLTNPNEIGETKKDIARINTAISAAK
G1	MKYIDISAKSISELNALLKEKKVLLFTRLRQKLKTMQLTNPNEIRDTKKEIARINTAISAAK
H	MARSLKKGPFVDDHVMKKVLAACAANDNKPIKTWSRRSMIPEMIGLTFNVHNGKGFIPVYVTENHIGYKLG FAPTRTFKGHKGSVQKKIGK
H1	MARSLKKGPFVDDHVMKKVLAACAANDNKPIKTWSRRSMIPEMIGLTFNVHNGKGFIPVYVTENHIGYKLG FAPTRTFKGHKGSVQKKIGK
I	MAKKSMAKAARKPKFSARGYTRCQICGRPHSVYKDFGICRVCLRKMANEGLIPGLKKASW

Tabelle 16: Legende zu Tabelle 15 - vollständige Aminosäuresequenzen

Alle zu untersuchenden Isolate wurden für die Phyloproteomische Analyse mit dem Referenzstamm LMG 6442 (NCTC 10842) verglichen. Hierbei beobachtete Massenshifts wurden daraufhin mit den Massen der möglichen Isoformen von der Isoformenliste (Tab. 12) verglichen und so Isoformen der entsprechenden Biomarker identifiziert. Insgesamt ließen sich für Biomarker L33-M (RpmF) 3 Isoformen nachweisen. Für die Biomarker L34 (RpmH), L32-M (RpmF), L29 (RpmC), L24-M (RplX), S20-M (RpsT) und S19-M (RpsS) konnten je zwei Isoformen nachgewiesen werden. Die Biomarker L36 (RpmJ) und S14-M (RpsN) zeigten beide nur eine einzige Isoform (Emele et al. 2019a) (Abbildung 6).

Um die phylogenetischen Verwandtschaftsgrade zwischen den einzelnen Isolaten zu bestimmen wurden die Aminosäuresequenzen der 9 identifizierten Biomarker zu einer zusammenhängenden Sequenz fusioniert. Hieraus konnte anschließend mittels MEGA X Software ein UPGMA-Stammbaum konstruiert werden (Kumar et al. 2018; Emele et al. 2019a). Eine eindeutige Unterscheidung zeigte sich zwischen den *C. fetus* ssp. *fetus* und *C. fetus* ssp. *venerealis* Isolaten einerseits und den *C. fetus* ssp. *testudinum* Isolaten andererseits welche sich unter dem Proteotyping Typ D zusammenfassen ließen.

Zum Vergleich der gewonnenen Daten wurde ein aus den MLST-Sequenztypen generiertes UPGMA-Dendrogramm konstruiert und dem Proteotypisierungs-basierten UPGMA-Dendrogramm gegenübergestellt. Vergleichend zeigten sich zwischen beiden Dendrogrammen kleinere Unterschiede. So war die Anzahl der unterscheidbaren Typen beim Proteotyping mit 4 Typen im Vergleich zu 14 verschiedenen MLST-Sequenztypen deutlich geringer. Eine Differenzierung des MLST-Sequenztyps 4 war mittels Proteotyping unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht möglich.

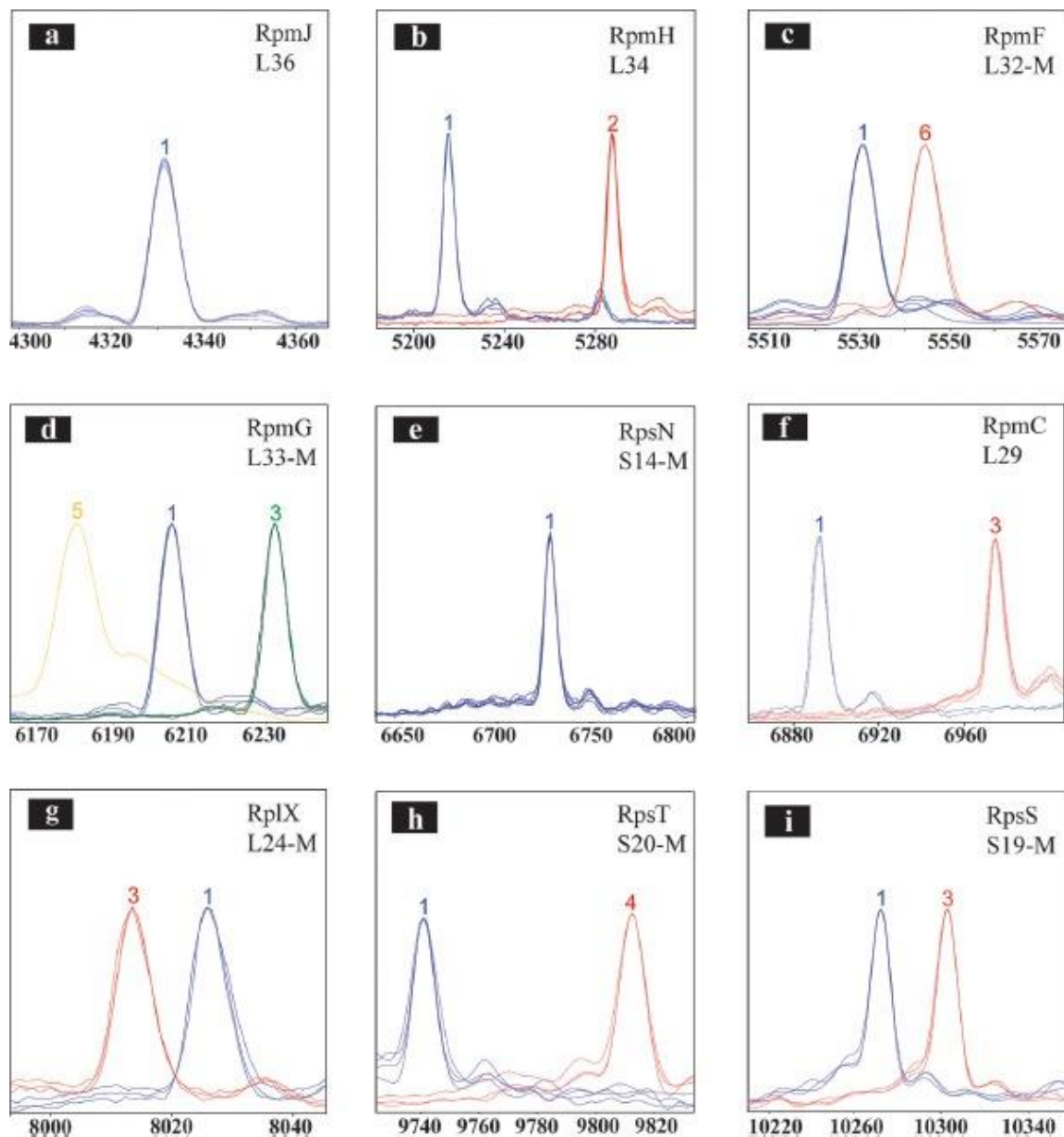


Abbildung 6: Massenspektrogramme der einzelnen für die Proteotypisierung verwendeten Biomarker

Abbildung 6 zeigt die Massenpeaks der einzelnen für die Proteotypisierung verwendeten Biomarker. Zur Visualisierung der verschiedenen Isoformen wurden die Spektren verschiedener Stämme überlagert. Zur besseren Visualisierung wurde die Intensität/Höhe der Peaks einander angepasst. In allen Massenspektren entspricht die Farbe blau dem

Referenzstamm *C. fetus* ssp. *fetus* LMG 6442 (NCTC 10842). Die Farben gelb, rot und grün zeigen die Isoformen an, die sich im Vergleich zum Referenzstamm in ihrer Masse unterscheiden. Das Kürzel -M hinter der Primerbezeichnung steht für die Entfernung des N-terminalen Methionins.

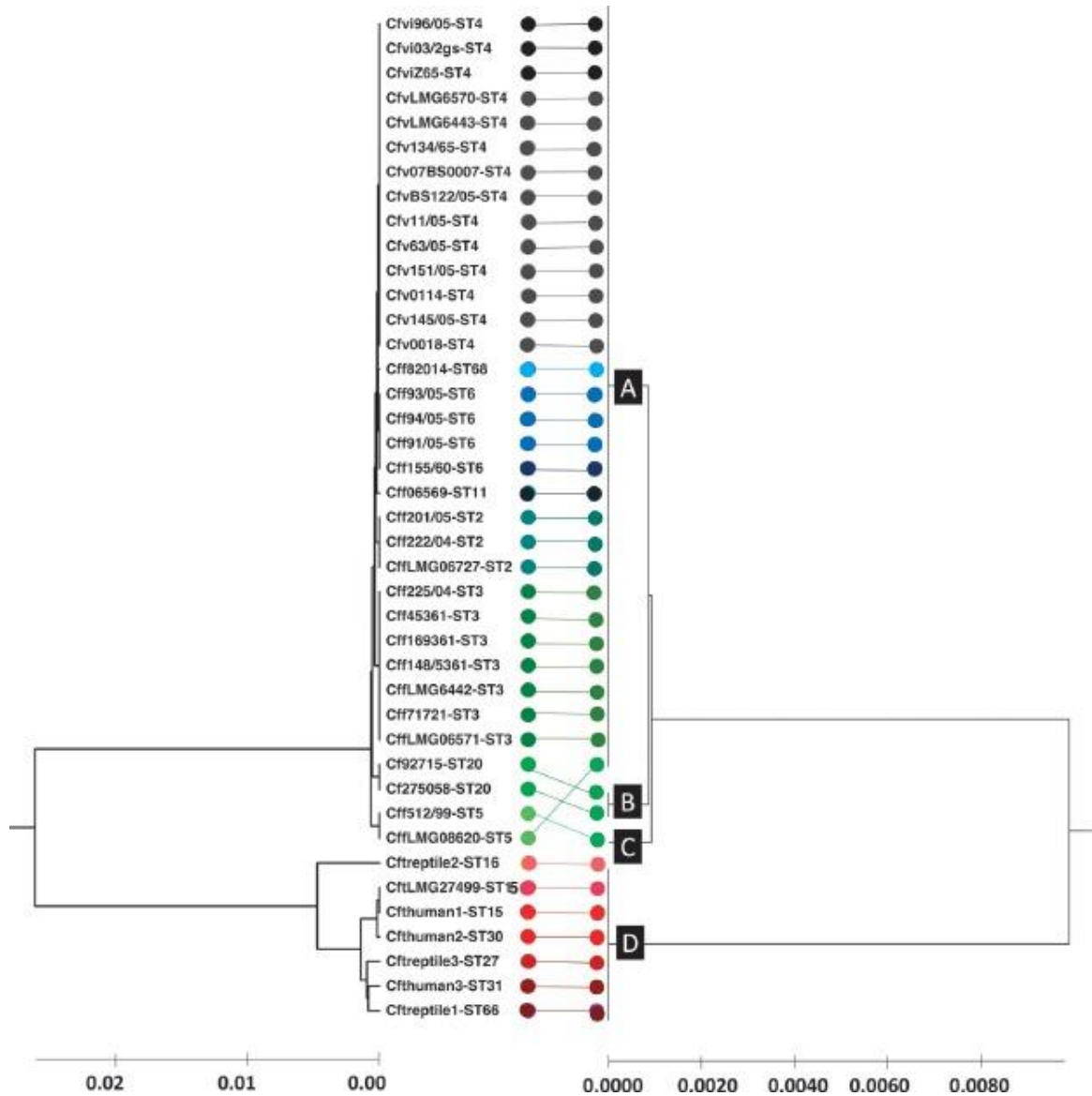


Abbildung 7: Gegenüberstellung des MLST-basierten und des Proteotypisierungs-basierten UPGMA-Dendrogramms für *C. fetus*.

Entsprechend der bereits publizierten Ergebnissen von Emele und Karg 2019 zeigt Abbildung 7 zwei gegenübergestellte UPGMA-Dendrogramme (Emele et al. 2019a). Hier werden die MLST-basierte Phylogenie und die Proteotypisierungs-basierte Phylogenie gegenübergestellt. Links ist der MLST-Stammbaum aufgeführt. Insgesamt konnten 14 verschiedene MLST-Sequenztypen identifiziert werden. Diese werden durch verschiedene Farben dargestellt. Rechts aufgeführt ist der auf Proteotypisierung basierte Stammbaum. Hierbei konnten vier verschiedene Typen identifiziert werden. A: hauptsächlich *C. fetus* ssp. *fetus* und *C. fetus* ssp. *venerealis* Stämme. B und C: Zweimal *C. fetus* ssp. *fetus* MLST Sequenztyp

5 und einmal *C. fetus* ssp. *fetus* MLST Sequenztyp 20. D: hierunter lassen sich exklusiv alle *C. fetus* ssp. *testudinum* Stämme zusammenfassen. Typ D ist daher für eine Differenzierung von *C. fetus* ssp. *testudinum* geeignet.

4 Diskussion

Die oben beschriebenen zwei grundverschiedenen Methoden der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung und der Massenspektrometrie-basierten Proteotypisierung zeigen unterschiedliche Ansätze in der Differenzierung von mikrobiellen Isolaten auf der Speziesebene bzw. unterhalb der Subspezies-Ebene. Bei der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung wird eine Fluoreszenzsonde an ein spezifisches Riboprotein, eine transkribierte RNA (RNA FISH) oder eine Genomsequenz gebunden unter der Prämisse, dass nur eng verwandte Subspezies diese Fluoreszenz letztlich ausbilden während bei einer zu großen taxonomischen Entfernung keine Bindung und damit auch keine Fluoreszenz zustande kommt. Im Gegensatz dazu macht man sich bei der Massenspektrometrie die spezifische Masse bestimmter Biomarker zunutze, woraus sich wiederum ein Sequenztyp errechnen lässt. Hierbei wird die, je nach taxonomischer Entfernung größere, Massendifferenz verwendet um einen Sequenztyp zu bestimmen anhand dessen man ein Verwandtschaftsverhältnis der Stämme bestimmen kann.

In der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung zeigte sich, dass durch die spezifische Anwendung der beiden für das Experiment designten Sonden *C. fetus* 1 und *C. fetus* 16S_1027 eine Differenzierung der unterschiedlichen *Campylobacter*-Spezies möglich ist. Für die Sonde *C. fetus* 1 ergab sich hierbei eine Sensitivität von 90,2% und eine Spezifität von 100%; bei Sonde *C. fetus* 16S_1027 eine Sensitivität von 96,4% und eine Spezifität von ebenfalls 100%. Eine Bindung an Nicht-*C. fetus*-Isolate ist somit zu einem geringen Prozentsatz möglich. Im Rahmen dieser Studie bestand natürlich durch die in Tabelle A1 beschriebene Berechnung der zu erwartenden Miss Matches eine belastbare Gegenprobe. Dies erfüllt in hohem Maße die, an die *C. fetus*-spezifische FISH-Sonde gestellten, Erwartungen. Eine Unterscheidung von *C. fetus* von den verschiedenen *Campylobacter*-Spezies mittels eigens erstellter Fluoreszenzsonden ist demnach prinzipiell möglich. Eine Unterscheidung der drei *C. fetus*-Subspezies jedoch nicht. Die Anzahl der dabei untersuchten Stämme ist mit 42 relativ gering. Dies ist vor allem der geringen Nachweisrate von *Campylobacter fetus* in humanen Proben geschuldet. Es ist daher auch nicht ausgeschlossen, dass mit der Zeit weitere *C. fetus*-Subspezies hinzukommen und die hier erstellten Sonden angepasst werden müssen. Der Angriffspunkt für zukünftige Mutationen liegt hierbei vor allem in der Bindung der Sonden an das Erbgut des Mikroorganismus, seine RNA oder seine Riboproteine.

Abgesehen von der geringen Probenzahl bestehen weitere mögliche Fehlerquellen, die berücksichtigt werden müssen. Es kam während der Versuche gelegentlich zu kleineren Verunreinigungen der Kulturen durch andere Mikroorganismen wie beispielsweise Schimmelpilze. Diese Verunreinigungen waren stets schnell erkenntlich und konnten dadurch vermieden werden, dass jeder Stamm auf vier separaten Agarplatten angezüchtet wurde. Verunreinigte Agarplatten konnten so einfach verworfen bzw. ersetzt werden. Im Vergleich zu *C. coli* und *C. jejuni* kann man *C. fetus* leider nicht auf *Campylobacter*-Selektivagarplatten anzüchten. Ebenfalls denkbar waren Verunreinigungen der verwendeten

Chemikalien. Es wurde bei der Herstellung beispielsweise der, für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung, verwendeten Puffer auf Einhaltung der höchst möglichen Reinheit geachtet. Zu Verunreinigungen kam es mutmaßlich nicht; jedoch wäre dies bei einem solchen Versuchsaufbau denkbar und musste berücksichtigt werden. Außentemperatur und Räumlichkeiten spielten bei der potentiellen Beeinflussung der Versuche eine untergeordnete Rolle, da die Bedingungen für alle Proben gleich waren. Auch einen subjektiven Untersucher-Fehler galt es zu berücksichtigen. Die Beurteilung der Fluoreszenzintensität erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop und unterlag damit trotz der vorher festgelegten Kriterien der subjektiven Wahrnehmung des Untersuchers. Eine sekundäre Evaluation durch ein Vier-Augen-Prinzip wäre hier bei weiteren Versuchen in der Zukunft anzuwenden, um menschliche Wahrnehmungsfehler zu verhindern. Abgesehen davon wurde beim Versuchsaufbau darauf geachtet Störfaktoren wie Lagerung, Temperaturschwankungen, Licht, Verunreinigungen etc. zu vermeiden indem strikt auf eine Einhaltung des Versuchsaufbaus geachtet wurde. Ein, nicht mit ausreichender Gründlichkeit, durchgeführter Versuchsablauf hätte in diesem Fall entweder die Nichtauswertbarkeit der Proben oder gegebenenfalls auch eine Missinterpretation der Proben zur Folge. Zur Fehleranalyse beider oben beschriebenen Versuchsanordnungen gehört demnach die Sicherstellung optimaler und reproduzierbarer Arbeitsbedingungen. Gleiches gilt natürlich auch für Versuche mittels Massenspektrometrie. Im Versuchsaufbau wurde jeder Biomarker in allen Isolaten einzeln durch Microsynth/Seq Lab Göttingen sequenziert. Fehler bei der Sequenzierung der Proben sind zwar prinzipiell sehr selten, könnten aber durchaus zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen, da möglicherweise fälschlich davon ausgegangen wäre, dass es sich um eine Isoform handelt. Gänzlich zu vermeiden wäre dieser Fehler letztlich nur durch eine größere Anzahl an Sequenzvorgängen gleicher Erregerstämme zu unterschiedlichen Zeitpunkten und bestenfalls unter Zuhilfenahme mehrerer externer Sequenzlaboratorien.

Die Untersuchungen mittels Massenspektrometriebasierter Proteotypisierung zeigen, dass mit dieser Methode eine sogar noch genauere Bestimmung und Unterscheidung als mit der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung möglich ist.

Bei den Ergebnissen der Massenspektrometriebasierten Proteotypisierung ist besonders Proteotypisierungs-Typ D für die Eingangs gestellte Fragestellung interessant, da dieser Typ ausschließlich *C. fetus* ssp. *testudinum* Isolate enthält und somit geeignet ist diese Subspezies von den anderen beiden Subspezies zu differenzieren. Eine Vergleichbarkeit mit dem Goldstandard der MLST-Diagnostik ist somit für eine Subspezies gegeben. Eine Differenzierung des MLST-Sequenztyps 4 war mittels Proteotypisierung unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht möglich. In diesem Bezug scheint das Verfahren der Proteotypisierung der MLST unterlegen zu sein.

Es war in dieser Studie möglich 9 ribosomale Proteine als Biomarker zu identifizieren und so die bisherige Informationslücke über die Identität der *Campylobacter fetus* ssp. *testudinum* spezifischen Biomarker zumindest teilweise zu schließen.

Die Anwendbarkeit der Proteotypisierung als mikrobiologisches Verfahren ist limitiert durch die zur Verfügung stehenden Biomarker-Sequenzsätze. Bei *Campylobacter fetus* waren dies 67 im Vergleich zu einer Vielzahl mehr (>4000) bei *Campylobacter jejuni*. Dies ist vor allem der größeren Prominenz des letztgenannten Erregers in der aktuellen Forschung geschuldet. Ein Fokus der weiteren *Campylobacter fetus* - Forschung sollte daher auf der Bestimmung weiterer Biomarker liegen, um die Qualität der Untersuchung noch einmal zu steigern. Dies stellt hierbei nicht unbedingt eine mögliche Fehlerquelle dieser Studie dar als vielmehr die Vielseitigkeit und Ausbaufähigkeit des gezeigten Versuchsansatzes. Voraussetzung zur optimalen Anwendbarkeit des Proteotyping ist die Sichtbarkeit und Darstellbarkeit aller zum Schema gehörigen Biomarker. Sollte dies nicht gewährleistet sein ist die Verwendung des MLST-Schemas stattdessen zu empfehlen (Emele et al. 2019a).

Die bisher zur Verfügung stehenden Methoden einer Artbestimmung oder Sub-Differenzierung über die biochemischen Unterschiede der Stämme gilt es zusammenfassend ebenfalls zu berücksichtigen. Natürlich kann beispielsweise die unterschiedliche Glycintoleranz, Selenite-Reduktion oder aber die H₂S-Produktion verwandt werden um ein spezifisches Stammprofil zu erstellen, welches theoretisch reproduzierbar wäre. Diese Methoden sind jedoch aus mehreren Gründen zumindest ungenau, wenn nicht sogar diagnostisch ungeeignet. Zum einen gibt es Eigenschaften welche nicht konstant exprimiert werden und daher nicht verlässlich sind. Hier zu nennen ist beispielsweise die von Schulze (Schulze et al. 2006) beschriebene Resistenz gegen ausgewählte Antibiotikaklassen. Antibiotikaresistenzen sind weit verbreitet und bilden sich gegebenenfalls innerhalb kürzerer Zeit. Es ist also nicht sinnvoll davon auszugehen, dass dieses zu einem bestimmten Zeitpunkt erhobene Antibiotogramm langfristig diagnostischen Bestand haben wird. Zum anderen ist die oben beschriebene biochemische Differenzierung stets nur eine indirekte Bestimmung von Eigenschaften. Demgegenüber steht die direkte Auswertung molekularer Massen in der Massenspektrometrie und die Fluoreszenz von spezifischen DNA-Sequenzen in der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung. Zudem ist davon auszugehen, dass zu einer genauen Stamm- oder Subspeziesbestimmung mittels biochemischer Merkmale die Untersuchung mehrerer Merkmale erforderlich ist. Daher wäre hierfür ein höherer finanzieller und arbeitstechnischer Aufwand von Nöten für ein letztlich ungenaueres Resultat. Desweiteren wurde bereits von van Bergen et al. (van Bergen et al. 2005) nachgewiesen, dass der von Véron und Chatelain 1973 entwickelte 1%-Glycintoleranztest und der Hydrogensulphit-Test (Véron, R. und Chatelain 1973) ungeeignet sind, um eindeutige Differenzierungen zu ermöglichen. Zum einen bestand eine geringe Reproduzierbarkeit im Falle des Glycintoleranztest; zum anderen blieb *Campylobacter fetus* Biovar *intermedius* unberücksichtigt.

Abgesehen von den oben beschriebenen phänotypischen Differenzierungsmöglichkeiten existieren in der Literatur beschriebene molekulare Assays (van der Graaf-van Bloois et al. 2013). Van der Graaf van Blois bezieht sich hierbei auf Nukleinsäureamplifikation mittels nested PCR, abzielend auf 16S und 23SRNA (Inglis und Kalischuk 2003) und beschreibt, dass diese Methode diagnostisch nicht zu bevorzugen sei, da sie anfällig für Kontaminationen sei. (van der Graaf-van Bloois et al. 2013) Eine weitere diskutierte Methode ist die *loop mediated isothermal amplification* (LAMP) zur Unterscheidung von *Campylobacter fetus* und seiner Subspezies *venerealis* (Yamazaki et al. 2009; Yamazaki et al. 2010; van der Graaf-van Bloois et al. 2013). Diese Methode sei jedoch zum einen relativ ungebräuchlich und außerdem nicht geeignet die drei *Campylobacter fetus* Subspezies voneinander zu unterscheiden wie van der Graaf van Blois in ihrer Arbeit ausführt (van der Graaf-van Bloois et al. 2013).

Möglich und sinnvoll ist die Unterscheidung auf Subspeziesebene durch molekulare Typisierungsmethoden wie *amplified fragment length polymorphism* (AFLP) (Duim et al. 2001) und *multilocus sequence typing* (MLST) (van Bergen et al. 2005). Beide Methoden zeigten sich als verlässlich und reproduzierbar. Allerdings handelt es sich bei beiden um Labortests welche zur Routinediagnostik unpraktisch sind (van der Graaf-van Bloois et al. 2013).

5 Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich die Erkenntnis gewinnen, dass die Methode der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung generell und unter Anwendung der Sonden *C. fetus* 1 und *C. fetus* 16S_1027 im Besonderen, geeignet ist eine Unterscheidung zwischen *Campylobacter fetus* und anderen Spezies und Subspezies der Art *Campylobacter* zu treffen. Einer theoretischen Anwendbarkeit dieses Verfahren schließt sich empfehlend auch eine praktische Anwendbarkeit an, da FISH als Verfahren bereits im klinisch-mikrobiologischen Setting zur Erregerdetektion etabliert ist. Das Verfahren wird praktisch genutzt; nicht nur zur Differenzierung von mikrobiellen Erregern im klinisch-medizinischen Umfeld (Cerqueira et al. 2008), sondern auch zur Identifikation von Pilzen (Da Silva et al. 2015) oder im veterinärmedizinischen Umfeld (Wolf-Jäckel et al. 2020). Die experimentelle Testung der Massenspektrometrie-basierten Proteotypisierung zeigte ebenfalls gute Resultate in der Unterscheidung von *Campylobacter fetus* spp. *testudinum* von den anderen Subspezies. Eine weitere Differenzierung innerhalb der Spezies *C. fetus* war nicht möglich. Außerdem konnten auch diverse Einzelstämme eindeutig voneinander unterschieden werden (Sequenztypen: 2, 5 und 11). Eine Unterscheidung der für *Campylobacter fetus venerealis* exklusiven Sequenztyp 4 konnte nicht signifikant erbracht werden. Ein entsprechender Peak zeigte sich zwar auch hier, blieb jedoch unter dem Signifikanzniveau. Eine Unterscheidung der Sequenztypen 3, 6, 20 und 68 war ebenfalls auf diese Weise nicht möglich. Die Proteotypisierung zeigt somit eine generell gute Performance für den untersuchten Anwendungsbereich. Allerdings sind hier die Untersuchung weiterer Biomarker und vor allem der Aufbau einer umfassenden Referenzdatenbank notwendig. Eine Unterscheidbarkeit des für *Campylobacter fetus venerealis* exklusiven Sequenztyp 4 konnte nicht signifikant erbracht werden. Ein entsprechender Peak zeigte sich zwar auch hier, blieb jedoch als Differenzierungsmarker zu unspezifisch. Hier bietet sich in der Zukunft die Implementierung eines weiteren ST4 – spezifischen Biomarkers an. ST4 ist hierbei von besonderer Bedeutung, da er im untersuchten Stammkollektiv besonders häufig vorkam. Im Gegensatz zu den Sequenztypen 3, 6, 20 und 68, welche Einzelfälle darstellten und ihnen daher für die praktische Anwendung eine geringere Bedeutung zukommt. Generell liegt aber die Vermutung nahe, dass für alle unterschiedlichen Sequenztypen, basierend auf den oben beschriebenen Erkenntnissen, eine Unterscheidung prinzipiell möglich sein müsste, sobald eine der charakteristischen Biomarkerisoformen identifiziert wurde. Ein erweiterter Anwendungsbereich für weitere Spezies ist zu empfehlen, um die Methode noch effektiver zu gestalten.

Aus ökonomischen Gesichtspunkten lässt sich vergleichend sagen, dass die Methode der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung eine gut etablierte und relativ kostengünstige Alternativen zur biochemischen Erregeridentifikation, insbesondere in Biopäten, darstellen. Für die Proteotypisierung gilt dies eingeschränkt. Die in der Anschaffung extrem kostenintensiven Gerätschaften stellen für viele Anwendungsbereiche sicherlich ein objektives Hindernis dar. Wenn allerdings ein MALDI-TOF Gerät bereits vorhanden ist, reduzieren sich diese Kosten

immens. Für den zeitlichen Aufwand von der Probengewinnung bis zur eindeutigen Identifikation und Differenzierung des Erregers lässt sich sagen, dass diese bei einer für beide Versuchsreihen gleichen Bebrütungszeit von 3-4 Tagen, für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung circa 3-4 Stunden beträgt. Im Falle der Massenspektromie ist dies aufgrund der Notwendigkeit der genauen Auswertung der Massenspektren im Vergleich zu Referenzstämmen mit einem deutlich umfangreicheren Zeitrahmen verbunden. Hierbei spielen auch die harten und weichen Faktoren in der Arbeitsumgebung des Labors eine entscheidende Rolle. Beispielsweise ist hier die Qualifizierung und Anlernung des Personals als weicher Faktor anzuführen sowie die Anzahl und Wartung der zur Verfügung stehenden Geräte, der Personalschlüssel und die Verfügbarkeit aller Materialien als harte Faktoren zu nennen. Dies gilt natürlich für beide Methoden prinzipiell gleichermaßen. Kritisch zu bewerten ist hier aber der schwierigere Umgang mit dem MALDI-TOF-Gerät als differenzierender und Ressourcen verbrauchender Faktor. Die wirtschaftsökonomische Betrachtung abschließend und den Skaleneffekt berücksichtigend kann man formulieren, dass der Autor die Etablierung des insgesamt detaillierteren Proteotypisierungs-Verfahrens in seiner Eignung und Implementierung eher im Bereich großer, gut ausgerüsteter Labore, z.B. in Unikliniken oder großen Laborzentren, sieht. Für Laboratorien und Kliniken mit geringerem Testaufkommen und ohne das Vorhandensein eines MALDI-TOF-Geräts kann die biochemische Speziesbestimmung oder in Biopaten die Methode der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung eine Alternative darstellen, sofern die etwas geringere Aussagekraft medizinisch vertretbar ist. Als potentielle Anwendungsbereiche kann hier auch an finanz- und ressourcenschwächere Labore in Schwellen- und Entwicklungsländern gedacht werden. Der Autor empfiehlt allerdings, wenn möglich beide Methoden kombiniert zu verwenden, um eine größtmögliche diagnostische Sicherheit zu erlangen. Ergänzend kann eine phänotypische Differenzierung erfolgen (Véron, R. und Chatelain 1973; van der Graaf-van Bloois et al. 2013). Hierzu können beispielsweise die H₂S-Produktion und die Glycintoleranz als zusätzliche Faktoren hinzugezogen werden, ebenso wie umfangreiche Labordiagnostische Verfahren wie AFLP (amplified fragment-length polymorphism) oder MLST (Multilokus-Sequenztypisierung) (van der Graaf-van Bloois et al. 2013). Eine dynamische Anpassung dieser verschiedenen Methoden entsprechend der zur Verfügung stehenden Materialien und der wissenschaftlichen oder diagnostischen Fragestellung ist zu empfehlen. Eine Ausdehnung der existierenden Proteotypisierungs-Datenbanken sowie einer Vergrößerung des FISH-Sondenrepertoires für weitere mikrobiologische Spezies und Subspezies ist Voraussetzung für eine optimale Nutzung in der Zukunft.

Abschließend kann festgehalten werden, dass sowohl die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung als auch die Massenspektrometrie-basierte Proteotypisierung das Repertoire der mikrobiologischen Labordiagnostik ergänzen. Klinische Infektionen mit *Campylobacter fetus* sowohl bei Tieren als auch bei Menschen können so effektiv und schnell auf ihre Subspezies untersucht werden.

6 Anhang

Position	ORF Locus in LMG 6442	Errechnete Masse in Da (Durchschnitt)		Häufigkeit in der Datenbank
RpmJ/L36				
Sequenz	MKVRPSVKKMCDKCKIVKRKGIVHVICENPKHKQRQG (37AA)			
1 α	Referenz Isoform LMG 6442 (NCTC 10842)	4331.35	0.00	100.000% (67/67)
RpmH/L34				
Sequenz	MKRTYQPHKTPKKRTHGFRGRMKTKNGRQVINARRAKGRKRLAA (44aa)			
1 α	Referenz Isoform LMG 6442 (NCTC 10842)	5217.26	0.00	47.761% (32/67)
2 α	MKRTYQPHKTPKKRTHGFRERMKTNGRQVINARRAKGRKRLAA (44aa)	5289.32	+72.06	32.836 % (22/67)
3	MKRTYQPHKTPKKRTHGFRERMRTKNGRQVINARRAKGRKRLAA (44aa)	5317.33	+100.07	19.403% (13/67)
RpmF/L32-M				
Sequenz	(M)AVPKRRVSHTRAARRRTHYKVTLPMPVKDDKDGSWKMPHRINKTTGEY α (48aa)			
1 α	Referenz Isoform LMG 6442 (NCTC 10842)	5530.47	0.00	47.761% (32/67)
2	(M)AVPKRRVSHTRAARRRTHYKVTLPMPVKDDKDGSWKMPHRMNKTTGEY (48aa)	5548.50	+18.03	77.941% (53/68)
3	(M)AVPKRRVSHTRAARRRTHYKVTLPMPVKDDKDGSWKMPHRINKTTGEY (48aa)	5542.52	+12.05	1.471 (1/68)
4	(M)AVPKRRVSHTRAARRRTHYKVTLPMPVKDDKDGSWKMPHRINKTTGEY (48aa)	5477.42	-53.05	1.471 (1/68)
5	(M)AVPKRLVSHTRAARRRTHYKVTLPMPVKNDKDGSWKMPHRINKTTGEY (48aa)	5486.45	-44.02	1.471 (1/68)
6 α	(M)AVPKRRVSHTRAARRRTHYKVTLPMPVKDDKDGSWKMPHRINKTTGEY (48aa)	5544.49	+14.02	neue Sequenz
RpmG/L33-M				
Sequenz	(M)ASANRVKIGLKCAECNDINYTTTKNSKTTTEKLELKKYCPRLKKHTVHKEVKLK (55aa)			
1 α	Referenz Isoform LMG 6442 (NCTC 10842)	6205.31	0.00	46.97% (31/66)
2	(M)ASANRIKIGLKCEVCGDINYTTTKNSKTTTEKLELKKYCPRLKKHTEHKEVKLK (55aa)	6247.39	+42.08	18.182% (12/66)
3 α	(M)ASANRVKIGLKCAECNDINYTTTKNSKTTTEKLELKKYCPRLKKHTVHKEVKLK (55aa)	6232.38	+27.07	33.333% (22/66)
4	(M)ASVNRKIGLKCEVCGDINYTTTKNSKTTTEKLELKKYCPRLKKHTEHKEVKLK (55aa)	6275.44	+70.13	1.515% (1/66)
5 α	(M)ASANRVKIGLKCAECNDINYTTTKNSKTTTEKSELKKYCPRLKKHTVHKEVKLK (55aa)	6179.23	-26.08	Neue Sequenz
RpsN/S14-M				
Sequenz	(M)AKKSMIAKAARKPKFSARGYTRCQICGRPHSVYKDFGICRVCLRKMANEGLIPGLKK ASW (61aa)			
1 α	Referenz Isoform LMG 6442 (NCTC 10842)	6728.11	0.00	80.303% (53/66)
2	(M)AKKSMIAKAARKPKFSVRGYTRCQICGRPHSVYKDFGICRVCLRKMANEGLIPGLKK ASW (61aa)	6756.16	+28.05	3.030% (2/66)
3	(M)AKKSMIAKAARAPKFSRGYTRCQICGRPHSVYKDFGICRVCLRKMANEGLIPGLKK ASW (61aa)	6687.01	+41.10	16.667% (11/66)
RpmC/L29				
Sequenz	MKYIDISAKSMSELNALLKEKKVLLFTLRQKLTMTQLTNPNEIGETKKDIARINTAISAAK (61aa)			
1 α	Referenz Isoform LMG 6442 (NCTC 10842)	6893.22	0.00	47.761% (32/67)
2	MKYTEISAKSVSELTALLKEKKVLLFTLRQKLTMTQLTNPNEIRDTKKEIARINTAISAAK (61aa)	6949.27	+56.05	19.403% (13/67)
3 α	MKYIDISAKSISELNALLKEKKVLLFTLRQKLTMTQLTNPNEIRDTKKEIARINTAISAAK (61aa)	6974.32	+81.10	32.836% (22/67)
RplX/L24-M				

Sequenz	(M)AVKYKIKKGGDEVKVIAGDDKGVAKVIAVLPPKGGQVIVEGVKVAKKAVKPTTEKN PNGGFVSKEMPIDISNVAKVEG (77aa)			
1 α	Referenz Isoform LMG 6442 (NCTC 10842)	8026.59	0.00	47.751% (32/67)
2	(M)AIKYKIKKGGDEVKVIAGDDKGVAKVIAVLPPKGGQVIVEGVKVAKKAVKPTDKN PNGGFVSKEMPIDISNVAKVEG (77aa)	8012.56	-14.03	17.91% (12/67)
3 α	(M)AVKYKIKKGGDEVKVIAGDDKGVAKVIAVLPPKGGQVIVEGVKVAKKAVKPTDKN PNGGFVSKEMPIDISNVAKVEG (77aa)	8012.56	-14.03	32.836% (22/67)
4	(M)AIKYKIKKGGDEVKVIAGDDKGVAKVIAVLPPKGGQVIVEGIVAKKAVKPTDKNP NGGFVSKEMPIDISNVSKVEG (77aa)	8042.59	+16.00	1.493% (1/67)
RpsT/S20-M				
Sequenz	(M)ANHKSAEKRARQTIKRTERNRFYRTRLKNLTKAVRVAVASGDKDAALVALKDANK NFHSFVSKGFLKKETASRKVSRLAKLVSTLAA (88aa)			
1 α	Referenz Isoform LMG 6442 (NCTC 10842)	9741.33	0.00	48.529% (33/68)
2	(M)ANHKSAEKRARQTIKRTERNRFYRTRLKNLTKAVRVAVANGDKDAALLALKDVNK NFHSFVSKGFLKKETASRKVSRLAKLVSTLAA (88aa)	9810.43	+69.10	16.176% (11/68)
3	(M)ANHKSAEKRARQTIKRTERNRFYRTRLKNLTKAVRVAVANGDKDAALLALKDVNK NFHSFVSKGFLKKETASRKVSRLAKLVSTLAA (88aa)	9809.49	+68.14	1.471% (1/68)
4 α	(M)ANHKSAEKRARQTIKRTERNRFYRTRLKNLTKAVRVAVTSGDKDAALLALKDVNK NFHSFVSKGFLKKETASRKVSRLAKLVSTLAA (88aa)	9813.43	+72.10	32.353% (22/68)
5	(M)ANHKSAEKRARQTIKRTERNRFYRTRLKNLTKAVRVAVANGDKDAALLALKDVNK NFHSFVSKGFLKKETASRKVGRLAKLVSTLAA (88aa)	9780.41	+39.08	1.471% (1/68)
RpsS/S19-M				
Sequenz	(M)ARSLKKGPFVDDHVMKKVLAACAANDNKPIKTWSRRSMIPEMIGLTFNVHNGKGF IPVYVTENHIGYKLGEFAPTRTFKGHKGSVQKKIGK (93aa)			
1 α	Referenz Isoform LMG 6442 (NCTC 10842)	10277.10	0.00	47.761% (32/67)
2	(M)ARSLKKGPFVDDHVMKKVLAACAANDNKPIKTWSRRSTIPEMIGLTFNVHNGKFSI PVYVTENHIGYKLGEFAPTRTFKGHKGSVQKKIGK (93aa)	10277.04	-0.06	14.925% (10/67)
3 α	(M)ARSLKKGPFVDDHVMKKVLAACAANDNKPIKTWSRRSMIPEMIGLTFNVHNGKFSI PVYVTENHIGYKLGEFAPTRTFKGHKGSVQKKIGK (93aa)	10307.12	+30.02	32.836% (22/67)
4	(M)ARSLKKGPFVDDHVMKVLAAKATNDNKPIKTWSRRSTIPEMIGLTFNVHNGKFSI PVYVTENHIGYKLGEFAPTRTFKGHKGSVQKKIGK (93aa)	10308.00	+30.90	4.478% (3/67)

Tabelle A1: Zusammenfassung der bereits im Ergebnisteil vereinfacht dargestellten Tabellen 15 und 16 mit zusätzlicher Angaben zur statistischen Häufigkeit der entsprechenden Sequenzen in der NCBI-Datenbank.

Biomarker	Isoform	Gene Bank Accession	Locus Tag	Protein ID
L36	1	MK463617		
L34	1	CP000487.1:557520-557,654	CFF8240_0551	ABK82017.1
L34	2	CP027287.1:608973-609,107	C6B32_03095	AVK80859.1
L32-M	1	CP000487.1:210702-210,848	CFF8240_0235	ABK81894.1
L32-M	6	MK463615		
L33-M	1	CP000487.1:1313847-1,313,949	CFF8240_1324	ABK82614.1
L33-M	3	CP027287.1:c1398913-1,398,746	C6B32_06940	AVK81560.1
L33-M	5	MK463616		
S14-M	1	CP000487.1:39526-39,711	CFF8240_0047	ABK82398.1
L29	1	CP000487.1:37925-38110	CFF8240_0042	ABK82084.1
L29	3	CP027287.1:36898-37,083	C6B32_00200	AVK80319.1

L24-M	1	CP000487.1:38746-38,979	CFF8240_0045	ABK83333.1
L24-M	3	CP027287.1:37719-37,952	C6B32_00215	AVK80322.1
S20-M	1	CP000487.1:1678191-1,678,457	CFF8240_1718	ABK82453.1
S20-M	4	CP027287.1:1762618-1,762,884	C6B32_08820	AVK81906.1
S19-M	1	CP000487.1:36187-36,468	CFF8240_0038	ABK81869.1
S19-M	3	CP027287.1:35160-35,441	C6B32_00180	AVK80315.1

Tabelle A2: Gene-Bank-Accession, Locus-Tag und Protein-ID zu den einzelnen Biomarkern und ihrer jeweiligen Isoformen.

Biomarker	Isoform	gemessene Masse (Da)	Standard-abweichung	gemessene Masse/Durchschnittsmasse	Monoisotopische Masse	durchschnittliche Masse (Da)
L36	1	4331	0.765	0.35	4328.40	4331.35
L34	1	5217	0.425	0.26	5214.02	5217.26
L34	2	5290	0.593	0.68	5286.04	5289.32
L32-M	1	5530	0.478	0.47	5526.99	5530.47
L32-M	6	5544	0.475	0.49	5541.01	5544.49
L33-M	1	6205	0.867	0.31	6201.37	6205.31
L33-M	3	6232	0.381	0.38	6228.42	6232.38
L33-M	5	6179	0.271	0.23	6175.32	6179.23
S14-M	1	6728	0.445	0.11	6854.63	6728.11
L29	1	6893	0.321	0.22	6888.84	6893.22
L29	3	6975	0.877	0.68	6969.96	6974.32
L24-M	1	8026	0.928	0.59	8021.62	8026.59
L24-M	3	8012	0.620	0.56	8007.61	8012.56
S20-M	1	9741	0.959	0.33	9735.50	9741.33
S20-M	4	9813	0.361	0.43	9807.56	9813.43
S19-M	1	10,277	0.499	0.10	10270.58	10277.10
S19-M	3	10,308	0.635	0.88	10300.59	10307.12

Tabelle A3: Ausführliche Zusammenfassung der verwandten Biomarker basierend auf der Isoformenliste. Zugehörig werden die errechneten und gemessenen molekularen Massen, sowie die Durchschnittsmassen in (Da) angegeben.

7 Literaturverzeichnis

Allos BM (1997): Association between Campylobacter Infection and Guillain-Barré Syndrome. *J Infect Dis* 176, S125–S128

Allos BM (2001): Campylobacter jejuni Infections: update on emerging issues and trends. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 32, 1201–1206

Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA (1990): Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* 56, 1919–1925

Bergey DH: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Band 4. Band 4; Williams & Wilkins, University of Michigan, USA 1984

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

Blom K, Patton C, Nicholson M, Swaminathan B (1995): Identification of Campylobacter fetus by PCR-DNA probe method. *J Clin Microbiol* 33, 1360–2

Bloois L van der G, Miller WG, Yee E, Rijnsburger M, Wagenaar JA, Duim B (2014): Inconsistency of Phenotypic and Genomic Characteristics of Campylobacter fetus Subspecies Requires Reevaluation of Current Diagnostics. *J Clin Microbiol* 52, 4183

Butzler JP (1973): Related vibrios in Africa. *Lancet Lond Engl* 2, 858

Campero CM, Anderson ML, Walker RL, Blanchard PC, Barbano L, Chiu P, Martínez A, Combessies G, Bardon JC, Cordeviola J (2005): Immunohistochemical identification of Campylobacter fetus in natural cases of bovine and ovine abortions. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 52, 138–141

Cardarelli-Leite P, Blom K, Patton C, Nicholson M, Steigerwalt A, Hunter S, Brenner D, Barrett T, Swaminathan B (1996): Rapid identification of Campylobacter species by restriction fragment length polymorphism analysis of a PCR-amplified fragment of the gene coding for 16S rRNA. *J Clin Microbiol* 34, 62–7

Casadémont I, Bizet C, Chevrier D, Guesdon JL (2000): Rapid detection of Campylobacter fetus by polymerase chain reaction combined with non-radioactive hybridization using an oligonucleotide covalently bound to microwells. *Mol Cell Probes* 14, 233–240

Cerqueira L, Azevedo NF, Almeida C, Jardim T, Keevil CW, Vieira MJ (2008): DNA Mimics for the Rapid Identification of Microorganisms by Fluorescence in situ Hybridization (FISH). *Int J Mol Sci* 9, 1944–1960

Chaban B, Ngeleka M, Hill JE (2010): Detection and quantification of 14 Campylobacter species in pet dogs reveals an increase in species richness in feces of diarrheic animals.

BMC Microbiol 10, 73

Conway GC, Smole SC, Sarracino DA, Arbeit RD, Leopold PE (2001): Phyloproteomics: species identification of Enterobacteriaceae using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3, 103–112

Coustillères F, Hanoï M, Lemée L, Le Roy F, Bertrand D (2022): *Campylobacter fetus* bacteremia complicated by multiple splenic abscesses and multivisceral signs in a renal transplant recipient: a case report and review of the literature. *Braz J Infect Dis* 26, 102336

Da Silva RM, Da Silva Neto JR, Santos CS, Frickmann H, Poppert S, Cruz KS, Koshikene D, De Souza JVB (2015): Evaluation of fluorescence in situ hybridisation (FISH) for the detection of fungi directly from blood cultures and cerebrospinal fluid from patients with suspected invasive mycoses. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 14, 6

Dekeyser P, Gossuin-Detrain M, Butzler JP, Sternon J (1972): Acute enteritis due to related vibrio: first positive stool cultures. *J Infect Dis* 125, 390–392

Dingle K, Blaser M, Tu Z-C, Pruckler J, Fitzgerald C, Bergen M, Lawson A, Owen R, Wagenaar J (2010): Genetic Relationships among Reptilian and Mammalian *Campylobacter fetus* Strains Determined by Multilocus Sequence Typing. *J Clin Microbiol* 48, 977–80

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

Duim B, Vandamme PAR, Rigter A, Laevens S, Dijkstra JR, Wagenaar JA (2001): Differentiation of *Campylobacter* species by AFLP fingerprinting. *Microbiol Read Engl* 147, 2729–2737

Eichler J, Adams MWW (2005): Posttranslational Protein Modification in Archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* 69, 393–425

Emele MF, Karg MM, Hotzel H, Bloois LG, Groß U, Bader O, Zautner AE (2019a): Differentiation of *Campylobacter fetus* Subspecies by Proteotyping. *Eur J Microbiol Immunol* 9, 62–71

Emele MF, Možina SS, Lugert R, Bohne W, Masanta WO, Riedel T, Groß U, Bader O, Zautner AE (2019b): Proteotyping as alternate typing method to differentiate *Campylobacter coli* clades. *Sci Rep* 9, 4244

Fisher M (1956): An Unusual Variant of Acute Idiopathic Polyneuritis (Syndrome of Ophthalmoplegia, Ataxia and Areflexia). *N Engl J Med* 255, 57–65

Fitzgerald C, Tu ZC, Patrick M, Stiles T, Lawson AJ, Santovenia M, Gilbert MJ, van

- Bergen M, Joyce K, Pruckler J, et al. (2014): *Campylobacter fetus* subsp. *testudinum* subsp. nov., isolated from humans and reptiles. *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 2944–2948
- Frickmann H, Zautner AE, Moter A, Kikhney J, Hagen RM, Stender H, Poppert S (2017): Fluorescence in situ hybridization (FISH) in the microbiological diagnostic routine laboratory: a review. *Crit Rev Microbiol* 43, 263–293
- Gonzales T, Robert-Baudouy J (1996): Bacterial aminopeptidases: properties and functions. *FEMS Microbiol Rev* 18, 319–344
- Gorkiewicz G, Feierl G, Schober C, Dieber F, Köfer J, Zechner R, Zechner EL (2003): Species-specific identification of campylobacters by partial 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol* 41, 2537–2546
- Harvey S, Greenwood JR (1985): Isolation of *Campylobacter fetus* from a pet turtle. *J Clin Microbiol* 21, 260–261
- Hauri AM, Just M, McFarland S, Schweigmann A, Schlez K, Krahn J (2013): Campylobacteriosis outbreaks in the state of Hesse, Germany, 2005-2011: raw milk yet again. *Dtsch Med Wochenschr* 138, 357–361
- Herbinger K-H, Alberer M, Berens-Riha N, Schunk M, Bretzel G, von Sonnenburg F, Nothdurft HD, Löscher T, Beissner M (2016): Spectrum of Imported Infectious Diseases: A Comparative Prevalence Study of 16,817 German Travelers and 977 Immigrants from the Tropics and Subtropics. *Am J Trop Med Hyg* 94, 757–766
- Inglis GD, Kalischuk LD (2003): Use of PCR for direct detection of *Campylobacter* species in bovine feces. *Appl Environ Microbiol* 69, 3435–3447
- Jimenez DF, Perez AM, Carpenter TE, Martinez A (2011): Factors associated with infection by *Campylobacter fetus* in beef herds in the Province of Buenos Aires, Argentina. *Prev Vet Med* 101, 157–162
- Kaakoush NO, Castaño-Rodríguez N, Mitchell HM, Man SM (2015): Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. *Clin Microbiol Rev* 28, 687–720
- Karg MM, Frickmann H, Hotzel H, Lugert R, Groß U, Hagen RM, Tomaso H, Poppert S, Zautner AE (2018): Identification of *Campylobacter fetus* by fluorescence in situ hybridization (FISH). *J Microbiol Methods* 151, 44–47
- Karmali MA, Fleming PC (1979): *Campylobacter* enteritis. *Can Med Assoc J* 120, 1525–1532
- King EO (1957): Human infections with *Vibrio fetus* and a closely related vibrio. *J Infect Dis* 101, 119–128
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018): MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* 35, 1547–

1549

Kumar Y, Westram R, Kipfer P, Meier H, Ludwig W (2006): Evaluation of sequence alignments and oligonucleotide probes with respect to three-dimensional structure of ribosomal RNA using ARB software package. *BMC Bioinformatics* 7, 240

Lartigue M-F (2013): Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for bacterial strain characterization. *Infect Genet Evol* 13, 230–235

Leder K, Torresi J, Libman MD, Cramer JP, Castelli F, Schlagenhaut P, Wilder-Smith A, Wilson ME, Keystone JS, Schwartz E, et al. (2013a): GeoSentinel Surveillance of Illness in Returned Travelers, 2007–2011. *Ann Intern Med* 158, 456–468

Leder K, Torresi J, Brownstein JS, Wilson ME, Keystone JS, Barnett E, Schwartz E, Schlagenhaut P, Wilder-Smith A, Castelli F, et al. (2013b): Travel-associated Illness Trends and Clusters, 2000–2010. *Emerg Infect Dis* 19, 1049–1073

Levine ND (1975): Buchanan, R. E. & Gibbons, N. E., eds. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed. Williams & Wilkins Co. *J Protozool* 22, 7–7

Levy AJ (1946): A Gastro-enteritis Outbreak Probably Due to a Bovine Strain of *Vibrio*. *Yale J Biol Med* 18, 243-258.1

Loy A, Arnold R, Tischler P, Rattei T, Wagner M, Horn M (2008): probeCheck – a central resource for evaluating oligonucleotide probe coverage and specificity. *Environ Microbiol* 10, 2894–2898

Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H, Yadhukumar null, Buchner A, Lai T, Steppi S, Jobb G, et al. (2004): ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* 32, 1363–1371

Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, et al. (1998): Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3140–3145

Maxie G: Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals. Band 2; Elsevier Health Sciences 2015

McFadyean J, Stockman S: Report of the Departmental Committee appointed by the Board of Agriculture and Fisheries to inquire into epizootic abortion. Appendix to part III, Abortion in sheep. (Board of Agriculture and Fisheries). Band Committee to Inquire into Epizootic Abortion; H.M.S.O. by Eyre and Spottiswoode, London [England 1913

Moter A, Göbel UB (2000): Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J Microbiol Methods* 41, 85–112

Murray PR (2010): Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass

spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 16, 1626–1630

Nishiguchi S, Sekine I, Kuroda S, Sato M, Kitagawa I (2017): Myositis Ossificans of the Hip Due to Pyogenic Arthritis Caused by *Campylobacter fetus* Subspecies *fetus*. *Intern Med* 56, 967–972

Oyarzabal OA, Wesley IV, Harmon KM, Schroeder-Tucker L, Barbaree JM, Lauerman LH, Backert S, Conner DE (1997): Specific identification of *Campylobacter fetus* by PCR targeting variable regions of the 16S rDNA. *Vet Microbiol* 58, 61–71

Pardue ML, Gall JG (1969): Molecular hybridisation of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 64, 600–604

Patrick ME, Gilbert MJ, Blaser MJ, Tauxe RV, Wagenaar JA, Fitzgerald C (2013): Human Infections with New Subspecies of *Campylobacter fetus*. *Emerg Infect Dis* 19, 1678–1680

Poppert S, Haas M, Yildiz T, Alter T, Bartel E, Fricke U, Essig A (2008): Identification of thermotolerant *Campylobacter* species by fluorescence in situ hybridization. *J Clin Microbiol* 46, 2133–2136

Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J, Glöckner FO (2007): SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res* 35, 7188–7196

Salama SM, Tabor H, Richter M, Taylor DE (1992): Pulsed-field gel electrophoresis for epidemiologic studies of *Campylobacter hyointestinalis* isolates. *J Clin Microbiol* 30, 1982–1984

Schulze F, Bagon A, Müller W, Hotzel H (2006): Identification of *Campylobacter fetus* subspecies by phenotypic differentiation and PCR. *J Clin Microbiol* 44, 2019–2024

Sebald M, Veron M (1963): Base DNA content and classification of vibrios. *Ann Inst Pasteur* 105, 897–910

Seong YJ, Lee SH, Kim EJ, Choi YH, Kim T-J, Lee WG, Heo JY (2021): *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis* meningitis associated with a companion dog in a young adult: a case report. *BMC Infect Dis* 21, 1280

Shigematsu T, Shibue Y (2023): Bacterial Pericarditis Caused by *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* After Mutton Consumption. *Cureus* 15, e33213

Silveira C da S, Fraga M, Giannitti F, Macías-Rioseco M, Riet-Correa F (2018): Diagnosis of Bovine Genital *Campylobacteriosis* in South America. *Front Vet Sci* 5, 321

Smith T (1918): Spirilla associated with disease of the fetal membranes in Cattle (infectious abortion). *J Exp Med* 28, 701–719

- Smith T, Taylor MS (1919): Some morphological and biological characters of the *Spirilla* (*Vibrio fetus*, N. SP.) associated with disease of the fetal membranes in cattle. *J Exp Med* 30, 299–311
- Sokal RR, Michener CD (1958): A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ Kans Sci Bull* 1409–1438
- Stiller C: Zum Vorkommen von *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* in Rohmilch von Erzeugerbetrieben in Nordbayern mit Versuchen zur Überlebensfähigkeit von *Campylobacter jejuni* in Milch. Text.PhDThesis. Berlin 1998
- The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. (2010) *EFSA J* 8, 1496
- van Bergen MA, Simons G, van der Graaf-van Bloois L, van Putten JP, Rombout J, Wesley I, Wagenaar JA (2005): Amplified fragment length polymorphism based identification of genetic markers and novel PCR assay for differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *J Med Microbiol* 54, 1217–1224
- van der Graaf-van Bloois L, van Bergen MAP, van der Wal FJ, de Boer AG, Duim B, Schmidt T, Wagenaar JA (2013): Evaluation of molecular assays for identification *Campylobacter fetus* species and subspecies and development of a *C. fetus* specific real-time PCR assay. *J Microbiol Methods* 95, 93–97
- van der Graaf–van Bloois L, Duim B, Miller WG, Forbes KJ, Wagenaar JA, Zomer A (2016): Whole genome sequence analysis indicates recent diversification of mammal-associated *Campylobacter fetus* and implicates a genetic factor associated with H2S production. *BMC Genomics* 17, 713
- van Doorn PA, Ruts L, Jacobs BC (2008): Clinical features, pathogenesis, and treatment of Guillain-Barré syndrome. *Lancet Neurol* 7, 939–950
- van Samkar A, Brouwer MC, van der Ende A, van de Beek D (2016): *Campylobacter Fetus Meningitis* in Adults. *Medicine (Baltimore)* 95, e2858
- Vargas A, Costa M, Vainstein M, Carlos K, Neves J (2003): Phenotypic and molecular characterization of bovine *Campylobacter fetus* strains isolated in Brazil. *Vet Microbiol* 93, 121–32
- Varland S, Osberg C, Arnesen T (2015): N-terminal modifications of cellular proteins: The enzymes involved, their substrate specificities and biological effects. *Proteomics* 15, 2385–2401
- Vasquez LA, Ball L, Bennett BW, Rupp GP, Ellis R, Olson JD, Huffman MH (1983): Bovine genital campylobacteriosis (vibriosis): vaccination of experimentally infected bulls. *Am J Vet Res* 44, 1553–1557

- Véron M, Chatelain R (1973): Taxonomic Study of the Genus *Campylobacter* Sebald and Véron and Designation of the Neotype Strain for the Type Species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor). *Int J Syst Evol Microbiol* 23, 122–134
- Véron, R. M, Chatelain R (1973): Taxonomic Study of the Genus *Campylobacter* Sebald and Véron and Designation of the Neotype Strain for the Type Species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron. *Int J Syst Evol Microbiol* 23, 122–134
- Vinzent R, Dumas J, Picard N (1947): Septicémie grave au cours de la grossesse due à un vibrion. Avortement consécutif. *Bull Acad Natl Méd, Paris*, 90–92
- Voet D, Voet JG, Pratt CW: *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level*, 5th Edition. 5. Edition; Wiley 2016
- Wagenaar JA, van Bergen MAP, Blaser MJ, Tauxe RV, Newell DG, van Putten JPM (2014): *Campylobacter fetus* Infections in Humans: Exposure and Disease. *Clin Infect Dis* 58, 1579–1586
- Wang C-M, Shia W-Y, Jhou Y-J, Shyu C-L (2013): Occurrence and molecular characterization of reptilian *Campylobacter fetus* strains isolated in Taiwan. *Vet Microbiol* 164, 67–76
- Weersink A, VanLeeuwen JA, Chi J, Keefe GP (2002): Direct Production Losses and Treatment Costs due to Four Dairy Cattle Diseases. 21
- Wesley IV, Wesley RD, Cardella M, Dewhirst FE, Paster BJ (1991): Oligodeoxynucleotide probes for *Campylobacter fetus* and *Campylobacter hyointestinalis* based on 16S rRNA sequences. *J Clin Microbiol* 29, 1812–1817
- Wolf-Jäckel GA, Boye M, Angen Ø, Müller M, Jensen TK (2020): Fluorescence in situ hybridization in species-specific diagnosis of ovine *Campylobacter* abortions. *J Vet Diagn Investig Off Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc* 32, 413–419
- Yamagami M, Sakurai Y, Hamada K, Sugimoto I, Hatanaka Y, Uchibori A, Chiba A (2016): Unilateral hypoglossal nerve palsy with asymmetric facial and limb paresis in axonal Guillain–Barré syndrome. *Neurol Clin Neurosci* 4, 25–27
- Yamazaki W, Taguchi M, Ishibashi M, Nukina M, Misawa N, Inoue K (2009): Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection *Campylobacter fetus*. *Vet Microbiol* 136, 393–6
- Yamazaki W, Taguchi M, Misawa N (2010): Development of loop-mediated isothermal amplification and PCR assays for rapid and simple detection of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. *Microbiol Immunol* 54, 398–404
- Zautner AE, Masanta WO, Tareen AM, Weig M, Lugert R, Groß U, Bader O (2013): Discrimination of multilocus sequence typing-based *Campylobacter jejuni* subgroups by

MALDI-TOF mass spectrometry. *BMC Microbiol* 13, 247

Zautner AE, Masanta WO, Weig M, Groß U, Bader O (2015): Mass Spectrometry-based PhyloProteomics (MSPP): A novel microbial typing Method. *Sci Rep* 5, 13431

Zautner AE, Lugert R, Masanta WO, Weig M, Groß U, Bader O (2016): Subtyping of *Campylobacter jejuni* ssp. *doylei* Isolates Using Mass Spectrometry-based PhyloProteomics (MSPP). *J Vis Exp JoVE* 54165

The University of Washington's Proteomics Ressource (UWPR).
<https://proteomicsresource.washington.edu/protocols06/masses.php>; abgerufen am 02.03.2023

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. med habil. Andreas Erich Zautner, welcher diese Dissertation als Doktorvater und Betreuer stets begleitet hat und mit Unterstützung zur Seite stand. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Prof. Dr. med habil. Timo Buhl, meinem Zweitbetreuer, danken.

Außerdem gilt mein Dank Dr. rer. nat. Matthias Emele und Prof. Dr. med Hagen Frickmann mit welchen ich Teile meiner Arbeit in geteilter Erstautorenschaft veröffentlichte. Vielen Dank für die gute Zusammenarbeit.

Zuletzt bedanke ich mich bei Prof. Dr. med Uwe Groß und dem Institut für medizinische Mikrobiologie und Virologie der Universitätsmedizin Göttingen für die Bereitstellung von Laboren und Materialien, sowie für die Unterstützung und Begleitung der Arbeit.

Lebenslauf

Ich, Moritz Matti Karg, wurde am 23.09.1992 in Braunschweig als Sohn von Diplom Soz Arb./Sozpäd. Iris Arndt-Karg und Diplom Ing. Edmund Karg geboren. Ich wuchs in Braunschweig auf und besuchte von 1999 bis 2003 die Grundschule Mascheroder Holz und von 2003 bis 2004 die Orientierungsstufe Lindbergsiedlung ehe ich die Gymnasialreife erreichte und am 2004 auf das Gymnasium Raabeschule in Braunschweig wechselte. 2011 erlangte ich hier meinen Abschluss mit dem Abitur (Note: 1,3). Nach dem Abitur begann ich 2011 mit dem Studium der Humanmedizin an der Georg-August Universität Göttingen. Das erste Staatsexamen legte ich am 19.08.2014 ab. Die vorliegende Dissertation wurde am 12.10.2016 im Institut der medizinischen Mikrobiologie und Virologie begonnen. Der schriftliche Teil des zweiten Staatsexamen folgte am 12.04.2018 mit erfolgreichem Abschluss. Es folgte 2018-2019 das praktische Jahr in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Universitätsmedizin Göttingen, der Allgemein- und Viszeralchirurgie sowie Unfallchirurgie des städtischen Klinikums Wolfenbüttel und schließlich in der Inneren Medizin der HELIOS-Klinik Herzberg. Das dritte Staatsexamen der Humanmedizin schloss ich erfolgreich am 21.05.2019 erfolgreich ab. Nach Abschluss des Studiums der Humanmedizin mit der Gesamtnote 2,83 und dem Erwerb der Approbation begann ich am 15.09.2019 eine Arbeitsstelle als Arzt in Weiterbildung in der Klinik für Hals-, Nasen-, und Ohrenheilkunde des Klinikum Bremen Mitte.