

Aus dem Department für Veterinärwissenschaften
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen
Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie
Univ.-Prof. Dr. R. K. Straubinger, Ph.D.

**Einsatz der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung
zur Identifizierung ausgewählter veterinärpathogener Erreger**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Annerose Cordula Gey
aus Hamburg

München 2010

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität-München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Straubinger
Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Dr. Dr. habil. Sinowatz

Tag der Promotion: 24. Juli 2010

Meinem Vater

*„Glücklich ist wer nie verlor
im Kampf des Lebens den Humor“*

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	IV
VERZEICHNIS DER TABELLEN	VIII
VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN	IX
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	X
1 EINLEITUNG.....	1
2 SCHRIFTTUM	2
2.1 Nachweis und Identifizierung bakterieller Erreger	2
2.1.1 Mikroskopischer und kultureller Nachweis von Erregern.....	2
2.1.2 Identifizierung mittels klassischer phänotypischer Methoden	3
2.1.3 Identifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	4
2.2 Fluoreszenz-<i>in-situ</i>-Hybridisierung	5
2.2.1 Prinzip und Entwicklung der FISH	5
2.2.2 Durchführung der FISH.....	6
2.2.2.1 Sonden und Kompetitoren.....	6
2.2.2.2 Ablauf einer FISH	8
2.2.2.3 Faktoren, die das Ergebnis der FISH beeinflussen.....	8
2.2.3 Einsatz der FISH	10
2.3 <i>Haemophilus parasuis</i>	11
2.3.1 Bedeutung des Erregers.....	11
2.3.2 Nachweismethoden für <i>H. parasuis</i>	12
2.4 Mastitiserreger und Nachweismethoden.....	12
2.4.1 Bakterielle Erreger der Mastitis	13
2.4.2 Nachweismethoden für Mastitiserreger.....	15
2.4.2.1 Kulturelle und biochemische Methoden.....	15
2.4.2.2 Molekularbiologische Nachweismethoden	17

3 MATERIAL UND METHODEN	19
3.1 Bakterienstämme	19
3.2 Sonden und Kompetitoren	19
3.3 Verwendete Probenmaterialien	21
3.4 Medien, Lösungen und Puffer	21
3.5 Chemikalien und Enzyme	21
3.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien	21
3.7 Anzucht und Asservierung	21
3.7.1 Anzucht asservierter Stämme	21
3.7.2 Kulturelle Untersuchung der Milchproben und Gesamtkeimzahlbestimmung	22
3.7.3 Asservierung von Bakterien	23
3.8 Speziesbestimmung der verwendeten Isolate	23
3.8.1 Makroskopische Beurteilung des Erregerwachstums.....	23
3.8.2 Mikroskopische Untersuchungen	23
3.8.3 Biochemische und serologische Methoden	24
3.8.4 Bestimmung der 16S-rRNA-Sequenz	26
3.8.4.1 Gesamtzell-DNA-Extraktion.....	26
3.8.4.2 Agarose-Gelelektrophorese	27
3.8.4.3 16S-rRNA-PCR, Aufreinigung des PCR-Produktes und Sequenzierung	27
3.9 FISH	30
3.9.1 Objektträger und Wattestäbchen	30
3.9.2 Anfertigen der Präparate	30
3.9.3 Enzymatische Vorbehandlung grampositiver Bakterien	30
3.9.4 Hybridisierung.....	31
3.9.5 Waschen und Eindecken	31
3.9.6 Mikroskopische Beurteilung	34
3.10 Evaluierung von Sondenkandidaten und publizierten Sonden	35
3.11 Homogenisierung und Savinasevorbehandlung der Milchproben	36

3.12 Vorversuche für die Untersuchung von Mastitismilchproben	37
3.12.1 Autofluoreszenz.....	37
3.12.2 Ermittlung des Einflusses der Savinasevorbehandlung.....	37
3.12.3 Ermittlung der Nachweisgrenze von Erregern in Milchproben.....	37
3.13 Untersuchung von Mastitismilchproben	38
4 ERGEBNISSE	39
4.1 Objektträger und Wattestäbchen	39
4.2 Sondenevaluierung	40
4.2.1 Datenbankabgleich der Sondenkandidaten.....	40
4.2.2 Evaluierung der Sondenkandidaten bei verschiedenen Formamidkonzentrationen.....	40
4.2.2.1 Sondenkandidaten HPS 1436 und HPS 1435 für <i>H. parasuis</i>	40
4.2.2.2 Sondenkandidat SUB 196 für <i>S. uberis</i>	42
4.2.2.3 Sondenkandidat APYO 183 für <i>A. pyogenes</i>	43
4.2.3 Evaluierung der Sondenkandidaten mit verschiedenen Bakterienspezies.....	45
4.2.3.1 Sondenkandidat HPS 1436 für <i>H. parasuis</i>	45
4.2.3.2 Sondenkandidat SUB 196 für <i>S. uberis</i>	46
4.2.3.3 Sondenkandidat APYO 183 für <i>A. pyogenes</i>	48
4.3 Hybridisierung publizierter Sonden aus der Humanmedizin mit veterinärmedizinischen Isolaten	50
4.4 Hybridisierungszeiten	52
4.5 Vorversuche zum Erregerdirektnachweis in Milchproben	53
4.5.1 Autofluoreszenz.....	53
4.5.2 Evaluierung der Savinasevorbehandlung an künstlich kontaminierten Milchproben	54
4.5.3 Evaluierung der quantitativen Nachweisbarkeit in künstlich kontaminierten Milchproben	55
4.6 Untersuchungen von Mastitismilchproben mit FISH und kultureller Anzucht.....	56
4.6.1 Auswertung der untersuchten Feldproben hinsichtlich der nachgewiesenen Erreger	56
4.6.2 Auswertung der Feldproben bezüglich der Savinasevorbehandlung	66
4.6.3 Ermittlung der Nachweisgrenze bei Feldproben	67
4.6.4 Einfluss der Zeit auf die Nachweisbarkeit von Erregern in Mastitismilchproben.....	68

5 DISKUSSION	69
5.1 Etablierung einer FISH-Sonde für <i>H. parasuis</i>	70
5.2 FISH-Sonden zur Identifizierung von <i>S. uberis</i> und <i>A. pyogenes</i>	72
5.3 Einsatz der FISH für die Diagnostik von Mastitismilchproben.....	75
5.3.1 Vorversuche, Einfluss einer Vorbehandlung der Milch und Nachweisgrenze.....	75
5.3.2 Qualitative Beurteilung des Vergleichs von FISH und kultureller Untersuchung anhand von Feldproben.....	78
6 ZUSAMMENFASSUNG	83
7 SUMMARY	85
8 LITERATURVERZEICHNIS	87
9 ANHANG.....	101
9. 1 Eingesetzte Stämme für die Evaluierung der Sonden.....	101
9. 2 Verwendete Mastitismilchproben	110
9. 3 Medien, Lösungen und Puffer	114
9. 4 Chemikalien und Enzyme.....	120
9. 5 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	121
9. 6 Einzelergebnisse der FISH publizierter Sonden mit veterinärmedizinischen Isolaten.....	123
9. 7 Einzelergebnisse der Savinase-Auswertung von Mastitismilchproben	127

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1	Eingesetzte Oligonukleotide.....	20
Tab. 2	Bewertung der Bakterienmenge pro Gesichtsfeld im mikroskopischen Präparat.....	34
Tab. 3	Beurteilung der Fluoreszenzintensität.....	34
Tab. 4	Evaluierung der Sonden HPS 1436 und HPS 1435 bei verschiedenen Formamidkonzentrationen (mit Kompetitor).....	41
Tab. 5	Evaluierung der Sonde SUB 196 bei verschiedenen Formamidkonzentrationen.....	42
Tab. 6	Evaluierung der Sonde APYO 183 bei verschiedenen Formamidkonzentrationen (mit Kompetitor).....	44
Tab. 7	Evaluierung der Sonde HPS 1436 bei 30 % Formamid.....	45
Tab. 8	Evaluierung der Sonde SUB 196 bei 30 % Formamid.....	46
Tab. 9	Evaluierung der Sonde APYO 183 bei 30 % Formamid.....	48
Tab. 10	Evaluierung publizierter Sonden mit veterinärmedizinischen Stämmen.....	50
Tab. 11	Evaluierung verschiedener Hybridisierungszeiten mit Streptokokken und Enterokokken.....	52
Tab. 12	Ergebnisse der Savinasevorbehandlung der künstlich kontaminierten Milchproben.....	54
Tab. 13	Quantitative Nachweisbarkeit von Bakterien in künstlich kontaminierten Milchproben.....	55
Tab. 14	Ergebnisse von Mastitismilchproben mit kulturellem Nachweis von Erregern in Reinkulturen.....	58
Tab. 15	Ergebnisse von Mastitismilchproben mit kulturellem Nachweis von Erregern in Mischkulturen.....	60
Tab. 16	Ergebnisse der Savinasevorbehandlung der untersuchten Mastitismilchproben.....	66
Tab. 17	Quantitative Nachweisbarkeit von Bakterien in den untersuchten Mastitismilchproben.....	67
Tab. 18	Vergleichende Auswertung der Ergebnisse von FISH und kultureller Untersuchung der Mastitismilchproben (n = 119) nach der Gesamtkeimzahl und der Zeit zwischen Eingang im Labor und FISH.....	68

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1	Gesamtkeimzahlbestimmung.....	22
Abb. 2	Präparateherstellung für die FISH.....	32
Abb. 3	Durchführung der FISH.....	33
Abb. 4	Grade der Fluoreszenzintensität.....	34
Abb. 5	Objektträger mit Silikonfolie und beschichteter 8-Feld-Objektträger.....	39
Abb. 6	<i>H. parasuis</i> mit Sondenkandidat HPS 1436 und Kontrolle EUB 338.....	41
Abb. 7	<i>S. uberis</i> mit Sondenkandidat SUB 196 und Kontrolle EUB 338.....	43
Abb. 8	<i>A. pyogenes</i> mit Sondenkandidat APYO 183 und Kontrolle EUB 338.....	44
Abb. 9	Autofluoreszenz von Milchproben	53
Abb. 10	Einfluss der Savinasevorbehandlung am Beispiel einer Milchprobe mit <i>E. coli</i> (Gramfärbung).....	55

Verzeichnis der Abkürzungen

6-FAM	6-carboxyfluorescein
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
A. demin.	Aqua demineralis
API	Analytical Profile Index
ATCC	American Type Culture Collection (Manassas, USA)
BAL	Bronchioalveoläre Lavage
BAP	Blutagarplatte
BfT	Bundesverband für Tiergesundheit e.V. (Bonn)
BHI	Brain-Heart-Infusion
bp	Basenpaare
BVL	Bundeamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (Berlin)
cfu	colony forming units
CNA	Colistin, Nalidixinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig)
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
HCL	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
kb	Kilobasenpaare
KBE	Koloniebildende Einheit (-en)
KBE/ml	Koloniebildende Einheiten pro Milliliter
l	Liter
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LVG	Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim
M	molar

Verzeichnis der Abkürzungen

mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
n.d.	nicht durchgeführt
NaCl	Isotonische Kochsalzlösung
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
Na ₂ -EDTA	Dinatrium-Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
NCBI	National Center of Biotechnology Information
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
S	Svedberg-Einheit
SH	Landeslabor Schleswig-Holstein (Neumünster)
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Tab.	Tabelle
TES-Puffer	Tris-EDTA-Natriumchlorid-Puffer
TGD	Tiergesundheitsdienst Bayern e.V. (Grub)
U/min	Umdrehungen pro Minute

1 Einleitung

Die Bekämpfung bakterieller Infektionskrankheiten spielt in der Tiermedizin eine wichtige Rolle. Sie erfolgt aus Gründen der Tierseuchenbekämpfung, des Verbraucherschutzes und der Lebensmittelsicherheit, des Tierschutzes und nicht zuletzt aus ökonomischen Erwägungen. In der Nutztierhaltung wird unter anderem durch Hygienemaßnahmen und den Einsatz antimikrobieller Wirkstoffe versucht, Erkrankungen durch bakterielle Erreger zu minimieren. Für eine Optimierung therapeutischer Maßnahmen ist eine möglichst schnelle Identifizierung eines Erregers bei Auftreten einer Erkrankung notwendig. Durch eine zeitnahe gezielte Intervention kann das Krankheitsgeschehen frühzeitig eingegrenzt und somit für das einzelne Tier, den Bestand oder, im Fall von Zoonosen, auch den Besitzer und andere Kontaktpersonen eine weitergehende Problematik verhindert werden.

Zu den bedeutendsten bakteriellen Erkrankungen in der Veterinärmedizin gehören Infektionen der Reproduktionsorgane des Rindes (Aborte, Genitallerkrankungen, Mastitiden) sowie Infektionen der Atemwege und des Magendarmtraktes, insbesondere bei Kälbern und Ferkeln. Ein weiteres Problem ist das mit steigender Häufigkeit auftretende Therapieversagen, verursacht durch unzureichende Diagnostik von großer Bedeutung. Neben den klassischen indirekten Nachweismethoden (Serologie) und den direkten bakteriologischen Methoden (Kultur mit anschließender Differenzierung) haben in den letzten Jahren die oft schnelleren molekularen Methoden an Bedeutung gewonnen. Es werden insbesondere PCR- oder *Real-time*-PCR-Methoden zum Erregernachweis aus dem Probenmaterial eingesetzt. Die Identifizierung kultivierter Bakterien erfolgt in der Regel mit Hilfe biochemischer und serologischer Untersuchungen, wobei neben diesen klassischen Methoden auch die Sequenzierung bestimmter Genombereiche oder die Massenspektrometrie eingesetzt werden können. Limitierende Faktoren für einen Einsatz dieser spezifischen Techniken sind vielfach der Zeitaufwand bzw. die hohen Gerätekosten. Zusätzliche einfach durchzuführende Methoden, die zu einer schnellen und frühen Entscheidungsfindung beitragen können, sind daher nach wie vor wünschenswert. Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) kann diese Anforderungen für viele Spezies erfüllen. Die Methode wird in der Humanmedizin im diagnostischen Bereich eingesetzt, spielt aber in der Tiermedizin für die Diagnostik bakterieller Infektionen bisher eine untergeordnete Rolle. Ziel der vorliegenden Arbeit war vor diesem Hintergrund die Untersuchung der Eignung der FISH für die Identifizierung ausgewählter veterinärpathogener Erreger sowie für den Direktnachweis von pathogenen Erregern in bovinen Mastitismilchproben.

2 Schrifttum

2.1 Nachweis und Identifizierung bakterieller Erreger

Die Diagnostik von Erkrankungen mit bakterieller Beteiligung beruht auf dem Nachweis sowie der Identifizierung der ursächlichen Erreger. Es existieren verschiedene Methoden, die je nach Ausgangsmaterial, Fragestellung und verdächtigtem Erreger zur Anwendung kommen.

2.1.1 Mikroskopischer und kultureller Nachweis von Erregern

Mit mikroskopischen Verfahren können Erreger sowohl im Probenmaterial direkt als auch nach ihrer Anzucht beurteilt werden. Es werden Größe, Form und Lagerung (Morphologie) der Bakterien sowie Besonderheiten wie Sporenbildung oder Säurefestigkeit für eine Charakterisierung herangezogen. Zusätzlich kann im Nativpräparat die Beweglichkeit überprüft werden. Zur Beurteilung der Morphologie werden verschiedene Färbetechniken eingesetzt, von denen die Gramfärbung die wichtigste Färbung in der Routinediagnostik ist. Sie ermöglicht eine Einteilung in grampositive und gramnegative Bakterien aufgrund der Zellwandbeschaffenheit (Gramverhalten). Weitere klassische Färbemethoden sind die Sporenfärbung nach Rakette und die Ziehl-Neelsen-Färbung zur Darstellung säurefester Stäbchen (Hof und Dörries, 2005).

Zur kulturellen Untersuchung diagnostischer Materialien werden Fest-, Halbfest- und Flüssigmedien verwendet. Eingesetzt werden universelle, selektive und elektive Medien, wobei viele Medien sowohl selektiv als auch elektiv funktionieren. Die am häufigsten eingesetzten universellen Medien sind Agarplatten mit und ohne Blutzusatz, auf denen die Morphologie, das Hämolyse- und das Schwärmverhalten von Bakterien generell beurteilt werden können. Im Gegensatz dazu dienen Selektivmedien der gezielten Vermehrung bestimmter Bakterien und elektive Medien der Differenzierung und Identifizierung verschiedener Erreger auf den Platten. Sie werden entweder parallel beim ersten Ansatz des Materials mitgeführt oder im Anschluss an eine Voranreicherung zur weiteren Differenzierung der Erreger eingesetzt. Selektivnährmedien beinhalten in der Regel Zusätze, die das Wachstum bestimmter Spezies fördern und/oder Zusätze (beispielsweise Antibiotika), die die Begleitflora im Wachstum hemmen. Als Beispiel für ein differenzierendes Medium in der Mastitisdiagnostik kann die Zugabe von Äskulin zum Nährmedium der ersten Anzucht angeführt werden, die durch den Nachweis der Fähigkeit zur Äskulinspaltung bei Enterokokken und einigen Streptokokkenspezies zur Einteilung in „äskulinpositive Streptokokken/Enterokokken“ und „äskulinnegative Streptokokken“ führt (Fehlings et al.,

2009). In anderen Medien lassen zugesetzte Indikatoren durch Farbumschlag eine Änderung des pH-Wertes erkennen, der durch das Stoffwechselgeschehen der Bakterien (zum Beispiel den Abbau von Glucose) hervorgerufen wird. Der Einsatz von Selektiv- und Elektivmedien trägt maßgeblich zur Verkürzung des Untersuchungsgangs bei.

Kultiviert werden die Erreger in der Regel aerob, mikroaerophil oder anaerob bei 37 °C. Der Anzucht der Erreger folgt, sofern sie nicht aufgrund der kulturellen Morphologie eindeutig zuzuordnen sind, die Identifizierung. Die klassische kulturelle Untersuchung beansprucht in der Regel 48-72 Stunden, kann sich aber auch über Wochen erstrecken (Hof und Dörries, 2005).

2.1.2 Identifizierung mittels klassischer phänotypischer Methoden

Die Identifizierung von Mikroorganismen über ihr biochemisches Verhalten gehört zu den ältesten bekannten Verfahren. Es werden Stoffwechselleistungen der Bakterien wie die Bildung von Säure oder Gas aus zur Verfügung gestellten Reaktionskörpern nachgewiesen (Krüger, 2002). Die Überprüfung einer Anzahl biochemischer Reaktionen wird auch als „Bunte Reihe“ bezeichnet. In der Regel werden kommerziell erhältliche Test-Systeme eingesetzt, beispielsweise Enterotube™ II (BD, Heidelberg) oder die API Systeme (bioMérieux, Nürtingen). Die Auswertung erfolgt bei diesen Systemen überwiegend manuell. Weiterhin stehen auch automatisierte Test-Systeme, wie das VITEK-System (bioMérieux, Nürtingen), zur Verfügung. Dabei werden die biochemischen Reaktionen von einem Computer abgelesen sowie ausgewertet und die Identifikation automatisiert ausgegeben. Unabhängig vom System benötigt die biochemische Charakterisierung in der Regel ein bis zwei Tage, da sie auf das Wachstum der Bakterien angewiesen ist.

Eine weitere Möglichkeit der phänotypischen Identifizierung von Erregern ist die Serotypisierung. Anhand von Antigenen, die meist Bestandteil von an der Oberfläche lokalisierten Strukturen der Bakterien sind, können einige Bakterienspezies identifiziert oder in Serotypen unterteilt werden. Beispiele sind Streptokokken, die aufgrund gruppenspezifischer zellwandständiger Antigene nach Lancefield-Gruppen klassifiziert werden oder Salmonellen, die nach dem Kauffmann-White-Schema in Serovaren eingeteilt werden (Hof und Dörries, 2005). Diese Art der Identifizierung benötigt eine Kultivierung der Erreger und das Subkultivieren zur Einzelkolonie, wodurch sich ein Zeitraum von einigen Tagen bis zur Identifizierung ergibt.

2.1.3 Identifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Molekulare Nachweisverfahren differenzieren Bakterien aufgrund ihres genetischen Materials. Sie werden sowohl zum direkten Erregernachweis im Material als auch zur Speziesidentifizierung von kultivierten Bakterien eingesetzt (Bangsow et al., 2007). Ein Vorteil dieser Methoden ist die Möglichkeit der Identifizierung auch von nicht oder schwer kultivierbaren Mikroorganismen, ein Nachteil ist eine mögliche positive Reaktion ohne das Vorhandensein lebender Krankheitserreger aufgrund von im Material vorhandener DNA. Bei klassischen PCR-Methoden wird ein bestimmter DNA-Abschnitt so oft amplifiziert, bis sich die Amplifikate mit Hilfe einer Gelelektrophorese nachweisen lassen bzw. das Amplifikat sequenziert werden kann. In der Regel werden für die Untersuchung mittels PCR und Gelelektrophorese ca. fünf Stunden benötigt, wozu unter Umständen noch die DNA-Isolierung hinzuzurechnen ist. Schließen sich eine Aufreinigung des PCR-Produktes sowie eine Sequenzierung an, müssen ein bis zwei weitere Arbeitstage eingerechnet werden. Eine *Real-time*-PCR bietet im Vergleich zur klassischen PCR insofern einen Zeitvorteil, als hier keine Gelelektrophorese erforderlich ist und ein sich positiv entwickelndes Ergebnis zeitgleich noch während des PCR-Laufes beobachtet werden kann.

Als Zielstrukturen einer Identifizierung werden häufig die Operons für die ribosomale RNA (rRNA) der Bakterien verwendet (Amann et al., 1995). Innerhalb der Operons kommen Bereiche mit einem unterschiedlich hohen Grad an Konservierung vor. Eine Identifizierung anhand der rRNA erfolgt entweder durch die Amplifikation von Abschnitten der ribosomale DNA (rDNA) unter Verwendung von nur für diese Spezies spezifischen Primern, oder unter Verwendung von Primern aus konservierten Bereichen mit anschließender Sequenzierung. Die Sequenzierung umfaßt meist große Bereiche der 16S- oder 23S-rDNA bzw. Abschnitte zwischen diesen Genen („spacer“). Der Vergleich der ermittelten DNA-Sequenz mit Datenbanken erlaubt die Identifizierung der Erreger, sofern ein entsprechender Eintrag vorhanden ist. In den verschiedenen verfügbaren Datenbanken, zum Beispiel der „GenBank“ des National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>), liegen inzwischen über eine Million 16S-rRNA-Sequenzen vor.

Neben der Identifizierung über die rRNA kann auch der Nachweis bestimmter Haushaltsgene oder weiterer genetischer Elemente herangezogen werden. Hierbei ist eine Sequenzierung nicht in jedem Fall erforderlich, da bestimmte Gene oder auch integrierte Transposons (zum Beispiel Insertionssequenzen) spezifisch für die entsprechenden Erreger sind. Es reicht demnach in diesen Fällen der Nachweis des Vorkommens mittels PCR aus (Gillespie und Oliver, 2005).

2.2 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Ein anderes molekulares Verfahren, das genetische Unterschiede verwendet, jedoch auf eine Vervielfältigung von Genabschnitten verzichtet, ist die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH).

2.2.1 Prinzip und Entwicklung der FISH

Als Hybridisierung bezeichnet man den Prozess der Reassoziaton von einzelsträngig vorliegenden Nukleinsäuren zu einem Doppelstrang. Die Hybridisierung kann zwischen zwei Einzelsträngen der DNA, einer als Einzelstrang vorliegenden DNA und einer RNA oder zwischen zwei RNA-Strängen erfolgen. Bei der Hybridisierung bildet sich eine Doppelhelix aufgrund der Prinzipien der komplementären Basenpaarung. Unter stringenten Bedingungen, beeinflusst durch Temperatur, der Konzentration an Ionen und Formamid, hybridisieren nur vollständig komplementäre oder sehr ähnliche Sequenzen. Als besonders stringente Bedingungen gelten hohe Temperaturen, niedrige Ionenkonzentrationen und hohe Konzentrationen an Formamid (Niemann, 1999a).

Die FISH basiert auf dem Verfahren der *In-situ*-Hybridisierung (ISH). Mit Hilfe einer Sonde - einem genau definierten, künstlich hergestellten und markierten, kurzen DNA-Stück, das auch als Oligonukleotid bezeichnet wird - lassen sich komplementäre einzelsträngig vorliegende Nukleinsäuresequenzen, zum Beispiel von Bakterien, in einem Organismus, im Gewebe oder innerhalb einer Zelle vor Ort („*in-situ*“) nachweisen. Die ISH wurde von zwei unabhängigen Forschergruppen entwickelt (John et al., 1969; Pardue und Gall, 1969). Zunächst wurden radioaktiv markierten Sonden verwendet und die Hybride mit Hilfe der Autoradiographie visualisiert. Dieses Verfahren setzte Giovannoni (1988) zum Nachweis von Mikroorganismen ein. DeLong verwendete 1989 erstmals die ISH mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Oligonukleotiden zum Nachweis von Bakterien. Im Vergleich zu einer radioaktiven Markierung ist eine Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen sicherer und bietet den Vorteil, dass sich verschiedene Sonden, die mit unterschiedlichen Fluorochromen markiert sind, in einem Hybridisierungsschritt kombinieren lassen (Moter und Göbel, 2000). Da in vitalen Bakterienzellen bis zu 50.000 Ribosomen vorkommen können, ist die ribosomale RNA als Zielstruktur gut für eine Hybridisierung geeignet, ohne dass eine Amplifikation erfolgen muss. Für die Identifizierung von Bakterien wird für die FISH werden daher üblicherweise die 16S-, seltener auch die 23S-rRNA, als Zielsequenz herangezogen. Neben der Identifizierung kultivierter Bakterien lassen sich mit der Methode innerhalb weniger Stunden Bakterien auch direkt im Material nachweisen und zugleich identifizieren (Blasco et al.,

2003). Da außer einem Epifluoreszenzmikroskop keine besondere Laborausstattung benötigt wird und nur geringe Kosten für Verbrauchsmaterialien anfallen, ist die FISH nicht nur eine schnelle, sondern zugleich auch eine kostengünstige Methode (Kempf et al., 2000). Sie läßt sich zudem vom Arbeitsablauf her leicht in die tägliche Labordiagnostik integrieren. Nachteil der FISH ist jedoch, dass bei unbekanntem Erregern nicht ungezielt gesucht werden kann, sondern dass nur diejenigen Bakterien identifiziert werden können, für die spezifische Sonden eingesetzt werden.

2.2.2 Durchführung der FISH

2.2.2.1 Sonden und Kompetitoren

Der Begriff „Sonden“ wird, wie erwähnt, für markierte Moleküle verwendet, die spezifisch an eine Nukleinsäuresequenz (in anderem Zusammenhang auch an ein Protein) binden und so eine gesuchte Zielstruktur identifizieren (Niemann, 1999b). Bei der FISH werden als Sonden Oligonukleotide mit einer Länge von 15-30 Basenpaaren (bp) verwendet. Mit zunehmender Länge der Sonde erhöht sich ihre Spezifität, allerdings sinkt gleichzeitig ihre Penetrationsfähigkeit durch die Zellwand der Bakterien (Moter und Göbel, 2000). Sonden werden synthetisch hergestellt und meistens am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) markiert. Fluorochrome emittieren bei Bestrahlung mit kurzwelligem Licht längerwellige Lichtstrahlen im sichtbaren Bereich (Smollich, 1999). Es stehen mehrere Fluoreszenzfarbstoffe, die jeweils andere Wellenlängen emittieren, zur Verfügung.

Für die FISH überprüfte Sonden sind seit einiger Zeit in wissenschaftlichen Veröffentlichungen für viele Bakterienspezies, aber auch genus- und teilweise familienübergreifend, publiziert worden (Amann et al., 1990; Trebesius et al., 2000; Bohnert et al., 2000; Kempf et al., 2000; Poppert et al., 2009). Eine regelmäßig als Kontrolle eingesetzte, stammübergreifende Eubakterien-Sonde (EUB 338) wurde von Amann et al. (1990) publiziert. Angaben zu weiteren Sonden finden sich in Datenbanken, die im Internet frei zugänglich sind (Loy et al., 2007). Ein Beispiel ist die Datenbank „ProbeBase“ (<http://www.microbial-ecology.net/probebase/>), in der derzeit 2480 rRNA-zielgerichtete Oligonukleotid-Sequenzen (Stand 06.03.2010) hinterlegt sind. Als für die FISH überprüft werden etwa 720 dieser Sonden angegeben. Da zurzeit immer noch mehr 16S- als 23S-rRNA-Sequenzen zur Verfügung stehen, richten sich publizierte Sonden vorrangig gegen die 16S-rRNA.

Sind Sequenzen bekannt, aber die Sonden stehen nicht kommerziell zur Verfügung, kann die Synthese bei verschiedenen Herstellern von Oligonukleotiden (z.B. Fisher Scientific, Ulm;

MWG Biotech, Ebersberg; GATC, Konstanz) in Auftrag gegeben werden. Für einige Erreger, zum Beispiel *Staphylococcus (S.) aureus*, können Sonden kommerziell bezogen werden (AdvanDx, Vedbaek, Denmark). In diesem Fall sind Sonden künstlich hergestellte, in der Natur nicht vorkommende peptidische Nukleinsäuresonden (PNA-Sonden), bei denen im Gegensatz zu einer natürlichen DNA die Zucker-Phosphat-Struktur des Rückgrats einer DNA durch eine N-(2-Amino-Ethyl) Glycin-Struktur ersetzt worden ist. Diese Moleküle sind ungeladen, wodurch die bei der Hybridisierung ausgebildeten Wasserstoff-Brücken-Bindungen stabiler sein sollen. Nachteile der PNA-Sonden sind ihr hohes molekulares Gewicht und die damit verbundenen Schwierigkeiten bei der Passage der bakteriellen Zellwand (Ray und Nordén, 2000).

Für Bakterien, für die bisher noch keine Sonden oder überprüfte Sequenzen zur Verfügung stehen, können zukünftige Sonden zunächst als „Sondenkandidaten“ mit Hilfe einer geeigneten Software wie dem ARB Programm (www.arb-home.de) ausgewählt werden (Ludwig et al., 2004). Für eine Auswahl wird zunächst die gewünschte Zielspezies angegeben. Das Programm vergleicht vorhandene rRNA-Sequenzen in jeweils kurzen Abschnitten mit allen verfügbaren Sequenzen anderer Bakterien, berücksichtigt Eigenheiten der Sequenzabschnitte wie zum Beispiel Sekundärstrukturen, und entwickelt mit Hilfe eines komplizierten Algorithmus mögliche Kandidatensequenzen. Diese können dann einzeln ausgewählt und bezüglich der potentiellen Hybridisierungseigenschaften, der Zugänglichkeit und der Kreuzreaktion mit Bakterien mit gleicher oder sehr ähnlicher Sequenz beurteilt werden. Das entsprechende Programm ist aufgrund der großen Zahl zugrunde liegender Datenbankeinträge und der komplexen Analyse bei der Auswahl der spezifischen Sequenzbereiche allerdings sehr umfangreich und zudem bisher wenig komfortabel in der Bedienung. Eine Überprüfung von Sondenkandidaten kann auch durch ein komfortableres Programm erfolgen (ProbeCheck; <http://131.130.66.200/cgi-bin/probecheck/content.pl?id=home>), welches sich gut zur Kontrolle ausgewählter Kandidatensequenzen oder früher publizierter Sondensequenzen mit bekannten rRNA-Sequenzen eignet. Weitere Angaben zur FISH, Protokolle und aktuelle Entwicklungen finden sich auch unter <http://www.arb-silva.de/fish-probes/>.

Stellt sich heraus, dass eine ansonsten geeignete Sonde aufgrund von nur wenigen Basenaustauschen („mismatches“) im Sondenbereich bei anderen Bakterien Kreuzreaktionen hervorrufen könnte, kann der Einsatz eines sogenannten „Kompetitors“ sinnvoll sein (<http://www.arb-silva.de/fish-probes/testing>). Kompetitoren weisen die Sequenz der Nicht-Zielspezies auf, sind im Gegensatz zu den auf die Zielspezies gerichteten Sonden aber

unmarkiert und werden zusammen mit den jeweiligen Sonden eingesetzt (Poppert et al., 2009). Spezies, die sich in ihrem Sequenzabschnitt nur durch ein oder zwei Nukleotide von der Zielspezies unterscheiden, werden durch die spezifischere Bindung der Kompetitoren erfolgreich unmarkiert „weggefangen“ und reagieren somit nicht falsch positiv.

2.2.2.2 Ablauf einer FISH

Das zu untersuchende Material wird auf einen Objektträger aufgebracht und fixiert. Es stehen prinzipiell verschiedene Fixierungsmethoden zur Verfügung. Die für andere Färbungen häufig eingesetzte Hitzefixierung ist ungeeignet, da hierbei Eiweiße denaturiert und so die Ribosomen in den Erregern durch das Einwirken hoher Temperaturen beschädigt werden können. Eine Fixierung in Methanol oder Paraformaldehyd führt im Gegensatz dazu zu einer unveränderten Morphologie der Ribosomen. In der Regel wird eine Fixierung mit Methanol durchgeführt, da eine Verwendung von Paraformaldehyd zwar die hochwertigere Fixierung darstellt (<http://www.arb-silva.de/fish-probes/fish-protocols/>), aber auch mit einer höheren Umweltbelastung einhergeht. Im nächsten Schritt müssen die morphologisch intakten Bakterienzellwände für die Sonden durchlässig gemacht werden. Die Passierbarkeit der Zellwand der meisten grampositiven Erreger kann durch eine kurzzeitige Inkubation mit Lysozym erreicht werden. Bei Staphylokokken ist aufgrund der anderen Verknüpfung des Mureingerüsts der Einsatz von Lysostaphin notwendig (Gory et al., 1999). Die Untersuchung gramnegativer Bakterien erfordert hingegen keine zusätzliche Lyse. Anschließend erfolgt die Hybridisierung der fixierten Bakterien mit den Sonden in einer feuchten dunklen Kammer zwischen 37 °C und 50 °C. Die Hybridisierungszeit kann zwischen 30 min und einigen Stunden variieren. Danach wird überschüssige Sonde in einem Waschschrift entfernt. Das trockene Präparat wird mit einem fluoreszenzschützenden Eindeckmedium und einem Deckglas eingedeckt. Sofern für den jeweiligen Erreger passende Sonden verwendet wurden, lassen sich die nun fluoreszierenden Erreger mit einem Fluoreszenzmikroskop nachweisen (Moter und Göbel, 2000).

2.2.2.3 Faktoren, die das Ergebnis der FISH beeinflussen

Ein entscheidender Faktor für ein optimales Ergebnis der FISH ist die Vitalität der Erreger, da nur in stoffwechselaktiven Bakterien ausreichend Ribosomen vorhanden sind, um genügend Sonden für ein eindeutig auswertbares Fluoreszenzsignal binden zu können. Um die Bakterien in einem möglichst aktiven Stoffwechsellzustand zu untersuchen, sollten Kulturen immer am Tag zuvor subkultiviert werden bzw. bei einem Einsatz direkt an einer Probe frische Materialien verwendet werden.

Ein weiteres Kriterium für das Gelingen der FISH ist die Durchlässigkeit der bakteriellen Zellwand für die Sonden. Mit Hilfe des kurzzeitigen Einwirkens der Enzyme Lysozym oder Lysostaphin wird die Peptidoglykanschicht grampositiver Bakterien teilweise lysiert und für die Sonden passierbar. Ein zu langes Lysieren führt zur Zerstörung der Integrität der Zellwand, wodurch die Morphologie der Bakterien nicht erhalten bleibt und die Erreger nicht mehr nachgewiesen werden können. Es ist daher notwendig, für jede Spezies spezielle Lysezeiten und gegebenenfalls entsprechende Enzymmixturen zu ermitteln (Amann et al., 1995).

Ein dritter Parameter, der die FISH beeinflusst, ist die Hybridisierungstemperatur. Diese muss einerseits so niedrig sein, dass überhaupt eine Hybridisierung stattfindet, andererseits aber so hoch, dass eine fehlerhafte Hybridbildung vermieden wird (Brown, 2002). Für die Ermittlung einer Hybridisierungstemperatur kann die Schmelztemperatur T_m von Oligonukleotiden mit weniger als 50 bp nach einer einfachen Formel [$T_m = 4 (G + C) + 2 (A + T) ^\circ C$] näherungsweise bestimmt werden [wobei die Buchstaben für die Basen Guanin (G), Cytosin (C), Adenin (A) und Thymin (T) stehen]. Für die Hybridisierung sollte die verwendete Temperatur unter dem errechneten Wert liegen (Brown, 2002; Hoff, et al., 2007). Ebenfalls zu einer optimierten Hybridisierung trägt die Verwendung von Formamid bei. Formamid senkt die notwendige Hybridisierungstemperatur um ca. 0,63 °C je Prozentanteil. Durch den Zusatz wird außerdem die Bildung von DNA/RNA-Hybriden begünstigt (Hoff, et al., 2007). Da bei der FISH oft mehrere Sonden mit unterschiedlichen Längen gleichzeitig mit derselben Formamidkonzentration eingesetzt werden, wird in der Regel von der berechneten Schmelztemperatur der jeweiligen Sonden geringgradig abgewichen.

Im Zusammenhang mit dem Einsatz der Sonden spielt auch das mögliche Ausbleichen der Präparate eine Rolle. Fluoreszenzfarbstoffe sind lichtempfindlich, daher ist die FISH weitgehend unter abgedunkelten Bedingungen durchzuführen. Zum Eindecken der Präparate empfiehlt es sich, ein Eindeckmedium mit Fluoreszenzschutz zu verwenden, um ein vorzeitiges Ausbleichen der Präparate bei der Beurteilung unter dem Fluoreszenzmikroskop zu verhindern (Moter und Göbel, 2000).

Werden mittels FISH Probenmaterialien direkt untersucht, kann eine mögliche Autofluoreszenz als problematischer Faktor hinzu kommen. Hierbei handelt es sich um eine unspezifische Fluoreszenz, die vom Untersuchungsmaterial selbst ausgeht oder auch durch die Fixation entstanden sein kann. Zelltrümmer zeigen oft eine ausgeprägte Autofluoreszenz (Alber, 1999). In Vorversuchen ist daher abzuklären, ob das zu untersuchende Material eine die Beurteilung beeinträchtigende Autofluoreszenz aufweist.

2.2.3 Einsatz der FISH

Die FISH zum Nachweis von Bakterien findet sowohl zur Charakterisierung mikrobieller Populationen, als auch in der Überwachung von Lebensmitteln und in der klinischen Mikrobiologie Anwendung (Moter und Göbel, 2000). Beispiele für den Einsatz der Methode außerhalb der Veterinärmedizin sind die Charakterisierung der bakteriellen Flora in Wasser (Ootsubo et al., 2003; Kitaguchi et al., 2006), in Klärschlamm aus Textilfabriken (Aktan und Salih, 2006) oder bei der Weinherstellung (Blasco et al., 2003). In der Humanmedizin wird die FISH sowohl in der Grundlagenforschung zur Identifizierung pathogener Erreger oder ihrer Resistenzen (Colombo et al., 2007; Haas et al., 2008) als auch in der klinischen Diagnostik (Wellinghausen et al., 2007; Poppert et al., 2009) eingesetzt. In diesen Studien wird die FISH als eine Technik dargestellt, die konventionelle Methoden zur Bakterienidentifizierung sinnvoll ergänzen oder sogar ersetzen kann (Poppert et al., 2008; Poppert et al., 2009). Zudem können sich durch eine schnelle Identifizierung frühzeitige Hinweise für eine zielgerichtete Therapie ergeben. Zusätzlich zur Identifizierung kultivierter Bakterien wurde die FISH auch für den Direktnachweis aus Materialien, zum Beispiel aus Blutkulturen, Liquor oder Gewebeschnitten, eingesetzt (Kempf et al., 2000; Poppert et al., 2005; Wellinghausen et al., 2007).

In der Veterinärmedizin wurde die FISH bisher vor allem zur Charakterisierung von Bakterienpopulationen und zum Nachweis bestimmter Erreger im Zusammenhang mit spezifischen klinischen Fragestellungen verwendet. Das am häufigsten untersuchte Organsystem war der Magen-Darm-Trakt. Es wurden Untersuchungen zur Pathogenese der Colitis bei Hunden mit einer eubakteriellen Sonde durchgeführt (Mansfield et al., 2009), *Helicobacter*, *Campylobacter* und *Brachyspira* spezies bei verschiedenen Tierarten nachgewiesen (Jensen et al., 2001; Priestnal et al., 2004; Klitgaard et al., 2005; Jergens et al., 2009; Recordati et al., 2009) sowie Eigenschaften spezieller Erreger wie *Lawsonia intracellularis* bei Schweinen (Boutrup et al., 2010), *Desulfovibrio* spezies und weiterer Darmbewohner der Katze (Inness et al., 2007) und *Bifidobacterium* spezies bei Kälbern (Vlková et al., 2008) analysiert. Der Einsatz der FISH in Verbindung mit der Durchflusszytometrie wurde von Collado und Sanz (2007) zur Quantifizierung von Schleimhautbewohnern des Gastrointestinaltraktes von Lämmern und Kälbern beschrieben. Weiterhin wurde die FISH zum Direktnachweis von Bakterien in histologischen Schnitten für die Charakterisierung der Darmflora beim Geflügel genutzt (Olsen et al., 2008). Im Rahmen von Untersuchungen zur Pathogenese der Hufrehe beim Pferd wurde die FISH ebenfalls zur Charakterisierung von Veränderungen der Darmflora eingesetzt (Milinovich et al., 2007).

Auch die Beteiligung von Treponemen an der caninen Periodontitis wurde mittels FISH untersucht (Nordhoff et al., 2008). Ein anderes klinisches Bild mit einer Vielzahl beteiligter Bakterien ist die Dermatitis digitalis der Rinder; deren potentielle Erreger wurden ebenfalls mittels FISH charakterisiert (Schlafer et al., 2007; Klitgaard et al., 2008). Boye et al. (2006) und Agerholm et al. (2007) setzten die Methode zum Nachweis von *Fusobacterium necrophorum* aus Abortfällen bei Schafen ein; der gleiche Erreger wurde von Handeland et al. (2010) mittels FISH bei digitalen Nekrobazilloosen der Rentiere identifiziert. Ebenfalls im Gewebe von Abortfällen konnte *Coxiella burnetii* mittels FISH nachgewiesen werden (Jensen et al., 2007) und das Vorkommen von Chlamydien wurde in einer weiteren Arbeit ebenfalls mittels FISH kontrolliert (Pollmann et al., 2005). Außerdem wurden Sonden für bisher selten beschriebene Erreger wie *Helcococcus ovis* publiziert (Kutzer et al., 2008) und nicht kultivierbare, bei Fischen vorkommende Erreger charakterisiert (Urdaci et al., 2008). Beim Geflügel wurden Vertreter aus der Familie der Pasteurellaceae (*Pasteurella multocida* und *Gallibacterium* spezies) über die FISH detektiert (Mbuthia et al., 2001; Bojesen et al., 2003). In der Routinediagnostik der Veterinärmedizin wurde die FISH, im Gegensatz zur Humanmedizin, bisher weder zur Identifizierung kultivierter Erreger noch zum Direktnachweis aus klinischen Materialien regelmäßig eingesetzt. Ein Einsatz zur Ergänzung klassischer Methoden der Identifizierung und zur Verkürzung der Zeit bis zur Identifizierung erscheint aufgrund von Defiziten der biochemischen oder PCR-Methoden (fehlende Datenbasis bzw. fehlende Methoden, zeitaufwändige Untersuchungen) jedoch sinnvoll.

2.3 Haemophilus parasuis

2.3.1 Bedeutung des Erregers

Für *Haemophilus (H.) parasuis* wurde die Etablierung einer FISH-Sonde angestrebt, da für eine Identifizierung der Spezies keine einfachen Methoden zur Verfügung stehen. Das Bakterium ist ein kleines, gramnegatives, unbewegliches Stäbchen, das zur Familie der *Pasteurellaceae* gehört. Es werden 15 Serovare unterschieden. Die Serovare 4 und 5 treten besonders häufig in Zusammenhang mit der Glässerschen Krankheit der Schweine auf (Selbitz, 2002), jedoch wird der Erreger auch auf der Schleimhaut der oberen Atemwege gesunder Ferkel und Läufer nachgewiesen (Møller und Kilian, 1990). Zum Ausbruch der Erkrankung kommt es in Verbindung mit besonderen Belastungen wie Transport und Unterkühlung, oder wenn der Erreger auf immunologisch ungeschützte Tiere trifft (Meyer und Steinbach, 1999). Die Glässersche Krankheit geht typischerweise mit Polyarthritiden und -serositis einher. Sie zeigt einen akuten oder perakuten Verlauf und betrifft meist

heranwachsende Schweine. In der Massentierhaltung treten gelegentlich auch enzootisch verlaufende Infektionen mit einer hohen Morbidität auf, bei denen es zu Pneumonien oder zu Pleuritiden kommt. In den meisten dieser Fälle handelt es sich nicht um eine Monoinfektion mit *H. parasuis*, sondern um Mischinfektionen. Differenzialdiagnostisch sind bei Encephalitiden vor allem Infektionen mit *Streptococcus (S.) suis* und bei Pneumonien mit Pasteurellen, Bordetellen oder *Actinobacillus (A.) pleuropneumoniae* zu berücksichtigen (Møller und Kilian, 1990; Selbitz, 2002). Infektionen mit *H. parasuis* sind eine wichtige Erkrankung in der Schweinehaltung. Hohe Kosten werden insbesondere verursacht durch Antibiotikabehandlungen oder den Verlust erkrankter Tiere (Oliveira et al., 2001).

2.3.2 Nachweismethoden für *H. parasuis*

Erreger der Gattung *Haemophilus* benötigen die Wachstumsfaktoren X (Hämin) und/oder V (NAD). Für *H. parasuis* ist der Faktor V essentiell. Diese Faktorenabhängigkeit kann bei der Anzucht zusammen mit der Kolonimorphologie (langsam wachsende opake Kolonien) einen ersten Hinweis auf eine mögliche Spezieszugehörigkeit geben. Zur Beurteilung der Faktor V-Abhängigkeit eignet sich die Anzucht mit einem sogenannten „Ammenstamm“, zum Beispiel *S. aureus*, der den Wachstumsfaktor V bildet und in den Agar abgibt. Da jedoch mehrere Spezies des Genus *Haemophilus* eine Abhängigkeit von Faktor V zeigen, ist eine eindeutige Identifizierung von *H. parasuis* mit dieser Methode nicht möglich (Selbitz, 2002). Daher werden zur Identifizierung von *H. parasuis*-Stämmen PCR-Verfahren eingesetzt, die den Stamm nach Kultivierung mittels einer spezifischen PCR im Bereich der 16S-rDNA als *H. parasuis* erkennen lassen (Oliveira et al., 2001). Zur Identifizierung von *H. parasuis* in Gewebeschnitten wurde auch die ISH mit Digoxigenin-markierten Sonden eingesetzt, wobei das gesamte, mehr als 800 bp lange PCR-Fragment der PCR nach Oliveira et al. (2001) als Sonde eingesetzt wurde. Diese Methode wurde mit dem Nachweis mittels PCR verglichen und zeigte übereinstimmende Ergebnisse (Jung und Chae, 2004). Die Identifizierung von *H. parasuis* mit der FISH wurde bisher nicht publiziert.

2.4 Mastitiserreger und Nachweismethoden

Auch Erreger, die unter anderem häufig an Mastitiden beteiligt sind, lassen sich mit biochemischen und serologischen Methoden nicht immer so schnell und sicher identifizieren, wie es für eine Therapiewahl oder für einen Rückschluss auf epidemiologische Zusammenhänge wünschenswert wäre. Daher wurde ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit auf dieses Gebiet gelegt. Die Mastitis gehört zu den wichtigsten Erkrankungen in der Milchwirtschaft. Sie verursacht jährlich einen wirtschaftlichen Schaden von schätzungsweise

200–300 € pro Tier (Huijps et al., 2008; Krömker et al., 2007). Nach der Symptomatik wird in die Formen der Mastitis catarrhalis, Mastitis apostematosa, Mastitis phlegmonosa, Mastitis granulomatosa und sonstigen Mastitiden eingeteilt. Weiterhin werden subklinische und klinische Mastitiden unterschieden, bei letzteren wiederum akute, subakute und chronische Verlaufsformen. Überwiegend sind an der Entwicklung einer Mastitis bakterielle Erreger beteiligt (Krömker, 2007; Winter und Zehle, 2009). Anhand der klinischen Symptomatik der Erkrankung ist ein ursächlicher Erreger nicht sicher zu identifizieren; der Verlauf beim Einzeltier oder in der Herde kann jedoch Hinweise auf das Vorkommen von eher kuh- oder eher umweltassoziierten Erregern geben.

2.4.1 Bakterielle Erreger der Mastitis

„Kuhassoziierte“ Mastitiserreger werden in der Regel direkt von Tier zu Tier übertragen [Beispiele *S. aureus* oder *Streptococcus (S.) agalactiae*], während andere Bakterien eher über die Umwelt eingetragen werden (umweltassoziiert). Zu den am häufigsten vorkommenden umweltassoziierten Erregern zählen *Streptococcus (S.) uberis*, Enterokokken, koagulase-negative Staphylokokken (CNS), *Escherichia (E.) coli* und andere coliforme Erreger (Sears und McCarthy, 2003). Prinzipiell wird angenommen, dass kuhassoziierte Bakterien eher subklinische Mastitiden verursachen, wohingegen umweltassoziierte Erreger häufiger akute Erkrankungen hervorrufen (Krömker, 2007). Zur Häufigkeit der verschiedenen Erreger wurde in einer deutschen Studie in den Jahren 2005 und 2006 publiziert, dass überwiegend verschiedene Spezies von Streptokokken und Enterokokken, gefolgt von CNS, coliformen Bakterien und *S. aureus* aus Proben klinischer und subklinischer Mastitiden isoliert wurden (Tenhagen et al., 2009). Die gleichen Autoren berichteten in einer anderen Publikation vom überwiegenden Auftreten von CNS und *Corynebacterium bovis* in den dort untersuchten Proben (Tenhagen et al., 2006). Für Mastitisproben aus Niedersachsen aus dem Jahr 2003 wurden ebenfalls CNS als häufigste Erreger angegeben, gefolgt von *S. uberis*, anderen Streptokokken, Enterokokken und *S. aureus* (Krömker, 2007). Insgesamt liegen zur Verbreitung von Mastitiserregern aus Deutschland jedoch nur wenige publizierte Studien vor, die zudem in der Regel nur einen Teil der bisher beschriebenen, möglichen Pathogene (Krömker, 2007) abdecken.

S. uberis ist weltweit ein häufiger umweltassoziiertes Erreger (Bentley et al., 1993; Devriese et al., 1999). Sein Auftreten wird vor allem mit der Haltung von Rindern in Laufställen in Zusammenhang gebracht (Lopez-Benavides et al., 2007); jedoch wurde auch eine Übertragung von Tier zu Tier beschrieben (Phuektes et al., 2001b). Neben den oben

beschriebenen Studien aus Deutschland wird auch in der Jahresstatistik der norddeutschen Milchtierherdenforschungs- und Betreuungsgesellschaft (MBFG; Wunsdorf) für 2007 von *S. uberis* als dem am zweithäufigsten nachgewiesenen Mastitiserreger (32,7 %) berichtet (Tschischkale et al., 2008). *S. uberis* wird mit weiteren Streptokokkenspezies wie *Streptococcus (S.) bovis* und mit Spezies des Genus *Enterococcus* häufig als „äskulinpositive Streptokokken“ zusammengefasst. Dies ist aus praktischer Hinsicht insofern sinnvoll, als bei diesen Erregern, im Gegensatz zu den eher kuhassoziierten Streptokokken wie *S. agalactiae* und *Streptococcus (S.) dysgalactiae*, nicht selten (Streptokokken) oder in der Regel (Enterokokken) Resistenzen gegenüber Penicillin G auftreten. Eine erhöhte Resistenzlage im Gegensatz zu anderen Streptokokken, aber in geringerem Ausmaß als bei Enterokokken wurde zum Beispiel von Kaspar (2008) berichtet. Auch bei Tenhagen et al. (2006) lagen die Minimalen Hemmkonzentrationswerte für Ampicillin und Cefquinom für *S. uberis* über denen für *S. dysgalactiae*, jedoch unter denen für *Enterococcus* spezies. Eine Differenzierung von äskulinpositiven Streptokokken und Enterokokken zu äskulinnegativen Streptokokken ist mit nicht differenzierenden Anzuchtmedien wie zum Beispiel Blutagarplatten (BAP) nicht möglich.

Arcanobacterium (A.) pyogenes (Ramos et al., 1997) ist ein Eitererreger vor allem der Wiederkäuer und Schweine. Die Spezies ist Bestandteil der Schleimhautflora gesunder Tiere und konnte auf den Tonsillen, im Respirations- und Genitaltrakt, aber auch im Magen-Darm-Trakt nachgewiesen werden. Als opportunistischer Krankheitserreger trägt *A. pyogenes* zu eitrig abszedierenden Infektionen diverser Organsysteme bei, wobei die Spezies häufig an Mischinfektionen beteiligt ist. Mastitiden mit Beteiligung von *A. pyogenes* werden auch als „Sommermastitis“ oder „Holstein'sche Euterseuche“ bezeichnet. Betroffen sind vor allem Färsen und nicht laktierende Kühe (Nattermann und Horsch, 1976; Jousimies-Somer, 1996; Quinn et al., 2002). Mastitiden, die von *A. pyogenes* verursacht werden, können einen perakuten, akuten oder chronischen Verlauf nehmen. Die eitrig-abszedierende Euterentzündung kann sowohl sporadisch als auch enzootisch auftreten (Jost und Billington, 2005). Infektionen, die durch diese Spezies verursacht werden, führen oft zu erheblichen wirtschaftlichen Verlusten (Gröhn et al., 2004). *A. pyogenes* war 2002/2003 in Schweden einer der am häufigsten isolierten Erreger bei klinischen Mastitiden (Ericsson Unnerstad et al., 2008). Weitere bedeutende klinische Erscheinungsformen einer *A. pyogenes*-Infektion sind Endometritiden, Aborte, Abszesse der Haut und der inneren Organe sowie Pneumonien, Osteomyelitiden, Arthritiden und Endokarditiden (Jost und Billington, 2005). Hinsichtlich einer antibiotischen Therapie bereitet *A. pyogenes* nach In-vitro-Ergebnissen nur für

Tetracycline eventuell Probleme (Werckenthin et al., 2007); für Penicilline wurden bisher noch nie Resistenzen beobachtet. Da jedoch im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium antimikrobielle Stoffe aufgrund der Abszessbildung weniger wirksam sind, ist ein frühzeitiger Nachweis des Erregers von Bedeutung.

Zusätzlich zu *A. pyogenes* beinhaltet das Genus *Arcanobacterium* acht weitere Spezies, die teilweise auch aus Tieren isoliert wurden und kulturell zu *A. pyogenes* Ähnlichkeiten aufweisen. Die Relevanz der einzelnen Vertreter generell und als Mastitiserreger des Rindes im Speziellen wurde großteils noch nicht untersucht. Aus Tieren isoliert wurden *Arcanobacterium (A.) phocae* (Ramos et al., 1997), *Arcanobacterium (A.) pluranimalium* (Lawson et al., 2001) und *Arcanobacterium (A.) hippocoleae* (Hoyles et al., 2002), während *Arcanobacterium (A.) haemolyticum* (Collins et al., 1982) und *Arcanobacterium (A.) bernardiae* (Ramos et al., 1997) humanpathogen sind. In den letzten Jahren wurden als weitere Spezies aus Tieren *Arcanobacterium (A.) bialowiezense*, *Arcanobacterium (A.) bonasi* (Lehnen et al., 2006) und *Arcanobacterium (A.) abortisuis* (Azuma et al., 2009) beschrieben.

2.4.2 Nachweismethoden für Mastitiserreger

2.4.2.1 Kulturelle und biochemische Methoden

In der Regel werden Milchproben mit der klassischen Anzucht auf Agarplatten, zum Beispiel Columbia-Blut-Agar, Gassner-Agar (als Selektivplatte für Enterobakterien) und CNA-Agar (enthält Colistin und Nalidixinsäure zur selektiven Anreicherung grampositiver Erreger) oder Edwards-Agar (zur Anzucht besonders von Streptokokken) untersucht, gefolgt von einer makro- und mikroskopischen Beurteilung der Bakterienmorphologie sowie von biochemischen Tests zur Identifizierung der Spezies. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit und Reinheit werden mindestens 24–48 Stunden für eine Identifizierung benötigt (Sears and McCarthy, 2003).

S. uberis zeigte in der Regel eine alpha-Hämolyse auf BAP und eine Äskulinspaltung auf entsprechenden differenzierenden Medien. Die Spezies ist morphologisch nicht von Streptokokken mit einem ähnlichen Hämolyseverhalten, zum Beispiel *S. bovis*, von Enterokokken und Laktokokken zu unterscheiden. In Routinelabors wird eine Differenzierung von äskulinpositiven Streptokokken und Enterokokken häufig nicht durchgeführt (Devriese et al., 1999), weil die bisherigen Methoden als zu zeit- und kostenintensiv angesehen werden. Zur Unterscheidung von *S. uberis* und Enterokokken könnten zum Beispiel folgende Untersuchungen herangezogen werden: Zugehörigkeit zur Lancefield-Gruppe D (*S. uberis*:- / Enterokokken: +), Wachstum auf Galle-Äskulin-Agar (*S. uberis*:- / Enterokokken: +),

Wachstum auf Slanetz und Bartley-Medium (*S. uberis*:- / Enterokokken: +), Wachstum auf BAP bei 45°C (*S. uberis*:- / Enterokokken: +) und die biochemische Differenzierung.

Für die Identifizierung von *A. pyogenes* werden in der Routinediagnostik die tybischen langsam wachsenden Kolonien mit schwacher vollständiger Hämolyse auf BAP, das coryneforme, pleomorphe grampositive Bild in der Gramfärbung, die negative Katalasereaktion sowie die biochemische Identifizierung herangezogen (Quinn et al., 1998). Die Identifizierung anhand der Mikroskopie wird erschwert durch das teilweise kokkoide Bild und die oft schlechte Anfärbbarkeit älterer Bakterien (Reddy et al., 1982). Die Verwechslungsgefahr mit Streptokokken kann auch dadurch verstärkt werden, dass *A. pyogenes* mit Antikörpern, die gegen Streptokokken der Lancefieldgruppe G gerichtet sind, positiv reagieren kann (Reddy et al., 1982). In Zweifelsfällen kann die Serolyse mittels Loeffler-Serum überprüft und das CAMP (Christie, Atkins und Munch-Petersen)-Phänomen mit *S. aureus* bewertet werden. Vom Probenansatz bis zur Bestätigung der Spezies ist eine Dauer von mindestens zwei Tagen zu veranschlagen, bei biochemischer Differenzierung auch von vier oder fünf Tagen. Zu beachten ist, dass regelmäßig Isolate auftreten, die sich nicht eindeutig identifizieren lassen. Von anderen coryneformen Stäbchen die kulturell-morphologisch ähnlich zu *A. pyogenes* sind („*A. pyogenes*-like“, Narayanan et al., 1998) wurde in der Vergangenheit jedoch ab und an berichtet. Das Vorkommen anderer *Arcanobacterium* spezies bei Tieren wurde oben schon erwähnt. In der Humanmedizin wurde darüberhinaus von Verwechslungen mit *A. haemolyticum* berichtet; diese Gefahr besteht in der Tiermedizin jedoch nicht, da *A. haemolyticum* als humanspezifisch angesehen wird (Lämmle und Blobel, 1988).

Unabhängig vom verdächtigten Erreger wurde in einigen Studien berichtet, dass Kulturen von Milchproben trotz der Anwesenheit von Mastitiserregern negativ blieben (Krömker et al., 2007; Taponen et al., 2009). Als mögliche Ursache hierfür wird unter anderem angegeben, dass einige Spezies (zum Beispiel *S. aureus*) nur intermittierend oder in sehr geringen Mengen ausgeschieden worden sein könnten (Graber et al., 2007; Krömker, 2007; Yamagishi et al., 2007). Für solche Fälle werden Methoden, die auf einem DNA-Nachweis basieren, empfohlen (Krömker et al., 2007; Yamagishi et al., 2007). Eine weitere Möglichkeit, um in geringer Anzahl vorhandene Erreger unter Verwendung einer kulturellen Methode nachzuweisen, ist die Verwendung eines sogenannten „Petriefilms“ (Krömker et al., 2007). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass im Fall einer akuten Mastitis die am häufigsten beschriebenen Mastitiserreger prinzipiell mit den herkömmlichen kulturellen Methoden nachgewiesen werden können. Da diese Methoden jedoch wie erwähnt mindestens 24-48

Stunden bis zur Identifizierung einer Spezies erfordern, wären schnellere zusätzliche Untersuchungstechniken wünschenswert. Aufgrund einer früheren Information zur ursächlichen Spezies könnten wichtige Managemententscheidungen, zum Beispiel die gezielte Auswahl eines antimikrobiellen Stoffes, früher getroffen werden (Krömker et al., 2007).

2.4.2.2 Molekularbiologische Nachweismethoden

Für einen schnellen Nachweis auch geringer Mengen an Bakterien wurden kulturunabhängige Methoden entwickelt. Als molekulare Methode zum Nachweis geringer Mengen an Mastitiserregern bzw. von deren DNA, wurde vielfach die PCR beschrieben (Brakstad et al. 1992; Forsman et al., 1997; Phuektes et al., 2001a; Chotár et al., 2006). Seit einigen Jahren werden vermehrt Multiplex-PCR-Methoden (Phuektes et al., 2001a; Lee et al., 2008) und *Real-time*-PCR-Methoden eingesetzt (Gillespie and Oliver, 2005; Chiang et al., 2007; Graber et al., 2007; Studer et al., 2008; Taponen et al., 2009). Die *Real-time*-PCR hat die Vorteile, dass quantitative Ergebnisse erzielt werden können und durch die proportional zur Menge der entstehenden PCR-Produkte ansteigenden Fluoreszenzsignalen eine direkte Ablesung möglich ist (Gillespie and Oliver, 2005; Koskinen et al. 2009). Den prinzipiellen Vorteilen der PCR wie Schnelligkeit und hoher Sensitivität stehen als möglich Nachteile der Nachweis von geringgradig vorhandenen Kontaminanten, der Einfluss inhibitorischer Substanzen und die fehlende Möglichkeit der Empfindlichkeitsbestimmung gegenüber (Phuektes et al., 2001a; Riffon et al., 2001; Yamagishi et al., 2007). Publiziert wurden Methoden zum Nachweis von schlecht kultivierbaren Erregern wie Mykoplasmen (Hayman und Hirst, 2003; Cremonesi et al., 2007) und Mykobakterien (Gao et al., 2009), aber auch zur Detektion der am häufigsten nachgewiesenen Spezies (Riffon et al., 2001; Aznar und Alarcón, 2003; Gillespie and Oliver, 2005; Yamagishi et al., 2007; Taponen et al., 2009).

Die verschiedenen PCR-Methoden wurden sowohl an klinischen Mastitisproben direkt als auch nach Anreicherung von einigen Stunden (Phuektes et al., 2001a; Chiang et al., 2007) bis zwei Tagen (Aznar und Alarcón, 2003) eingesetzt. Für einige Studien wurden nicht nur klinische Mastitismilchproben, sondern sterile, künstlich mit Mastitiserregern versetzte Milchen verwendet (Riffon et al., 2001; Gillespie und Oliver, 2005; Yamagishi et al., 2007). Bei Verwendung von Proben direkt ergaben sich Nachweisgrenzen zwischen 10^2 - 10^3 KBE/ml (Riffon et al., 2001; Gillespie und Oliver, 2005; Chiang et al., 2007) und 10^6 (Phuektes et al., 2001a; Yamagishi et al., 2007; Taponen et al., 2009). Nach Anreicherung konnte in den meisten Studien eine Erregermenge von unter 10 KBE/ml nachgewiesen werden (Phuektes et

al., 2001a; Yamagishi et al., 2007; Chiang et al., 2007). Die Entwicklung eines Biochips zum Nachweis von Mastitiserregern wurde von Lee et al. (2008) beschrieben. Die Nachweisgrenze, die hier mit künstlich kontaminierten Milchproben ermittelt wurde, lag zwischen 10^3 und 10^5 KBE/ml.

Die FISH wurde zum Nachweis einiger Bakterien wie *Pseudomonas* spp., *E. coli* und *S. aureus* in künstlich kontaminierten Milchproben im Zusammenhang mit der Durchflußzytometrie in einigen Studien einer Arbeitsgruppe erfolgreich eingesetzt (Gunasekera et al., 2000; Gunasekera et al., 2003a; Gunasekera et al., 2003b). Um störende Fette und Proteinbestandteile aus der Milch zu entfernen, wurden die zu untersuchenden Proben mit Enzymen wie Savinase und Proteinase K behandelt (Gunasekera et al., 2000). In Gunasekera et al. (2003a) wurden 100 µl Milch mit 1 µl Savinase bei 30 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Die Bakterien konnten ab einer Menge von 10^4 KBE/ml nachgewiesen werden. Die FISH zum mikroskopischen Nachweis von Bakterien aus Milchproben wurde auch von Oliveira et al. (2004) beschrieben. In dieser Studie wurden Milchproben von Schafen künstlich mit *Listeria monocytogenes* und *Salmonella* Enteritidis kontaminiert. Es wurden für die Erreger spezifische Proben eingesetzt, eine Vorbehandlung der Milchproben wurde nicht durchgeführt. Über eine Nachweisgrenze in diesen Proben wurde nicht berichtet. Die Methode wurde jedoch als leicht durchzuführen und zuverlässig eingestuft (Oliveira et al., 2004). Zum jetzigen Zeitpunkt wird die FISH als Nachweismethode für Mastitiserreger dennoch nicht routinemäßig eingesetzt.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Methode der FISH im Labor zu etablieren und anschließend Sonden für eine spezifische Identifizierung von *H. parasuis*, *S. uberis* und *A. pyogenes* zu evaluieren. Darüberhinaus sollte die FISH für den Direktnachweis von Pathogenen in Milchproben aus Fällen klinischer Mastitiden etabliert und eingesetzt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Bakterienstämme

Es wurden insgesamt 363 Bakterienstämme zur Evaluierung der Sonden und für die künstliche Kontamination von Milchproben eingesetzt. Referenzstämme (n = 31) wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen. Feldstämme wurden entweder im Rahmen der vorliegenden Arbeit isoliert oder stammten aus der Sammlung des Lehrstuhls für Bakteriologie und Mykologie des Veterinärwissenschaftlichen Departments der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München. Weitere Stämme wurden vom Tiergesundheitsdienst Bayern e.V. (Poing) und dem Landeslabor Schleswig-Holstein (Neumünster) zur Verfügung gestellt. Alle Stämme sind mit ihrer Herkunft, Identifikationsnummer, Tierart und dem Probenmaterial (soweit verfügbar) in Anhang 9.1 aufgeführt.

3.2 Sonden und Kompetitoren

Es wurden sowohl speziesübergreifende als auch speziespezifische Sonden eingesetzt. Die Sequenzen der 19 verwendeten Oligonukleotide sind zusammen mit ihren Zielorganismen in Tabelle 1 aufgeführt. Die Sonde EUB 338 wurde zur Kontrolle der FISH eingesetzt, da von ihr alle relevanten Eubakterien erkannt werden. Die speziesübergreifenden Sonden Strept, ENC 221, Staphy und EBAC 1790 wurden zur Identifizierung von Streptokokken, Enterokokken, Staphylokokken und Enterobacteriaceae eingesetzt. Vier der neun speziespezifischen Sonden waren Sondenkandidaten, die in dieser Arbeit evaluiert wurden. Diese richteten sich gegen *H. parasuis* (HPS 1435 und HPS 1436), *S. uberis* (SUB 196) und *A. pyogenes* (APYO 183). Die Sonden wurden jeweils am 5'-Ende mit den Fluorochromen 6-FAM (Emissionswellenlänge 518 nm) oder Cy3 (Emissionswellenlänge 570 nm) versehen. Unter Verwendung der entsprechenden Filtersätze erschienen die Hybridisierungssignale der 6-FAM-markierten Sonden grün und die der Cy3-markierten Sonden orangerot. Zusätzlich wurden unmarkierte Kompetitoren eingesetzt. Alle Oligonukleotide wurden von kommerziellen Herstellern (Thermo Scientific, Ulm; MWG Biotech, Ebersberg) in lyophilisierter Form bezogen (Synthesemaßstab 0,02 bis 0,2 µmol, Reinheitsgrad RP-HPLC) und mit entsprechenden Kontrollstämmen auf ihre Funktionalität überprüft.

Tab. 1 Eingesetzte Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequence (5' - 3') ^a	Position ^b	Zielorganismus	Referenz
EUB 338	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	338 ^c	Eubacteria	Amann et al., 1990
Strept (Str, Strep T)	CAC TCT CCC CTT CTG CAC	665 ^c	Streptococcaceae	Trebesius et al., 2000
Kompetitor Strept T Komp	CAC TCT CCT CTT CTG CAC	665 ^c		Poppert et al., 2009
Straga (Saga)	GTA AAC ACC AAA CMT CAG CG	67 ^c	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Trebesius et al., 2000
SUB 196	CAT AGT GAA GCA TTT GCC CCT	196 ^c	<i>Streptococcus uberis</i>	diese Arbeit
ENC 221	CAC CGC GGG TCC ATC CAT CA	221 ^c	Enterococcaceae	Wellinghausen et al., 2007
ENF 191	GAA AGC GCC TTT CAC TCT TAT GC	191 ^c	<i>Enterococcus faecalis</i>	Wellinghausen et al., 2007
ENU 140	TTC ACA CAA TCG TAA CAT CCTA	140 ^d	<i>Enterococcus faecium</i>	Wellinghausen et al., 2007
Staphy (Sta)	TCC TCC ATA TCT CTG CGC	697 ^c	Staphylococcaceae	Trebesius et al., 2000
Sau	GAA GCA AGC TTC TCG TCC G	96 ^c	<i>Staphylococcus aureus</i>	Kempf et al., 2000
APYO 183	CCC ACC ATG CGG CAA AAG CAG AA	183 ^c	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	diese Arbeit
Kompetitor APYO 183	CCC ACC ATG CGG CAG AAG CAG AA	183 ^c		diese Arbeit
EBAC 1790	CGT GTT TGC ACA GTG CTG	1790 ^d	Enterobacteriaceae	Bohnert et al., 2000
Kompetitor EBAC 1790	CGT GTT TGC AGA GTG CTG	1790 ^d		Bohnert et al., 2000
ESC 468	GCG GGT AAC GTC AAT GAG CAA AGG	468 ^c	<i>Escherichia coli</i>	mod. v. Esco 473, Poppert et al., 2005
HPS 1435	CCC CTT TCA GTT AAG CTA TC	1435 ^c	<i>Haemophilus parasuis</i>	diese Arbeit
Kompetitor HPS 1435	CCC CTT TCG GTT AAG CTA TC	1435 ^c		diese Arbeit
HPS 1436	CCC CCT TTC AGT TAA GCT ATC T	1436 ^c	<i>Haemophilus parasuis</i>	diese Arbeit
Kompetitor HPS 1436	CCC CCT TTC GGT TAA GCT ATC T	1436 ^c		diese Arbeit

^a fett dargestellt sind die im Vergleich zur entsprechenden Sonde ausgetauschten Nukleotide des Kompetitors

^b Position entsprechend der *E. coli* -Nummerierung

^c Zielsequenz in der 16S-rRNA

^d Zielsequenz in der 23S-rRNA

3.3 Verwendete Probenmaterialien

Für Vorversuche zur FISH von Mastitismilchproben wurde als Ausgangsmaterial kommerziell erhältliche Vollmilch mit einem Fettgehalt von 3,8 % verwendet.

Es wurden 128 Viertelgemelksproben von Kühen mit klinischer oder subklinischer Mastitis untersucht (Anhang 9.2). Die Proben wurden vom Tiergesundheitsdienst Bayern e.V., Poing und vom Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim der Tierärztlichen Fakultät der LMU München zur Verfügung gestellt. Weitere Milchproben stammten aus den Einsendungen des Diagnostiklabors des Lehrstuhls für Bakteriologie und Mykologie des Veterinärwissenschaftlichen Departments der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die eingesandten Milchproben wurden bis zu ihrer Weiterverarbeitung bei 4-7 °C aufbewahrt.

3.4 Medien, Lösungen und Puffer

Medien, Lösungen und Puffer, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind im Anhang 9.3 aufgeführt.

3.5 Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien und Enzyme sind im Anhang 9.4 in alphabetischer Reihenfolge angegeben.

3.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die benötigten Geräte sowie weitere Materialien sind im Anhang 9.5 in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet.

3.7 Anzucht und Asservierung

3.7.1 Anzucht asservierter Stämme

Zur Reaktivierung kryoasservierter Stämme wurde mit Hilfe einer Einmalimpföse etwas Material von der Oberfläche der gefrorenen Masse abgekratzt und auf eine BAP beziehungsweise Kochblutplatte mit einem Drei-Ösen-Ausstrich aufgebracht. Die beimpfte Platte wurde 24 Stunden bei 37 °C aerob oder bei einer Inkubationsatmosphäre mit 3 % CO₂ bebrütet. Von den gewachsenen Kolonien wurde eine Einzelkolonie subkultiviert und 16-18 Stunden bei gleichen Bedingungen inkubiert. Die Kolonien der Subkultur wurden für weitere Untersuchungen verwendet.

3.7.2 Kulturelle Untersuchung der Milchproben und Gesamtkeimzahlbestimmung

Die zu untersuchenden Milchproben wurden mechanisch auf einem Schüttler homogenisiert. Anschließend wurden mit einer sterilen Impföse jeweils ca. 10 µl der Milchprobe auf die entsprechende Anzuchtagarplatte verbracht und mit einem Drei-Ösen-Ausstrich verdünnt. Zur Anzucht wurden eine BAP, eine CNA-Platte und eine geteilte Platte mit Gassner-Agar und Rambach-Agar angesetzt. Diese wurden aerob bei 37 °C 48 Stunden bebrütet und nach 24 sowie 48 Stunden visuell beurteilt. Die kultivierten Kolonien wurden subkultiviert und in der Regel für weiterführende Untersuchungen kryoasserviert.

Zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl wurde zunächst ein Grampräparat von der zu untersuchenden Milch angefertigt und die enthaltene Erregermenge anhand des mikroskopischen Bildes geschätzt. Die Milchproben wurden in einer Verdünnungsreihe in Schritten von 1:100 bis zu einer Verdünnungsstufe, die nach der vermuteten Menge der Erreger etwa 10-100 KBE/ml enthielt, verdünnt. Jeweils 100 µl dieser Verdünnungsstufe wurden auf zwei BAP mit einem sterilen Glasspatel gleichmäßig verteilt. Diese Platten wurden bei 37 °C aerob 24-48 Stunden bebrütet. Anschließend wurden die Kolonien manuell ausgezählt (Abbildung 1), der Mittelwert aus beiden Ergebnissen gebildet und der ermittelte Wert auf die Gesamtkeimzahl zurückgerechnet.



Abb. 1 Gesamtkeimzahlbestimmung

3.7.3 Asservierung von Bakterien

Vor einer Asservierung wurde eine Einzelkolonie von dem betreffenden Isolat dreifach subkultiviert, inkubiert und auf Reinheit visuell überprüft. Eine Einzelkolonie der letzten Subkultur wurde in 3 ml Brain-Heart-Infusion (BHI) gegeben. Der Ansatz wurde bei 37 °C 18-24 Stunden bebrütet. Anschließend wurden je 870 µl der Bakteriensuspension und 130 µl steriles Glycerin in ein 1,8 ml fassendes Polypropylen-Reaktionsgefäß gegeben. Die Mischung wurde homogenisiert und für zwei bis vier Stunden bei 4 °C aufbewahrt. Von jedem Stamm wurden zwei Aliquots bei -80 °C asserviert. Danach konnte dieser Ansatz bei -80 °C eingefroren werden. Für einige Spezies wie *H. parasuis* wurde zur Asservierung das Microbank[®]-System (inverness medical, Köln) eingesetzt. Es wurde nach Angaben des Herstellers verfahren.

3.8 Speziesbestimmung der verwendeten Isolate

3.8.1 Makroskopische Beurteilung des Erregerwachstums

Das kulturelle Wachstum verschiedener Erreger wurde anhand der Koloniemorphologie beurteilt. Hierzu wurden übliche Kriterien wie Koloniegröße, Koloniefarbe, Kolonieform sowie die Ausbildung einer Hämolyse auf der BAP herangezogen. Zusätzlich wurde die in den untersuchten Milchproben enthaltene Erregermenge semiquantitativ bestimmt. Dabei wurde ein Wachstum im ersten Ausstrich bis zu zehn Kolonien mit „ganz vereinzelt“, [$\hat{=}$ (+)], von mehr als zehn Kolonien als „vereinzelt“ ($\hat{=}$ +), bis in den zweiten Ausstrich mit „mäßig viel“ ($\hat{=}$ ++), bis in den dritten Ausstrich mit „reichlich“ ($\hat{=}$ +++) und als dichter Bakterienrasen im letzten Verdünnungsausstrich mit „massenhaft“ ($\hat{=}$ +++++) bewertet.

3.8.2 Mikroskopische Untersuchungen

Für die Gramfärbung wurden mit einer Impföse ein bis zwei Kolonien mit etwas NaCl auf einem Objektträger gleichmäßig verteilt. Das luftgetrocknete und hitzefixierte Präparat wurde 3 min mit Karbolgentianaviolett gefärbt. Danach wurde das Präparat in Lugol'scher Lösung 1,5 min gebeizt und anschließend mit einer Ethanol-Acetonmischung gründlich entfärbt. Das mit Leitungswasser gespülte Präparat wurde mit Karbolfuchsin für 30 Sekunden gegengefärbt und abschließend erneut mit Leitungswasser gespült. Nach dem Trocknen wurden die Präparate mikroskopisch beurteilt.

Zur Beurteilung der Beweglichkeit der Erreger wurde eine geringe Menge der zu untersuchenden Spezies mit einer Öse in einem Tropfen NaCl auf einem Glasobjektträger

verrieben und mit einem Deckgläschen bedeckt. Dieses Präparat wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskops beurteilt.

3.8.3 Biochemische und serologische Methoden

Zur Unterscheidung von grampositiven Bakterien, die keine Katalase bilden (zum Beispiel Streptokokken und Arcanobakterien) zu grampositiven Katalasebildnern wie Staphylokokken und Corynebakterien wurde der Katalasenachweis mit Wasserstoffperoxid durchgeführt. Das Enzym Katalase ist in der Bakterienzelle als Peroxidase wirksam und spaltet Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff (Kolb, 1999). Drei bis vier Bakterienkolonien wurden auf einem Objektträger mit ein bis zwei Tropfen 3 %iger Wasserstoffperoxidlösung verrieben. Eine Sauerstoffbildung zeigte sich durch Blasenbildung, welche im negativen Fall ausblieb.

Zur Differenzierung von Streptokokken wurden der CAMP-Test, die serologische Differenzierung nach Lancefield mit einem kommerziellen Test-Kit (Streptococcal Grouping Kit, Oxoid, Wesel) und der API rapid ID32STREP (bioMérieux, Nürtingen) eingesetzt.

Der CAMP-Test dient der Differenzierung von *S. agalactiae* zu anderen Streptokokken. Der CAMP-Faktor ist ein thermostabiles Protein von *S. agalactiae*, das gemeinsam mit dem β -Toxin von *S. aureus* zur Ausbildung des CAMP-Phänomens führt. *S. agalactiae* und *S. aureus* wurden im rechten Winkel zueinander auf eine Blutagarplatte aufgetragen. Nach 24 Stunden Bebrütung bei 37 °C bildete der CAMP-Faktor von *S. agalactiae* im Bereich der unvollständigen Hämolyse von *S. aureus*, eine halbmondförmige Zone einer vollständigen Hämolyse (Lämmle, 1999a).

Bei der Agglutinationsreaktion nach Lancefield werden gruppenspezifische Antigene in der Zellwand von Streptokokken nachgewiesen, welche eine Zuordnung in sogenannte Lancefield-Gruppen ermöglichen. Gruppenspezifische Antikörper tragende Latexpartikel, die über die enzymatisch zugänglich gemachten Antigene in den Bakterien vernetzt werden, dienen der Sichtbarmachung der Agglutinationsreaktion. Der Test-Kit „Streptococcal Grouping Kit“ der Firma Oxoid (Wesel) wurde nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

Zur weiteren Differenzierung von Streptokokken wurde der API rapid ID32STREP nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Identifizierung der Bakterien erfolgte hier über die Auswertung von 32 Stoffwechselfparametern der zu testenden Spezies, die mit Hilfe von Indikatoren beurteilt werden. Die Inkubation erfolgte für vier Stunden, eine Auswertung war mittels eines Beurteilungsschemas und einer zugrundeliegenden Datenbank in den meisten Fällen möglich.

Staphylokokken wurden mit folgenden Tests differenziert: Der Nachweis des Clumping-Faktors („zellwandgebundene Koagulase“) dient zur Identifizierung von *S. aureus* (Lämmler, 1999b), es gibt allerdings auch Stämme, die keinen Clumping-Faktor bilden. Die fraglichen Kolonien wurden mit einem Tropfen Citratplasma vom Kaninchen (1,3 ml Vollblut + 0,7 ml 3,8 %iges Na-Citrat) auf einem Objektträger verrieben. Im positiven Fall trat eine deutlich sichtbare Klumpenbildung auf. Als negative Kontrolle wurde jeweils etwas Koloniematerial mit physiologischer Kochsalzlösung anstelle von Plasma verrieben, wobei sich nur eine homogene Trübung zeigte. Im Falle eines negativen Ergebnisses wurden *S. aureus*-verdächtige Kolonien mit dem Testsystem Slidex Staph Plus (bioMérieux, Nürtingen) nach Angaben des Herstellers untersucht.

Mit dem Koagulase-Test wurde die „freie Koagulase“ von Staphylokokken nachgewiesen. Bei der „freien Koagulase“ handelt es sich um ein Gerinnungsenzym, das extrazellulär abgegeben wird und - analog zum Thrombin - die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin bewirkt. Die Bildung dieses Enzyms ist für *S. aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus pseudintermedius* und mit Einschränkungen auch für *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus schleiferi*, *coagulans* und *Peptostreptococcus indolicus* charakteristisch. Ihr Nachweis ermöglicht eine Abgrenzung zu Koagulase-negativen Staphylokokken (Kolb et al., 1999). Für den Nachweis der „freien Koagulase“ wurden fragliche Kolonien im 2 ml Citratplasma vom Kaninchen homogenisiert und 3-4 Stunden bei 37 °C bebrütet. Eine Gerinnung des Plasmas wurde als positiver Nachweis für die Bildung „freier Koagulase“ gewertet. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz mit NaCl mitgeführt. Zusätzlich wurde zur Differenzierung von Staphylokokken der ID 32 STAPH (bioMérieux, Nürtingen) nach den Angaben des Herstellers eingesetzt.

Coryneforme grampositive Stäbchen wurden auf Katalaseaktivität und Serolyseaktivität geprüft. Zur Überprüfung der Serolyseaktivität von Arcanobacterien wurde etwas Koloniematerial auf eine Serumplatte nach Löffler aufgebracht. Nach einer Inkubation von 24-72 Stunden bei 37 °C und 3 Vol% CO₂ wurde die Platte beurteilt. Im positiven Fall war der Agar an der beimpften Stelle deutlich eingesunken. Der API CORYNE (bioMérieux, Nürtingen) wurde zur weiteren Differenzierung coryneformer grampositiver Stäbchen nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

Zur Differenzierung gramnegativer Stäbchen wurden der Cytochromoxidase-Test sowie verschiedene kommerziell erhältliche biochemische Systeme eingesetzt. Der Cytochromoxidase-Test weist das Vorhandensein von Cytochromen in der Atmung derjenigen Spezies nach, die Sauerstoff als Elektronenakzeptor im Energiestoffwechsel

verwenden. Cytochrome ermöglichen den Eintritt atmosphärischen Sauerstoffs in den Organismus, indem sie durch diesen oxidiert werden. Beim Cytochromoxidase-Test bewirken künstliche Substanzen anstelle natürlicher Elektronenakzeptoren die Reduktion des Cytochromoxidase-Systems. Dieses wird durch Verfärbung des Substrats angezeigt (Krüger, 1999). Es wurde das Oxydase Reagenz der Firma bioMérieux (Nürtingen) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Zur Differenzierung von gramnegativen Nicht-Enterobacteriaceae wurde der API 20 NE (bioMérieux, Nürtingen) und zur Differenzierung von Enterobacteriaceae der rapid ID 32 E beziehungsweise das Test-System Enterotube™ II (BD, Heidelberg) eingesetzt. Es wurde jeweils nach den Angaben des Herstellers verfahren.

3.8.4 Bestimmung der 16S-rRNA-Sequenz

3.8.4.1 Gesamtzell-DNA-Extraktion

Die Gesamtzell-DNA-Extraktion wurde nach der Methode von Pospiech und Neumann (1995) durchgeführt. Von dem zu untersuchenden Stamm wurde eine 24 Stunden alte Bakterienkolonie in ein steriles 15 ml fassendes Polypropylenröhrchen (VWR, Darmstadt) mit 10 ml Brain-Heart-Infusion-Bouillon (BHI) inokuliert. Der Ansatz wurde auf einem Schüttelgerät bei 37 °C aerob über Nacht bebrütet. Am folgenden Tag wurde die Bakteriensuspension 10 min bei 6000 U/min (Centrifuge 5810R, Rotor A-4-62, Eppendorf, Hamburg) abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 2 ml Tris-EDTA-Natriumchlorid (TES)-Puffer resuspendiert und erneut 10 min bei 6000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen. Der Bodensatz wurde in 500 µl TES-Puffer aufgenommen und in ein neues 1,8 ml fassendes Reaktionsgefäß (VWR, Darmstadt) überführt.

Die Lyse erfolgte durch Zugabe von Enzymen in einem Thermomixer bei 37 °C für ca. 30 min. Für Staphylokokken wurden 10 µl Lysostaphin (1800 U/ml) und bei anderen grampositiven Bakterien 5 µl Lysozym (100 mg/ml) eingesetzt.

Die anschließende Denaturierung der Zellwand erfolgte durch Zugabe von 20 µl einer 10 %igen Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS). Das Reaktionsgefäß wurde solange vorsichtig mit der Hand gedreht, bis sich der Inhalt von der Wand löste und anschließend für 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nun wurden 500 µl einer Phenol/Chloroform-Lösung dazu gegeben, gut gemischt und 5 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Die oberste Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurden wiederum 500 µl Phenol/Chloroform-Lösung pipettiert und 5 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nun mit 500 µl einer Chloroform/Isoamylalkohol-

Lösung (Verhältnis 24:1) vermischt. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation. Nach Aufnahme des DNA-haltigen Überstandes in ein weiteres Reaktionsgefäß wurden 500 µl Isopropanol dazugegeben, die DNA durch vorsichtiges Schwenken ausgefällt, bei 13000 U/min für 30 min abzentrifugiert und in einem Exsikkator getrocknet. Die getrocknete DNA wurde in ca. 40 µl A. demin. aufgenommen und über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Der Erfolg der DNA-Isolierung wurde mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

3.8.4.2 Agarose-Gelelektrophorese

Es wurden 0,8 bis 1%ige (w/v) Agarosegele verwendet. Als Laufpuffer wurde Tris-Acetat-Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA)-Puffer [TAE-Puffer (1x)] eingesetzt. Zu 10 µl der zu untersuchenden DNA wurden 4 µl eines Bromphenolblau enthaltenden „Blaumarkers“ zur Beschwerung und Sichtbarmachung zugegeben und die Mischung in die Taschen des Gels geladen. Als Größenstandard wurde ein „1 Kilobasenpaar (Kbp)- Größenstandard“ (NEB, Frankfurt am Main) verwendet.

Zu Beginn der Gelelektrophorese wurde eine Spannung von 40 Volt angelegt, um die DNA vollständig aus den Taschen in das Gel hineinwandern zu lassen. Danach wurde die Spannung auf 90 Volt erhöht. Die Auftrennung erfolgte für etwa 1-2 Stunden. Zur Sichtbarmachung der DNA-Fragmente wurde 3,8-Diamino-6-ethyl-5-phenylphenantridiniumbromid (Ethidiumbromid) verwendet. Ethidiumbromid lagert sich zwischen die einzelnen Basenpaare eines Nukleinsäuremoleküls und fluoresziert unter der Bestrahlung mit UV-Licht. Das Gel wurde für ca. 10-20 min in einem ca. 0,0001%igen (v/v) Ethidiumbromid-Bad belassen und anschließend unter UV-Lichtbestrahlung ausgewertet.

3.8.4.3 16S-rRNA-PCR, Aufreinigung des PCR-Produktes und Sequenzierung

Die PCR ermöglicht die Vervielfältigung eines gewünschten DNA-Abschnittes. Eine doppelsträngige DNA wird durch Erhitzen einzelsträngig (Denaturierung). Es folgt die Hybridisierung der entsprechenden Primer an die als Matrizen dienenden Einzelstränge durch ein Absenken der Temperatur (Annealing). Mit Hilfe einer thermostabilen Polymerase, die an den Primern ansetzt, wird das gewünschte DNA-Stück synthetisiert (Elongation). Durch ein erneutes Anheben der Temperatur dissoziieren der neu gebildete DNA-Strang und der als Matritze dienende Strang wieder voneinander. Beide dienen nun als Matritze bei der nächsten Synthese. Dieser Vorgang wird durch Temperaturänderung so oft wiederholt, bis die gewünschte Menge an DNA synthetisiert ist. Die Synthese wird nach einem abschließenden verlängerten Elongationsschritt durch Abkühlen des PCR-Produktes beendet.

Die PCR wurde in einem sterilen 0,2 ml fassenden Reaktionsgefäß (Thermo Tube, Abgene, Fisher Scientific, Ulm) nach einem üblichen Protokoll einer Standard-PCR durchgeführt. Die Mastermixe wurden unter sterilen Bedingungen auf Eis angesetzt. Es wurden die üblichen Sicherheitsvorkehrungen, wie zum Beispiel Arbeiten mit Handschuhen und Benutzung getrennter Räume für die DNA-Isolierung, den Ansatz der Mastermixe, die DNA-Zugabe und die Kontrolle der PCR-Produkte getroffen.

Es kamen die folgenden Primer nach LFGB § 64 zum Einsatz (Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, 2006):

bak44f

Sequenz 5'-3'	GCT CAG ATT GAA CGC TGG CG
Position	32-51
Referenzsequenz	J01859
Spezies	<i>E. coli</i>

bak1066rev

Sequenz 5'-3'	ACA TTT CAC AAC ACG AGC TG
Position	1062-1081
Referenzsequenz	J01859
Spezies	<i>E. coli</i>

Das PCR-Produkt hatte eine Länge von 1050 bp. Die Elongation wurde mit Hilfe der *Pwo*-Polymerase durchgeführt.

Es wurden zwei getrennte Mastermixe angesetzt und anschließend auf Eis zusammenpipettiert.

Mastermix 1:

dNTPs (120 µM/dNTP)		2,0 µl
Primer (20 pmol)	je	1,5 µl
A. demin.	ad	49,0 µl

Mastermix 2:

Complete Buffer		10,0 µl
<i>Pwo</i> -Polymerase		3,0 µl
A. demin.	ad	50,0 µl

Anschließend erfolgte die Zugabe von 1,0 µl DNA (10-100 ng/µl). Als Negativkontrolle wurde bei jeder PCR ein Ansatz mit 1,0 µl doppelt autoklaviertem A. demin. anstelle der DNA mitgeführt.

Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler mit beheizbarem Deckel. Folgendes Protokoll wurde verwendet:

	Temperatur	Zeit
Denaturierung	94 °C	2 min
<hr/>		
Zyklen A-C:	30x	
A: Denaturierung	94 °C	15 sek
B: Annealing	56 °C	30 sek
C: Elongation	68 °C	1 min
<hr/>		
Termination	68 °C	7 min
Aufbewahrung	4 °C	∞

Die Aufreinigung des PCR-Produktes erfolgte mit einem kommerziellen System [illustra DNA and Gel Band Purification Kit[®] der Firma GE Healthcare (München)] nach Angaben des Herstellers. Die gereinigte DNA wurde spektroskopisch im Minimalverfahren mit einem NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (peqLab, Erlangen) gemessen, auf ihre Reinheit kontrolliert und bis zum Versand bei -20 °C aufbewahrt. Die Sequenzierung wurde mit den auch zur PCR eingesetzten Primern kommerziell (MWG Biotech, Ebersberg) durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mittels des Programms DNASTAR 7.1 (Module EditSeq, SeqBuilder und MegAlign) der Firma GATC Biotech, Konstanz. Sequenzsuchen und Alignments wurden mit Hilfe des Programms BLASTN 2.2 (Altschul et al, 1997; Zhang et al., 2000) auf der Homepage des NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) durchgeführt.

3.9 FISH

3.9.1 Objektträger und Wattestäbchen

Zu Beginn der Arbeit wurden verschiedene Objektträger auf ihre Tauglichkeit für die FISH bei einigen Ansätzen erprobt. Einerseits wurden Glasobjektträger verwendet, auf die eine wiederverwendbare, mit Löchern versehene Silikonfolie (Science Services, München) durch Andrücken aufgetragen wurde. Die Folie konnte nach der Hybridisierung entfernt, gereinigt und zur weiteren Verwendung aufbewahrt werden. Andererseits wurden mit Epoxy beschichtete Objektträger (Roth, Karlsruhe) mit acht Vertiefungen zur Aufnahme des Materials verwendet.

Für das Auftragen der Bakterien auf die Objektträger wurden Wattestäbchen von zwei verschiedenen Bezugsquellen (Heiland und VWR) eingesetzt.

3.9.2 Anfertigen der Präparate

Für die FISH wurden teflonbeschichtete 8-Feld-Adhäsiv Objektträger (Roth, Karlsruhe) eingesetzt. Zur Untersuchung von kultivierten Bakterien wurden, mit Ausnahme von sehr langsam wachsenden, über Nacht angezüchtete Erreger verwendet. Jeweils zwei bis drei Kolonien, abhängig von deren Größe, wurden von den zu untersuchenden Isolaten in die Vertiefungen eines 8-Feld-Objektträgers aufgetragen. Dazu wurde ein steriles mit NaCl-Lösung (0,9 %ig) benetztes Wattestäbchen verwendet (Abbildung 2).

Zu untersuchende Milchproben wurden homogenisiert und enzymatisch mit Savinase, wie in Abschnitt 3.10 beschrieben, vorbehandelt. Das durch die Zentrifugation erhaltene Pellet wurde in 100 µl NaCl resuspendiert und daraus jeweils ca. 8 µl in eine Vertiefung eines 8-Feld-Objektträgers pipettiert. Die luftgetrockneten Präparate wurden aufrecht stehend in einer Küvette mit Methanol (100 %) für 15 min fixiert. Nach dem anschließenden Trocknen an der Luft konnten die Präparate entweder bei -20 °C aufbewahrt oder mit der FISH weiterbearbeitet werden (Abbildung 2).

Wurden eingefrorene Präparate für die FISH verwendet, wurde eine Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 %, 80 % und 100 %) mit anschließendem Lufttrocknen durchgeführt.

3.9.3 Enzymatische Vorbehandlung grampositiver Bakterien

Grampositive Bakterien müssen permeabilisiert werden, um die Mureinschicht für die Sonden passierbar zu machen. Streptokokken, Enterokokken, Laktokokken und grampositive Stäbchen wurden mit Lysozym (1 µg/µl), Staphylokokken mit Lysostaphin (2 U/µl) lysiert.

Mit einer Mikropipette wurden ca. 15 µl Enzymlösung je Vertiefung aufgebracht. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer bei 37 °C im Brutschrank. Die Lysezeit betrug für Enterokokken, Laktokokken und coryneforme Bakterien 5 min, für Streptokokken 10 min und für Staphylokokken 15 min. Danach erfolgte das Abstoppen der Lyse für 3 min in einer Küvette mit absolutem Ethanol. Anschließend wurden die Objektträger luftgetrocknet. Die Lyse wurde entsprechend der auf der jeweiligen Vertiefung verwendeten spezifischen Sonde durchgeführt.

3.9.4 Hybridisierung

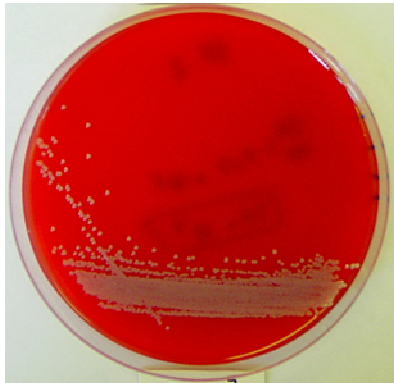
Die Durchführung der Hybridisierung erfolgte bei abgedunkelten Lichtverhältnissen. Zunächst wurde eine Sondenmischung aus Hybridisierungspuffer mit der gewünschten Formamidkonzentration (siehe Anhang 9.3) und Sonden hergestellt. Je Objektträgerfeld wurden 10 µl Hybridisierungspuffer und je 1 µl jeder Sonde oder Kompetitor verwendet.

Diese Sondenmischung wurde auf die entsprechenden Vertiefungen der Objektträger aufgetragen und der Objektträger in eine feuchte Kammer verbracht. Als solche diente ein mit schwarzem Isolierband umklebtes Schraubröhrchen (50 ml), das durch einen angebrachten Steg aus Alufolie am Wegrollen gehindert wurde. In das Röhrchen wurde ein Filterpapierstreifen eingelegt und mit 2 ml Hybridisierungspuffer getränkt, um ein Austrocknen der Präparate während der Hybridisierung zu verhindern und die Formamidkonzentration aufrecht zu erhalten. Die Hybridisierung erfolgte bei 46 °C für 90 min (Abbildung 3).

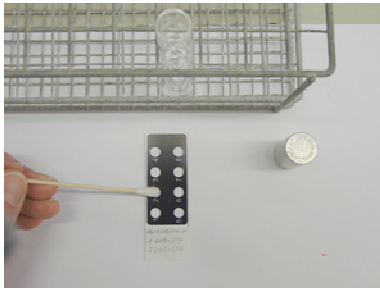
3.9.5 Waschen und Eindecken

Nach vorsichtigem Abspülen der Sondenmischung von den Präparaten mit A. demin. folgte ein Waschschrift in vorgewärmtem Waschpuffer bei 48 °C für 15 min. Anschließend wurden die Präparate noch einmal gut mit A. demin. gespült und mit einem Fön schnell und vorsichtig getrocknet. Die trockenen Präparate wurden mit zwei Tropfen Citifluor anti bleaching agent AF 1 (Science Services, München) und einem Deckgläschen luftblasenfrei eingedeckt. Bis zur mikroskopischen Untersuchung wurden die Präparate dunkel im Kühlschrank aufbewahrt (Abbildung 3).

FISH von Kultur

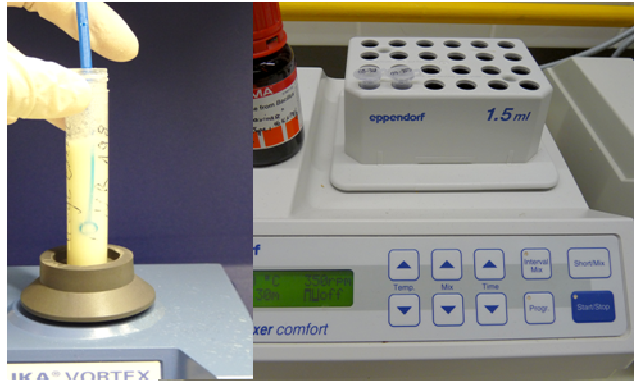


Bakterienkultur

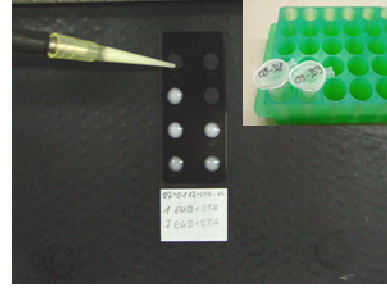


Präparat von Bakterien

Direktnachweis aus Milchproben



Homogenisierung + Savinasevorbehandlung



Präparat von Milchproben



Trocknen



Fixierung



Trocknung

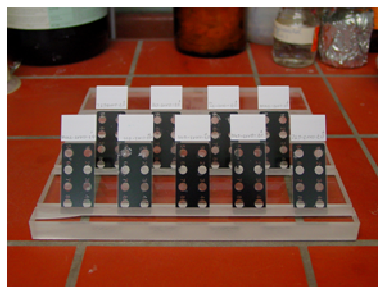
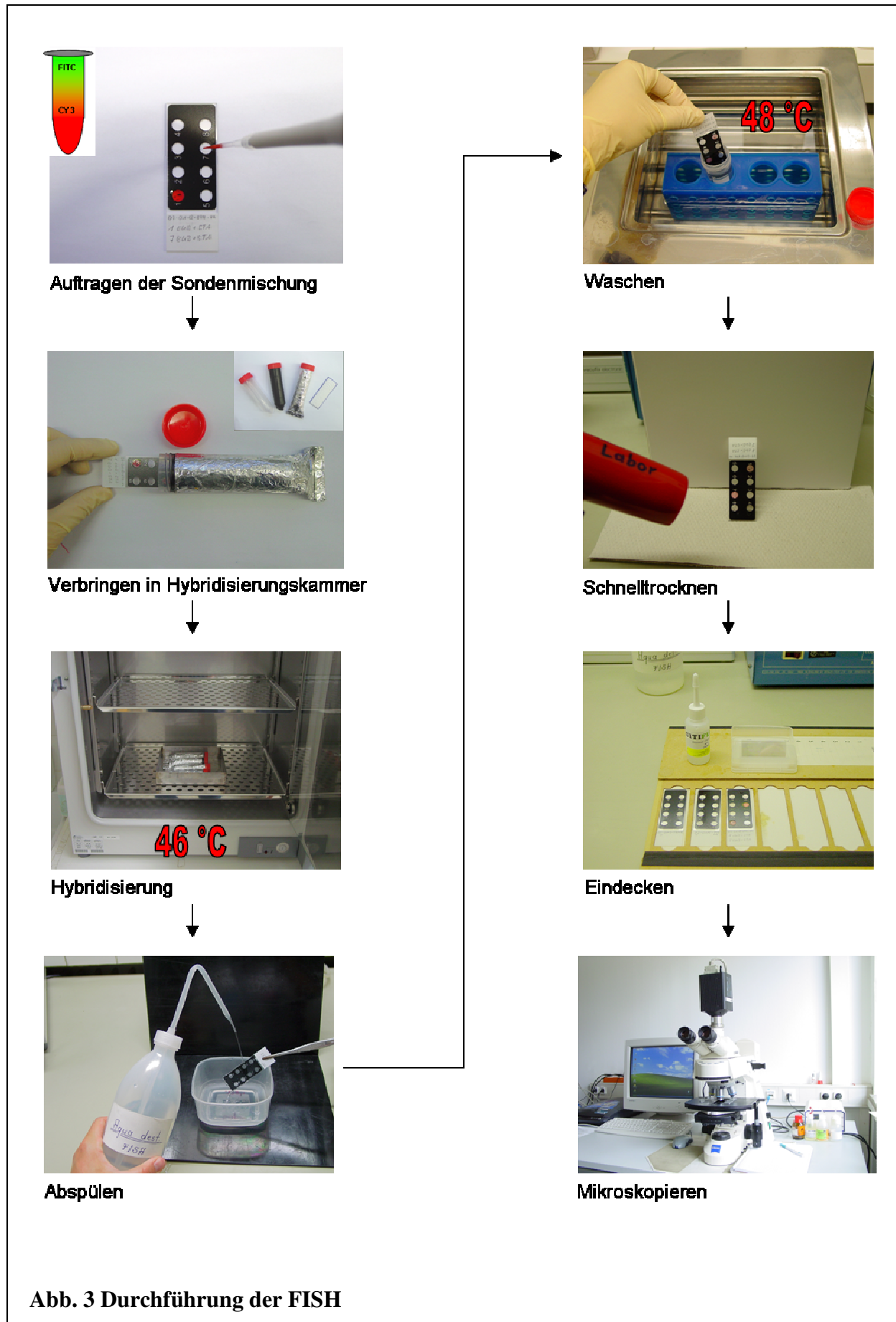


Abb. 2 Präparateherstellung für die FISH



3.9.6 Mikroskopische Beurteilung

Die FISH-Präparate wurden mit einem Epifluoreszenzmikroskop (Axioskop 2 plus, Zeiss, Göttingen), ausgestattet mit einem 63x Objektiv und Filtern für 6-FAM markierte Sonden (Filterset 44) und Cy3-markierte Sonden (Filterset 20), ausgewertet. Die Bakterienmenge wurde semiquantitativ nach Tabelle 2 und die Fluoreszenz der Erreger nach Tabelle 3 (siehe auch Abbildung 4) beurteilt.

Tab. 2 Bewertung der Bakterienmenge pro Gesichtsfeld im mikroskopischen Präparat

Kategorie	Anzahl der Bakterien pro Gesichtsfeld ^a
-	0
(+)	1-10
+	11-100
++	101-500
+++	501-1000
++++	>1000

^a bei einer 630-fachen Vergrößerung

Tab. 3 Beurteilung der Fluoreszenzintensität

Fluoreszenzgrad	Fluoreszenzintensität	Beurteilung der FISH
0	keine Bakterien zu erkennen	Negativ
1	Bakterien erkennbar, ohne Fluoreszenz	Negativ
2	schwache Fluoreszenz	Negativ
3	mäßige Fluoreszenz	fraglich positiv
4	gute Fluoreszenz	Positiv
5	maximale Fluoreszenz	Positiv

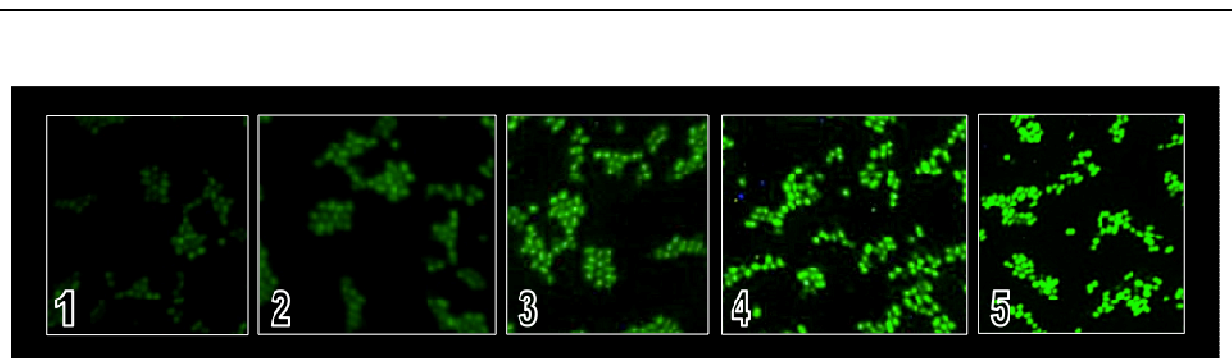


Abb. 4 Grade der Fluoreszenzintensität

3.10 Evaluierung von Sondenkandidaten und publizierten Sonden

Die vier Sondenkandidaten wurden in Kooperation mit Dr. S. Poppert (Bernhard Nocht Institut, Hamburg) entwickelt. Die vom ARB-Programm erhaltenen Informationen über Spezies mit wenigen Basenaustauschen im Bereich der Sonde wurden hinsichtlich ihrer Relevanz beurteilt. Eine weitere Überprüfung der Kandidaten wurde mit zwei Datenbanken (Ribosomal Database Project II, <http://rdp.cme.msu.edu/> und GenBank®, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>) durchgeführt. Wurden relevante Bakterienspezies ermittelt, die im Bereich der Sonde nur ein Mismatch zur Sequenz der Zielspezies aufwiesen, wurde ein Kompetitor eingesetzt. Die Synthese der Sondenkandidaten erfolgte durch einen kommerziellen Hersteller (vgl. Abschnitt 3.2).

Die in lyophilisierter Form gelieferten Sondenkandidaten sowie die verwendeten publizierten Sonden wurden mit A. demin. aufgelöst und auf eine Konzentration von 0,5 µg/µl (6-FAM-markierte Sonden) bzw. 0,3 µg/µl (Cy3-markierte Sonden) eingestellt. Bis zu ihrer weiteren Verwendung wurden diese Sondenstocklösungen, zu jeweils 20 µl aliquotiert und bei -20 °C lichtgeschützt gelagert. Die eingesetzte Endkonzentration betrug bei 6-FAM-markierten Sonden 50 ng/µl und bei Cy3-markierten Sonden 30 ng/µl. Es wurden in der Regel jeweils zwei verschieden markierte Sonden zusammen eingesetzt.

Für die Evaluierung der Sonden wurden frisch kultivierte Erreger verwendet, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden. Die Anzucht betrug maximal 24 Stunden. Die Anzucht der Stämme erfolgte wie unter 3.7.1 beschrieben. Die Präparate wurden für die FISH wie bei Abschnitt 3.9.2.1 beschrieben angefertigt. Die Eubacteria Sonde EUB 338 wurde bei allen Experimenten als Kontrolle für eine erfolgreich durchgeführte Hybridisierung mitgeführt.

Die Evaluierung der Sondenkandidaten erfolgte bei verschiedenen Formamidkonzentrationen, um ihre spezifische Bindungsfähigkeit zu überprüfen. Für die Evaluierung wurden Formamidkonzentrationen in zehnpromzentigen Abstufungen zwischen 20 und 50 % (HPS 1435, HPS 1436 und APYO 183) beziehungsweise 10 und 60 % (SUB 196) gewählt. Für die Evaluierung des Sondenkandidaten APYO 183 konnte teilweise auf bereits vorliegende Ergebnisse aufgebaut werden. Ziel war der Einsatz möglichst aller Sonden bei gleichen Hybridisierungsbedingungen, um beliebige Kombinationen zu ermöglichen. Da die meisten bereits publizierten Sonden bei einer Formamidkonzentration von 30 % eingesetzt werden, wurde diese Konzentration angestrebt. Die übrigen Hybridisierungsbedingungen wurden nicht variiert. Die Sondenkandidaten wurden sowohl mit Stämmen der Zielspezies als

auch mit Stämmen von Nicht-Zielspezies evaluiert. Für APYO 183 konnten auch in diesem Zusammenhang einige Daten aus schon vorliegenden Versuchen mit einbezogen werden. Als Nicht-Zielspezies wurden sowohl Spezies mit ähnlichen Sequenzabschnitten als auch Spezies, die aus den gleichen Untersuchungsmaterialien wie die Zielspezies isoliert werden, ausgewählt.

Publizierte Sonden wurden mit Stämmen aus der Veterinärmedizin getestet. Ein Teil dieser Stämme gehörte Spezies an, die in früheren Publikationen nicht getestet worden waren.

Zusätzlich wurde untersucht, in wieweit sich die Hybridisierungszeiten verkürzen lassen. Mit verschiedenen Spezies von Streptokokken und Enterokokken erfolgten Hybridisierungen von unterschiedlicher Dauer. Als Sonden wurden die speziesübergreifenden Sonden EUB 338, Strept und ENC 221 eingesetzt. Die 44 Präparate wurden von frischen Kulturen angefertigt und lysiert (vgl. Abschnitt 3.9.3). Die Durchführung der FISH wurde wie in Abschnitt 3.9 beschrieben vorgenommen. Ein Beenden der Hybridisierung erfolgte jeweils bei 5 min, 10 min, 45 min und 90 min. Die Präparate wurden anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

3.11 Homogenisierung und Savinasevorbehandlung der Milchproben

Alle Milchproben wurden mittels eines Vortex mechanisch homogenisiert. Bei stark flockiger Konsistenz wurde die Homogenisierung mit Hilfe eines Rührspatels, der während des Vortexens in die Probe gehalten wurde, unterstützt. Danach wurden der kulturelle Ansatz (vgl. Abschnitt 3.7.2), die Gesamtkeimzahlbestimmung und ein Grampräparat angefertigt.

Für die enzymatische Vorbehandlung mit Savinase wurden 50 µl der Probe mit 5 µl Savinase (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in einem 1,8 ml fassenden Reaktionsgefäß vermischt und bei 30 °C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die behandelte Milch bei 13000 U/min 10 min abzentrifugiert. Die oben schwimmende Lipidschicht wurde vorsichtig mit einer Mikropipette abgesaugt und mit dem Überstand der verdauten Proteine verworfen. Das Pellet wurde in 500 µl NaCl resuspendiert, gefolgt von einer Zentrifugation bei 13000 U/min für 5 min. Der Überstand wurde erneut verworfen. Falls der Überstand noch nicht klar war, wurde der Waschschrift mit 500 µl NaCl und anschließender Zentrifugation wiederholt, anderenfalls wurde das Bakterienpellet in 100 µl NaCl aufgenommen. Von dieser Suspension wurden ein zweites Grampräparat und die Präparate für die FISH hergestellt.

3.12 Vorversuche für die Untersuchung von Mastitismilchproben

3.12.1 Autofluoreszenz

Da eine Autofluoreszenz des Untersuchungsmaterials die Auswertung der FISH beeinträchtigen könnte, wurden zunächst Präparate von Mastitmilchproben unter dem Fluoreszenzmikroskop bewertet. Dazu wurden einige für die FISH erstellte Präparate mit Citifluor und einem Deckglas eingedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet.

3.12.2 Ermittlung des Einflusses der Savinasevorbehandlung

Vor und nach der Behandlung mit Savinase wurde je ein Objektträgerausstrich mit künstlich kontaminierter Vollmilch angefertigt. Zur Kontamination der Milch wurden die Referenzstämme *S. aureus* (DSM 2569), *Enterococcus (E.) faecalis* (DSM 2570) und *Escherichia (E.) coli* (DSM 1103) eingesetzt. Die Präparate wurden nach Gram gefärbt und mit einem Lichtmikroskop bei einer 630-fachen Vergrößerung nach den Kategorien in Tabelle 2 ausgewertet. Die Ergebnisse wurden anschließend verglichen.

Für die Kontamination wurde eine Suspension des entsprechenden Bakteriums in NaCl (0,9 %ig) mit einer Dichte entsprechend einem McFarland Standard (bioMérieux, Nürtingen) von 1 hergestellt. Die Dichte McFarland 1 entspricht bei *E. coli* ca. 3×10^8 KBE/ml. Von dieser Suspension wurde 1 ml mit 9 ml Vollmilch vermischt. Von diesem Ausgangsmaterial wurde eine Verdünnungsreihe (1:10) bis zu einem Bakteriengehalt von ca. 3×10^3 KBE/ml erstellt. Das Ausgangsmaterial und die vier Verdünnungen dienten als kontaminierte Milchproben für den Versuch.

Von jeder Probe wurde zunächst ein Grampräparat angefertigt und eine Gesamtkeimzahlbestimmung (vgl. Abschnitt 3.7.2) durchgeführt. Anschließend wurde die Milchprobe mit Savinase behandelt und danach das zweite Grampräparat angefertigt.

3.12.3 Ermittlung der Nachweisgrenze von Erregern in Milchproben

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze diente ebenfalls im Handel erworbene Vollmilch als Untersuchungsmaterial. Sie wurde künstlich mit den Referenzstämmen *S. aureus* (DSM 2569), *E. faecalis* (DSM 2570) und *E. coli* (DSM 1103) kontaminiert. Anschließend wurden Verdünnungsreihen der Proben, wie unter 3.12.2 beschrieben, hergestellt. Zunächst wurde eine Gesamtkeimzahlbestimmung der gespickten Milchproben durchgeführt. Im Anschluß an die Savinasevorbehandlung erfolgte die FISH mit der Sonde EUB 338. Die nachgewiesenen Erregermengen wurden nach Tabelle 2 beurteilt. Von den jeweiligen Proben

wurde die Gesamtkeimzahl in Bezug zu der nachweisbaren Bakterienmenge gesetzt und ausgewertet.

3.13 Untersuchung von Mastitismilchproben

Insgesamt wurden 128 Viertelgemelksproben mit der FISH untersucht. Bei 119 Mastitismilchproben wurde parallel dazu ein kultureller Ansatz und bei 125 Proben eine Gesamtkeimzahlbestimmung durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.7.2). Die Ergebnisse von 103 Proben wurden im Vergleich zu den Ergebnissen der FISH für eine Auswertung bezüglich der Nachweisgrenze herangezogen. Die kulturell nachgewiesenen Erreger wurden semiquantitativ bestimmt und den Erfordernissen entsprechend bis zur Speziesebene identifiziert (vgl. Abschnitt 3.8). Von 50 Milchproben wurde zusätzlich zu dem Grampräparat nach der Savinasebehandlung auch eines davor angefertigt (vgl. Abschnitt 3.11). Die Ergebnisse des Vergleichs beider Gramfärbungen wurden für die Beurteilung der Savinasevorbehandlung herangezogen. Anschließend wurden Präparate für die FISH angelegt (vgl. Abschnitt 3.9.2). Die Milchproben wurden entweder mit ausgewählten Sonden untersucht, entsprechend dem Ergebnis der Gramfärbung, oder es wurde der „komplette SONDENSATZ“ verwendet. Dieser „komplette Satz“ beinhaltete alle in Tabelle 1 aufgeführten Sonden mit Ausnahme der *H. parasuis*-spezifischen Sonden. Folgende Kombinationen wurden eingesetzt: EUB 338 (6-FAM)/ENF 191 (Cy3), ENC 221 (6-FAM)/ENU 140 (Cy3), Staphy (6 FAM)/Sau (Cy3), Strept (6-FAM)/Straga (Cy3), Strept (6-FAM)/SUB 196 (Cy3), EUB 338 (6-FAM)/APYO 183 (Cy3) und EBAC 1790 (6-FAM)/ESC 468 (Cy3).

Die Ergebnisse der FISH wurden mit den Ergebnissen der mikroskopischen Untersuchung (Gramfärbung) und den Ergebnissen des kulturellen Ansatzes verglichen. Schlussendlich wurde auch das Alter der Proben bis zur Untersuchung ausgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Objektträger und Wattestäbchen

Von den beiden eingesetzten Systemen zur Herstellung der Präparate (Abbildung 5) erwies sich das Verfahren mit einer auf einen Objektträger aufgedruckten Silikonfolie als ungeeignet. Es konnte bei diesem System nicht verhindert werden, dass die aufgetragene Sondenmischung durch Kapillarkräfte am Rand des Feldes unter die Folie gesogen wurde und für die Hybridisierung verloren ging. Ein weiterer Nachteil war, dass die Felder mit einem Diamantstift auf der Gegenseite des Objektträgers markiert werden mussten, um sie nach Ablösen der Folie beim Mikroskopieren wiederzufinden. Daher wurde für die Untersuchungen ein adhäsiver, teflonbeschichteter 8-Feld-Objektträger eingesetzt. Zum einen bot dieser Objektträger dem Untersuchungsmaterial guten Halt, zum anderen ermöglichte er ein leichtes Auffinden des Materials unter dem Mikroskop.

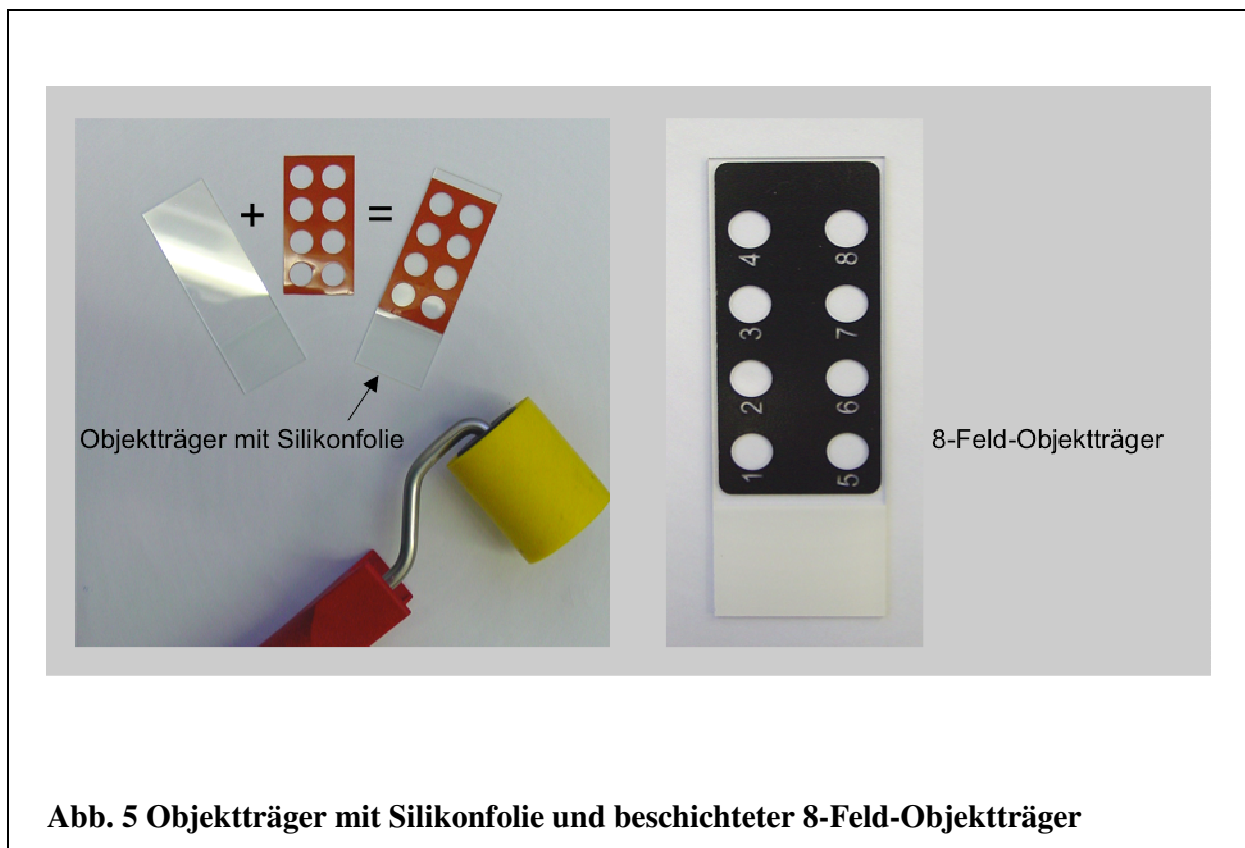


Abb. 5 Objektträger mit Silikonfolie und beschichteter 8-Feld-Objektträger

Von zwei von verschiedenen Lieferanten verwendeten Wattestäbchen eigneten sich nur die der Firma VWR zum präzisen Auftragen von Bakterienmaterial auf den Objektträger, da sie beim Benetzen mit NaCl ihre Form behielten. Die Wattestäbchen der Firma Heiland neigten zum vermehrten Aufquellen beim Kontakt mit Flüssigkeit. Ein genaues Arbeiten war bei dieser Art der Anwendung nicht möglich. Daher wurden sie nicht weiter verwendet.

4.2 Sondenevaluierung

4.2.1 Datenbankabgleich der Sondenkandidaten

Für den Sondenkandidaten HPS 1436 wurden mit einem Mismatch folgende Spezies angegeben: *Haemophilus paracuniculus*, *Histophilus somni*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella gallinarum*, *Pasteurella volantium*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus succinogenes*, *Avibacterium gallinarum* und *Avibacterium volantium*.

Für den Kandidaten SUB 196 wurden zwei Nicht-Zielspezies mit einem Mismatch ermittelt (*Streptococcus (S.) didelphis* und *S. porcinus*). Spezies, die zwei Mismatches aufwiesen, waren *S. agalactiae*, *S. bovis*, *S. canis*, *Streptococcus criae*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus orisratti*, *Streptococcus parauberis*, *Streptococcus phocae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius* und *S. suis*.

Für den Sondenkandidaten APYO 183 wurden zum Zeitpunkt der Auswahl der Sondenkandidaten mit einem Mismatch nur *A. haemolyticum* und *A. phocae* angegeben. Alle weiteren Spezies wiesen drei oder mehr Mismatches auf.

4.2.2 Evaluierung der Sondenkandidaten bei verschiedenen Formamidkonzentrationen

4.2.2.1 Sondenkandidaten HPS 1436 und HPS 1435 für *H. parasuis*

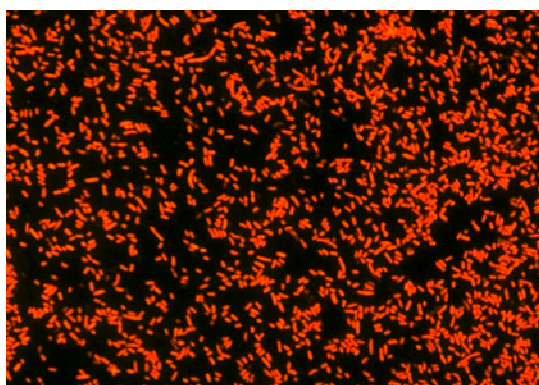
Es wurden zwei Sondenkandidaten für den Erreger *H. parasuis* evaluiert (Tabelle 4). Beide Sonden wurden bei Formamidkonzentrationen von 20-50 % mit fünf Stämmen der Spezies *H. parasuis* getestet. Bei der Sonde HPS 1436 zeigten drei Stämme eine optimale Fluoreszenz bei einer Formamidkonzentration von 20-40 % (Abbildung 6). Bei einem dieser Stämme (Nr. 410) war bei 50 % Formamid jedes Mal eine Abnahme der Fluoreszenz zu beobachten, bei einem Stamm (Nr. 409) nur bei einer Testung. Zwei der getesteten Stämme (Nr. 553 und 555) zeigten bei 20 % Formamid eine mäßige Fluoreszenz, die sich bei 30 % optimierte und bei 40 % und 50 % nicht mehr festzustellen war.

Die Sonde HPS 1435 zeigte eine positive Reaktion nur bei einem Versuch mit einer Konzentration von 30 % Formamid. Bei allen weiteren Versuchen erfolgte keine ausreichende Hybridisierung der Zielorganismen. Die Sonde wurde nicht weiter evaluiert.

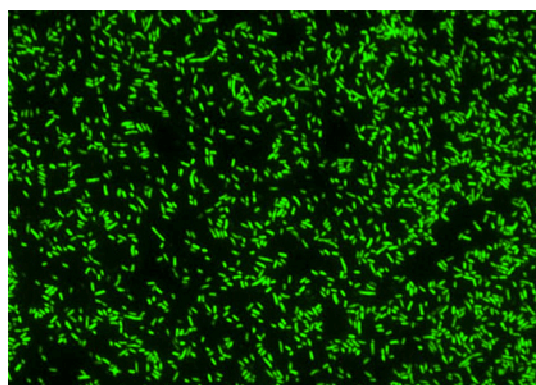
Tab. 4 Evaluierung der Sonden HPS 1436 und HPS 1435 bei verschiedenen Formamidkonzentrationen (mit Konkpetitor)

HPS 1436					HPS 1435				
<i>H. parasuis</i> Stammnummer	Formamidkonzentration				<i>H. parasuis</i> Stammnummer	Formamidkonzentration			
	20 %	30 %	40 %	50 %		20 %	30 %	40 %	50 %
409	4	5	5	3	409	3	5	3	2
409	4	5	4	4	409	1	1	0	0
410	4	5	4	3	410	1	2	0	0
410	4	5	4	3	410	1	1	0	0
411	4	5	4	4	411	1	2	0	0
411	4	5	4	4	411	1	1	0	0
553	3	4	0	0	553	1	0	0	0
553	3	4	0	0	553	1	0	0	0
555	3	4	0	0	555	0	2	0	0
555	3	4	0	0	555	0	0	0	0

^a Bewertung nach Tab. 3; fett dargestellt sind die positiven Ergebnisse



HPS 1436 (Cy3-markiert)



EUB 338 (6-FAM-markiert)

Abb. 6 *H. parasuis* mit Sondenkandidat HPS 1436 und Kontrolle EUB 338

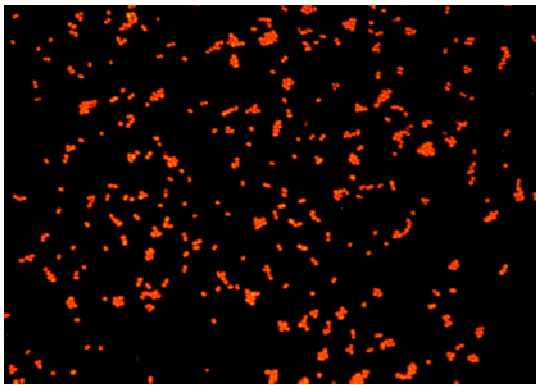
4.2.2.2 Sondenkandidat SUB 196 für *S. uberis*

Maximale Fluoreszenz zeigte die Sonde SUB 196 bei Formamidkonzentrationen von 10-40 % (Tabelle 5 und Abbildung 7). Bei 50 % Formamid war bei zwei von sechzehn Stämmen ein schwach positives Fluoreszenzsignal erkennbar. Dreizehn Stämme wiesen eine sehr schwache Fluoreszenz und ein Stamm keine Fluoreszenz mehr auf. Bei einer Konzentration von 60 % Formamid war bei keinem der Stämme eine Fluoreszenz zu beobachten.

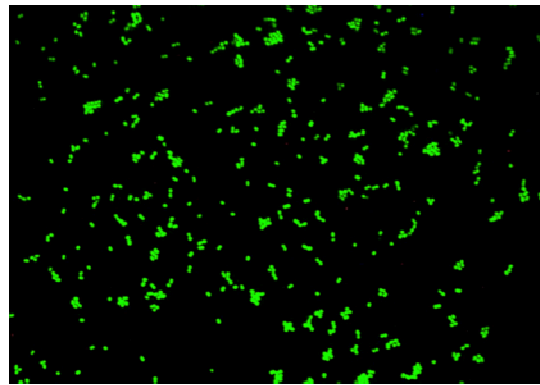
Tab. 5 Evaluierung der Sonde SUB 196 bei verschiedenen Formamidkonzentrationen

<i>S. uberis</i> Stammnummer	Formamidkonzentration					
	10 %	20 %	30 %	40 %	50 %	60 %
	Fluoreszenzintensität ^a					
36	4	5	5	4	3	0
41	5	5	5	5	3	0
45	5	5	5	5	2	0
46	5	5	5	4	2	0
48	5	5	5	4	2	0
49	5	5	5	5	2	1
50	5	5	5	4	1	0
51	4	5	5	4	2	0
54	5	5	5	4	2	1
55	5	5	5	4	2	1
58	5	5	5	4	2	1
59	5	5	5	5	2	1
62	5	5	5	4	2	1
64	5	5	5	4	2	1
65	5	5	5	4	2	1
66	5	5	5	4	2	1

^a Bewertung entsprechend Tab. 3; fett dargestellt sind die positiven Ergebnisse



SUB 196 (Cy3-markiert)



EUB 338 (6-FAM-markiert)

Abb. 7 *S. uberis* mit Sondenkandidat SUB 196 und Kontrolle EUB 338

4.2.2.3 Sondenkandidat APYO 183 für *A. pyogenes*

Die aus vorangegangenen Versuchen ohne den Einsatz eines Kompetitors für diese Arbeit zur Verfügung gestellten Ergebnisse hatten gezeigt, dass der Referenzstamm von *A. pyogenes* bei den untersuchten Konzentrationsstufen von 20-40 % Formamid Fluoreszenzintensitäten zwischen 4 und 5 aufwies. Die Referenzstämmen der Spezies *A. hippocoleae*, *A. pluranimalium* und *A. bernardiae* reagierten eindeutig negativ, für Referenzstämmen der Spezies *A. haemolyticum* und *A. phocae* traten Intensitäten von 4 (bei 20-30 % Formamid) beziehungsweise 2-3 (bei 40 % Formamid) auf. Die Referenzstämmen der erst kürzlich beschriebenen Arten *A. bialowiezense* und *A. bonasi* zeigten bei allen untersuchten Konzentrationsstufen positive Reaktionen.

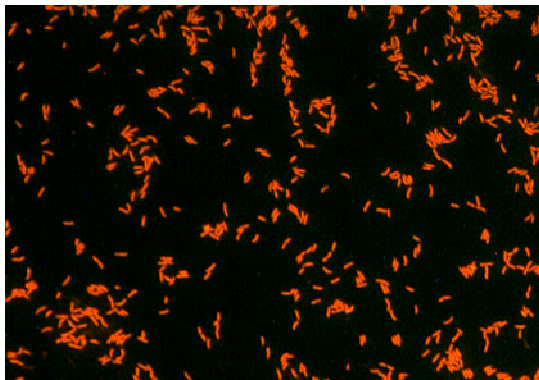
Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Sonde in der vorliegenden Arbeit mit einem Kompetitor evaluiert, dessen Sequenz (Tabelle 1, Seite 43) komplementär zu den Spezies *A. haemolyticum* und *A. phocae* war. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt. Der *A. pyogenes*-Stamm zeigte auch mit Kompetitor bei 20-40 % Formamid maximale Fluoreszenz (Abbildung 8), die sich bei 50 % Formamid nur leicht abschwächte. Die Referenzstämmen der Spezies *A. bernardiae*, *A. hippocoleae* und *A. pluranimalium* reagierten bei allen Konzentrationen negativ mit der Sonde. *A. haemolyticum* und *A. phocae* zeigten bei 20 und 30 % eine sehr schwache Fluoreszenz. Ab 40 % wurde keine Fluoreszenz mehr beobachtet. Die Stämme der Spezies *A. bialowiezense* und *A. bonasi* reagierten bei Konzentrationen von 20 und 30 % Formamid positiv mit der Sonde. Hingegen war bei einer Konzentration von 40 % eine schwache Fluoreszenz und von 50 % keine Fluoreszenz zu beobachten.

Tab. 6 Evaluierung der Sonde APYO 183 bei verschiedenen Formamidkonzentrationen (mit Kompetitor)

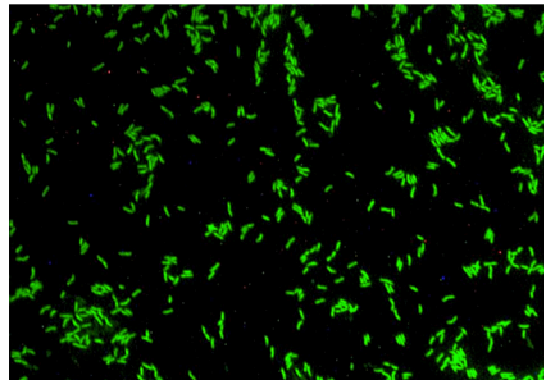
Spezies	Referenzstamm ^a	Formamidkonzentration			
		20 %	30 %	40 %	50 %
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	DSM 20630	5	5	5	4
<i>Arcanobacterium bernardiae</i>	DSM 9152	1	1	0	0
<i>Arcanobacterium bialowiezense</i>	DSM 17162	4	4	3	1
<i>Arcanobacterium bonasi</i>	DSM 17163	4	4	3	1
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	DSM 20595	2	2	1	0
<i>Arcanobacterium hippocoleae</i>	DSM 15539	1	0	0	0
<i>Arcanobacterium phocae</i>	DSM 10002	2	1	1	0
<i>Arcanobacterium pluranimalium</i>	DSM 13483	1	0	0	0

^a DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

^b Bewertung entsprechend Tab. 3; fett dargestellt sind die positiven Reaktionen



APYO 183 (Cy3-markiert)



EUB 338 (6-FAM-markiert)

Abb. 8 A. *pyogenes* mit Sondenkandidat APYO 183 und Kontrolle EUB 338

4.2.3 Evaluierung der Sondenkandidaten mit verschiedenen Bakterienspezies

4.2.3.1 Sondenkandidat HPS 1436 für *H. parasuis*

Die Sonde für HPS 1436 wurde mit insgesamt 103 Stämmen evaluiert (Tabelle 7). Davon wurden alle *H. parasuis*-Stämme (n = 61) von der Sonde richtig erkannt. Weitere 36 gramnegative Nicht-Zielspezies zeigten keine oder nur eine schwache Reaktion mit der Sonde. Ebenso wurde keine Hybridisierung mit 6 Stämmen grampositiver Spezies beobachtet.

Tab. 7 Evaluierung der Sonde HPS 1436 bei 30 % Formamid

Spezies	Anzahl der Stämme	
	positiv	getestet
Gramnegative Bakterien		
<i>Haemophilus parasuis</i>	61	61
<i>Histophilus somni</i>	0	2
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	0	13
<i>Actinobacillus equuli</i>	0	2
<i>Pasteurella aerogenes</i>	0	1
<i>Pasteurella multocida</i>	0	5
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	0	2
<i>Mannheimia haemolytica</i>	0	1
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	0	3
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	1
<i>Pantoea agglomerans</i>	0	1
<i>Proteus</i> spezies	0	1
<i>Serratia liquefaciens</i>	0	1
<i>Salmonella</i> spezies	0	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	1
Grampositive Bakterien		
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	1
<i>Micrococcus</i> spezies	0	1
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	0	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	1
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0	1
<i>Staphylococcus hyicus</i>	0	1

4.2.3.2 Sondenkandidat SUB 196 für *S. uberis*

Die Evaluierung der Sonde SUB 196 wurde bei einer Formamidkonzentration von 30 % mit insgesamt 208 Stämmen verschiedener Spezies durchgeführt (Tabelle 8). Alle 46 Stämme der Zielspezies *S. uberis* wurden von der Sonde richtig erkannt. Als Nicht-Zielspezies wurden 42 Streptokokken, 86 weitere grampositive Erreger und 82 gramnegative Erreger getestet. Bei keiner dieser Spezies wurde eine Fehlbindung mit der Sonde SUB 196 beobachtet.

Tab. 8 Evaluierung der Sonde SUB 196 bei 30 % Formamid (fortgesetzt)

Spezies	Anzahl der Stämme	
	positiv	getestet
Grampositive Bakterien		
<i>Streptococcus uberis</i>	46	46
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0	9
<i>Streptococcus bovis</i>	0	2
<i>Streptococcus canis</i>	0	3
<i>Streptococcus didelphis</i>	0	1
<i>Streptococcus dysgalactiae dysgalactiae</i>	0	8
<i>Streptococcus dysgalactiae equisimilis</i>	0	4
<i>Streptococcus equi. zooepidemicus</i>	0	3
<i>Streptococcus parauberis</i>	0	1
<i>Streptococcus pluranimalium</i>	0	1
<i>Streptococcus suis</i>	0	10
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	0	4
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	31
<i>Enterococcus faecium</i>	0	5
<i>Enterococcus hirae</i>	0	1
<i>Lactococcus garvieae</i>	0	5
<i>Lactococcus lactis lactis</i>	0	5
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	14
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	0	3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	3
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0	1
<i>Staphylococcus hyicus</i>	0	3
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	0	3
<i>Staphylococcus simulans</i>	0	1
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	2
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	0	1
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	0	1

Tab. 8 (Fortsetzung) Evaluierung der Sonde SUB 196 bei 30 % Formamid

Spezies	Anzahl der Stämme	
	positiv	getestet
Grampositive Bakterien		
<i>Rhodococcus equi</i>	0	1
<i>Micrococcus</i> spezies	0	1
<i>Bacillus</i> spezies	0	1
Gramnegative Bakterien		
<i>Escherichia coli</i>	0	8
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	2
<i>Pantoea agglomerans</i>	0	2
<i>Proteus vulgaris</i>	0	1
<i>Proteus</i> spezies	0	1
<i>Salmonella enterica</i>	0	3
<i>Serratia liquefaciens</i>	0	1
<i>Serratia marcescens</i>	0	1
<i>Serratia rubidea</i>	0	1
<i>Acinetobacter</i> spezies	0	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	2
<i>Histophilus somni</i>	0	1
<i>Mannheimia haemolytica</i>	0	1
<i>Pasteurella multocida</i>	0	1
<i>Pasteurella</i> spezies	0	3
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	0	1

4.2.3.3 Sondenkandidat APYO 183 für *A. pyogenes*

Der Sondenkandidat APYO 183 wurde mit 179 Stämmen evaluiert. Die Ergebnisse der meisten *A. pyogenes*-Stämme und einiger weiterer Spezies wurden aus vorangegangenen Versuchen zur Verfügung gestellt. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 9 gemeinsam aufgeführt. Die Sonde zeigte mit allen 39 Stämmen der Spezies *A. pyogenes* ein positives Fluoreszenzsignal. Von den anderen Spezies des Genus *Arcanobacterium* reagierten *A. bialowiezense* und *A. bonasi* bei 30 % Formamid positiv mit der Sonde, während *A. haemolyticum* eine schwache, aber als negativ bewertete Reaktion zeigte.

Stämme weiterer Nicht-Zielspezies, eingeschlossen 17 grampositive Stäbchen, 46 grampositive Kokken und 19 gramnegative Stäbchen, zeigten keine Fluoreszenz bei einer Testung mit 30 % Formamid.

Tab. 9 Evaluierung der Sonde APYO 183 bei 30 % Formamid (fortgesetzt)

Spezies	Anzahl der Stämme	
	positiv	getestet
grampositive Bakterien		
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	39	39
<i>Arcanobacterium bernardiae</i>	0	1
<i>Arcanobacterium hippocoleae</i>	0	1
<i>Arcanobacterium pluranimalium</i>	0	1
<i>Arcanobacterium phocae</i>	0	1
<i>Arcanobacterium bialowiezense</i>	1	1
<i>Arcanobacterium bonasi</i>	1	1
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	0	3
<i>Actinobaculum suis</i>	0	1
<i>Actinomyces</i> spezies	0	5
<i>Corynebacterium</i> spezies	0	3
<i>Propionibacterium acnes</i>	0	2
<i>Rhodococcus equi</i>	0	1
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	0	1
<i>Lactobacillus fermentum</i>	0	1
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	2
<i>Bacillus</i> spezies	0	1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0	5
<i>Streptococcus uberis</i>	0	14
<i>Streptococcus</i> spezies	0	2
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	4

Tab. 9 (Fortsetzung) Evaluierung der Sonde APYO 183 bei 30 % Formamid

Spezies	Anzahl der Stämme	
	positiv	getestet
grampositive Bakterien		
<i>Enterococcus</i> spezies	0	4
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	7
<i>Staphylococcus hyicus</i>	0	1
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	0	1
<i>Staphylococcus delphini</i>	0	1
koagulase-negative Staphylokokken	0	6
<i>Micrococcus</i> spezies	0	1
gramnegative Bakterien		
<i>Escherichia coli</i>	0	5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	1
<i>Pantoea agglomerans</i>	0	1
<i>Proteus</i> spezies	0	1
<i>Salmonella enterica</i>	0	1
<i>Serratia liquefaciens</i>	0	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	1
<i>Histophilus somni</i>	0	2
<i>Mannheimia haemolytica</i>	0	1
<i>Pasteurella aerogenes</i>	0	1
<i>Pasteurella multocida</i>	0	1
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	0	1
<i>Fusobacterium</i> spezies	0	1

4.3 Hybridisierung publizierter Sonden aus der Humanmedizin mit veterinärmedizinischen Isolaten

Bei der Überprüfung der aus früheren Publikationen übernommenen Sonden mit Isolaten aus veterinärklinischem Material wurden keine unspezifischen Bindungen beobachtet (Tabelle 10).

Tab. 10 Evaluierung publizierter Sonden mit veterinärmedizinischen Stämmen (fortgesetzt)

Spezies	Sonden $n_{\text{positiv}}/n_{\text{getestet}}^a$									
	EUB 338	Staphy	Sau	Strept	Straga	ENC 221	ENF 191	ENU 140	EBAC 1790	ESC 468
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	1/1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1/1	0/1	0/1	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	31/31	0/6	0/6	0/31	0/4	31/31	31/31	0/31	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecium</i>	3/3	0/2	0/2	0/2	0/2	3/3	0/3	3/3	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus hirae</i>	1/1	0/1	0/1	0/1	n.d.	1/1	0/1	0/1	n.d.	n.d.
<i>Lactococcus garvieae</i>	4/4	n.d.	n.d.	0/4	n.d.	0/4	0/4	0/4	n.d.	n.d.
<i>Lactococcus lact. lact.</i>	5/5	n.d.	n.d.	0/5	n.d.	0/5	0/5	0/5	n.d.	n.d.
<i>Streptococcus agalactiae</i>	4/4	0/4	0/4	4/4	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
<i>Streptococcus bovis</i>	1/1	0/1	0/1	1/1	n.d.	0/1	0/1	0/1	n.d.	n.d.
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1/1	0/1	0/1	1/1	n.d.	0/1	0/1	0/1	n.d.	n.d.
<i>Streptococcus equi zooep.</i>	1/1	0/1	0/1	1/1	n.d.	0/1	0/1	0/1	n.d.	n.d.
<i>Streptococcus suis</i>	7/7	0/7	0/7	7/7	n.d.	0/7	0/7	0/7	n.d.	n.d.
<i>Streptococcus uberis</i>	18/18	0/14	0/14	18/18	0/14	0/14	0/14	0/14	0/2	0/2
<i>Staphylococcus aureus</i>	14/14	14/14	14/14	0/14	0/8	0/14	0/14	0/14	0/7	0/7
<i>Staphylococcus chromog.</i>	3/3	3/3	0/3	0/3	n.d.	0/3	0/3	0/3	0/1	0/1
<i>Staphylococcus epiderm.</i>	3/3	3/3	0/3	0/3	n.d.	0/3	0/3	0/3	0/1	0/1
<i>Staphylococcus haemol.</i>	1/1	1/1	0/1	0/1	n.d.	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>Staphylococcus hyicus</i>	3/3	3/3	0/3	0/3	n.d.	0/3	0/3	0/3	0/1	0/1
<i>Staphylococcus pseudinter.</i>	3/3	3/3	0/2	0/2	n.d.	0/3	0/3	0/3	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus simulans</i>	1/1	1/1	0/1	0/1	n.d.	0/1	0/1	0/1	n.d.	n.d.
<i>Listeria monocytogenes</i>	1/1	0/1	0/1	0/1	n.d.	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>Escherichia coli</i>	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	n.d.	4/4	4/4
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1/1	0/1	0/1	0/1	n.d.	0/1	0/1	n.d.	1/1	0/1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1/1	0/1	0/1	0/1	n.d.	0/1	0/1	n.d.	1/1	0/1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1/1	0/1	0/1	0/1	n.d.	0/1	0/1	n.d.	1/1	0/1
<i>Pantoea agglomerans</i>	1/1	0/1	0/1	0/1	n.d.	0/1	0/1	n.d.	1/1	0/1
<i>Proteus spezie</i>	1/1	0/1	0/1	0/1	n.d.	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1

Tab. 10 (Fortsetzung) Evaluierung publizierter Sonden mit veterinärmedizinischen Stämmen

Spezies	Sonden $n_{\text{positiv}}/n_{\text{getestet}}$ ^a									
	EUB 338	Staphy	Sau	Strept	Straga	ENC 221	ENF 191	ENU 140	EBAC 1790	ESC 468
<i>Serratia liquefaciens</i>	1/1	0/1	0/1	0/1	n.d.	0/1	0/1	0/1	1/1	0/1
<i>Salmonella</i> spezies	1/1	0/1	0/1	0/1	n.d.	0/1	0/1	n.d.	1/1	0/1
<i>Histophilus somni</i>	2/2	0/2	0/2	0/2	n.d.	0/2	0/2	n.d.	0/2	0/2
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	2/2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0/2	0/2
<i>Pasteurella multocida</i>	2/2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0/2	0/2

^a grau unterlegt sind die Ergebnisse von in früheren Publikationen nicht getesteten Spezies
n.d.: nicht durchgeführt

4.4 Hybridisierungszeiten

Bei einer Hybridisierungszeit ab 45 min und länger zeigten alle getesteten Stämme mit den entsprechenden Sonden eine Fluoreszenzintensität von 4 oder 5. Bei einer Hybridisierungszeit von 20 min war bei einem Enterokokkenstamm und einem Streptokokkenstamm eine leicht verminderte Fluoreszenz und bei einem Enterokokkenstamm eine mäßige Fluoreszenz zu beobachten. Bei einer Hybridisierung über 5 min zeigten nur zwei Enterokokkenstämme eine Fluoreszenz von 4 und besser und drei Streptokokkenstämme eine Fluoreszenz zwischen 3 und 4. Die restlichen sechs Stämme, vier Streptokokkenstämme und zwei Enterokokkenstämme wiesen eine Fluoreszenz von 3 und weniger auf (Tabelle 11).

Tab. 11 Evaluierung verschiedener Hybridisierungszeiten mit Streptokokken und Enterokokken

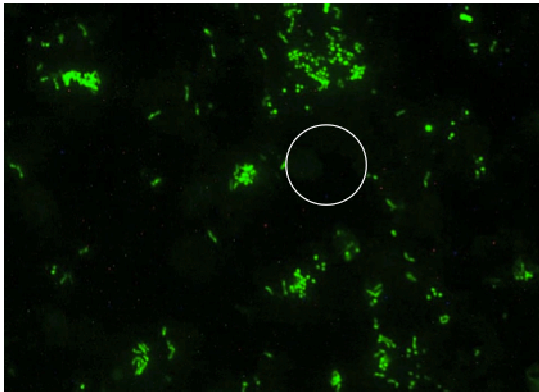
Sonde	Spezies	Nummer	Hybridisierungszeit in Minuten			
			5 min	20 min	45 min	90 min
EUB 338	<i>Streptococcus agalactiae</i>	G1	3-4	4-5	5	5
EUB 338	<i>Streptococcus canis</i>	H6	3-4	4-5	5	5
EUB 338	<i>Streptococcus uberis</i>	Ä23	2-3	4	5	5
EUB 338	<i>Streptococcus uberis</i>	Ä23	3	3-4	4	4
EUB 338	<i>Streptococcus uberis</i>	Ä23	3-4	4-5	5	5
EUB 338	<i>Enterococcus faecalis</i>	Ä24	4	4-5	5	4-5
EUB 338	<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS2	4-5	4	5	5
Strept	<i>Streptococcus uberis</i>	Ä23	2-3	4	5	5
Strept	<i>Streptococcus uberis</i>	Ä23	3	4	4-5	4-5
ENC 221	<i>Enterococcus faecalis</i>	Ä24	1	3-4	4	4
ENC 221	<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS2	1	3	4	4-5

^a Bewertung entsprechend Tab. 3; fett dargestellt sind die positiven Reaktionen

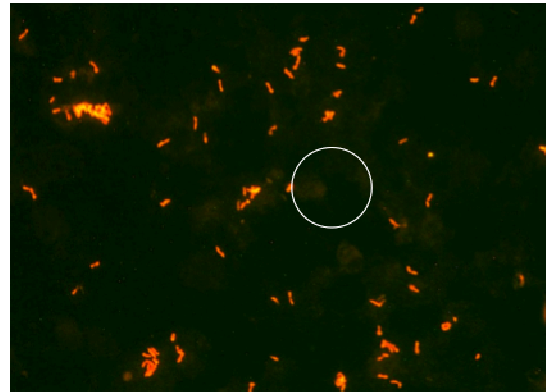
4.5 Vorversuche zum Erregerdirektnachweis in Milchproben

4.5.1 Autofluoreszenz

Die Präparate mit dem Untersuchungsmaterial Milch wiesen keine prägnante Autofluoreszenz auf. Auch durch die FISH wurde keine Fluoreszenz der eventuell verbliebenen Milchbestandteile verursacht (Abbildung 9). Zur besseren Darstellung des Ergebnisses wurde hier ein Präparat mit Bakterien ausgewählt. Die Erreger lassen sich deutlich erkennen, während Reste der Milchprobe nur schwach im Hintergrund zu erkennen sind (Kreis). Sie beeinträchtigen eine Beurteilung der FISH nicht. Daher wurde die Milch als zu untersuchendes Material für geeignet angesehen.



6-FAM-markierte Sonde



Cy3-markierte Sonde

Abb. 9 Autofluoreszenz von Milchproben

4.5.2 Evaluierung der Savinasevorbehandlung an künstlich kontaminierten Milchproben

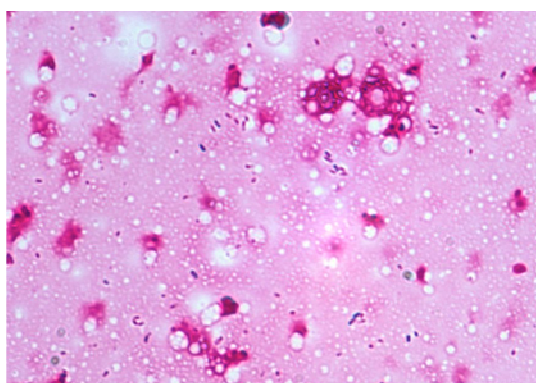
Insgesamt wurden 55 künstlich kontaminierte Proben ausgewertet (Tabelle 12). Die Gesamtkeimzahl in den einzelnen Proben lag zwischen 2×10^1 KBE/ml und $7,5 \times 10^8$ KBE/ml. Bei einer Bakterienkonzentration unter 10^2 KBE/ml führte eine Vorbehandlung der Milch mit Savinase zu keiner Anreicherung der Bakterienmenge in den mikroskopisch nachweisbaren Bereich. Eine Erhöhung um eine Kategorie (vgl. Tabelle 2) konnte bei Milchproben, die eine Bakterienmenge von 1×10^2 bis 9×10^4 KBE/ml ($n = 23$) enthielten, beobachtet werden. Bei einer Gesamtkeimzahl von 10^5 KBE/ml und darüber ($n = 27$) resultierten 89 % der untersuchten Proben in einer Steigerung der nachweisbaren Bakterienmenge. Bei 19 Fällen erfolgte eine Steigerung von einer Kategorie und bei fünf Fällen eine Steigerung von zwei bis drei Kategorien (Abbildung 10).

Tab. 12 Ergebnisse der Savinasevorbehandlung der künstlich kontaminierten Milchproben

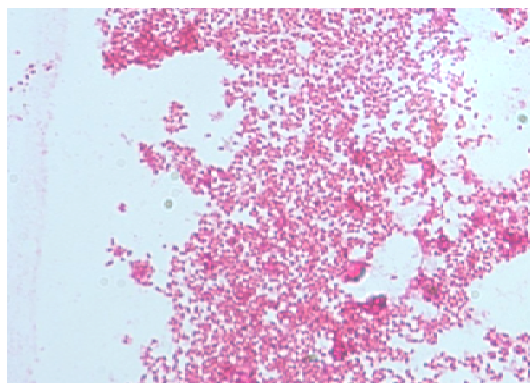
GKZ ^a (KBE/ml)	Anzahl der untersuchten Proben	Anstieg der mikroskopisch nachweisbaren Bakterienmenge durch Savinasebehandlung der Milch ^b			
		kein	eine Kategorie	zwei Kategorien	drei Kategorien
$1-9 \times 10^1$	5	5	0	0	0
$1-9 \times 10^2$	6	5	1	0	0
$1-9 \times 10^3$	9	3	6	0	0
$1-9 \times 10^4$	8	2	6	0	0
$1-9 \times 10^5$	9	0	7	2	0
$1-9 \times 10^6$	7	1	5	0	1
$1-9 \times 10^7$	2	0	0	2	0
$1-9 \times 10^8$	9	2	7	0	0

^a GKZ: Gesamtkeimzahl

^b Vergleich zweier Präparate von Milchproben, mit und ohne Savinasebehandlung nach Gram gefärbt, beurteilt entsprechend der Kategorien in Tab. 2



ohne Savinase



mit Savinase

Abb. 10 Einfluss der Savinasevorbehandlung am Beispiel einer Milchprobe mit *E. coli* (Gramfärbung)

4.5.3 Evaluierung der quantitativen Nachweisbarkeit in künstlich kontaminierten Milchproben

Die Nachweisgrenze wurde an 75 künstlich kontaminierten Milchproben mit Savinasevorbehandlung evaluiert (Tabelle 13). Bei Proben mit einem Bakteriengehalt von unter 100 KBE/ml konnten die Erreger nicht mit der FISH nachgewiesen werden. Bei einer Gesamtkeimzahl von 1×10^2 bis 9×10^3 wurden drei von 19 Proben von der FISH als positiv erkannt. Im Bereich von 1×10^4 bis 9×10^5 KBE/ml lag die Trefferquote der FISH bei 64 und 69 %. Ab einem Bakteriengehalt von 1×10^6 KBE/ml war eine Nachweisbarkeit von 100 % gegeben.

Tab. 13 Quantitative Nachweisbarkeit von Bakterien in künstlich kontaminierten Milchproben

GKZ ^a (KBE/ml)	Anzahl der Proben		Nachweisbarkeit (%)
	FISH positiv	getestet	
$1-9 \times 10^1$	0	5	0
$1-9 \times 10^2$	1	7	14
$1-9 \times 10^3$	2	12	17
$1-9 \times 10^4$	7	11	64
$1-9 \times 10^5$	9	13	69
$1-9 \times 10^6$	13	13	100
$1-9 \times 10^7$	4	4	100
$1-9 \times 10^8$	10	10	100

^a GKZ: Gesamtkeimzahl

4.6 Untersuchungen von Mastitismilchproben mit FISH und kultureller Anzucht

Insgesamt wurden 119 Viertelgemelksproben mit FISH als Direktnachweis und parallel mit klassischen Methoden untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden getrennt nach Reinkulturen und Mischkulturen ausgewertet.

4.6.1 Auswertung der untersuchten Feldproben hinsichtlich der nachgewiesenen Erreger

Insgesamt wurden in 62 Fällen Erreger in Reinkultur nachgewiesen (Tabelle 14), während in 57 Proben zwei oder mehr Spezies isoliert wurden (Tabelle 15). In den meisten Proben ($n = 77$; 65 %) konnten mit der Bestimmung der Gesamtkeimzahl mehr als 10^6 KBE/ml nachgewiesen werden. Vierundzwanzig Proben wiesen eine Bakterienmenge zwischen 10^4 und 9×10^5 KBE/ml (20 %) und in 15 Proben ließen sich weniger als 10^4 KBE/ml nachweisen. Von drei Proben wurde die Bakterienmenge nicht bestimmt.

Mit einer Auswahl von Sonden wurden 40 Proben untersucht (22 Reinkulturen und 18 Mischkulturen). Von den so untersuchten Proben stimmten bei 80 % ($n = 32$) die Ergebnisse der FISH und der kulturellen Untersuchung überein (Punkte 1 der Tabellen 14 und 15). Die Übereinstimmung betraf sowohl die nachgewiesenen Spezies bzw. Genera als auch die Erregermengen. Ein Unterschied von bis zu zwei Stufen bei der semiquantitativen Bestimmung der Erregermenge wurde sowohl mikroskopisch als auch kulturell als „gleich“ interpretiert. Fünf Proben, die Erreger in Reinkultur, aber in sehr geringer Menge enthielten, wurden von der FISH nicht als positiv erkannt (Punkt 2, Tabelle 14). Bei den Mischkulturen zeigten drei Proben Unterschiede in den Ergebnissen. In einer der Proben wurde mit der FISH ein weiterer Erreger im Vergleich zur kulturellen Untersuchung nachgewiesen (Nr. 44, Teil 2A, Tabelle 15), während in den beiden anderen Proben jeweils eine Spezies nicht mit der FISH nachgewiesen werden konnte (Nr. 92 und 93, Teil 3A, Tabelle 15). Bei den zuletzt genannten Proben wurden *Enterococcus (E.) hirae*, der nur in geringer Menge unter Staphylokokken und Mikrokokken vorkam von der Enterokokken-Sonde und *Hafnia (H.) alvei*, die in mäßiger Menge unter reichlich Laktokokken und mäßig viel aeroben Sporenbildnern vertreten war, von der Enterobacteriaceae-Sonde nicht hybridisiert.

Mit dem kompletten Sondensatz wurden weitere 79 Mastitismilchproben untersucht. Hierbei konnten kulturell in 40 Fällen Reinkulturen und in 39 Fällen Mischkulturen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der FISH wurden wiederum mit dem kulturellen Ansatz verglichen. In 51 % ($n = 40$) wurden übereinstimmende Ergebnisse von FISH und kulturellem Ansatz vorgefunden, unter diesen befanden sich 25 Proben mit Bakterien in Reinkultur und 15

Proben mit Bakterien in Mischkultur (Teil 1B in Tabellen 14 und 15). Bei neun Proben (11 %) konnten mit der FISH-Methode im Vergleich zur kulturellen Untersuchung zusätzliche Erreger nachgewiesen werden (Teile 2B in Tabellen 14 und 15). Bei 29 Proben wurden einige der kulturell angezüchteten Erreger mit der FISH in deutlich geringerer Menge oder nicht nachgewiesen (Teile 2B und 3B in Tabellen 14 und 15). Die meisten dieser Proben ($n = 17$) enthielten eine geringe Erregermenge von unter 10^6 KBE/ml. In der verbleibenden Probe (Nr. 14, Teil 2B, Tabelle 15) wurde eine Spezies mit FISH zusätzlich nachgewiesen und eine weitere gleichzeitig in deutlich geringerer Menge als in der Kultur.

Betrachtet man nur die Ergebnissen aller am Tag des Eingangs untersuchten Proben ($n = 60$) unabhängig davon, ob der komplette SONDENSATZ oder nur ausgewählte Sonden eingesetzt wurden, zeigte die FISH in 41 Fällen (68 %) übereinstimmende oder bessere Ergebnisse als die kulturelle Untersuchung. Bezieht man nur die Proben mit einer Menge von $\geq 10^4$ KBE/ml in die Auswertung ein, konnte in 83 % der Fälle die gleichen oder mehr Erreger nachweisen als die Kultur. Bei Mastitismilchproben mit einer Gesamtkeimzahl von $\geq 10^6$ KBE/ml traf dies in 100 % der Fälle zu (Tabellen 14 und 15). In Proben, die nicht am Tag des Probeneingangs untersucht wurden, konnte in knapp 70 % ein übereinstimmendes oder besseres Ergebnis mit der FISH erzielt werden.

Tab. 14 Ergebnisse von Mastitismilchproben mit kulturellem Nachweis von Erregern in Reinkulturen (fortgesetzt)

Proben Nr.	Ergebnisse mit FISH ^a	GKZ (KBE/ml)	Ergebnisse der kulturellen Untersuchung ^b	T. ^c
1 Milchproben ohne Unterschiede zwischen FISH und kultureller Untersuchung				
A Milchproben, die mit einer bestimmten Auswahl von Sonden untersucht wurden				
97	++++ <i>S. aureus</i>	2,5 x 10 ⁹	++++ <i>S. aureus</i>	4
63	++ <i>E. coli</i>	1,2 x 10 ⁹	+++ <i>E. coli</i>	1
27	+++ <i>E. coli</i>	6,9 x 10 ⁸	+++ <i>E. coli</i>	7
59	++ <i>A. pyogenes</i>	2,5 x 10 ⁸	+++ <i>A. pyogenes</i>	0
4	+++ <i>S. aureus</i>	5,0 x 10 ⁷	+++ <i>S. aureus</i>	0
46	+ <i>S. aureus</i>	5,0 x 10 ⁷	+++ <i>S. aureus</i>	0
58	++ <i>S. aureus</i>	2,5 x 10 ⁷	++ <i>S. aureus</i>	0
3	++ <i>Streptococcus</i> spp.	2,0 x 10 ⁷	+++ <i>Streptococcus</i> spp.	1
5	++ EUB 338 positiv (coryneforme Stb.)	7,0 x 10 ⁶	+++ <i>A. pyogenes</i>	0
6	++ <i>Streptococcus</i> spp.	5,0 x 10 ⁶	+++ <i>Streptococcus</i> spp.	2
1	+++ <i>Streptococcus</i> spp.	4,0 x 10 ⁶	+++ <i>Streptococcus</i> spp.	1
62	(+) EBAC 1790 positiv, ESC 468 negativ	3,2 x 10 ⁶	++ <i>K. pneumoniae</i>	1
54	(+) <i>S. aureus</i>	1,7 x 10 ⁶	++ <i>S. aureus</i>	0
10	+ <i>Streptococcus</i> spp.	9,0 x 10 ⁵	+ <i>Streptococcus</i> spp.	2
47	+ <i>Streptococcus</i> spp.	2,5 x 10 ⁴	+++ <i>Streptococcus</i> spp.	0
8	++ <i>A. pyogenes</i>	n.d. ^d	+++ <i>A. pyogenes</i>	0
48	+ EUB 338 positiv (kurze Stb.)	n.d. ^d	+ <i>E. coli</i>	0
B Milchproben, die mit dem vollständigen Sondensatz untersucht wurden				
99	+++ <i>A. pyogenes</i>	4,8 x 10 ⁸	+++ <i>A. pyogenes</i>	0
86	+++ <i>S. aureus</i>	2,9 x 10 ⁸	+++ <i>S. aureus</i>	9
87	+++ nur EUB 338 positiv (Kokken)	2,7 x 10 ⁸	+++ <i>L. lactis</i>	1
15	+++ <i>Streptococcus</i> spp.	ca. 10 ⁸	++ <i>Streptococcus</i> spp.	11
102	+ <i>A. pyogenes</i>	4,8 x 10 ⁷	+++ <i>A. pyogenes</i>	0
88	+++ <i>S. uberis</i>	3,2 x 10 ⁷	+++ <i>S. uberis</i>	0
66	++ <i>S. aureus</i>	3,0 x 10 ⁷	+++ <i>S. aureus</i>	1
101	++ <i>S. uberis</i>	3,0 x 10 ⁷	++ <i>S. uberis</i>	0
124	+++ <i>S. agalactiae</i>	1,0 x 10 ⁷	++ <i>S. agalactiae</i>	0
85	+++ <i>S. uberis</i>	7,3 x 10 ⁶	++ <i>S. uberis</i>	0
112	++ <i>S. uberis</i>	2,4 x 10 ⁶	++ <i>S. uberis</i>	0
89	+ <i>E. coli</i>	1,5 x 10 ⁶	+ <i>E. coli</i>	0
78	++ <i>A. pyogenes</i>	1,4 x 10 ⁶	++ <i>A. pyogenes</i>	7
113	++ <i>S. uberis</i>	1,2 x 10 ⁶	++ <i>S. uberis</i>	0
129	(+) <i>E. coli</i>	5,0 x 10 ⁵	+ <i>E. coli</i>	0
123	+ <i>S. aureus</i>	2,2 x 10 ⁵	+ <i>S. aureus</i>	0
119	(+) <i>S. aureus</i>	2,0 x 10 ⁵	+ <i>S. aureus</i>	0

Tab. 14 (Fortsetzung) Ergebnisse von Mastitismilchproben mit kulturellem Nachweis von Erregern in Reinkulturen

Proben Nr.	Ergebnisse mit FISH ^a	GKZ (KBE/ml)	Ergebnisse der kulturellen Untersuchung ^b	T. ^c
B Milchproben, die mit dem vollständigen Sondensatz untersucht wurden				
118	(+) <i>E. coli</i>	$1,5 \times 10^5$	+ <i>E. coli</i>	0
125	(+) <i>S. agalactiae</i>	$1,5 \times 10^5$	(+) <i>S. agalactiae</i>	0
126	(+) <i>S. aureus</i>	$5,2 \times 10^4$	(+) <i>S. aureus</i>	0
90	(+) <i>E. coli</i>	$3,0 \times 10^4$	(+) <i>E. coli</i>	0
106	+ <i>S. aureus</i>	$1,3 \times 10^4$	++ <i>S. aureus</i>	0
91	keine Bakterien nachgewiesen	$9,0 \times 10^3$	+ <i>Candida rugosa</i>	0
134	(+) <i>E. coli</i>	$2,4 \times 10^3$	(+) <i>E. coli</i>	0
110	keine Bakterien nachgewiesen	$\leq 1 \times 10^3$	(+) Mikrokokken- ähnliche Bakterien	0
2 Untersuchte Milchproben, deren kulturell nachgewiesene Pathogene mit der FISH in geringerer Menge oder nicht ermittelt wurden				
A Milchproben, die mit einer bestimmten Auswahl von Sonden untersucht wurden				
130	keine Bakterien nachgewiesen	$2,6 \times 10^4$	(+) <i>A. pyogenes</i>	0
100	keine Bakterien nachgewiesen	$1,0 \times 10^4$	+ <i>S. aureus</i>	0
103	keine Bakterien nachgewiesen	$3,0 \times 10^3$	+ <i>S. aureus</i>	0
107	keine Bakterien nachgewiesen	$2,0 \times 10^3$	++ <i>S. aureus</i>	0
115	keine Bakterien nachgewiesen	$\leq 1 \times 10^3$	+ <i>S. aureus</i>	0
B Milchproben, die mit dem vollständigen Sondensatz untersucht wurden				
30	(+) / <i>Staphylococcus</i> spp. / (+) <i>S. uberis</i>	$2,6 \times 10^8$	+++ <i>S. uberis</i>	3
71	(+) <i>S. aureus</i>	$4,4 \times 10^7$	+++ <i>S. aureus</i>	6
40	keine Bakterien nachgewiesen	$6,6 \times 10^6$	+++ <i>E. coli</i>	12
65	keine Bakterien nachgewiesen	$2,5 \times 10^6$	+ <i>S. uberis</i>	1
121	keine Bakterien nachgewiesen	$9,0 \times 10^5$	+ <i>S. agalactiae</i>	0
120	keine Bakterien nachgewiesen	$2,4 \times 10^5$	+ <i>S. agalactiae</i>	0
31	(+) nur EUB 338 positiv (Kokken)	$1,5 \times 10^5$	++ <i>S. uberis</i>	5
111	(+) nur EUB 338 positiv (Kokken)	$1,0 \times 10^5$	++ <i>S. uberis</i>	0
127	keine Bakterien nachgewiesen	$7,6 \times 10^3$	(+) <i>S. aureus</i>	0
131	keine Bakterien nachgewiesen	$5,5 \times 10^3$	(+) <i>S. agalactiae</i>	0
122	keine Bakterien nachgewiesen	$1,5 \times 10^3$	(+) <i>S. aureus</i>	0
108	keine Bakterien nachgewiesen	$\leq 1 \times 10^3$	(+) <i>S. aureus</i>	0
109	keine Bakterien nachgewiesen	$\leq 1 \times 10^3$	(+) <i>S. aureus</i>	0
114	keine Bakterien nachgewiesen	$\leq 1 \times 10^3$	(+) <i>E. coli</i>	0
105	keine Bakterien nachgewiesen	$\leq 1 \times 10^3$	(+) <i>E. coli</i>	0

^a Kategorien entsprechend Tab. 2

^b semiquantitative Beurteilung (siehe Abschnitt 3.8.1)

^c T.: Tage zwischen Laboreingang und Untersuchung der Mastitismilchprobe

^d nicht durchgeführt

Ergebnisse

Tab. 15 Ergebnisse von Mastitismilchproben mit kulturellem Nachweis von Erregern in Mischkulturen (fortgesetzt)

Proben-Nr.	Ergebnisse FISH ^a												GKZ (KBE/ ml)	Ergebnisse der kulturellen Untersuchung ^b		T. ^e
	EUB 338	Staphy	Sau	Strept	SUB 196	Straga	ENC 221	ENF 191	ENU 140	APYO 183	EBAC 1790	ESC 468		Bakterien, für deren Nachweis spezies-und/oder genus- spezifische Sonden eingesetzt wurden	Bakterien, für deren Nachweis keine Sonden eingesetzt wurden	
1 Milchproben mit identischen Ergebnissen bei der kulturellen Untersuchung und der FISH (eingeschlossen quantitativer Unterschiede bis zu zwei Kategorien)																
A Milchproben, die mit einer bestimmten Auswahl von Sonden untersucht wurden																
64	++	n.d. ^c	n.d. ^c	(+)	-	-	-	-	-	-	++	++	1,8 x 10 ⁹	++ <i>E. coli</i> , ++ <i>Streptococcus</i> spp.		5
25	++++	n.d. ^c	n.d. ^c	-	-	-	+++	++	-	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	1,6 x 10 ⁹	++++ <i>E. faecalis</i>	+++ Mikrokokken-ähnliche Bakt., + <i>S. aureus</i>	12
26	+++	n.d. ^c	n.d. ^c	-	-	-	+++	(+)	-	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	6,8 x 10 ⁸	++++ <i>E. faecalis</i>	(+) <i>S. simulans</i>	7
96	+++	+++	+++	+++	-	-	-	n.d. ^c	n.d. ^c	-	n.d. ^c	n.d. ^c	4,3 x 10 ⁸	+++ <i>S. aureus</i> , ++ <i>Streptococcus</i> spp.		13
61	++++	++++	++++	+	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	-	n.d. ^c	+++	n.d. ^c	n.d. ^c	9,5 x 10 ⁷	++++ <i>S. aureus</i> , +++ <i>A. pyogenes</i> , (+) <i>Streptococcus</i> spp.		0
95	++++	-	-	++++	-	n.d. ^c	-	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	9,0 x 10 ⁷	+++ <i>S. dysgalactiae equisimilis</i>	+ gramnegative Stäbchen ^d	3
7	+	n.d. ^c	n.d. ^c	+	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	-	-	8,6 x 10 ⁷	++ <i>Streptococcus</i> spp.	++ gramnegative Stäbchen ^d	2
2	+	n.d. ^c	n.d. ^c	+	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	2,0 x 10 ⁷	+++ <i>Streptococcus</i> spp.	++ grampos., Kat.-pos. Kok. ^d	8
9	+++	-	-	+++	+++	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	1,6 x 10 ⁷	+++ <i>S. uberis</i>	+ grampos., Kat.-pos. Kok. ^d	7
51	+	+	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	1,2 x 10 ⁷	++ <i>S. aureus</i>	+ <i>E. coli</i>	0
77	+	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	-	+	+	1,2 x 10 ⁷	+ <i>E. coli</i>	+ <i>E. faecalis</i>	2
50	+	+	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	1,0 x 10 ⁷	++ <i>S. epidermidis</i>	++ <i>E. coli</i>	0
60	++	-	n.d. ^c	++	++	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	3,0 x 10 ⁶	++ <i>S. uberis</i> ,	++ grampos., Kat.-pos. Kok. ^d	0
53	+	-	n.d. ^c	(+)	-	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	2,0 x 10 ⁶	+ <i>Streptococcus</i> spp.	++ gramnegative Stäbchen ^d , + grampos., Kat.-pos. Kok. ^d	0
49	+	n.d. ^c	-	+	+	n.d. ^c	-	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n. d. ^c	++ <i>S. uberis</i>	+ <i>E. coli</i> , + aerobe Sporenbildner	0

Ergebnisse

Tab. 15 (Fortsetzung) Ergebnisse von Mastitismilchproben mit kulturellem Nachweis von Erregern in Mischkulturen

Proben-Nr.	Ergebnisse FISH ^a												GKZ (KBE/ ml)	Ergebnisse der kulturellen Untersuchung ^b		
	EUB 338	Staphy	Sau	Strept	SUB 196	Straga	ENC 221	ENF 191	ENU 140	APYO 183	EBAC 1790	ESC 468		Bakterien, für deren Nachweis spezies-und/oder genuspezifische Sonden eingesetzt wurden	Bakterien, für deren Nachweis keine Sonden eingesetzt wurden	T. ^e
1 Milchproben mit identischen Ergebnissen bei der kulturellen Untersuchung und der FISH (eingeschlossen quantitativer Unterschiede bis zu zwei Kategorien)																
B Milchproben, die mit dem vollständigen Sondensatz untersucht wurden																
67	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	1,2 x 10 ⁹	+++ <i>E. coli</i>	(+) Mikrokokken-ähnliche Bakt.	3
81	+++	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	5,0 x 10 ⁸	++ <i>S. uberis</i>	+ <i>Acinetobacter</i> spp.	2
68	++++	+++	-	-	-	-	++++	++++	-	-	-	-	4,0 x 10 ⁸	+++ <i>Staphylococcus lentus</i> , ++ <i>E. faecalis</i>		3
73	++++	-	-	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5 x 10 ⁸	+++ <i>S. dysgalactiae equisimilis</i>	+ Mikrokokken-ähnliche Bakt.	19
22	+++	++	+	+++	-	-	-	-	-	-	++	++	ca. 10 ⁸	+++ <i>E. coli</i> , +++ <i>K. pneumoniae</i> , ++ <i>S. aureus</i> , ++ <i>S. bovis</i> , + <i>Proteus</i> spp.		6
21	++++	(+)	(+)	++++	-	-	(+)	(+)	-	-	-	-	ca. 10 ⁸	+++ <i>S. dysgal. dysgalactiae</i> + <i>E. faecalis</i> , (+) <i>S. aureus</i>		6
19	++++	-	-	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	ca. 10 ⁸	+++ <i>S. dysgal. dysgalactiae</i>	++ Mikrokokken-ähnliche Bakt.	6
38	++++	-	-	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	3,5 x 10 ⁷	++++ <i>S. dysgal. dysgalactiae</i>	+++ Mikrokokken-ähnliche Bakt.	12
83	+++	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	3,0 x 10 ⁷	+++ <i>S. equi zooepidemicus</i>	+ <i>L. lactis lactis</i>	0
56	++	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	2,3 x 10 ⁷	+ <i>Streptococcus</i> spp.	+ gramnegative Stäbchen ^d , + grampos., Kat.-pos. Kok. ^d , + aerobe Sporenbildner	0
34	(+)	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,2 x 10 ⁷	+++ <i>Staphylococcus</i> spp.	(+) <i>Proteus</i> spp.	3

Ergebnisse

Tab. 15 (Fortsetzung) Ergebnisse von Mastitismilchproben mit kulturellem Nachweis von Erregern in Mischkulturen

Proben-Nr.	Ergebnisse FISH ^a												GKZ (KBE/ ml)	Ergebnisse der kulturellen Untersuchung ^b		T. ^e
	EUB 338	Staphy	Sau	Strept	SUB 196	Straga	ENC 221	ENF 191	ENU 140	APYO 183	EBAC 1790	ESC 468		Bakterien, für deren Nachweis spezies-und/oder genus- spezifische Sonden eingesetzt wurden	Bakterien, für deren Nachweis keine Sonden eingesetzt wurden	
1 Milchproben mit identischen Ergebnissen bei der kulturellen Untersuchung und der FISH (eingeschlossen quantitativer Unterschiede bis zu zwei Kategorien)																
B Milchproben, die mit dem vollständigen Sondensatz untersucht wurden																
128	++++	-	-	(+)	-	(+)	-	-	-	++++	-	-	6,9 x 10 ⁶	+++ <i>A. pyogenes</i> , + <i>S. agalactiae</i>		0
82	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5 x 10 ⁶	+ <i>Staphylococcus</i> spp.	(+) <i>Corynebacterium</i> spp.	0
72	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,4 x 10 ⁵	+ <i>S. aureus</i>	(+) grampos., Kat.-pos. Kok. ^d	1
133	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	2,6 x 10 ⁴	+ <i>E. coli</i>	+ grampos., Kat.-pos. Kok. ^d	0
2 Milchproben deren Pathogene nur mit FISH nachgewiesen werden konnten																
A Milchproben die mit einer bestimmten Auswahl von Sonden untersucht wurden																
44	++	(+)	-	(+)	(+)	n.d. ^c	-	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	6,5 x 10 ⁵	(+) <i>S. uberis</i>	++ Mikrokokken-ähnliche Bakt.	12
B Milchproben die mit dem vollständigen Sondensatz untersucht wurden																
43	+++	-	-	+++	+++	-	++	-	-	-	-	-	9,7 x 10 ⁸	+++ <i>S. uberis</i>	+++ Mikrokokken-ähnliche Bakt.	4
17	++++	+++	+++	++	-	-	+++	-	-	-	-	-	3,7 x 10 ⁸	+++ <i>S. aureus</i> , +++ <i>E. hirae</i>		7
76	++++	++	+	+++	(+)	-	++	-	-	-	-	-	3,7 x 10 ⁸	+++ <i>S. aureus</i> , +++ <i>S. dysgalactiae equisimilis</i> , +++ <i>E. gallinarum</i>		2
69	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	-	-	+++	-	2,9 x 10 ⁸	+++ <i>S. aureus</i> , ++ <i>Pantoea</i> spp.		3
18	++++	++	-	++++	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	ca. 10 ⁸	+++ <i>S. dysgal. dysgalactiae</i> , +++ <i>Staphylococcus</i> spp.		7
23	+++	-	-	+	-	-	-	-	-	-	++	++	ca. 10 ⁸	+++ <i>E. coli</i>	+++ <i>L. lactis lactis</i>	6
14	++	-	-	-	-	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-	7,2 x 10 ⁷	+++ <i>Pantoea agglomerans</i>	+++ Mikrokokken-ähnliche Bakt.	4

Ergebnisse

Tab. 15 (Fortsetzung) Ergebnisse von Mastitismilchproben mit kulturellem Nachweis von Erregern in Mischkulturen

Proben-Nr.	Ergebnisse FISH ^a												GKZ (KBE/ ml)	Ergebnisse der kulturellen Untersuchung ^b		T. ^e
	EUB 338	Staphy	Sau	Strept	SUB 196	Straga	ENC 221	ENF 191	ENU 140	APYO 183	EBAC 1790	ESC 468		Bakterien, für deren Nachweis spezies-und/oder genus- spezifische Sonden eingesetzt wurden	Bakterien, für deren Nachweis keine Sonden eingesetzt wurden	
2 Milchproben deren Pathogene nur mit FISH nachgewiesen werden konnten																
B Milchproben die mit dem vollständigen Sondensatz untersucht wurden																
57	+	+++	-	+++	-	-	(+)	-	-	-	-	-	2,1 x 10 ⁶	++ grampos., Kat.-pos. Kok. ^d , + <i>Streptococcus</i> spp.	(+)aerobe Sporenbildner	0
29	++++	++	-	++	-	-	+	-	-	-	(+)	-	2,0 x 10 ⁵	++ <i>Staphylococcus</i> spp., + <i>S. dysgal. dysgalactiae</i>		3

Ergebnisse

Tab. 15 (Fortsetzung) Ergebnisse von Mastitismilchproben mit kulturellem Nachweis von Erregern in Mischkulturen

Proben-Nr.	Ergebnisse FISH ^a												GKZ (KBE/ ml)	Ergebnisse der kulturellen Untersuchung ^b		T. ^e	
	EUB 338	Staphy	Sau	Strept	SUB 196	Straga	ENC 221	ENF 191	ENU 140	APYO 183	EBAC 1790	ESC 468		Bakterien, für deren Nachweis spezies-und/oder genus- spezifische Sonden eingesetzt wurden	Bakterien, für deren Nachweis keine Sonden eingesetzt wurden		
3 Untersuchte Milchproben, deren kulturell nachgewiesene Pathogene mit der FISH in geringerer Menge oder nicht ermittelt wurden																	
A Milchproben, die mit einer bestimmten Auswahl von Sonden untersucht wurden																	
93	++++	+++	+++	-	-	n.d. ^c	-	-	n.d. ^c	-	n.d. ^c	-	n.d. ^c	2,3 x 10 ⁹	+++ <i>S. aureus</i> , + <i>E. hirae</i>	++ grampos., Kat.-pos. Kok. ^d	3
92	++++	n.d. ^c	n.d. ^c	-	-	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	n.d. ^c	-	-	-	5,2 x 10 ⁸	++ <i>H. alvei</i>	+++ <i>L. lactis</i> , ++ aerobe Sporenbildner	3
B Milchproben, die mit dem vollständigen Sondensatz untersucht wurden																	
33	+	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	1,8 x 10 ⁹	+++ <i>S. aureus</i> , +++ <i>Streptococcus</i> spp., +++ <i>E. coli</i>		3
32	+++	++	-	-	-	-	+	-	-	-	++	++	++	5,9 x 10 ⁸	++++ <i>E. coli</i> , ++++ <i>E. avium</i> ,	++++ <i>L. lactis</i> , ++ grampos., Kat.-pos. Kok. ^d	5
24	++	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	ca. 10 ⁸	+++ <i>E. coli</i> , +++ <i>Staphylococcus</i> spp.		6
16	(+)	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ca. 10 ⁸	+++ <i>E. coli</i> , +++ <i>Streptococcus anginosus</i>	+++ <i>L. lactis</i>	11
39	++++	-	-	+++	-	-	++	+++	-	-	-	-	-	7,5 x 10 ⁷	++++ <i>E. faecalis</i> , ++++ <i>S. dysgal. dysgal.</i> , (+) <i>S. aureus</i>	++++ Mikrokokken-ähnliche Bakt.	12

Ergebnisse

Tab. 15 (Fortsetzung) Ergebnisse von Mastitismilchproben mit kulturellem Nachweis von Erregern in Mischkulturen

Proben-Nr.	Ergebnisse FISH ^a												GKZ (KBE/ ml)	Ergebnisse kultureller Untersuchung ^b		T. ^e
	EUB 338	Staphy	Sau	Strept	SUB 196	Straga	ENC 221	ENF 191	ENU 140	APYO 183	EBAC 1790	ESC 468		Bakterien für deren Nachweis spezies-und/oder genus- spezifische Sonden eingesetzt wurden	Bakterien für deren Nachweis keine Sonden eingesetzt wurden	
3 Untersuchte Milchproben, deren kulturell nachgewiesene Pathogene mit der FISH in geringerer Menge oder nicht ermittelt wurden																
B Milchproben, die mit dem vollständigen Sondensatz untersucht wurden																
36	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,2 x 10 ⁷	+++ <i>S. sciuri</i>	+++ Mikrokokken- ähnliche Bakt., +++ aerobe Sporenbildner	12
11	++	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	4,8 x 10 ⁷	+++ <i>Streptococcus</i> spp., +++ <i>E. coli</i>		7
75	+++	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	-	3,3 x 10 ⁷	++ <i>S. uberis</i> , (+) <i>S. aureus</i>	+ Mikrokokken-ähnliche Bakt.	2
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0 x 10 ⁷	+++ <i>S. sciuri</i>	++ Mikrokokken-ähnliche Bakt.	12
42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,2 x 10 ⁵	+++ <i>E. coli</i> , ++ <i>Streptococcus</i> spp.	++ Mikrokokken-ähnliche Bakt.	10
80	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0 x 10 ⁵	+ <i>E. coli</i>	(+) Hefen	6
116	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,0 x 10 ⁴	(+) <i>Streptococcus</i> spp.	(+) grampos., Kat.-pos. Kok. ^d	0
55	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,6 x 10 ⁴	+ <i>S. chromogenes</i> , (+) <i>Streptococcus</i> spp., (+) Enterobacteriaceae	+ grampos., Kat.-pos. Kok. ^d	0
132	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,1 x 10 ³	(+) <i>E. coli</i> , (+) <i>Streptococcus</i> spp.	(+)Mikrokokken-ähnliche Bakt.	0
104	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0 x 10 ³	+ <i>S. aureus</i>	+ <i>Corynebacterium</i> spp.	0

^a Kategorien entsprechend Tab. 2; eingerahmt/ grau hinterlegt: FISH-Ergebnisse die gegenüber der Kultur besser/ schlechter waren

^b semiquantitative Beurteilung (siehe Abschnitt 3.8.1)

^c nicht durchgeführt

^d nicht weiter differenziert

^e T.:Tage zwischen Laboreingang und Untersuchung der Mastitismilchprobe

4.6.2 Auswertung der Feldproben bezüglich der Savinasevorbehandlung

Es wurden die mikroskopisch nachweisbaren Erregermengen der Grampräparate, die vor und nach der Savinasebehandlung durchgeführt wurden, miteinander verglichen. Die Beurteilung erfolgte analog der Kategorien entsprechend Tabelle 2. Insgesamt wurden 50 Feldproben von Mastitisfällen ausgewertet (Tabelle 16). Bei einer Gesamtkeimzahl von unter 10^4 KBE/ml wurde in keiner Probe eine Anreicherung der Erreger durch die Savinasevorbehandlung festgestellt. Bei Bakterienmengen von 10^4 bis 10^6 KBE/ml konnte bei 79 % der untersuchten Proben ($n = 14$) eine Steigerung um eine Kategorie eruiert werden. Bei Milchproben, die einen Erregergehalt von über 10^6 KBE/ml aufwiesen, zeigte sich in 96 % der 24 Milchproben eine Anreicherung der Bakterien, bei drei dieser Proben konnte eine Verbesserung um zwei bis drei Kategorien erreicht werden.

Tab. 16 Ergebnisse der Savinasevorbehandlung der untersuchten Mastitismilchproben

GKZ ^a (KBE/ml)	Anzahl der untersuchten Proben	Anstieg der mikroskopisch nachweisbaren Bakterienmenge durch die Savinasebehandlung der Milch ^b			
		kein	eine Kategorie	zwei Kategorien	drei Kategorien
$<10^3$	6	6	0	0	0
$1-9 \times 10^3$	6	6	0	0	0
$1-9 \times 10^4$	5	1	4	0	0
$1-9 \times 10^5$	9	2	7	0	0
$1-9 \times 10^6$	9	1	6	1	1
$1-9 \times 10^7$	7	0	6	1	0
$1-9 \times 10^8$	6	0	6	0	0
$1-9 \times 10^9$	2	0	2	0	0

^a GKZ: Gesamtkeimzahl

^b Vergleich zweier Präparate nach Gram gefärbt, mit und ohne Savinasebehandlung von Milchproben, beurteilt entsprechend den Kategorien in Tab. 2

4.6.3 Ermittlung der Nachweisgrenze bei Feldproben

Für die Ermittlung der Nachweisgrenze wurden 103 untersuchte Feldproben von Mastitisfällen herangezogen (Tabelle 17). Bei einer Gesamtkeimzahl von unter 10^4 KBE/ml konnte die FISH in einer von 15 Proben den Erreger detektieren. Eine Nachweisbarkeit von ca. 80 % wurde bei den Proben erreicht, die eine Bakterienmenge zwischen 10^4 und 10^6 KBE/ml aufwiesen. Bei 66 Proben, die 10^6 KBE/ml und mehr Erreger enthielten, erreichte die FISH eine Nachweisbarkeit von mindestens 94 %.

Tab. 17 Quantitative Nachweisbarkeit von Bakterien in den untersuchten Mastitismilchproben

GKZ ^a (KBE/ml)	Anzahl der Proben		Nachweisbarkeit (%)
	FISH positiv	getestet	
$< 10^3$	0	6	0
$1-9 \times 10^3$	1	9	11
$1-9 \times 10^4$	7	9	78
$1-9 \times 10^5$	11	13	85
$1-9 \times 10^6$	16	17	94
$1-9 \times 10^7$	25	25	100
$1-9 \times 10^8$	17	17	100
$1-9 \times 10^9$	7	7	100

^a GKZ: Gesamtkeimzahl

4.6.4 Einfluss der Zeit auf die Nachweisbarkeit von Erregern in Mastitismilchproben

Unterschiede zwischen der Untersuchung am Tag des Probeneingangs und einer Untersuchung nach 1 bis 19 Tagen sind zusammenfassend in Tabelle 18 dargestellt. Wertet man zur Evaluierung der Nachweisbarkeit von Erregern nach längerer Aufbewahrungszeit Mastitismilchproben mit einer Lagerung von 7 bis 19 Tage aus (Tabellen 14 und 15), konnten bei 14 von 21 Proben die Erreger ohne Unterschiede zur kulturellen Untersuchung nachgewiesen werden. Darunter waren zwei sieben Tage alte Proben, die *E. coli* bzw. *A. pyogenes* enthielten. Staphylokokken konnten in in bis zu 13 Tage alten Proben, Enterokokken in bis zu 12 Tage alten Proben und Streptokokken in bis zu 19 Tage alten Proben nachgewiesen werden. Andererseits konnte *E. coli* in drei zwischen sechs und zwölf Tage alten Proben mit der FISH nicht mehr detektiert werden.

Tab. 18 Vergleichende Auswertung der Ergebnisse von FISH und kultureller Untersuchung der Mastitismilchproben (n = 119) nach der Gesamtkeimzahl und der Zeit zwischen Eingang im Labor und FISH

Vergleich ^a		Tabelle		Anzahl Mastitismilchproben									
				Gesamt Tage		Gesamtkeimzahl (KBE/ml)						n.d. Tage	
						<10 ⁴ Tage		10 ⁴ -10 ⁵ Tage		>10 ⁶ Tage			
				0	1-19	0	1-19	0	1-19	0	1-19	0	1-19
Reinkulturen	F = A	14	1A	9	8	0	0	1	1	6	7	2	0
	F < A		2A	5	0	3	0	2	0	0	0	0	0
	F = A		1B	20	5	3	0	8	0	9	5	0	0
	F < A		2B	10	5	7	0	3	1	0	4	0	0
Mischkulturen	F = A	15	1A	6	9	0	0	0	0	5	9	1	0
	F > A		2A	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
	F < A		3A	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0
	F = A		1B	5	10	0	0	1	1	4	9	0	0
	F > A		2B	1	8	0	0	0	1	1	7	0	0
	F < A		3B	4	11	2	0	2	2	0	9	0	0
Summe				60	59	15	0	17	7	25	52	3	0

^a F = A: identische Ergebnisse in FISH und Anzucht; F < A: weniger Pathogene mit FISH als mit Anzucht nachgewiesen; F > A: mehr Pathogene mit FISH als mit Anzucht nachgewiesen
n. d.: nicht durchgeführt

5 Diskussion

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) ist eine Technik, mit der unter Zuhilfenahme molekularer Strukturen Bakterien mikroskopisch gleichzeitig nachgewiesen, identifiziert und auf ihre Lokalisation hin untersucht werden können (Moter und Göbel, 2000). Sichtbar gemacht werden die Bakterien durch die Bindung (Hybridisierung) von etwa 20 bp langen, Fluoreszenzfarbstoff-markierten Oligonukleotiden (Sonden) an komplementäre Sequenzabschnitte, die Teile der bakteriellen ribosomalen RNA umfassen. Da die rRNA unterschiedlich hoch konservierte Bereiche beinhaltet, können Sonden für den Nachweis von Bakterien auf verschiedenen taxonomischen Ebenen (häufig Stamm, Familie, Genus und Spezies) erarbeitet werden (Amann et al., 1995). Gelegentlich kann eine Sondenauswahl jedoch eingeschränkt sein, entweder durch eine nahe Verwandtschaft zweier Organismen, die dazu führt, dass keine ausreichend langen spezifischen Bereiche vorhanden sind oder durch eine fehlende Zugänglichkeit von geeigneten Bereichen aufgrund von Sekundär- und Tertiärstrukturen der rRNA (Ludwig et al., 2004). Da die FISH als ein Verfahren der direkten mikroskopischen Detektion eine einfach durchzuführende Methode ist, die nur einen geringen apparativen Aufwand erfordert und niedrige Verbrauchskosten verursacht (Oliveira et al., 2004), wurde sie auf vielen Gebieten der Mikrobiologie in den vergangenen Jahren zunehmend eingesetzt (Jensen et al., 2007; Nordhoff et al., 2008; Poppert et al., 2009). Ein weiterer Vorteil der FISH ist der Nachweis von nicht kultivierbaren, aber lebensfähigen Bakterien *in situ*, weswegen sie zur Charakterisierung von Bakterienpopulationen Verwendung findet (Urdaci et al., 2008). Darüberhinaus beansprucht die FISH nur eine kurze Zeitdauer von weniger als einem halben Arbeitstag bis zum Erhalt eines Ergebnisses, weshalb die Methode auch Anwendung bei der schnellen, vorläufigen Erregeridentifizierung in klinischen Probenmaterialien findet (Wellinghausen et al., 2007). Eine Einschränkung kann die FISH erfahren, da nur stoffwechselaktive Bakterien nachgewiesen werden können, was zum Beispiel bei einer verzögerten Untersuchung von Probenmaterialien zu falschnegativen Ergebnissen führen kann (Moter und Göbel, 2000). Um falschnegative Ergebnisse bei einer erregerspezifischen Identifizierung auszuschließen, wurde schon zu Beginn der Etablierung der FISH eine Sonde (EUB 338) erarbeitet (Amann et al., 1990), die klassenübergreifend alle relevanten Eubakterien erkennt und als Kontrolle der korrekten Durchführung mitgeführt werden sollte. Eine weitere Limitierung ist die eingeschränkte Suchmöglichkeit bei unbekanntem Erregerspektrum, da nicht beliebig viele Sonden in einem Untersuchungsgang kombiniert beziehungsweise eingesetzt werden können. Es können folglich nur Erreger nachgewiesen werden, für die die entsprechenden Sonden verwendet werden. Die FISH

eignet sich daher vor allem zur Verifikation eines bestehenden Verdachts oder zur Abklärung einer Fragestellung bei einem begrenzten Erregerspektrum.

Trotz dieser Einschränkungen hat sich die FISH seit einigen Jahren auf vielen Gebieten der Mikrobiologie bewährt. Sie wurde in der Tiermedizin vor allem zur Charakterisierung von Bakterienpopulationen im Rahmen der Grundlagenforschung und für den Nachweis von Erregern im Gewebe, auch im klinischen Zusammenhang, eingesetzt (Jensen et al., 2007; Nordhoff et al., 2008; Schlafer et al., 2008). In der Humanmedizin wird die FISH zusätzlich in der klinischen Diagnostik, zum Beispiel zur schnellen Identifizierung von Pathogenen in Blutkulturen, erfolgreich verwendet (Kempf et al., 2000; Poppert et al., 2005).

Obwohl die Methode, wie beschrieben, sowohl eine schnelle und einfache Identifizierung kultivierter Erreger als auch den Erregernachweis direkt aus dem Material ermöglicht, hat sie in der veterinärmedizinischen Routinediagnostik bisher keine weite Verbreitung gefunden. Von besonderem Interesse könnte die FISH sein, wenn herkömmliche Methoden der Speziesidentifizierung an ihre Grenzen stoßen und andere moderne Alternativen zur Identifizierung wie die Massenspektrometrie oder die Amplifikation spezifischer Genombereiche über eine PCR mit eventueller anschließender Sequenzierung generell oder im jeweiligen Labor nicht zur Verfügung stehen (Schweickert et al., 2004).

5.1 Etablierung einer FISH-Sonde für *H. parasuis*

Der Erreger der Glässerschen Krankheit der Schweine, *H. parasuis*, wurde in der Vergangenheit mittels kultureller, mikroskopischer und biochemischer Methoden untersucht (Raßbach et al., 1994), wird aber heutzutage üblicherweise durch eine PCR identifiziert (Jung und Chae, 2004). Der PCR geht in der Regel eine mehrtägige kulturelle Anzucht voraus. Sofern die PCR im Hause durchgeführt werden kann, benötigt die Untersuchung ein bis zwei Tage. Muss die PCR außer Haus durchgeführt werden, sind damit ein zusätzlicher zeitlicher Aufwand und Kosten verbunden. Die Verwendung einer FISH-Sonde könnte für viele Laboratorien eine einfache und schnelle alternative Methode der Identifizierung darstellen. Es wurde daher in dieser Arbeit die Etablierung einer spezifischen Sonde für *H. parasuis* angestrebt.

Die Spezifität der Bindung von Sonden wird neben der Sequenz auch durch die Temperatur während der Hybridisierung sowie den Einsatz unterschiedlicher Konzentrationen von Formamid im Hybridisierungspuffer beeinflusst (Niemann, 1999a). Die meisten der bisher publizierten Sonden wurden bei einer Formamidkonzentration von 30 % und einer Temperatur von 46 °C eingesetzt. Ein Ziel der Sondenetablierung war es daher, Sonden zu entwickeln, die bei diesen Bedingungen verwendet und damit untereinander kombiniert

werden können. Bei der Untersuchung von zunächst zwei Sondenkandidaten (HPS 1435 und HPS 1436) mit verschiedenen Formamidkonzentrationen erwies sich der um zwei Nukleotide kürzere Kandidat, HPS 1435, bei 46 °C als nicht geeignet für die Erkennung der Zielspezies. Die Ursache für die überwiegend schlechte, aber auch zwischen verschiedenen Stämmen und Versuchen schwankende Bindung (Tabelle 4, Seite 41) liegt möglicherweise darin begründet, dass die angewendete Temperatur von 46 °C für die Sonde zu hoch war. In der Literatur wird angegeben, dass eine geeignete Hybridisierungstemperatur im optimalen Fall 5 °C unter der Schmelztemperatur liegen sollte (Hoff et al., 2007). Da es sich bei HPS 1435 um eine kurze Sonde mit einem niedrigen GC-Gehalt handelt, wies die Sonde eine deutlich niedrigere Schmelztemperatur auf. Ob HPS 1435 bei niedrigeren Hybridisierungstemperaturen bessere Hybridisierungseigenschaften zeigen würde, wurde aufgrund der Verfügbarkeit eines weiteren Sondenkandidaten nicht untersucht.

Dieser zweite Sondenkandidat HPS 1436 zeigte bei den angestrebten Bedingungen eine gute Hybridisierung mit der Zielspezies. Da bei Sequenzvergleichen festgestellt wurde, dass eine Reihe anderer Bakterienspezies nur einen Basenaustausch im Bereich der Sonde aufwies, wurde bei allen Versuchen ein sogenannter Kompetitor eingesetzt. Dabei handelt es sich um ein zu den Nicht-Zielspezies komplementäres Oligonukleotid, das unter stringenten Bedingungen bevorzugt an die Nicht-Zielspezies bindet und durch das Fehlen einer Fluoreszenzmarkierung falschpositive Signale verhindert (Poppert et al., 2009). Hat man einen für die Zielspezies geeigneten Kandidaten gefunden, wird im Rahmen einer Sondenevaluierung die Spezifität der Sonde überprüft, indem sowohl epidemiologisch nicht verwandte Stämme der Zielspezies als auch Stämme von Spezies, die im Bereich der Sonde wenige Basenaustausche aufweisen, taxonomisch verwandt sind oder im gleichen Probenmaterial vorkommen, untersucht werden. Bei diesen Untersuchungen konnte mit 61 über die PCR (Oliveira et al., 2001; Jung und Chae, 2004) identifizierten Stämmen von *H. parasuis* und 52 Stämmen von Nicht-Zielspezies gezeigt werden, dass HPS 1436 alle *H. parasuis*-Stämme erkannte und keine Kreuzreaktionen mit den getesteten Nicht-Zielspezies aufwies (Tabelle 7, Seite 45). Eine Ausnahme stellte teilweise *Histophilus somni* dar, bei dem für die zwei untersuchten Stämme eine schwache, jedoch nicht mit einem positiven Signal verwechselbare, Fluoreszenz beobachtet wurde. Es resultierte damit aus den Ergebnissen eine nahezu optimale Sensitivität und Spezifität der Sonde, die für die Identifizierung von *H. parasuis* prinzipiell als geeignet beurteilt wurde.

Einschränkend ist anzumerken, dass nur verhältnismäßig wenige Stämme von verwandten Spezies (z.B. *Histophilus somni* und weitere *Haemophilus* spezies) untersucht werden

konnten. Beim Einsatz von HPS 1436 in der Diagnostik fiel nach Abschluss der Sondenetablierung im Rahmen dieser Arbeit zudem auf, dass einige *H. parasuis*-verdächtige Stämme negativ reagierten. Für einige derartige Stämme konnten die Ergebnisse der FISH mittels der sonst üblichen PCR (Jung und Chae, 2004) bestätigt werden. Dies sollte jedoch noch mit weiteren Stämmen und unter Verwendung zusätzlicher Identifizierungsmethoden [zum Beispiel der 16S-rRNA-Sequenzierung oder Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight-Massenspektrometrie (MALDI TOF-MS)] abgesichert werden. Können die bisher vorliegenden Ergebnisse verifiziert werden, stellt die FISH zur *H. parasuis*-Identifizierung eine sinnvolle Alternative zur aufwändigeren PCR dar. Die Erprobung der Sonde für den Direktnachweis im Material wäre eine weitere Option für zukünftige Untersuchungen. Notwendig hierfür wäre allerdings ein schneller Transport des Materials ins Labor, da *H. parasuis* als empfindliche Spezies schnell an Vitalität verliert (Raßbach, 1994), woraus eine Reduktion der Ribosomen und folglich eine verminderte Nachweisbarkeit resultiert. Eine Möglichkeit zur Umgehung dieses Problems könnte die Fixierung des Materials vor Ort sein, wodurch die Erreger für einen Nachweis erhalten blieben.

5.2 FISH-Sonden zur Identifizierung von *S. uberis* und *A. pyogenes*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Ergebnisse zur Evaluierung der Sondenkandidaten SUB 196 für *S. uberis* und APYO 183 für *A. pyogenes* erarbeitet. Hintergrund der Arbeiten zu *S. uberis* ist die kulturell-morphologische Ähnlichkeit von pathogenetisch unterschiedlich beurteilten Bakterien aus den Genera *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* und *Aerococcus* (Devriese et al., 1999). Eine Unterscheidung von alphahämolyisierenden *S. uberis*-Stämmen zu Enterokokken, Laktokokken und Aerokokken (die letzteren Genera werden eher als gering pathogen eingestuft) ist auf nicht selektiven Platten auch mit anschließender Gramfärbung und einfachen biochemischen Reaktionen (Nachweis von Katalase) nicht möglich. Die Abgrenzung nach der Fähigkeit zur Äskulinspaltung kann zur Differenzierung von Streptokokkenspezies Verwendung finden, nicht aber zur Abgrenzung äskulinpositiver Spezies zu den erwähnten anderen Genera (Devriese et al., 1999). Der Einsatz weiterer biochemischer Parameter zur Differenzierung ist möglich, aber aufwändig und wird daher in der Routinediagnostik nicht immer durchgeführt. Wichtig ist eine Differenzierung von äskulinpositiven Streptokokken zu Enterokokken unter anderem, da sich diese Erreger in ihrem Resistenzspektrum unterscheiden. Enterokokken weisen eine Resistenz gegenüber Penicillin G und häufig einer Reihe weiterer Wirkstoffe auf, während bei äskulinpositiven Streptokokken zwar gelegentlich erhöhte minimale Hemmkonzentrationen gegenüber

Betalaktam-Antibiotika auftreten (Kaspar, 2008), aber generell eine höhere Empfindlichkeit als bei Enterokokken vorhanden ist. Äskulinnegative Streptokokken sind hingegen überwiegend hochempfindlich und darüberhinaus auch epidemiologisch häufig anders (nicht umweltassoziiert) zu beurteilen.

Bei dem zweiten Erreger, für den eine FISH-Sonde etabliert werden sollte, handelt es sich um ein coryneformes, teilweise auch kokkoides, katalasenegatives, grampositives Stäbchen. *A. pyogenes* ist kulturell-morphologisch von schlecht wachsenden hämolysierenden Streptokokken gelegentlich schwer zu unterscheiden. Zudem sind inzwischen acht weitere Spezies des Genus bekannt, die teilweise morphologisch sehr ähnlich sind und ebenfalls aus pyogenen Infektionen bei Rindern oder Schweinen isoliert werden können (Azuma et al., 2009). Bezüglich der antibiotischen Therapie stellt *A. pyogenes* kein Problem dar, da bisher keine Resistenzen gegenüber Penicillin G beobachtet wurden (Werckenthin et al., 2007), jedoch ist aufgrund der Abszessbildung eine schnelle Therapie anzuraten, die bei Kenntnis der Identität des Erregers mittels Penicillin G vorgenommen werden könnte, ohne dass auf Breitspektrumantibiotika zurückgegriffen werden müsste. Auch für *A. pyogenes* ist eine biochemische oder kulturelle (Löffler-Serum) Identifizierung möglich; diese erfordert aber aufgrund des langsamen Wachstums des Erregers mehrere Tage. Eine schnelle Bestätigung der Verdachtsdiagnose mittels FISH wäre vor diesem Hintergrund für beide Spezies hilfreich und könnte als Ergänzung oder Alternative zu herkömmlichen Methoden eine frühzeitige Identifizierung des Erregers noch am Tag der ersten Anzucht ermöglichen.

Alle überprüften 46 Stämme der Spezies *S. uberis* reagierten bei 30 % Formamid und 46 °C eindeutig positiv mit dem Sondenkandidat SUB 196. Kreuzreaktionen mit den anderen getesteten Spezies wurden nicht beobachtet. Als Nicht-Zielspezies wurden Stämme aus zehn verschiedenen Streptokokkenspezies, sechs Spezies von Enterokokken und Laktokokken sowie Stämme weiterer Erreger, die aus den gleichen klinischen Bildern wie *S. uberis* gefunden werden, überprüft. Die Sonde wurde daher als geeignet für eine sichere Identifizierung von *S. uberis* angesehen und in weiteren Versuchen zum Direktnachweis von *S. uberis* in Mastitismilchproben eingesetzt.

Für den Sondenkandidaten APYO 183 ergab sich ein etwas anderes Bild. Zwar wurden alle 39 untersuchten *A. pyogenes*-Stämme zuverlässig erkannt, aber auch zwei andere Spezies (*A. bialowiezense* und *A. bonasi*) reagierten bei 30 % Formamid eindeutig positiv. Zusätzlich konnte für die humanpathogene Spezies *A. haemolyticum* sowie für *A. phocae* eine schwächere, aber positive Reaktion beobachtet werden. Alle vier Spezies weisen im Bereich der Sonde eine Abweichung von einem Basenpaar auf, die sich jedoch für *A. bialowiezense* und

A. bonasi einerseits sowie *A. haemolyticum* und *A. phocae* andererseits an einer anderen Position befindet. Auch die im letzten Jahr neu beschriebene Spezies, *A. abortisuis* (Azuma et al., 2009), besitzt nach den Literaturangaben den gleichen Basenaustausch wie *A. haemolyticum*. Da zu Beginn der Arbeit von diesen fünf Spezies nur die Sequenzen für *A. haemolyticum* und *A. phocae* bekannt waren, wurde ein Kompetitor hergestellt und eingesetzt, der eine Kreuzbindung von APYO 183 an diese Spezies minimiert. Die unterschiedlichen Reaktionen der vier Spezies mit APYO 183 bei Verwendung des Kompetitors und verschiedenen Formamidkonzentrationen (Tabelle 6, Seite 44) sind hierdurch zu erklären. Alle auftretenden Kreuzreaktionen, auch die mit *A. bialowiezense* und *A. bonasi*, konnten durch eine Erhöhung der Formamidkonzentration im Hybridisierungspuffer auf 50 % verhindert werden. Da zudem alle kreuzreagierenden Spezies bisher nicht oder nur sehr selten in der veterinärmedizinischen Diagnostik beschrieben worden sind (Lehnen et al., 2006), wurde die Sonde dennoch als geeignet für den Einsatz zur Identifizierung von *A. pyogenes* aus klinischem Material beurteilt und bei den weiteren Untersuchungen an Mastitismilchproben eingesetzt. Das Vorkommen möglicher Kreuzreaktionen muss jedoch bei einem Einsatz zur Identifizierung kultivierter Bakterien, insbesondere bei Proben von Schweinen und Wildwiederkäuern, unbedingt berücksichtigt werden (Einsatz von 50 % Formamid im Hybridisierungspuffer oder Entwicklung eines weiteren Kompetitors).

Bei der Etablierung der Sonden wurde auch untersucht, in wieweit die Hybridisierungszeiten verkürzt und somit der Zeitaufwand für die Identifizierung verringert werden könnte. Hierbei zeigte sich, dass bei den untersuchten Erregern (*S. agalactiae*, *S. canis*, *S. uberis* und *E. faecalis*) die Hybridisierungszeit ohne Sensitivitätsverlust auf 45 Minuten reduziert werden konnte. Zu beachten ist jedoch, dass in diesen Versuchen mit Bakterien in einem optimalen Wachstumszustand gearbeitet wurde. Wird eine verkürzte Hybridisierungszeit an Feldisolaten eingesetzt, die sich möglicherweise in einem weniger optimalen Zustand befinden, sollte als Kontrolle, dass eine ausreichende Zeit hybridisiert wurde, der kombinierte Einsatz der spezifischen Sonden mit der Eubakterien-Sonde EUB 338 herangezogen werden. Zeigt diese Sonde bei einer verkürzten Hybridisierungszeit eine deutliche Fluoreszenz, kann die Durchführung als valide angesehen und die Fluoreszenzintensität der spezifischen Sonde als aussagekräftig bewertet werden.

Um abzuklären, ob sich in der Humanmedizin evaluierte Sonden auch für die Identifizierung bisher nicht getesteter veterinärmedizinischer Spezies eignen, wurden die neun entsprechenden verwendeten Sonden mit zehn bis fünfzehn Spezies aus der Veterinärmedizin untersucht (Ausnahme Sonde „Straga“; Tabelle 1, Seite 20). Alle Sonden erwiesen sich in

dieser Hinsicht als einsetzbar, da keine falschpositiven oder falschnegativen Reaktionen beobachtet wurde (Tabelle 10, Seite 50).

5.3 Einsatz der FISH für die Diagnostik von Mastitismilchproben

Neben der Etablierung neuer Sonden zur Identifizierung bestimmter Erreger sollte im Rahmen dieser Arbeit als ein zweiter Schwerpunkt überprüft werden, in wieweit sich die FISH zum Direktnachweis von Erregern in Mastitismilchproben eignet. Dazu wurden die beiden evaluierten Sonden SUB 196 und APYO 183 sowie die neun oben erwähnten, bereits publizierte Sonden eingesetzt. Der Nachweis folgender häufig vorkommender Mastitiserreger wurde durch die eingesetzten Sonden abgedeckt: Streptokokken, Enterokokken und Staphylokokken als Genusidentifizierung speziesübergreifend, Enterobacteriaceae als Familie und speziesspezifisch *S. uberis*, *S. agalactiae*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *S. aureus*, *A. pyogenes* und *E. coli*.

5.3.1 Vorversuche, Einfluss einer Vorbehandlung der Milch und Nachweisgrenze

Vor Beginn der eigentlichen Arbeiten wurde zunächst untersucht, ob sich Mastitismilchproben generell als Untersuchungsmaterial für die FISH eignen. Es konnte festgestellt werden, dass eine Autofluoreszenz in den untersuchten Milchproben sowohl ohne Hybridisierung mit markierten Sonden als auch später im Rahmen der standardmäßig durchgeführten Methode nicht auftrat. Als größeres Problem stellte sich die oft sehr flockige bis klumpige Konsistenz von Milchproben, insbesondere bei akuten Mastitiden, dar. Solche Proben enthalten neben den generell vorhandenen Milchbestandteilen an Proteinen und Fetten oft zusätzlich eine signifikante Menge an Immunzellen, Immunglobulinen und Fibrin. Da diese Bestandteile eine Homogenisierung der Proben und ein gleichmäßiges Aufbringen auf den Objektträger erschwerten, wurde eine Methode zur Aufarbeitung von Milchproben gesucht.

Für die Etablierung der Methode konnte auf eine bereits publizierte Methode zur Vorbehandlung von Milch aufgebaut werden (Gunasekera et al., 2003a; Gunasekera et al., 2003b). Als weiteren Grund für eine Aufarbeitung von Milchproben geben diese Autoren an, dass Proteine und Fettmoleküle unspezifische Bindungen mit den Fluoreszenzfarbstoffen von Sonden eingehen können und so den Erregernachweis beeinträchtigen (Gunasekera et al., 2000). Gunasekera et al. (2003a; 2003b) setzen in ihren Studien zum Nachweis von fluoreszenzmarkierten Bakterien mittels Durchflusszytometrie das Enzym Savinase ein, um eine Reduktion der Proteine in Milchproben zu erreichen. In Gunasekera et al. (2003a) wurde zur Entfernung von die Hybridisierung störenden Proteinen eine Inkubation des

Probenmaterials mit Savinase (1 µl/100 µl Milch) durchgeführt, der Ansatz 1:10 mit NaCl verdünnt und im Anschluß zur Eliminierung enthaltener Fettbestandteile ein Zentrifugation bei 10.000 xg für fünf Minuten vorgenommen. Diese Methode wurde adaptiert und angewendet. Die erarbeiteten Modifikationen beinhalteten eine zusätzliche mechanische Homogenisierung als ersten Schritt, eine längere Zentrifugationszeit und einen zusätzlichen Waschschrift. Nach dieser Vorbehandlung waren die Milchproben klar und das Pellet bestand fast ausschließlich aus Bakterien. Die Kontrolle des Einflusses der Savinase erfolgte über Gramfärbungen, die vor und nach der enzymatischen Behandlung angefertigt wurden. Es wurden für die Auswertung des Savinaseeffektes sowohl Daten aus Vorversuchen mit gespikten Milchproben (Tabelle 12, Seite 54) als auch Daten aus den späteren eigentlichen Versuchen an Feldproben (Tabelle 16, Seite 66) herangezogen. Ein positiver Effekt der enzymatischen Aufbereitung wurde in beiden Probenmaterialien in nahezu dem gleichen Umfang beobachtet. Folgende Aussagen können getroffen werden: Beinhaltet eine Milchprobe Bakterien in einer Gesamtkeimzahl unter etwa 10^4 KBE/ml, sind diese generell schwer zu detektieren und auch eine Konzentration durch den Einsatz der Savinase kann aufgrund der geringen Mengen nur in Ausnahmefällen zu einer Wiederfindung der Bakterien im mikroskopischen Präparat führen. Dies ist nicht unbedingt verwunderlich, wenn man berücksichtigt, dass sich bei einer Gesamtkeimzahl von 10^4 KBE/ml nur 5000 KBE in den eingesetzten 500 µl Milch befinden. Diese wurden nach Zentrifugation in 100 µl aufgenommen und davon wurden 10 µl auf ein Objektträgerfeld mit 8 mm Durchmesser aufgetragen. Geht man davon aus, dass sich in diesem Feld bei einer 630-fachen Vergrößerung ca. 50 Gesichtsfelder befinden, so wären in einem Gesichtsfeld rein rechnerisch zehn Bakterien zu detektieren. Diese Tatsache wird auch bei Amann et al. (1995) beschrieben. Da davon auszugehen ist, dass durch die Bearbeitung einige Bakterien verloren gehen, eventuell ungleichmäßig verteilt werden oder nicht immer lysiert bzw. von der Sonde erreichbar sind, ist es naheliegend, dass selbst bei einer optimalen Aufarbeitung mittels Savinase Proben mit so geringen Erregermengen als negativ beurteilt werden können. Hingegen trat ab einer Bakterienkonzentration von etwa 10^4 bis 10^5 KBE/ml ein deutlicher Effekt auf, der als eine Verbesserung um eine Stufe der mikroskopischen Skalierung (Tabelle 12, Seite 54) beurteilt wurde. Bei Milchproben, die mehr als 10^6 KBE/ml enthielten, was bei akuten Mastitisproben häufig der Fall ist (Krömker, 2007), konnte der Effekt einer Konzentration durch die Savinasebehandlung in jeder Probe nachgewiesen und teilweise als sehr deutlich (mehr als eine Stufe) befundet werden.

Ein mit dem zuvor Gesagten in Zusammenhang stehender weiterer Aspekt bei der Untersuchung der Milchproben war die Ermittlung einer Nachweisgrenze für die enthaltenen Bakterien. Hierfür wurde in Vorversuchen zunächst pasteurisierte Milch mit verschiedenen Erregern (*S. aureus*, *E. faecalis* und *E. coli*) künstlich kontaminiert, die Gesamtkeimzahl bestimmt, ein Aliquot aufgearbeitet und mittels FISH untersucht (Tabelle 13, Seite 55). Unter einer Gesamtkeimzahl von 10^4 KBE/ml konnten, wie oben beschrieben, Bakterien nur selten nachgewiesen werden (in zwei von 12 untersuchten Proben). Bei einem Bakteriengehalt von 10^4 bis 9×10^5 KBE/ml konnten mittels FISH in zwei Drittel der Proben die enthaltenen Mikroorganismen nachgewiesen werden. Eine zuverlässige Detektion der Erreger in den künstlich kontaminierten Milchproben war ab einer Gesamtkeimzahl von mehr als 10^6 KBE/ml möglich. Eine ähnliche analytische Sensitivität wurde mit einer unteren Grenze von 10^4 KBE/ml auch von Gunasekera et al. (2003b) für künstlich kontaminierte ultrahocherhitzte Milch beschrieben. Vergleicht man diese Nachweisgrenze mit Werten, die für den Erregernachweis aus Milchproben mittels PCR publiziert wurden, so kann festgestellt werden, dass bei Einsatz von Milch direkt in die PCR ebenfalls minimale Konzentrationen von 10^4 bis 10^6 KBE/ml angegeben werden (Riffon et al., 2001; Gillespie und Oliver, 2005; Chiang et al., 2007). Als Grund hierfür werden vor allem inhibitorische Substanzen im Material Milch angegeben (Yamagishi et al., 2007). In einigen Publikationen wurden daher Verdünnungen der Milch mit anschließender Voranreicherung von einigen Stunden bis hin zu Tagen durchgeführt. Anschließend konnten mittels PCR Bakterienkonzentrationen von unter 10 KBE/ml in der Ausgangsmilch nachgewiesen werden (Phuektes et al., 2001a; Yamagishi et al., 2007; Chiang et al., 2007). Dies kann zwar sinnvoll sein (zum Beispiel bei der Suche von Tieren, die *S. aureus* in sehr geringen Mengen ausscheiden), spielt aber für eine diagnostische Untersuchung von klinischen Mastitisfällen keine Rolle. Der hier im Vordergrund stehende Vorteil einer direkten Untersuchung, nämlich der Zeitvorteil gegenüber kulturellen Methoden, wird durch die Dauer der Anreicherung fast oder komplett aufgehoben. Demnach wäre die FISH der PCR bezüglich der Nachweisgrenze bei der direkten Erregerdetektion aus dem Material Milch gleichzusetzen. Da darüberhinaus in klinischen Proben akuter Mastitiden in der Regel mehr als 10^6 KBE/ml der Erreger vorhanden sind (Krömker, 2007; Taponen et al., 2009), stellt die untere Nachweisgrenze von 10^4 KBE/ml der FISH keinen Hinderungsgrund für einen diagnostischen Einsatz der FISH in diesen Fällen dar. Dies wurde bei der Auswertung der FISH-Ergebnisse im Vergleich zur Gesamtkeimzahl hinsichtlich der Nachweisgrenze bei 103 Viertelgemelksproben aus klinischen Fällen bestätigt (Tabelle 17, Seite 67). Die FISH detektierte wiederum Proben mit einem Gehalt von unter 10^4

vereinzelt, von 10^4 bis 10^6 KBE/ml in etwa 82 % der Fälle und alle Proben mit einem höheren Bakteriengehalt mit einer Ausnahme. Eine einzige Probe mit einer Gesamtkeimzahl knapp über 10^6 KBE/ml wurde in der FISH negativ gewertet, weil sie bei der mikroskopischen Untersuchung ein nur schwach positives Signal zeigte. Mögliche Ursache könnte hier sein, dass eine „Vorschädigung“ des Erregers (antibiotische Therapie?) zu einer Reduktion der Ribosomen und damit zu einem verminderten Fluoreszenzsignal geführt hat.

Eine weitere Senkung der Nachweisgrenze der FISH könnte theoretisch durch das Verwenden eines größeren Volumens an Milch, entweder am Beginn der Aufarbeitung oder bei der mikroskopischen Untersuchung nach Aufarbeitung erreicht werden. Dies würde jedoch die Handhabung deutlich erschweren, da bei Verwendung eines größeren Probenvolumens zum Beispiel nicht mehr mit 1,8 ml fassenden Reaktionsgefäßen gearbeitet werden könnte. Zudem lässt sich auf ein Untersuchungsfeld nur eine begrenzte Menge an Material auftragen, ohne dass es nach dem Trocknen zum Abplatzen desselben kommt. Daher wären im Fall der Untersuchung einer größeren Probenmenge nach Aufarbeitung die Verwendung von Objektträgern mit einem größeren Untersuchungsfeld und eine Heraufsetzung der Menge an Sonde, Puffer und gegebenenfalls Kompetitor notwendig. Dies führt zu höheren Kosten und zudem zu einem erhöhten Zeitaufwand für die mikroskopische Untersuchung, was insgesamt als nicht praxistauglich anzusehen ist.

5.3.2 Qualitative Beurteilung des Vergleichs von FISH und kultureller Untersuchung anhand von Feldproben

Im Anschluss an die beschriebenen Voruntersuchungen wurde die FISH an 119 Feldproben aus Fällen klinischer Mastitiden getestet und im Vergleich zur parallel durchgeführten kulturellen Untersuchung beurteilt. Die Ergebnisse beider Untersuchungsmethoden wurden sowohl qualitativ als auch quantitativ ausgewertet. Die zu Beginn der Arbeit untersuchten Proben ($n = 40$) wurden teilweise nicht mit allen (damals noch nicht) verfügbaren Sonden untersucht, sondern nur mit bestimmten Sonden, die nach dem Ergebnis der Gramfärbung ausgewählt wurden. Bei später untersuchten Proben wurde unabhängig vom verdächtigten Erreger der oben beschriebene festgelegte Satz von elf Sonden zuzüglich von EUB 338 als Kontrolle eingesetzt.

In 61 von 77 Proben mit einer nachgewiesenen Erregermenge von über 10^6 KBE/ml (79 %) wurden im Vergleich zur kulturellen Anzucht die gleichen Erreger nachgewiesen oder die FISH erkannte zusätzliche Genera oder Spezies („FISH gleich oder besser als Kultur“). Legt man einem Vergleich die 104 Proben mit einem Bakteriengehalt von mehr als 10^4 KBE/ml

(ermittelte Nachweisgrenze) zugrunde (einschließlich der drei Proben, für die die Gesamtkeimzahl nicht bestimmt wurde), betrug der Wert von „FISH gleich oder besser als Kultur“ 75 % (entsprechend 78 Proben). Für die Auswertung wurde „Übereinstimmung“ („FISH gleich Kultur“) definiert als qualitativ gleiches Ergebnis bezüglich des Genus bzw. der Spezies (je nach Sonde) und quantitativ gleiches Ergebnis mit einer maximalen Differenz von zwei „Stufen“ bei der semiquantitativen Beurteilung der Erregermenge (Tabelle 2, Seite 34). Zwei Stufen (von insgesamt fünf) wurden als „übereinstimmendes“ Ergebnis gewertet, da ein Unterschied von ein bis zwei Stufen in der Kultur bzw. dem mikroskopischen Präparat erfahrungsgemäß durch eine unterschiedliche Ausstrichtechnik verursacht werden kann. Hinzu kam, dass die Übergänge zwischen zwei Stufen fließend waren und durch eine subjektive Bewertung des Untersuchers leicht eine zusätzliche Verschiebung um eine Stufe hervorgerufen werden konnte, wenn sich die Anzahl der Erreger an den äußeren Grenzen einer Stufe bewegte. Alle Auswertungen wurden daher bewusst nur von einer Person durchgeführt.

In neun der oben genannten 78 Proben („FISH gleich oder besser als Kultur“) konnten mit der FISH Erreger nachgewiesen werden, die kulturell nicht nachweisbar waren („FISH besser als Kultur“). Zwei dieser neun Proben wiesen eine Gesamtkeimzahl von 10^5 KBE/ml auf, die restlichen lagen bei 10^6 KBE/ml und darüber. Der zusätzliche Nachweis betraf vor allem Bakterien mit einer ähnlichen Koloniemorphologie zu anderen in der Probe vorhandenen Erregern, zum Beispiel Streptokokken-Enterokokken-Laktokokken oder Staphylokokken-Mikrokokken. Die Ähnlichkeit in der Koloniemorphologie könnte dazu geführt haben, dass jeweils eine der vorhandenen Spezies bei der kulturellen Untersuchung übersehen worden ist. Ein anderer Grund könnte auch die „Überwucherung“ der jeweils kulturell „fehlenden“ Spezies durch andere Erreger gewesen sein. Dies kann vorkommen, wenn Bakterien, die große Kolonien bilden, Bakterien mit zarter Kolonienmorphologie überwuchern. Ebenso kann der Nachweis eines nur in geringer Menge vorkommenden Erregers durch das massenhafte Wachstum einer oder mehrere anderer Spezies beeinträchtigt sein. In solchen Fällen besitzt die FISH durch die Möglichkeit des Direktnachweises von Erregern im Material einen klaren Vorteil, da hier bessere Wachstumseigenschaften eines Erregers nicht zum Tragen kommen. Bei zwei Proben wurde mit der FISH sowohl ein zusätzlicher Erreger in geringer Menge nachgewiesen, als auch eine andere, kulturell reichlich nachgewiesene Spezies nur in deutlich geringerer Menge detektiert. Dies wurde aufgrund des großen quantitativen Unterschiedes als Versagen der FISH gewertet.

In 25 der 104 Proben (Gesamtkeimzahl mehr als 10^4 KBE/ml) zeigte die FISH Defizite im Nachweis der Erreger („FISH schlechter als Kultur“). Verschiedene Ursachen konnten hierfür festgestellt werden. Betrachtet man zunächst zusätzlich die bisher noch nicht aufgeführten 15 Proben, deren Erregergehalt unter der „Nachweisgrenze“ von 10^4 KBE/ml lag, so ist das negative Ergebnis der FISH hier in 12 Fällen wahrscheinlich auf die oben schon angesprochene Problematik der „physikalischen Grenzen“ der mikroskopischen Nachweisbarkeit zurückzuführen. Die Ursache liegt in diesen Fällen demnach in einer tatsächlich niedrigen Gesamtkeimzahl in den Milchproben, wie sie sich häufig bei subklinischen Mastitiden findet. In zwei der 15 Proben waren nicht geringe Erregermengen verantwortlich, sondern es wurden kulturell Mikroorganismen nachgewiesen, für die keine Sonden zur Verfügung standen. In der verbleibenden Probe (Nr. 134, Teil 1 B, Tabelle 14, Seite 59) ergab sich trotz einer geringen Gesamtkeimzahl ein positives Ergebnis mit der FISH.

Ein Problem mit einer zu geringen Menge von Erregern für einen Nachweis mittels FISH trat auch bei den Proben mit einer höheren Gesamtkeimzahl auf, wenn die Proben mehrere verschiedene Erreger in großen Mengen enthielten. Als Ursache kamen hier sowohl massive Kontaminationen des Probenmaterials als auch Mischinfektionen in Betracht. War ein bestimmter Erreger in derartigen Proben in sehr geringer Menge vorhanden, wurde er von der FISH nicht erkannt, während ein kultureller Nachweis (mehr oder weniger zufällig) gelang, weil eine auffällige Koloniemorphologie des geringgradig vorhandenen Bakteriums vorlag. Ein Beispiel für diese Problematik war Probe Nr. 75 (Teil 3 B, Tabelle 15, Seite 65), in der vereinzelt *S. aureus* in einer Mischkultur aufgrund der Hämolyse unter mäßig viel *S. uberis* kulturell nachgewiesen wurde, jedoch von der FISH nicht erkannt werden konnte. In diesem Fall lag die Menge des nicht nachgewiesenen Erregers sehr wahrscheinlich unter der Nachweisgrenze der FISH.

Ein weiterer Gesichtspunkt, der die Nachweisbarkeit eines Erregers beeinträchtigen kann, ist seine mangelnde Vitalität. Zum Beispiel können zu lange Aufbewahrungszeiten der Milchproben zu falschnegativen Ergebnissen führen. Dieser Parameter wurde in die Untersuchungen einbezogen, da es vorkommen kann, dass Proben erst nach einigen Tagen (zum Beispiel nach einem Wochenende) ins Labor versandt oder dort bearbeitet werden. Zudem werden in der Praxis nicht selten Milchproben vor einer Therapie entnommen und gelagert, aber erst bei Nicht-Ansprechen der Antibiose ins Labor versandt werden (Fehlings et al., 2009). Der Nachweis von Krankheitserregern, insbesondere von gramnegativen Stäbchen, gelang erwartungsgemäß umso schwerer, je mehr Zeit zwischen Probennahme und

Untersuchung lag. Um diesen Parameter zu evaluieren, wurden 21 Milchproben erst nach einer Lagerung von sieben bis neunzehn Tagen nach Laboreingang untersucht. Diese Zeit ist hinzuzurechnen zu einer Versandzeit von gewöhnlich ein bis zwei Tagen. In 14 der 21 untersuchten Proben ergab die FISH gegenüber der kulturellen Anzucht dennoch ein gleichwertiges Ergebnis. Der Nachweis von Erregern gelang in einzelnen Proben bei Enterokokken noch nach 12 Tagen, bei Staphylokokken nach 13 Tagen und bei Streptokokken nach 19 Tagen. *E. coli* und *A. pyogenes* konnten in Einzelfällen trotz einer zusätzlich vergangenen Zeit von sieben Tagen noch nachgewiesen werden, während die FISH den Nachweis von *E. coli* in fünf Proben, die zwischen sechs und 13 Tagen lagerten, verfehlte. Ebenso konnten Staphylokokken und Streptokokken in elf und zwölf Tage alten Proben nicht nachgewiesen werden. Daraus ist zu schließen, dass ein Nachweis von *E. coli* aus Milchproben, die ein Alter von mehr als fünf Tagen aufweisen, als unsicher anzusehen ist; grampositive Bakterien lassen sich einige Tage länger nachweisen. Es war zu folgern, dass ein Aufschub der Untersuchung von bis zu fünf Tagen die Ergebnisse der FISH nicht mehr beeinträchtigt, als dies bei einer kulturellen Untersuchung der Fall gewesen wäre.

Zuletzt können auch methodische Unregelmäßigkeiten den Erfolg der FISH beeinträchtigen. Beispielsweise führte eine unzureichende mechanische Homogenisierung der Probe, wie bei der Etablierung der Methode zur Vorbehandlung der Milch beschrieben, zu einem Abplatzen des Materials vom Objektträger, da sich das Material nicht gleichmäßig verteilen ließ. Methodische Probleme wurden bei den für die vorliegende Arbeit ausgewerteten Proben soweit wie möglich ausgeschlossen.

Bei insgesamt fünf Proben ließ sich ein Fehler der FISH bei der Detektion einiger Erreger weder durch eine geringe Bakterienmenge noch durch eine sehr verspätete Untersuchung oder durch methodische Fehler vollständig erklären. In zwei dieser Proben (Nr. 71, Teil 2 B, Tabelle 14, Seite 59; Nr. 24, Teil 3 B, Tabelle 15, Seite 64) wurden zwar die Erreger richtig erkannt (Staphylokokken bzw. Enterokokken), aber in einer sehr viel geringeren Menge als beim kulturellen Nachweis. Eine Erklärung für dieses Ergebnis könnte in einer Kombination von verschiedenen hemmenden Faktoren zu finden sein. Zum einen könnten die Bakterien durch Einflüsse vor der Probenentnahme (zum Beispiel einer zuvor durchgeführten Antibiotikabehandlung) oder durch unsachgemäße Probenentnahme, falsche Transportmedien oder einen verzögerten Transport weniger vital gewesen sein. Zum anderen könnte zusätzlich eine zeitliche Verzögerung vorgelegen haben, die nicht berichtet wurde. Bei zwei weiteren Proben wurde eine mäßige Anzahl der Spezies *E. hirae* in einer Mischkultur (Nr. 93, Teil 3 A, Tabelle 15, Seite 64) nicht detektiert oder es wurden deutlich weniger Enterokokken

nachgewiesen als bei der kulturellen Anzucht (Nr. 32, Teil 3 B, Tabelle 15, Seite 64). In einer letzten Probe hat die Sonde für Enterobacteriaceae die Anwesenheit von *H. alvei* in einer Probe nicht angezeigt (Nr. 92, Teil 3 A, Tabelle 15, Seite 64). Da die Sonde aber nach Kultivierung des Erregers eine positive Reaktion zeigte, liegt die Vermutung nahe, dass dieser bei der direkten Untersuchung der Milchprobe ein Defizit in seiner Vitalität aufwies.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die FISH bei der Untersuchung von Mastitismilchproben das kulturelle Bild sowohl qualitativ als auch quantitativ wiedergeben konnte. Die oben genannte Einschränkung bezüglich der Vitalität der Bakterien sollte sich durch eine sofortige Aufarbeitung nach Probeneingang weitgehend vermeiden lassen. Auch die ermittelte Nachweisgrenze sollte, wie erwähnt, bei akuten Mastitiden in der Regel nicht ins Gewicht fallen. Ob die bisher verfügbaren Sonden für einen Einsatz der Methode in der Routinediagnostik ausreichen, ist jedoch zu hinterfragen. Ebenso sollte diskutiert werden, ob der Vorteil einer vorläufigen Identifizierung eines Pathogens nach einem halben Arbeitstag ausreichend ist, um die Methode in ein Routinelabor zu integrieren.

Insgesamt erwies sich die FISH als unkomplizierte Untersuchungsmethode. Dies entspricht den Erfahrungen, die aus der humanmedizinischen Diagnostik berichtet wurden (Poppert et al., 2005; Poppert et al., 2009). Die FISH war einfach in der Durchführung und auch die Beurteilung der Präparate bereitete keine Schwierigkeiten. Es ist allerdings anzumerken, dass für die Beurteilung der Fluoreszenz in fraglichen Fällen Erfahrung bei der mikroskopischen Auswertung hilfreich ist. Aus den gewonnenen Erkenntnissen kann gefolgert werden, dass die FISH zwar nicht als Ersatz aller bisher eingesetzten Identifizierungsmethoden in der Routine zu empfehlen ist, dass sie jedoch eine kostengünstige und schnelle Alternative oder ergänzende Methode für die Identifizierung oder Differenzierung bestimmter Erreger (Beispiel *H. parasuis*) darstellen kann. Um die Methode für weitere Anwendungsgebiete interessant zu machen, wären für die Zukunft die Etablierung weiterer Sonden für veterinärpathogene Erreger und die Evaluierung an weiteren klinischen Probenmaterialien wünschenswert.

6 Zusammenfassung

Annerose Cordula Gey

Einsatz der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung zur Identifizierung ausgewählter veterinärpathogener Erreger

Im Vergleich zu konventionellen kulturellen Methoden kann die FISH in einem Schritt Bakterien detektieren und identifizieren. Die Methode ermöglicht Ergebnisse in zwei bis vier Stunden, sie ist leicht durchzuführen, kostengünstig und bedarf mit Ausnahme eines Fluoreszenzmikroskops keines besonderen Equipments. Ziel dieser Arbeit war es, Sonden für veterinärrelevante Erreger zu etablieren und die FISH als Methode für den Direktnachweis am klinischen Material am Beispiel von Mastitismilchproben einzusetzen. Es wurden Sondenkandidaten für drei veterinärpathogene Erreger evaluiert. Für eine Identifizierung von *H. parasuis* wurden zwei Sondenkandidaten (HPS 1435 und HPS 1436) untersucht. Die kürzere Sonde HPS 1435 erwies sich als nicht geeignet. Hingegen resultierte die Sonde HPS 1436 bei den untersuchten Stämmen in einer Sensitivität und Spezifität von 100 %. Die Sonde kann zur Identifikation von *H. parasuis* eingesetzt werden, die Untersuchung zusätzlicher Stämme verwandter Spezies wäre jedoch wünschenswert. Für den Nachweis von *S. uberis* wurde die Sonde SUB 196 evaluiert. Sie wies für die untersuchten Spezies ebenfalls eine Sensitivität und Spezifität von 100 % auf und wurde in den weiteren Untersuchungen von Mastitismilchproben erfolgreich eingesetzt. Auch der Sondenkandidat APYO 183 für *A. pyogenes* erkannte alle Stämme der Zielspezies richtig. Allerdings zeigten auch vier andere Spezies des Genus *Arcanobacterium* (*A. haemolyticum*, *A. phocae*, *A. bialowiezense* und *A. bonasi*) bei den üblichen Reaktionsbedingungen ohne den Einsatz eines Kompetitors positive Reaktionen. Aus diesem Grund wurde für die zu Beginn der Arbeit publizierten Spezies *A. haemolyticum* und *A. phocae* ein Kompetitor etabliert. Zusätzlich wurden bereits publizierte Sonden auf ihre Tauglichkeit für die Veterinärmedizin überprüft, da diese Sonden größtenteils mit Spezies aus der Humanmedizin evaluiert worden sind. Es wurden vier genus- und sieben speziesspezifische Sonden untersucht. Dabei wurden weder falschpositive noch falschnegative Reaktionen beobachtet. Die Sonden wurden daher für die Evaluierung der FISH zum Direktnachweis von Erregern aus Mastitismilchproben ohne Einschränkung eingesetzt.

Für einen Einsatz der FISH an Milchproben wurde in Vorversuchen zunächst eine Methode zur Aufarbeitung der Proben unter Verwendung des Enzyms Savinase erarbeitet. In einem weiteren Vorversuch mit künstlich kontaminierten Milchproben wurde eine Nachweisgrenze

ermittelt. Die Ergebnisse zum Einfluss der Savinase und die ermittelte Nachweisgrenze wurden darüberhinaus auch an den untersuchten Feldproben überprüft. Ein Einsatz von Savinase führte durch die Anreicherung der vorhandenen Bakterien zu einer erhöhten Nachweisbarkeit der Erreger mit der FISH. Die Nachweisgrenze lag bei einer Gesamtkeimzahl von etwa 10^4 KBE/ml, wobei jedoch erst ab einer Menge von 10^6 KBE/ml alle Proben sicher detektiert wurden. Es wurden insgesamt 119 Mastitismilchproben quantitativ und qualitativ im Vergleich zur Kultur bewertet. Bei Proben, die am Tag des Eingangs bearbeitet wurden, und für die eine Gesamtkeimzahl über der Nachweisgrenze von 10^4 KBE/ml ermittelt wurde ($n = 42$), wurden in 83 % der Fälle mit der FISH qualitativ die gleichen oder sogar mehr Erreger als mit der kulturellen Untersuchung nachgewiesen. In diesen Fällen stimmte die Beurteilung von FISH und Kultur auch hinsichtlich der Erregermenge überein. In weiteren Proben wurden die Erreger mittels FISH entweder in einer deutlich geringeren Anzahl nachgewiesen oder aber aufgrund einer Erregermenge von nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze nicht detektiert. Bei Proben, die vor Durchführung der FISH einen bis mehrere Tage gelagert wurden, konnte immer noch in knapp 70 % der Fälle ein übereinstimmendes oder besseres Ergebnis mit der FISH erzielt werden. Die FISH eignet sich somit als diagnostisches Werkzeug für den Direktnachweis von Erregern aus Mastitismilchproben. Einschränkungen der Methode bestehen durch die begrenzte Verfügbarkeit geeigneter Sonden und die Notwendigkeit einer zeitnahen Untersuchung. Vor allem in akuten Fällen, in denen eine erhebliche Erregermenge zu vermuten ist, ist die Methode jedoch gut geeignet, um innerhalb weniger Stunden ein orientierendes Ergebnis zur Verfügung zu stellen.

7 Summary

Annerose Cordula Gey

Fluorescence *in situ* hybridization for the identification of selected veterinary pathogens

In contrast to conventional cultural methods, FISH is able to detect and identify bacteria in a single working step. The method provides results in two to four hours, is easy to perform, cost-saving, and does not require a special equipment except an epifluorescence microscope.

The aim of this study was the evaluation of newly designed FISH probes for three veterinary pathogens as well as the evaluation of FISH as a diagnostic tool for the direct examination of bovine mastitis milk samples.

For the pig pathogen *Haemophilus parasuis*, the probe candidate PS 1436 was successfully established. However, as only few strains of closely related species have been tested, further examinations are recommended. The probe candidate SUB 196, evaluated for the detection of *Streptococcus uberis*, detected all strains of *S. uberis* correctly positive, and all other species correctly negative. The probe was also used with success for the detection of *S. uberis* in mastitis milk samples. Similarly, the third probe candidate APYO 183 for *Arcanobacterium pyogenes* showed a good detection capacity for the target organism. However, four related arcanobacteria reacted false-positive. A competitor for two of these species was established successfully. The false-positive reactions of the other two species (*A. bialowiezense* and *A. bonasi*) could be prevented by the use of 50 % formamide in the hybridization buffer. Furthermore, nine previously published probes from human medicine were tested for their ability to detect species occurring predominantly in veterinary medicine. None of them showed any unexpected reaction. Therefore, these probes were applied to field mastitis samples, too.

In preliminary assays a previously published pretreatment for viscous mastitis milk samples was improved and the effect of an enzymatical treatment with savinase was assessed. An enhancement of the detectable number of bacteria was observed. Additionally, the detection limit for the identification of bacteria in commercial as well as mastitis milk samples was evaluated. Amounts of bacteria of 10^4 to 10^5 cfu/ml were detected in about 70 % of the samples tested whereas amounts of more than 10^6 cfu/ml resulted in every sample but one in an identical result of culture and FISH.

A total of 119 quarter milk samples were included in the comparative study of FISH versus culture. Of these, FISH was performed on the day of admission to the laboratory for 42 samples containing more than 10^4 cfu/ml. In 83 % of these cases FISH detected all searched-

for bacteria which were also identified with the cultural approach or even revealed the presence of additional pathogens. Moreover, not only the qualitative but also the quantitative evaluation of these samples generated the same results for FISH and culture. In some of the remaining probes FISH detected the same pathogens as the culture, but in lower amounts, and for most of the probes the failure of FISH could be explained with a low amount of bacteria just above the detection limit. A number of samples was not examined immediately but stored at 4 °C for one to several days, as may occur in daily routine. Even for these cases the same result of FISH and culture was observed in nearly 70 % of the samples. Consequently, FISH can be recommended for the direct detection of pathogens in milk samples, especially in acute cases of mastitis, as well as for the identification of cultured bacteria. Restrictions of the method are a limited spectrum of detectable pathogens due to missing FISH probes and the necessity of an examination as immediate as possible if clinical materials are tested directly.

8 Literaturverzeichnis

- Agerholm, J. S., Boye, M., and Aalbaek, B., 2007.** Ovine fetal necrobacillosis. *J. Comp. Pathol.* 136, 213-212.
- Aktan, S., and Salih, B. A., 2006.** Fluorescent in situ Hybridisation (FISH) for the detection of bacterial community in activated sludge from textile factories. *Environ. Technol.* 27, 63-69.
- Alber, G., 1999.** Autofluoreszenz. In: Wiesner, E., und Ribbeck, R. (Hrsg.): *Lexikon der Veterinärmedizin*, 4. Aufl., Enke Verlag, Stuttgart, 136.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J., 1997.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Amann, R. I., Binder, B. J. Olsen, R. J., Chrisholm, S. W., Devereux, R., and Stahl, D. A., 1990.** Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1919-1925.
- Amann, R. I., Ludwig W., and Schleifer K. H., 1995.** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143-169.
- Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, 2006.** Nachweis einer gentechnischen Veränderung von *Lactobacillus curvatus* in Rohwurst durch Amplifikation der veränderten DNA-Sequenz mit Hilfe der PCR (Polymerase Chain Reaction) und Hybridisierung des PCR-Produktes mit einer DNA-Sonde, L 08.00-44.
- Aznar, R., and Alarcón, B., 2003.** PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity. *J. Appl. Microbiol.* 95, 958-966.
- Azuma, R., Murakami, S., Ogawa, A., Okada, Y., Miyazaki, S., and Makino, T., 2009.** *Arcanobacterium abortisuis* sp. nov., isolated from a placenta of a sow following an abortion. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 1469-1473.

- Bangsow, T., Deutsch, U., Engel, H., Korfhage, C. und Löffert, D., 2007.** Polymerase-Kettenreaktion (PCR). In: Jansohn, M. (Hrsg.): Gentechnische Methoden, 4. Aufl., Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 153-188.
- Bentley, R. W., Leigh, J. A., and Collins, M. D., 1993.** Development and use of species-specific oligonucleotide probes for differentiation of *Streptococcus uberis* and *Streptococcus parauberis*. J. Clin. Microbiol. 31, 57-60.
- Blasco, L., Ferrer, S., and Pardo, I., 2003.** Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for *in situ* identification of wine lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Letters. 225, 115-123.
- Bohnert, J., Hübner, B., and Botzenhart, K., 2000.** Rapid identification of Enterobacteriaceae using a novel 23S rRNA-targeted oligonucleotide probe. Int. J. Hyg. Environ. Health 203, 77-82.
- Bojesen, A. M., Christensen, H., Nielsen, O. L., Olsen, J. E., and Bisgaard, M., 2003.** Detection of *Gallibacterium* spp. in chickens by fluorescent 16S rRNA *in situ* hybridisation. J. Clin. Microbiol. 41, 5167-5172.
- Boutrup T. S., Boesen, H. T., Boye, M., Agerholm, J. S., and Jensen T. K., 2010.** Early pathogenesis in porcine proliferative enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis*. J. Comp. Pathol. (2010),doi:10.1016/j.jcpa.2010.01.006
- Boye, M., Aalbaek, B., and Agerholm, J. S., 2006.** *Fusobacterium necrophorum* determined as abortifacient in sheep by laser capture microdissection and fluorescence *in situ* hybridization. Mol. Cell Probes 20, 330-336.
- Brakstad, O. G., Aasbakk, K., Maeland, J. A., 1992.** Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. J. Clin. Microbiol. 30, 1654-1660.
- Brown, T. A., 2002.** Gentechnologie für Einsteiger. 3. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 206-207.
- Chiang, Y.C., Fan, C.M., Liao, W.W., Lin, C.K., Tsen, H.Y., 2007.** Real-time PCR detection of *Staphylococcus aureus* in milk and meat using new primers designed from the heat shock protein gene *htrA* sequence. J. Food Prot. 70, 2855-2859.

- Chotár, M., Vidová, B., Godány, A., 2006.** Development of specific and rapid detection of bacterial pathogens in dairy products by PCR. *Folia Microbiol. (Praha)* 51, 639-646.
- Collado, M. C. and Sanz, Y., 2007.** Quantification of mucosa-adhered microbiota of lambs and calves by the use of culture methods and fluorescent in situ hybridization coupled with flow cytometry techniques. *Vet. Microbiol.* 121, 299-306.
- Collins, M. D., Jones, D., Schofield, G. M., 1982.** Reclassification of '*Corynebacterium haemolyticum*' (MacLean, Liebow & Rosenberg) in the genus *Arcanobacterium* gen.nov. as *Arcanobacterium haemolyticum* nom.rev., comb.nov. *J. Gen. Microbiol.* 128, 1279-81.
- Colombo, A. V., da Silva, C. M., Haffajee, A., and Colombo, A., P., 2007.** Identification of intracellular oral species within human crevicular epithelial cells from subjects with chronic periodontitis by fluorescence in situ hybridization. *J. Periodontal Res.* 42, 236-243.
- Cremonesi, P., Vimercati, C., Pisoni, G., Perez, G., Ribera, A. M., Castiglioni, B., Luzzana, M., Ruffo, G., and Moroni, P., 2007.** Development of DNA extraction and PCR amplification protocols for detection of *Mycoplasma bovis* directly from milk samples. *Vet. Res. Commun.* 31 Suppl 1, 225-227.
- DeLong, E. F., Wickham, G. S., and Pace, N. R., 1989.** Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* 243, 1360-1363.
- Devriese, L. A., Hommez, J., Laevens, H., Pot, B., Vandamme, P., and Haesebrouck, F., 1999.** Identification of aesculin-hydrolyzing streptococci, lactococci, aerococci and enterococci from subclinical intramammary infections in dairy cows. *Vet. Microbiol.* 70, 87-94.
- Ericsson, Unnerstad H., Lindberg, A., Persson, Waller K., Ekman, T., Artursson, K., Nilsson-Ost, M., and Bengtsson, B., 2008.** Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors. *Vet. Microbiol.* 137, 90-97.

- Fehlings, K., Zschöck, M., Baumgärtner, B., Geringer, M., Hamann, J., und Knappstein K. (Hrsg.), 2009.** Leitlinien Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen und Isolierung und Identifizierung von Mastitiserregern. 2. überarb. Aufl., Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., Fachgruppe "Milchhygiene", Sachverständigenausschuss "Subklinische Mastitis", Giessen.
- Forsman, P., Tilsala-Timisjärvi, A., Alatossava, T., 1997.** Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. *Microbiology* 143, 3491-3500.
- Gao, A., Odumeru, J., Raymond, M., Hendrick, S., Duffield, T., Mutharia, L., 2009.** Comparison of milk culture, direct and nested polymerase chain reaction (PCR) with fecal culture based on samples from dairy herds infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Can. J. Vet. Res.* 73, 58-64.
- Gillespie, B. E. und Oliver, S. P., 2005.** Simultaneous detection of mastitis pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by multiplex real-time polymerase chain reaction. *J. Dairy Sci.* 88, 3510-3518.
- Giovannoni, S. J., DeLong, E. F., Olsen, G. J., and Pace, N. R., 1988.** Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.* 170, 720-726.
- Gory, L., Millet, L., Godon, J. J., and Montel, M. C., 1999.** Identification of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus warneri* isolated from meat by fluorescent in situ hybridization with 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 225-228.
- Graber, H. U., Casey, M. G., Naskova, J., Steiner, A., and Schaeren, W., 2007.** Development of a highly sensitive and specific assay to detect *Staphylococcus aureus* in bovine mastitic milk. *J. Dairy Sci.* 90, 4661-4669.
- Gröhn, Y. T., Wilson, D. J., Gonzalez, R. N., Hertl, J. A., Schulte, H., Bennett, G., and Schukken, Y. H., 2004.** Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87, 3358-3374.

- Gunasekera, T. S., Attfield, P. V., and Veal, D. A., 2000.** A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1228-1232.
- Gunasekera, T. S., Dorsch, M. R., Slade, M. B., and Veal, D. A., 2003a.** Specific detection of *Pseudomonas* spp. in milk by fluorescence in situ hybridization using ribosomal RNA directed probes. *J. Appl. Microbiol.* 94, 936-945.
- Gunasekera, T. S., Veal, D. A., and Attfield, P. V., 2003b.** Potential for broad applications of flow cytometry and fluorescence techniques in microbiological and somatic cell analyses of milk. *Int. J. Food Microbiol.* 85, 269-279.
- Haas, M., Essig, A., Bartelt, E., and Poppert, S., 2008.** Detection of resistance to macrolides in thermotolerant *Campylobacter* species by fluorescence in situ hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 46, 3842-3844.
- Handeland, K., Boye, M., Bergsjø, B., Bondal, H., Isaksen, K., and Agerholm, J. S., 2010.** Digital necrobacillosis in Norwegian wild tundra reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). *J. Comp. Pathol.* (2010), doi:10.1016/j.jcpa.2009.12.018.
- Hayman, B., and Hirst, R., 2003.** Development of a semi-nested PCR for the improved detection of *Mycoplasma bovis* from bovine milk and mucosal samples. *Vet. Microbiol.* 91, 91-100.
- Hof, H. und Dörries, R., 2005.** *Medizinische Mikrobiologie*. 3. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart.
- Hoff, C., Mikosch, T., Schulte, A., and Seranski, P., 2007.** Hybridisierungen. In: Jansohn, M. (Hrsg.): *Gentechnische Methoden*, 4. Aufl., Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 251-260.
- Hoyles, L., Falsen, E., Foster, G., Rogerson, F., and Collins, M. D., 2002.** *Arcanobacterium hippocoleae* sp. nov., from the vagina of a horse. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 617-619.
- Huijps, K., Lam, T. J., and Hogeveen, H., 2008.** Costs of mastitis: facts and perception. *J. Dairy Res.* 75, 113-120.

- Inness, V. L., McCatney, A. L., Khoo, C., Gross, K. L., and Gibson, G. R., 2007.** Molecular characterisation of the gut microflora of healthy and inflammatory bowel disease cats using fluorescence in situ hybridisation with special reference to *Desulfovibrio* spp. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.) 91, 48-52.
- Jensen, T. K., Boye, M., Ahrens, P., Korsager, B., Teglbjaerg, P. S., Lindboe, C. F., and Møller, K., 2001.** Diagnostic examination of human intestinal spirochetosis by fluorescent in situ hybridization for *Brachyspira aalborgi*, *Brachyspira pilosicoli*, and other species of the genus *Brachyspira* (*serpulina*). J. Clin. Microbiol. 39, 4111-4118.
- Jensen, T. K., Montgomery, D. L., Jaeger, P. T., Lindhardt, T., Agerholm, J. S., Bille-Hansen, V., and Boye, M., 2007.** Application of fluorescent in situ hybridisation for demonstration of *Coxiella burnetii* in placentas from ruminant abortions. APMIS 115, 347-353.
- Jergens, A. E., Pressel, M., Crandell, J., Morrison, J. A., Sorden, S. D., Haynes, J., Craven, M., Baumgart, M., and Simpson, K. W., 2009.** Fluorescence in situ hybridization confirms clearance of visible *Helicobacter* spp. associated with gastritis in dogs and cats. J. Vet. Intern. Med. 23, 16-23.
- John, H. A., Birnstiel, M. L., and Jones, K. W., 1969.** RNA-DNA hybrids at the cytological level. Nature 223, 582-587.
- Jost, B. H. and Billington, S. J., 2005.** *Arcanobacterium pyogenes*: molecular pathogenesis of an animal opportunist. Antonie Van Leeuwenhoek 88, 87-102.
- Jousimies-Somer, H., Pyorala, S., and Kanervo, A., 1996.** Susceptibilities of bovine summer mastitis bacteria to antimicrobial agents, Antimicrob. Agents. Chemother. 40, 157-160.
- Jung, K. and Chae, C., 2004.** In-situ hybridization for the detection of *Haemophilus parasuis* in naturally infected pigs. J. Comp. Path. 130, 294-298.
- Kaspar, H., 2008.** *Streptococcus* spp. In: GERMAP 2008, Antibiotika-Resistenz und – Verbrauch, Antiinfectives Intelligence, Rheinbach, 85.

- Kempf, V. A., Trebesius, K., and Autenrieth, I. B., 2000.** Fluorescent in situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* 38, 830-838.
- Kitaguchi, A., Yamaguchi, N., and Nasu, M., 2006.** Simultaneous enumeration of viable Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. within three hours by multicolor fluorescence in situ hybridization with vital staining. *J. Microbiol. Methods* 65, 623-627.
- Klitgaard, K., Boye, K., Capion, N., and Jensen, T. K., 2008.** Evidence of multiple *Treponema phylotypes* involved in bovine digital dermatitis as shown by 16S rRNA gene analysis and fluorescence in situ hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 46, 3012-3020.
- Klitgaard, K., Mølbak, L., Jensen, T. K., Lindboe, C. F., and Boye, M., 2005.** Laser capture microdissection of bacterial cells targeted by fluorescence in situ hybridization. *Biotechniques* 39, 864-868.
- Kolb, E., 1999.** Katalase. In: Wiesner, E. und Ribbeck, R. (Hrsg.): *Lexikon der Veterinärmedizin*, 4. Aufl., Enke Verlag, Stuttgart, 761.
- Kolb, E., Krüger M., Lämmler, C., 1999.** Koagulase. In: Wiesner, E. und Ribbeck, R. (Hrsg.): *Lexikon der Veterinärmedizin*, 4. Aufl., Enke Verlag, Stuttgart, 786.
- Koskinen, M.T., Holopainen, J., Pyörälä, S., Bredbacka, P., Pitkälä, A., Barkema, H. W., Bexiga, R., Roberson, J., Sølverød, L., Piccinini, R., Kelton, D., Lehmusto, H., Niskala, S., Salmikivi, L., 2009.** Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. *J. Dairy Sci.* 92, 952-959.
- Krömker, V. (Hrsg.), 2007.** *Kurzes Lehrbuch Milchkunde und Milchhygiene.* Parey, Stuttgart.
- Krömker, V., Hauptmann, T., und Bormann, A., 2007.** Bakteriologische Diagnostik von Viertelanfängsmilch- und Herdensammelmilchproben zum Nachweis von Mastitiserregern mit Petrifilm. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 114, 378-380, 382-383.

- Krüger, M., 1999.** Cytochromoxidase. In: Wiesner, E. und Ribbeck, R. (Hrsg.): Lexikon der Veterinärmedizin, 4. Aufl., Enke Verlag, Stuttgart, 307.
- Krüger, M., 2002.** Allgemeine Bakteriologie. In: Rolle, M. und Mayr, A. (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 7. Aufl., Enke Verlag, Stuttgart, 377- 415.
- Kutzer, P., Schulze, C., Engelhardt, A., Wieler, L. H., and Nordhoff, M., 2008.** *Helcococcus ovis*, an emerging pathogen in bovine valvular endocarditis. J. Clin. Microbiol. 46, 3291-3295.
- Lämmler, C., 1999a.** CAMP-Phänomen. In: Wiesner, E. und Ribbeck, R. (Hrsg.): Lexikon der Veterinärmedizin, 4. Aufl., Enke Verlag, Stuttgart, 236.
- Lämmler, C., 1999b.** Clumping-Faktor. In: Wiesner, E. und Ribbeck, R. (Hrsg.): Lexikon der Veterinärmedizin, 4. Aufl., Enke Verlag, Stuttgart, 279.
- Lämmler, C. and Blobel, H., 1988.** Comparative studies on *Actinomyces pyogenes* and *Arcanobacterium haemolyticum*. Med. Microbiol. Immunol. 177, 109-114.
- Lawson, P. A., Falsen, E., Foster, G., Eriksson, E., Weiss, N., and Collins, M. D., 2001.** *Arcanobacterium pluranimalium* sp. nov., isolated from porpoise and deer. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 55-59.
- Lee, K. H., Lee, J. W., Wang, S. W., Liu, L. Y., Lee, M. F., Chuang, S. T., Shy, Y. M., Chang, C. L., Wu, M. C., and Chi, C. H., 2008.** Development of a novel biochip for rapid multiplex detection of seven mastitis-causing pathogens in bovine milk samples. J. Vet. Diagn. Invest. 20, 463-471.
- Lehnen, A., Busse, H. J., Frolich, K., Krasinska, M., Kampf, P., and Speck, S., 2006.** *Arcanobacterium bialowiezense* sp. nov. and *Arcanobacterium bonasi* sp. nov., isolated from the prepuce of European bison bulls (*Bison bonasus*) suffering from balanoposthitis, and emended description of the genus *Arcanobacterium* Collins et al. 1983. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56, 861-866.

- Lopez-Benavides, M. G., Williamson, J. H., Pullinger, G. D., Lacy-Hulbert, S. J., Cursons, R. T., and Leigh, J. A., 2007.** Field observations on the variation of *Streptococcus uberis* populations in a pasture-based dairy farm. *J. Dairy Sci.* 90, 5558-5566.
- Loy, A., Maixner, F., Wagner, M., and Horn, M., 2007.** probeBase - an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features 2007. *Nucleic Acids Res.* 35: D800-D804.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Forster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A. W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lussmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A., and Schleifer, K. H., 2004.** ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* 32, 1363-1371.
- Mansfield, C. S., James, F. E., Craven, M., Davies, D. R., O'Hara, A. J., Nicholls, P. K., Dogan, B., MacDonough, S. P. and Simpson, K. W., 2009.** Remission of histiocytic ulcerative colitis in Boxer dogs correlates with eradication of invasive intramucosal *Escherichia coli*. *J. Vet. Intern Med.* 23, 964-969.
- Mbuthia, P. G., Christensen, H., Boye, M., Petersen, K. M., Bisgaard, M., Nyaga, P. N., and Olsen, J. E., 2001.** Specific detection of *Pasteurella multocida* in chickens with fowl cholera and in pig lung tissues using fluorescent rRNA in situ hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2627-2633.
- Meyer, H., und Steinbach, G., 1999.** Glässer'Krankheit. In: Wiesner, E. und Ribbeck, R. (Hrsg.): *Lexikon der Veterinärmedizin.* 4. Aufl., Enke Verlag, Stuttgart, 607.
- Milnovich, G. J., Trott, D. J., Burrell, P. C., Croser, E. L., Al Jassim, R. A., Morton, J. M., van Eps, A. W., and Pollitt, C. C., 2007.** Fluorescence in situ hybridization analysis of hindgut bacteria associated with the development of equine laminitis. *Environ. Microbiol.* 9, 2090-2100.
- Møller, K. and Kilian, M., 1990.** V factor-dependent members of the family Pasteurellaceae in the porcine upper respiratory tract. *J. Clin. Microbiol.* 28, 2711-2716.

- Moter, A. and Göbel, U. B., 2000.** Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microbiol. Methods* 41, 85-112.
- Narayanan, S., Nagaraja, T. G., Wallace, N., Staats, J., Chengappa, M. M., and Oberst, R. D., 1998.** Biochemical and ribotypic comparison of *Actinomyces pyogenes* and *A. pyogenes*-like organisms from liver abscesses, ruminal wall, and ruminal contents of cattle. *Am. J. Vet. Res.* 59,271-276.
- Nattermann, H. und Horsch, F., 1976.** Zur Pathogenese der *Corynebacterium-pyogenes*-Mastitis des Rindes. *Mh. Vet.-Med.* 31, 342-345.
- Niemann H., 1999a.** Hybridisierung. In: Wiesner, E. und Ribbeck, R. (Hrsg.): *Lexikon der Veterinärmedizin*, 4. Aufl., Enke Verlag, Stuttgart, 673.
- Niemann H., 1999b.** Sonde. In: Wiesner, E. und Ribbeck, R. (Hrsg.): *Lexikon der Veterinärmedizin*, 4. Aufl., Enke Verlag, Stuttgart, 13.
- Nordhoff, M., Ruhe, B., Kellermeier, C., Moter, A., Schmitz, R., Brunnberg, L., and Wieler, L. H., 2008.** Association of *Treponema* spp. with canine periodontitis. *Vet. Microbiol.* 127, 334-342.
- Oliveira, M., Blasco, L., Ferrer, S., Bernardo, F., 2004.** Rapid and simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in milk by fluorescent in situ hybridization. *RPCV* 99 (552), 215-218.
- Oliveira, S., Galina, L., and Pijoan, C., 2001.** Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. *J. Vet. Diagn. Invest* 13, 495-501.
- Olsen, K. N., Henriksen, M., Bisgaard, M., Nielsen, O. L., and Christensen, H., 2008.** Investigation of chicken intestinal bacterial communities by 16S rRNA targeted fluorescence in situ hybridization. *Antonie Van Leeuwenhoek* 94, 423-437.
- Ootsubo, M., Shimizu, T., Tanaka, R., Sawabe, T., Tajima, K., and Ezura, Y., 2003.** Seven-hour fluorescence in situ hybridisation technique for enumeration of Enterobacteriaceae in food and environmental water sample. *J. Appl. Microbiol.* 95, 1182-1190.

- Pardue, M. L., and Gall, J. G., 1969.** Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 64, 600-604.
- Phuektes, P., Mansell, P. D., Browning, G. F., 2001a.** Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 84, 1140-1148.
- Phuektes, P., Mansell, P. D., Dyson, R. S., Hooper, N. D., Dick, J. S., and Browning, G. F., 2001b.** Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* isolates from dairy cows with mastitis. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1460-1466.
- Pollman, M., Nordhoff, M., Pospischil, A., Tedin, K., and Wieler, L. H., 2005.** Effect of a probiotic strain of *Enterococcus faecium* on the rate of natural chlamydia infection in swine. *Infect. Immun.* 73, 4346-4353.
- Poppert, S., Essig, A., Stoehr, B., Steingruber, A., Wirths, B., Juretschko, S., Reischl, U., and Wellinghausen, N., 2005.** Rapid diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR and fluorescence in situ hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 43, 3390-3397.
- Poppert, S., Haas, M., Yildiz, T., Alter, T., Bartel, E., Fricke, U., and Essig, A., 2008.** Identification of thermotolerant *Campylobacter* species by fluorescence in situ hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2133-2136.
- Poppert, S., Nickel, D., Berger, A., Yildiz, T., Kaestner, N., Mauerer, S., and Spellerberg, B., 2009.** Rapid identification of beta-hemolytic streptococci by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Int. J. Med. Microbiol.*, 299, 421-426.
- Pospiech, A. and Neumann, B., 1995.** A versatile quick-prep. of genomic DNA from Gram-positive bacteria. *TIG* 11, 217-218.
- Priestnall, S. L., Wiinberg, B., Spohr, A., Neuhaus, B., Kuffer, M., Wiedmann, M., and Simpson, K. W., 2004.** Evaluation of „*Helicobacter heilmannii*“ subtypes in the gastric mucosas of cats and dogs. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2144-2151.
- Quinn, A. K., Vermunt, J. J., and Twiss, D.P., 2002.** *Arcanobacterium pyogenes* mastitis in a 18-month-old heifer. *N.Z. Vet. J.* 50, 167-168.

- Quinn, P. J., Carter M. E., Markey, B., and Carter, G. R., 1998.** Clinical veterinary microbiology, Mosby, London.
- Ramos, C. P., Foster, G., and Collins, M. D., 1997.** Phylogenetic analysis of the genus *Actinomyces* based on 16S rRNA gene sequences: description of *Arcanobacterium phocae* sp. nov., *Arcanobacterium bernardiae* comb. nov., and *Arcanobacterium pyogenes* comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 47, 46-53.
- Raßbach, A., 1994.** *Haemophilus parasuis*. In: AVID-Methodensammlung, <http://www.dvg.net/index.php?id=234>, Stand 11.03.2010.
- Ray, A., and Nordén, B., 2000.** Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnological applications and promise for the future. FASEB J. 14, 1041-1060.
- Recordati, C., Gualdi, V., Craven, M., Sala, L., Luini, M., Lanzoni, A., Rishniw, M., Simpson, K. W., and Scanziani, E., 2009.** Spatial distribution of *Helicobacter* spp. in the gastrointestinal tract of dogs. Helicobacter14, 180-191.
- Reddy, C. A., Cornell, C. P., and Fraga, A. M., 1982.** Transfer of *Corynebacterium pyogenes* (Glage) Ebersson to the genus *Actinomyces* as *Actinomyces pyogenes* (Glage) comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 32, 419-429.
- Riffon, R., Sayasith, K., Khalil, H., Dubreuil, P., Drolet, M., and Lagace, J., 2001.** Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. J. Clin. Microbiol. 39, 2584-2589.
- Schlafer, S., Nordhoff, M., Wyss, C., Strub, S., Hubner, J., Gescher, D. M., Petrich, A., Göbel, U. B., and Moter, A., 2008.** Involvement of *Guggenheimella bovis* in digital dermatitis lesions of dairy cows. Vet. Microbiol. 128, 118-125.
- Schweickert, B., Moter, A., Lefmann, M., and Göbel, U. B., 2004.** Let them fly or light them up: matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry and fluorescence in situ hybridization (FISH). APMIS 112, 856-885.
- Sears, P. M. and McCarthy, K. K., 2003.** Diagnosis of mastitis for therapy decisions. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 19, 93-108.

- Selbitz H.-J., 2002.** Bakterielle Krankheiten der Tiere. In: Rolle, M. und Mayr, A. (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 7. Aufl., Enke Verlag, Stuttgart, 485-487.
- Smollich A., 1999.** Fluorochrome. In: Wiesner, E. und Ribbeck, R. (Hrsg.): Lexikon der Veterinärmedizin, 4. Aufl., Enke Verlag, Stuttgart, 503.
- Studer, E., Schaeren, W., Naskova, J., Pfaeffli, H., Kaufmann, T., Kirchhofer, M., Steiner, A., Graber, H.U., 2008.** A longitudinal field study to evaluate the diagnostic properties of a quantitative real-time polymerase chain reaction-based assay to detect *Staphylococcus aureus* in milk. J. Dairy Sci. 91, 1893-1902.
- Taponen, S., Salmikivi, L., Simojoki, H., Koskinen, M. T., and Pyorala, S., 2009.** Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. J. Dairy Sci. 92, 2610-2617.
- Tenhagen, B. A., Hansen, I., Reinecke, A., and Heuwieser, W., 2009.** Prevalence of pathogens in milk samples of dairy cows with clinical mastitis and in heifers at first parturition. J. Dairy Res. 76, 179-187.
- Tenhagen, B. A., Köster, G., Wallmann, J., and Heuwieser, W., 2006.** Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. J. Dairy Sci. 89, 2542-2551.
- Trebesius, K., Leitritz, L., Adler, K., Schubert, S., Autenrieth, I. B., and Heesemann, J., 2000.** Culture independent and rapid identification of bacterial pathogens in necrotising fasciitis and streptococcal toxic shock syndrome by fluorescence in situ hybridisation. Med. Microbiol. Immunol. 188, 169-175.
- Tschischkale, R., Peters, T., und Ramm J., 2008.** Streptokokken aus der Umwelt als Mastitiserreger: Häufigkeiten von *Streptococcus uberis* und Enterokokken im Untersuchungsmaterial eines Routinelabors. Milchtierherden-Betreuungs- und Forschungsgesellschaft mbH, Vortrag auf dem Berlin-Brandenburgischen Rindertag 2008, URL: http://www.mbf-g-wunstorf.de/Infothek/BBR_TP_091008.pdf. Stand 25.02.2010.

- Udarci, M. C., Regnault, B., and Grimont, P. A., 2008.** Identification by in situ hybridization of segmented filamentous bacteria in the intestine of diarrheic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Res. Microbiol. 152, 67-73.
- Vlková, E., Rada, V., Trojanová, I., Killer, J., Smehilová, M., and Molatová, Z., 2008.** Occurrence of bifidobacteria in faeces of calves fed milk or a combined diet. Arch. Anim. Nutr. 62, 359-365.
- Wellinghausen, N., Bartel, M., Essig, A., and Poppert, S., 2007.** Rapid identification of clinically relevant *Enterococcus* species by fluorescence in situ hybridization. J. Clin. Microbiol. 45, 3424-3426.
- Werckenthin, C., Alešík, E., Grobbel, M., Lübke-Becker, A., Schwarz, S., Wieler, L. H., and Wallmann, J., 2007.** Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* from dogs and cats as well as *Arcanobacterium pyogenes* from cattle and swine as determined in the BfT-GermVet monitoring program 2004-2006. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 120, 412-422.
- Winter, P., (Hrsg.) und Zehle, H.-H., 2009.** Klinik der Mastitisformen. In: Praktischer Leitfaden Mastitis, Vorgehen beim Einzeltier im Bestand, Parey, Stuttgart, 95-101.
- Yamagishi, N., Jinkawa, Y., Omoe, K., Makino, S., and Oboshi, K., 2007.** Sensitive test for screening for *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis by broth cultivation and PCR. Vet. Rec. 161, 381-383.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., and Miller, W., 2000.** A greedy algorithm for aligning DNA sequences. J. Comput. Biol. 7, 203-214.

9 Anhang

9.1 Eingesetzte Stämme für die Evaluierung der Sonden

Spezies	ID-Nummer	Jahr	Tierart	Material	Herkunft ^a
<i>Acinetobacter</i> spezies	99-828	1999	k. A. ^b	k. A. ^b	LMU
<i>Acinetobacter</i> spezies	3589-08	2008	Rind	Milch	LMU
<i>Actinobacillus equuli</i>	06-1101	2006	Pferd	Lunge	LGL
<i>Actinobacillus equuli</i>	06-5598	2006	Pferd	Gelenk	LGL
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	06-5720	2006	Schwein	Lunge	LMU
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	06-6927	2006	Schwein	Lunge	LMU
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	07-443	2007	Schwein	Lunge	LMU
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	07-1134	2007	Schwein	Lunge	LMU
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	07-1246	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	07-0011195-002-01	2007	k. A. ^b	k. A. ^b	LGL
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	07-0011195-001-01	2007	k. A. ^b	k. A. ^b	LGL
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	241-BVL	2006	Schwein	Gewebeprobe	BVL
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	269-BVL	2006	Schwein	Lungengewebe	BVL
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	303-BVL	2006	Schwein	Lungengewebe	BVL
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	319-BVL	2006	Schwein	Lungengewebe	BVL
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	353-BVL	2006	Schwein	Gewebeprobe	BVL
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	356-BVL	2006	Schwein	Gewebeprobe	BVL
<i>Actinobaculum suis</i>	08-1541	2008	Schwein	Niere	LMU
<i>Actinomyces hyovaginalis</i>	07-2784	2007	Schwein	Nasentupfer	LMU
<i>Actinomyces hyovaginalis</i>	07-4988	2007	Schwein	Beckenhöhle	LMU
<i>Actinomyces hyovaginalis</i>	07-5302	2007	Schwein	Gehirntupfer	LMU
<i>Actinomyces spezies</i>	07-5045	2007	Katze	Darm	LMU
<i>Actinomyces urogenitalis</i>	07-4098	2007	Ratte	Punktat	LMU
<i>Arcanobacterium bernardiae</i>	DSM 9152	1995	k. A. ^b	Blutkultur	DSMZ
<i>Arcanobacterium bialowiezense</i>	DSM 17162	2006	Euro. Bison	Präputium	DSMZ
<i>Arcanobacterium bonasi</i>	DSM 17163	2006	Euro. Bison	Präputium	DSMZ
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	DSM 20595	1983	k. A. ^b	k. A. ^b	DSMZ
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	A 201	1980	k. A. ^b	k. A. ^b	LMU
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	0065	2007	k. A. ^b	k. A. ^b	LMU
<i>Arcanobacterium hippocoleae</i>	DSM 15539	2002	Pferd	Vagina	DSMZ
<i>Arcanobacterium phocae</i>	DSM 10002	1997	Robbe	Lunge	DSMZ
<i>Arcanobacterium pluranimalium</i>	DSM 13483	2001	Delphin	Milz	DSMZ
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	DSM 20630	1997	Schwein	k. A. ^b	DSMZ
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	0155	2003	Rind	Tupfer	BfT
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	0405	2004	Schwein	Tupfer	BfT
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	0562	2004	Schwein	Gewebeprobe	BfT
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	0996	2004	Schwein	Tupfer	BfT
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	1115	2004	Schwein	Tupfer	BfT
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	1319	2004	Rind	Gewebeprobe	BfT
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	0286	2004	Rind	Milch	BVL

Anhang

Spezies	ID-Nummer	Jahr	Tierart	Material	Herkunft^a
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	1457	2004	Rind	Lunge	BVL
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	2239	2005	Schwein	Tupfer	BfT
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	02-1426	2002	Schwein	Abszess	LMU
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	03-1257	2003	Schwein	Nase	LMU
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	03-1269	2003	Rind	Nabel	LMU
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	03-2641	2003	Schwein	Vaginaltupfer	LMU
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	03-3922	2003	Rind	Muskelgewebe	LMU
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	03-4004	2003	Rind	Milch	LMU
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	03-4939	2003	Rind	Milch	LMU
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	03-3850 R	2003	Rind	Lunge	LMU
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	04-2203	2004	Schwein	Gehirn	LMU
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	04-2607	2004	Chinchilla	Augentupfer	LMU
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	04-3627	2004	Schwein	Niere	LMU
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	04-6573	2004	Rind	Milch	LMU
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	05-530	2005	Schwein	Abszessstupfer	LMU
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	05-0931	2005	Pferd	Leber	LMU
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	05-2214	2005	Rind	Lunge	LMU
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	05-2655	2005	Rind	Gewebeprobe	LMU
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	05-2666	2005	Rind	Spülprobe	LMU
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	05-2816	2005	Schwein	Tupfer	LMU
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	05-3939	2005	Schwein	Abszessflüssigk.	LMU
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	05-4156	2005	Schaf	Abszess	LMU
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	05-4699	2005	Schwein	Gelenktupfer	LMU
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	06-0636	2006	Kaninchen	Leber	LMU
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	06-0987	2006	Chinchilla	Auge	LMU
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	06-2160	2006	Schwein	Gehirn	LMU
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	06-2843	2006	Rind	Abszessstupfer	LMU
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	06-2971	2006	Rind	Tupfer	LMU
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	06-4194	2006	Schwein	Cervixtupfer	LMU
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	06-5699	2006	Wisent	Lunge	LMU
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	08-2336	2008	Schwein	Nabel	LMU
<i>Bacillus spezies</i>	6066	k. A. ^b	k. A. ^b	k. A. ^b	TGD
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Diagn. Stamm	k. A. ^b	k. A. ^b	k. A. ^b	LMU
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	07-4541	2007	Schwein	Lunge	LMU
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	07-4588	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	07-5394	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	DSM 20689	1911	Schaf	Drüse	DSMZ
<i>Corynebacterium spezies</i>	08-0028	2008	Hund	Zystozenteseurin	LMU
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	07-2455	2007	Katze	Harn	LMU
<i>Enterobacter cloacae</i>	359	2008	Rind	Milch	d. A.
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	ÄS 22	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	ÄS 23	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	ÄS 24	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	ÄSK+ 37	2008	Rind	Milch	TGD

Anhang

Spezies	ID-Nummer	Jahr	Tierart	Material	Herkunft^a
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM 2570	1906	k. A.	Harn	DSMZ
<i>Enterococcus faecalis</i>	Ä 24	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 2	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 3	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 4	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 5	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 6	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 11	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 13	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 14	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 20	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 28	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 30	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 31	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 32	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 33	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 35	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 36	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 39	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 41	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 42	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 43	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 44	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 45	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 46	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 48	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 50	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄSK+ 33	2008	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄSK+ 39	2008	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄSK+ 40	2008	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecalis</i>	MÄ 116	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecium</i>	ÄS 7	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecium</i>	ÄS 9	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecium</i>	ÄS 26	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecium</i>	GZ 24B	2008	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus faecium</i>	GZ 33B	2008	Rind	Milch	TGD
<i>Enterococcus hirae</i>	48	2007	Rind	Milch	d. A.
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	DSM 5055	1900	Schwein	Milz	DSMZ
<i>Escherichia coli</i>	DSM 1103	1895	k. A. ^b	k. A. ^b	DSMZ
<i>Escherichia coli</i>	158	2007	Rind	Milch	d. A.
<i>Escherichia coli</i>	162	2007	Rind	Milch	d. A.
<i>Escherichia coli</i>	338	2008	Rind	Milch	d. A.
<i>Escherichia coli</i>	MEc 101	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Escherichia coli</i>	MEc 103	2007	Rind	Milch	TGD

Anhang

Spezies	ID-Nummer	Jahr	Tierart	Material	Herkunft^a
<i>Escherichia coli</i>	MEc 104	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Escherichia coli</i>	MEc 105	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Fusobacterium</i> spezie	08-1787	2008	Katze	Auge	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	04-2938	2004	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	04-2983	2004	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	04-3139	2004	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	04-3211	2004	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	06-3258	2006	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	06-3600	2006	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	06-3680	2006	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	06-3764	2006	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	06-4030	2006	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	06-4412	2006	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	06-4648	2006	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	06-5297	2006	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	06-5517	2006	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	06-5712	2006	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	06-5768	2006	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-159	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-1038	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-1147	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-1287	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-1387	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-1401	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-1487	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-1498	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-1502	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-1540	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-1560	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-1624	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-1867	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-1905	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-2008	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-2095	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-2272	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-2357	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-2641	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-2703	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-2962	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-3018	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-3020	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-3024	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-3051	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-3058	2007	Schwein	BAL	LMU

Anhang

Spezies	ID-Nummer	Jahr	Tierart	Material	Herkunft^a
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-4298	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-4440	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-4807	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-4916	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-239	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-340	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-1014	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-5945	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	07-5967	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	08-366	2008	Schwein	BAL	LMU
<i>Haemophilus parasuis</i>	409	k. A. ^b	Schwein	k. A. ^b	SH
<i>Haemophilus parasuis</i>	410	k. A. ^b	Schwein	k. A. ^b	SH
<i>Haemophilus parasuis</i>	411	k. A. ^b	Schwein	k. A. ^b	SH
<i>Haemophilus parasuis</i>	425	k. A. ^b	Schwein	k. A. ^b	SH
<i>Haemophilus parasuis</i>	465	k. A. ^b	Schwein	k. A. ^b	SH
<i>Haemophilus parasuis</i>	553	k. A. ^b	Schwein	k. A. ^b	SH
<i>Haemophilus parasuis</i>	555	k. A. ^b	Schwein	k. A. ^b	SH
<i>Haemophilus parasuis</i>	780	k. A. ^b	Schwein	k. A. ^b	SH
<i>Haemophilus parasuis</i>	790	k. A. ^b	Schwein	k. A. ^b	SH
<i>Haemophilus parasuis</i>	793	k. A. ^b	Schwein	k. A. ^b	SH
<i>Histophilus somni</i>	ATCC 700025	k. A. ^b	k. A. ^b	k. A. ^b	LMU
<i>Histophilus somni</i>	AH 20	k. A. ^b	k. A. ^b	k. A. ^b	LMU
<i>Klebsiella oxytoca</i>	202	2007	Rind	Milch	d. A.
<i>Klebsiella oxytoca</i>	213	2007	Rind	Milch	d. A.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	106	2007	Rind	Milch	d. A.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	271	2008	Hund	Harn	d. A.
<i>Lactobacillus fermentum</i>	07-5054	2007	Graupapagei	Kloakentupfer	LMU
<i>Lactococcus garvieae</i>	ÄS 25	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Lactococcus garvieae</i>	ÄS 27b	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Lactococcus garvieae</i>	ÄS 37	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Lactococcus garvieae</i>	ÄS 40	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Lactococcus garvieae</i>	ÄS 47	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Lactococcus garvieae</i>	MÄ 124	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Lactococcus lactis lactis</i>	ÄS 16	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Lactococcus lactis lactis</i>	ÄS 18	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Lactococcus lactis lactis</i>	ÄS 19	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Lactococcus lactis lactis</i>	ÄS 34	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Lactococcus lactis lactis</i>	ÄS 49	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Listeria monocytogenes</i>	DSM 20600	1926	Kaninchen	k. A. ^b	DSMZ
<i>Listeria monocytogenes</i>	Diagn. Stamm	k. A. ^b	k. A. ^b	k. A. ^b	LMU
<i>Mannheimia haemolytica</i>	DSM 10531	1932	k. A. ^b	k. A. ^b	DSMZ
<i>Micrococcus spezies</i>	31	2007	Rind	Milch	d. A.
<i>Pantoea agglomerans</i>	242	2007	Vogel	Kot	d. A.
<i>Pantoea agglomerans</i>	308	2008	Rind	Milch	d. A.

Anhang

Spezies	ID-Nummer	Jahr	Tierart	Material	Herkunft ^a
<i>Pasteurella aerogenes</i>	DSM 10153	1974	Schwein	Darm	DSMZ
<i>Pasteurella multocida</i>	DSM 5281	1899	k. A. ^b	k. A. ^b	DSMZ
<i>Pasteurella multocida</i>	07-6044	2007	Schwein	Lunge	LMU
<i>Pasteurella multocida</i>	07-5432	2007	Rind	Na.- Tupfer	LMU
<i>Pasteurella multocida</i>	07-5910	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Pasteurella multocida</i>	68	k. A. ^b	k. A. ^b	k. A. ^b	LMU
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	87	k. A. ^b	k. A. ^b	k. A. ^b	LMU
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	86	k. A. ^b	k. A. ^b	k. A. ^b	LMU
<i>Propionibacterium acnes</i>	07-1516	2007	Hund	Blutkultur	LMU
<i>Propionibacterium acnes</i>	07-2528	2007	Hund	Blutkultur	LMU
<i>Proteus vulgaris</i>	62	2007	Rind	Milch	d. A.
<i>Proteus spezies</i>	08-3934	2008	Schwein	Milch	LMU
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 1117	1872	k. A. ^b	Blutkultur	DSMZ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	07-5485	2007	Katze	Darm	LMU
<i>Rhodococcus equi</i>	DSM 20307	1923	Fohlen	Lunge	DSMZ
<i>Salmonella enterica</i>	Diagn. Stamm	k. A. ^b	k. A. ^b	k. A. ^b	LMU
<i>Salmonella enterica</i>	04-2884	2004	Schwein	Kot	LMU
<i>Salmonella enterica</i>	06-4016	2006	Schwein	Darm	LMU
<i>Salmonella enterica</i>	Ent. w1	k. A. ^b	k. A. ^b	k. A. ^b	LMU
<i>Serratia liquefaciens</i>	167	2007	Rind	Milch	d. A.
<i>Serratia marcescens</i>	Diagn. Stamm	k. A. ^b	k. A. ^b	k. A. ^b	LMU
<i>Serratia rubidea</i>	Diagn. Stamm	k. A. ^b	k. A. ^b	k. A. ^b	LMU
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM 1104	1884	k. A. ^b	k. A. ^b	DSMZ
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM 2569	1884	k. A. ^b	k. A. ^b	DSMZ
<i>Staphylococcus aureus</i>	07-191	2007	Hund	Wunde	LMU
<i>Staphylococcus aureus</i>	07-2943	2007	Katze	Tupfer HWI	BfT
<i>Staphylococcus aureus</i>	2822/ 43D	2008	Rind	Milch	TGD
<i>Staphylococcus aureus</i>	2824/ 37D	2008	Rind	Milch	TGD
<i>Staphylococcus aureus</i>	6833/ B	2008	Rind	Milch	TGD
<i>Staphylococcus aureus</i>	2847/ 66C	2008	Rind	Milch	TGD
<i>Staphylococcus aureus</i>	6948/ C	2008	Rind	Milch	TGD
<i>Staphylococcus aureus</i>	2921/ 20D	2008	Rind	Milch	TGD
<i>Staphylococcus aureus</i>	2936/ 24D	2008	Rind	Milch	TGD
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	2007	Rind	Milch	d. A.
<i>Staphylococcus aureus</i>	55	2007	Rind	Milch	d. A.
<i>Staphylococcus aureus</i>	114	2007	Rind	Milch	d. A.
<i>Staphylococcus aureus</i>	115	2007	Rind	Milch	d. A.
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	7	2007	Rind	Milch	d. A.
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	134	2007	Rind	Milch	d. A.
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	MKNS 60	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Staphylococcus delphini</i>	DSM 20771	1988	Delphin	Eiter	DSMZ
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	79	2007	Katze	Harn	d. A.
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	137	2007	Rind	Milch	d. A.
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	K3	2008	Rind	Milch	TGD

Anhang

Spezies	ID-Nummer	Jahr	Tierart	Material	Herkunft^a
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ST111	k. A. ^b	k. A. ^b	k. A. ^b	LMU
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	K8	2008	Rind	Milch	TGD
<i>Staphylococcus hyicus</i>	217	2007	Schwein	Lunge	d. A.
<i>Staphylococcus hyicus</i>	216	2007	Schwein	BAL	d. A.
<i>Staphylococcus hyicus</i>	253	2007	Schwein	Nasentupfer	d. A.
<i>Staphylococcus intermedius</i>	DSM 20373	1976	Taube	Nase	DSMZ
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	ST145	k. A. ^b	k. A. ^b	k. A. ^b	LMU
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	68	2007	Hund	Harn	d. A.
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	78	2007	Katze	Harn	d. A.
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	201	2007	Katze	Harn	d. A.
<i>Staphylococcus simulans</i>	135	2007	Rind	Milch	d. A.
<i>Staphylococcus spezieis</i>	2853/ 23D	2008	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus agalactiae</i>	15	2007	Rind	Milch	d. A.
<i>Streptococcus agalactiae</i>	291	2008	Rind	Milch	d. A.
<i>Streptococcus agalactiae</i>	297b	2008	Rind	Milch	d. A.
<i>Streptococcus agalactiae</i>	G1	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus agalactiae</i>	G5	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus agalactiae</i>	MG 25	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus agalactiae</i>	MG 26	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus agalactiae</i>	MG 27	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus agalactiae</i>	MG 28	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus agalactiae</i>	MG 29	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus bovis</i>	DSM 20480	1919	Rind	Kot	DSMZ
<i>Streptococcus bovis</i>	29	2007	Schwein	Lunge	d. A.
<i>Streptococcus canis</i>	DSM 20715	1986	Rind	Mastitis	DSMZ
<i>Streptococcus canis</i>	H6	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus canis</i>	80	2007	Katze	Harn	d. A.
<i>Streptococcus canis</i>	272	2008	Hund	Harn	d. A.
<i>Streptococcus didelphis</i>	DSM 15616	2000	Opossum	k. A. ^b	DSMZ
<i>Streptococcus dysgalactiae equisimilis</i>	314	2008	Rind	k. A. ^b	d. A.
<i>Streptococcus dysgalactiae equisimilis</i>	341	2008	Rind	Milch	d. A.
<i>Streptococcus dysgalactiae equisimilis</i>	349	2008	Rind	Milch	d. A.
<i>Streptococcus dysgalactiae equisimilis</i>	351	2008	Rind	Milch	d. A.
<i>Streptococcus dysgalactiae dysgalactiae</i>	DSM 20662	1983	Rind	k. A. ^b	DSMZ
<i>Streptococcus dysgalactiae dysgalactiae</i>	50	2007	Rind	Milch	d. A.
<i>Streptococcus dysgalactiae dysgalactiae</i>	53	2007	Rind	Milch	d. A.
<i>Streptococcus dysgalactiae dysgalactiae</i>	57	2007	Rind	Milch	d. A.
<i>Streptococcus dysgalactiae dysgalactiae</i>	110	2007	Rind	Milch	d. A.
<i>Streptococcus dysgalactiae dysgalactiae</i>	152	2007	Rind	Milch	d. A.
<i>Streptococcus dysgalactiae dysgalactiae</i>	173	2007	Rind	Milch	d. A.
<i>Streptococcus dysgalactiae dysgalactiae</i>	177	2007	Rind	Milch	d. A.
<i>Streptococcus equi zooepidemicus</i>	DSM 20727	1985	k. A. ^b	k. A. ^b	DSMZ
<i>Streptococcus equi zooepidemicus</i>	247/FAL/105	2004	Pferd	Respirationstrakt	BfT
<i>Streptococcus equi zooepidemicus</i>	188	k. A. ^b	k. A. ^b	k. A. ^b	d. A.

Anhang

Spezies	ID-Nummer	Jahr	Tierart	Material	Herkunft^a
<i>Streptococcus parauberis</i>	DSM 6631	1990	k. A. ^b	Milch (Mastitis)	DSMZ
<i>Streptococcus pluranimalium</i>	DSM 15636	1999	Rind	Mastitis	DSMZ
<i>Streptococcus suis</i>	9682	1987	Schwein	k. A. ^b	DSMZ
<i>Streptococcus suis</i>	154	2007	Schwein	Liquor	d. A.
<i>Streptococcus suis</i>	159	2007	Schwein	Lunge	d. A.
<i>Streptococcus suis</i>	07-4547	2007	Schwein	Lunge	LMU
<i>Streptococcus suis</i>	07-5105	2007	Schwein	Lunge	LMU
<i>Streptococcus suis</i>	07-5146	2007	Schwein	Ohr	LMU
<i>Streptococcus suis</i>	07-5150	2007	Schwein	Ohr	LMU
<i>Streptococcus suis</i>	07-5171	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Streptococcus suis</i>	07-5286	2007	Schwein	Lunge	LMU
<i>Streptococcus suis</i>	09-511	2009	Schwein	BAL	LMU
<i>Streptococcus suis</i>	07-5949	2007	Schwein	BAL	LMU
<i>Streptococcus uberis</i>	DSM 20569	1932	k. A. ^b	k. A. ^b	DSMZ
<i>Streptococcus uberis</i>	20	2007	Rind	Milch	d. A.
<i>Streptococcus uberis</i>	363	2008	Rind	Milch	d. A.
<i>Streptococcus uberis</i>	Ä 23	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	ÄS 27a	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	ÄS 29	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	ÄS 38	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	6843/ C	2008	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	6845/ B	2008	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	6848/ D	2008	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	6851/ A	2008	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	2809/ 24B	2008	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	2816/ 1A	2008	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	2831/ 23D	2008	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	2834/ 7D	2008	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	2853/ 27D	2008	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	6952/ D	2008	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	2952/ 15A	2008	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	2957/ 7B	2008	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	MÄ 36	2005	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	MÄ 41	2005	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	MÄ 45	2005	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	MÄ 46	2005	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	MÄ 48	2005	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	MÄ 49	2005	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	MÄ 50	2005	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	MÄ 51	2005	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	MÄ 53	2005	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	MÄ 54	2005	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	MÄ 55	2005	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	MÄ 58	2005	Rind	Milch	TGD

Anhang

Spezies	ID-Nummer	Jahr	Tierart	Material	Herkunft^a
<i>Streptococcus uberis</i>	MÄ 59	2005	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	MÄ 60	2005	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	MÄ 62	2005	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	MÄ 64	2005	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	MÄ 65	2005	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	MÄ 66	2005	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	MÄ 68	2005	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	MÄ 69	2005	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	MÄ 70	2005	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	MÄ 75	2006	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	MÄ 76	2006	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	MÄ 77	2006	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	MÄ 79	2006	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	MÄ 117	2007	Rind	Milch	TGD
<i>Streptococcus uberis</i>	MÄ 118	2007	Rind	Milch	TGD

^a siehe Abkürzungsverzeichnis; d. A.: diese Arbeit

^b k. A.: keine Angaben

9.2 Verwendete Mastitismilchproben

	Milchproben			Proben wurden ausgewertet in:			
	Proben- nummer	Tagebuch- nummer	Herkunft	Tabelle 14	Tabelle 15	Tabelle 16	Tabelle 17
Anzahl	128			62	57	50	103
1	06-1115-368	HR	LVG	x			x
2	06-1115-740	VR	LVG		x		
3	06-1122-25	VL	LVG	x			x
4	06-1129-22	HL	LVG	x			x
5	06-1129-644	VL	LVG	x			x
6	06-1206-679	HL	LVG	x			x
7	06-1206-696	HR	LVG		x		x
8	06-1220-644	VL	LVG	x			
9	07-1470		LMU		x		
10	07-1569		LMU	x		x	x
11	07-2639		LMU		x		
12	07-2747		LMU				x
13	07-2748		LMU				x
14	07-2749		LMU		x		x
15	07-2852		LMU	x		x	
16	07-2853		LMU		x		
17	07-2906		LMU		x		
18	07-2907		LMU		x		
19	07-2923		LMU		x		x
20	07-2924		LMU				x
21	07-2925		LMU		x		x
22	07-2929		LMU		x		x
23	07-2930		LMU		x		x
24	07-2931		LMU		x		x
25	07-3734		LMU		x		
26	07-3792		LMU		x		
27	07-3793		LMU	x		x	x
29	07-3885		LMU		x		x
30	07-3886		LMU	x		x	x
31	07-3968		LMU	x			x
32	07-3969		LMU		x		x
33	07-4003		LMU		x		x
34	07-4034		LMU		x		x
35	07-4035		LMU				x
36	07-4062		LMU		x		x

Anhang

Milchproben			Proben wurden ausgewertet in:			
Proben- nummer	Tagebuch- nummer	Herkunft	Tabelle 14	Tabelle 15	Tabelle 16	Tabelle 17
37	07-4063	LMU		x		
38	07-4064	LMU		x		
39	07-4065	LMU		x		
40	07-4080	LMU	x		x	
42	07-4097	LMU		x		
43	07-4208	LMU		x		x
44	07-5250	LMU		x		
46	07-0202-761 HR	LVG	x			x
47	07-0228-665 HL	LVG	x			x
48	07-0307-778 HL	LVG	x			
49	07-0307-778 HR	LVG		x		
50	07-0314-305 VR	LVG		x		x
51	07-0314-727 HL	LVG		x		x
52	07-0314-727 VL	LVG				x
53	07-0321-305 VR	LVG		x		x
54	07-0321-735 VR	LVG	x		x	x
55	07-0509-284 HR	LVG		x		x
56	07-0509-694 VR	LVG		x		x
57	07-0509-762 HR	LVG		x		x
58	07-0516-289 VR	LVG	x		x	x
59	07-0601-213 HR	LMU	x		x	
60	07-0619-1 VR	LMU		x		x
61	07-1012-439	LVG		x		x
62	08-0416	LMU	x		x	x
63	08-0443	LMU	x		x	x
64	08-2148	LMU		x		x
65	08-2230	LMU	x		x	x
66	08-2231	LMU	x		x	
67	08-2249	LMU		x		x
68	08-2250	LMU		x		x
69	08-2251	LMU		x		x
70	08-2283	LMU				x
71	08-2622	LMU	x		x	
72	08-2623	LMU		x		x
73	08-2858	LMU		x		
74	08-2859	LMU				x
75	08-2860	LMU		x		x
76	08-2861	LMU		x		x

Anhang

Milchproben			Proben wurden ausgewertet in:			
Proben- nummer	Tagebuch- nummer	Herkunft	Tabelle 14	Tabelle 15	Tabelle 16	Tabelle 17
77	08-2862	LMU		x		x
78	08-3040	LMU	x		x	x
80	08-3093	LMU		x		x
81	08-3589	LMU		x		x
82	08-3636	LMU		x		x
83	08-3637	LMU		x		x
84	08-3738	LMU				x
85	08-3763	LMU	x		x	x
86	08-3802	LMU	x			
87	08-3898	LMU	x		x	x
88	08-0521-727 HR	LVG	x		x	x
89	08-0618-381 HR	LVG	x		x	x
90	08-0618-765 HR	LVG	x		x	x
91	08-0806-388 VR	LVG	x			
92	08-1450	LMU		x		x
93	08-1451	LMU		x		x
95	08-1453	LMU		x		x
96	08-1586	LMU		x		
97	08-2775	TGD	x		x	x
99	08-3330 A	TGD	x		x	x
100	08-3337 D	TGD	x		x	x
101	08-3363 D	TGD	x		x	x
102	08-3367 A	TGD	x		x	x
103	08-3382 D	TGD	x		x	x
104	08-3383 B	TGD		x		x
105	08-3384 A	TGD	x		x	x
106	08-3385 D	TGD	x		x	x
107	08-3386 C	TGD	x		x	x
108	08-3388 C	TGD	x		x	x
109	08-3418 A	TGD	x		x	x
110	08-3447 B	TGD	x		x	x
111	08-3448 D	TGD	x		x	x
112	08-3478 B	TGD	x		x	x
113	08-3484 B	TGD	x		x	x
114	08-3485 B	TGD	x		x	x
115	08-3515 D	TGD	x		x	x
116	08-3527 A	TGD		x		x
117	08-3532 B	TGD				x

Anhang

Milchproben			Proben wurden ausgewertet in:			
Proben- nummer	Tagebuch- nummer	Herkunft	Tabelle 14	Tabelle 15	Tabelle 16	Tabelle 17
118	08-3545 D	TGD	x		x	x
119	08-3593 B	TGD	x		x	x
120	08-3608 A	TGD	x		x	x
121	08-3608 D	TGD	x		x	x
122	08-3626 B	TGD	x		x	x
123	08-3630 B	TGD	x		x	x
124	08-3632 A	TGD	x		x	x
125	08-3634 A	TGD	x		x	x
126	08-3635 D	TGD	x		x	x
127	08-3638 A	TGD	x		x	x
128	08-3655 A	TGD		x		x
129	08-3655 C	TGD	x		x	x
130	08-3657 B	TGD	x		x	x
131	08-3662 B	TGD	x		x	x
132	08-3663 C	TGD		x		x
133	08-3992 B	TGD		x		x
134	08-3997 B	TGD	x		x	x

9. 3 Medien, Lösungen und Puffer

Feste und flüssige Nährmedien

Schafblut-Agarplatten

Blutagar-Basis	40,0	g
A. demin.	1000	ml
defibriertes Schafblut	70	ml

Blutagar-Basis nach Angaben des Herstellers lösen und autoklavieren. Nach dem Abkühlen auf 50-52 °C defibriertes Schafblut zugeben. Für Selektivplatten entsprechend der gewünschten Endkonzentration Stocklösung der antimikrobiellen Wirkstoffe zugeben. Platten gießen, abkühlen und bei 4 °C aufbewahren.

Kochblut-Agarplatten

Blutagar-Basis	40,0	g
A. demin.	1000	ml
defibriertes Schafblut	70	ml

Blutagar-Basis nach Angaben des Herstellers lösen und autoklavieren. Nach dem Abkühlen auf 50-52 °C defibriertes Schafblut zugeben. Anschließend für 2 min. auf 100 °C im Dampftopf erhitzen. Nach Farbänderung von rot nach braun zum Abkühlen ins Wasserbad bei 50 °C stellen. Platten gießen, abkühlen und bei 4 °C aufbewahren.

CNA-Agarplatten

CNA-Agar	42,5	g
A. demin.	1000	ml

CNA-Agar nach Angaben des Herstellers lösen und autoklavieren. Platten gießen, abkühlen und bei 4 °C aufbewahren.

Rambach-Agarplatten

Rambach-Agar	30,5	g
Supplement	10	ml
Agar Agar	3,0	g
A. demin.	1000	ml

Rambach-Agar nach Angaben des Herstellers lösen und autoklavieren. Platten gießen, abkühlen und bei 4 °C aufbewahren.

Gassner-Agarplatten

Gassner-Agar	77,0	g
A. demin.	1000	ml

CNA-Agar nach Angaben des Herstellers lösen und autoklavieren. Platten gießen, abkühlen und bei 4 °C aufbewahren.

Brain-Heart-Infusion (BHI)-Bouillon

Brain Heart Infusion	37,0	g
A. demin.	1000	ml

Autoklavieren und bei 4 °C aufbewahren.

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung**Lysozym-Stocklösung**

Lysozym	10,0	mg
A. demin.	10	ml

Entspricht 1 mg/ml Stocklösung in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotieren und bei -20 °C aufbewahren.

Lysostaphin-Stocklösung

Lysostaphin	1,0	mg
A. demin.	0,5	ml

Entspricht 2 mg/ml Stocklösung in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotieren und bei -20 °C aufbewahren.

NaCl 5 M

NaCl	292,2	g
A. demin.	1000	ml

Lösen und bei Raumtemperatur lagern.

Tris HCl 1 M

Tris	60,57	g
A. demin.	500	ml

Tris unter dem Abzug abwiegen. In 400 ml A. demin. lösen, pH mit HCl auf 8,0 einstellen. Mit A. demin. auf 500 ml auffüllen. Bei Raumtemperatur aufbewahren.

10 % SDS-Lösung

SDS	20,0	g
A. demin.	200	ml

SDS mit Mundschutz einwiegen. In A. demin. lösen. Sterilfiltrieren.

Bei Raumtemperatur aufbewahren.

EDTA 0,5 M

EDTA		146,13	g
A. demin.		1000	ml

EDTA in 800 ml A. demin. lösen. Mit 5 M NaOH ph 8,0 einstellen. Mit A. demin. auf 1000 ml auffüllen. Bei Raumtemperatur aufbewahren.

Hybridisierungspuffer FISH (Formamidkonzentration 10-60 %)

Formamid		10-60	ml
NaCl	5 M	18	ml
Tris HCl	1 M	2	ml
SDS	10 %	0,1	ml
A. demin.		ad 100	ml

Puffer in 1,5 ml-Reaktionsgefäße aliquotieren. Bei -20 °C für maximal drei Monate aufbewahren.

Waschpuffer FISH (für Hybridisierungspuffer 10-60 %)

EDTA	0,5 M	10 %	0	ml
		20-60 %	10	ml
Tris HCl	1 M		20	ml
SDS	10 %		1	ml
NaCl	5 M	10 %	90	ml
		20 %	43	ml
		30 %	20,4	ml
		40 %	9,2	ml
		50 %	3,6	ml
		60 %	0,8	ml
A. demin.		ad	1000	ml

Puffer bei 4 °C für maximal 3 Monate aufbewahren.

DNA-Isolierungen

Lysozym-Stocklösung

Lysozym	0,5	g
A. demin.	5	ml

Entspricht 100 mg/ml. Stocklösung in 1,5 ml-Reaktionsgefäße aliquotieren.

Lagerung bei -20 °C aufbewahren.

Tris-EDTA-Saccharose (TES)-Puffer

NaCl	5,84	g
Tris/HCl pH 8,0	1,22	g
Na ₂ -EDTA	0,37	g
A. demin.	ad 1000	ml

In 800 ml A. demin. lösen, pH mit HCl auf 8,0 einstellen. Mit A. demin. auf 1000 ml auffüllen. Autoklavieren und bei Raumtemperatur lagern.

10 % SDS-Lösung

SDS	20,0	g
A. demin.	200	ml

SDS mit Mundschutz einwiegen. In A. demin. lösen. Sterilfiltrieren und bei Raumtemperatur lagern.

Agarose-Gelelektrophorese**Ethidiumbromidlösung**

Ethidiumbromid	10,0	mg
A. demin.	1000	ml

Ethidiumbromid mit Arbeitsschutz lösen. Bei Raumtemperatur im Dunklen aufbewahren.

Größenstandards (100 bp, 1kb-Marker)

Größenstandard	4	µl
Probenladepuffer	8	µl
A. demin.	12	µl

Probenladepuffer

Bromphenolblau	1 %	12,5	ml
Na ₂ -EDTA	0,5 M	5	ml
Glycerin		25	ml
A. demin.		7,5	ml

Tris-Acetat-EDTA (TAE) - Puffer (10x)

Tris		48,46	g
Na ₂ -EDTA	0,5 M	20	ml
Essigsäure	100 %	11,4	ml
A. demin.		ad 1000	ml

Den pH-Wert des Puffers auf 7,8 einstellen, autoklavieren und bei Raumtemperatur aufbewahren. Für den Gebrauch als Laufpuffer (1 x TAE-Puffer) 1:10 mit A. demin. verdünnen.

9. 4 Chemikalien und Enzyme

Aceton	Roth, Karlsruhe
Agarose	Eurogentec, Köln
BHI-Pulver	VWR, Darmstadt
Blutagar-Basis	VWR, Darmstadt
Bromkresolpurpur	VWR, Darmstadt
Carbolfuchsin GRAM rot	VWR, Darmstadt
Chloroform	VWR, Darmstadt
Citifluor anti bleaching agent AF1	Science Services, München
defibriertes Schafblut	von institutseigenen Schafen
Dinatriummethyldiamintetraessigsäure „Titriplex III“	VWR, Darmstadt
dNTPs	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
EDTA	Roth, Karlsruhe
Enterotube™ II ID – Testkit	BD Diagnostics, Heidelberg
Essigsäure Rotipuran, 100 %	Roth, Karlsruhe
Ethanol	VWR, Darmstadt
Ethidiumbromid 1 %ige Lösung in Wasser	VWR, Darmstadt
Formamid	VWR, Darmstadt
Glycerol Rotipuran, wasserfrei	Roth, Karlsruhe
Größenstandard (100bp -, 1kb -Marker)	NEB, Frankfurt am Main
Immersionsöl nach DIN ISO 8036-1	VWR, Darmstadt
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Karbolgentianaviolett	VWR, Darmstadt
Lysostaphin from <i>Staphylococcus staphylolyticus</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L7386 activity:>_ 500 units/mg	
Lysozyme 50 000 U/mg cryst.	VWR, Darmstadt
Magnesiumsulfatpuffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
McFarland-Standard 1-6	bioMérieux, Nürtingen
Methanol	VWR, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
peqGold <i>Pwo</i> -DNA-Polymerase	peqLab, Erlangen
Phenolchloroform	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Savinase® 16.0L (Protease from <i>B. cereus</i>) > 16U/g	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SDS/Natriumlaurylsulfat, kristallin	Roth, Karlsruhe
Tris ultrapure	Applichem, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	VWR, Darmstadt

9. 5 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Alufolie	VWR, Darmstadt
Axioskop 2 plus	Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen
Brutschrank aerob	Heraeus function line Kendro, Langenselbold
Brutschrank CO ₂	Heraeus function line Kendro, Langenselbold
CCD-Kamera	peqLab, Erlangen
Einmalimpfösen	VWR, Darmstadt
Elektronische Analysenwaage	Sartorius Research, Mettler Toledo, Giessen
Exsikkator	Speed Vac Concentrator, Bachhofer, Reutlingen
GEL Band Purification Kit [®]	Healthcare, München
Gelelektrophoresekammer, Model B1	Owl Separation Systems, Inc., Portsmouth, NH USA
Glaspipetten 1 ml, 5 ml, 10 ml	Silberbrand Eterna Klasse B, Brand Wertheim
Handroller	OBI, München
Isolierband schwarz	OBI, München
Küchenkrepppapier	Roth, Karlsruhe
Kühlzentrifuge, 5810 R, Rotor Nr. A-4-62/06896	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge, 3K15, Rotor Nr. 12156-H	Sigma, Osterode am Harz
Laborglaswaren	Schott, Mainz
Laborwaage	Navigator, Ohaus Corporation, Schweiz
Latexhandschuhe	VWR, Darmstadt
Lichtmikroskop Laborlux K	Leitz, Wetzlar
Microbank [®] -System	inverness medical, Köln
Mikrowellengerät, SS-758	Panasonic, Matsushita Electric, UK
Nano-Drop Spectrophotometer ND-1000	peqLab, Erlangen
Nitrilhandschuhe TouchNTuff [™]	VWR, Darmstadt
Objektträger beschichtet 1 Well 8 mm	VWR, Darmstadt
Objektträger beschichtet 8 Well 6 mm	Erie Scientific Company, Menzel, Roth, Braunschweig
Objektträger Standard mit Mattrand	Roth, Karlsruhe
Objektträger Superfrost Ultra Plus	VWR, Darmstadt
pH-Meter pH 535 MultiCal	Wissenschaftlich technische Werkstätten, Weilheim
Pipetten 1-10 µl, 10-100µl, 100-1000 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen mit Filter, Biosphere Filter Tips	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen Typ A 0,5-20 µl, Typ B 2-200 µl, Typ D 50-1000 µl	Brand, Wertheim
Pipettierhilfe, Accu Jet [®]	Brand, Wertheim
Plastikpetrischalen	Greiner Bio One GmbH, Österreich
Präparatekasten	VWR, Darmstadt
Reaktionsgefäße 0,2 ml Thermo Tube	abgene, Fisher Scientific, Ulm
Reaktionsgefäße 1,8 ml	VWR, Darmstadt

Anhang

Schraubdeckelröhrchen 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Sicherheitswerkbank	Hera safe, Kendro, Langenselbold
Silicone Isolators	Science Services, München
Stromgeber für die Gelelektrophoresekammer	Constant Power Supply, LKB, Bromma
Thermocycler Primus 96 advanced Gradient	peqLab, Erlangen
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Tissue-Tücher	Roth, Karlsruhe
UV-Tisch, Tex - 35c ltf	Labortechnik, Wasserburg
Vortex-Genie, Mod.K550-GE	Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
Wasserbad, Gfl 1083	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Wattestäbchen	Heiland, Stuttgart
Wattestäbchen	VWR, Darmstadt
Zentrifuge für 1,8 ml Reaktionsgefäße, RotorNr. 12124	Sigma, Osterode am Harz

9. 6 Einzelergebnisse der FISH publizierter Sonden mit veterinärmedizinischen Isolaten

Spezies	ID-Nummer	EUB 338	Staphy	Sau	Strept	Straga	ENC 221	ENF 191	ENU 140	EBAC 1790	ESC 468
<i>Enterococcus casselifl.</i>	ÄSK+ 37	4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4	1	2	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus hirae</i>	48	5	2	1	1	n.d.	4-5	3-4	1	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	2948/ 12C	5	1	1	2	1	5	5	1	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	2819/ 13B	5	1	1	1	1	5	5	1	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	2941/ 35B	5	1	1	1	1	5	5	1	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM 2570	4-5	1	0	1	n.d.	4-5	5	1	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	Ä 24	5	1	0	1-2	n.d.	5	5	1-2	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 2	5	n.d.	n.d.	1	n.d.	5	4	1	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 3	5	n.d.	n.d.	1	n.d.	5	4	1	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 4	5	n.d.	n.d.	1	n.d.	5	5	1	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 5	5	n.d.	n.d.	1	n.d.	5	5	1	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 6	4-5	n.d.	n.d.	1-2	n.d.	4	4-5	1	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 11	4-5	n.d.	n.d.	1	n.d.	4-5	5	1	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 13	4-5	n.d.	n.d.	1-2	n.d.	4-5	4-5	1-2	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 14	4-5	n.d.	n.d.	1-2	n.d.	4-5	4-5	1	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 20	4-5	n.d.	n.d.	1-2	n.d.	4-5	4-5	1	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 28	5	n.d.	n.d.	1	n.d.	5	5	1	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 30	4-5	n.d.	n.d.	1	n.d.	4-5	5	0	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 31	5	n.d.	n.d.	1	n.d.	5	5	1	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 32	5	n.d.	n.d.	1	n.d.	5	5	1	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 33	4-5	n.d.	n.d.	1	n.d.	5	5	0	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 35	5	n.d.	n.d.	1	n.d.	5	5	0	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 36	5	n.d.	n.d.	1	n.d.	5	5	1	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 39	4	n.d.	n.d.	1	n.d.	4-5	4-5	1	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 41	5	n.d.	n.d.	1	n.d.	5	5	1	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 42	5	n.d.	n.d.	1	n.d.	5	5	1	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 43	5	n.d.	n.d.	1	n.d.	5	5	1	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 44	5	n.d.	n.d.	1	n.d.	5	5	1	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 45	5	n.d.	n.d.	1	n.d.	5	5	1	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 46	5	n.d.	n.d.	1	n.d.	5	5	1	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 48	5	n.d.	n.d.	1	n.d.	5	5	1	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	ÄS 50	5	n.d.	n.d.	1	n.d.	5	5	1	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecalis</i>	MÄ 116	5	1	1	1	1	5	5	1	1	1

Anhang

Spezies	ID-Nummer	EUB 338	Staphy	Sau	Strept	Straga	ENC 221	ENF 191	ENU 140	EBAC 1790	ESC 468
<i>Enterococcus faecium</i>	ÄS 9	4-5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4	1	4	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecium</i>	GZ 24B	5	1	1	1	1	4	2	3-4	n.d.	n.d.
<i>Enterococcus faecium</i>	GZ 33B	5	1	1	1	1	4	2	3-4	n.d.	n.d.
<i>Lactococcus lact. lact.</i>	ÄS 16	4-5	n.d.	n.d.	1	n.d.	1	0	1	n.d.	n.d.
<i>Lactococcus lact. lact.</i>	ÄS 18	4-5	n.d.	n.d.	1	n.d.	1	0	1	n.d.	n.d.
<i>Lactococcus lact. lact.</i>	ÄS 19	4-5	n.d.	n.d.	1-2	n.d.	1	0	1	n.d.	n.d.
<i>Lactococcus lact. lact.</i>	ÄS 34	5	n.d.	n.d.	1	n.d.	1	0	0	n.d.	n.d.
<i>Lactococcus lact. lact.</i>	ÄS 49	5	n.d.	n.d.	1	n.d.	1	1	1	n.d.	n.d.
<i>Lactococcus garvieae</i>	ÄS 25	5	n.d.	n.d.	0	n.d.	0	0	0	n.d.	n.d.
<i>Lactococcus garvieae</i>	ÄS 37	5	n.d.	n.d.	2	n.d.	2	0	1	n.d.	n.d.
<i>Lactococcus garvieae</i>	ÄS 40	5	n.d.	n.d.	1	n.d.	1	1	1	n.d.	n.d.
<i>Lactococcus garvieae</i>	ÄS 47	4-5	n.d.	n.d.	1	n.d.	1	1	1	n.d.	n.d.
<i>Streptococcus agalact.</i>	MG 27	5	1	1	4	4	1	1	1	0	0
<i>Streptococcus agalact.</i>	MG 28	5	1	1	5	4	1	1	1	1	1
<i>Streptococcus agalact.</i>	MG 29	5	1	1	5	4	1	1	1	1	1
<i>Streptococcus agalact.</i>	G5	4-5	n.d.	n.d.	4	n.d.	1	1	1	n.d.	n.d.
<i>Streptococcus bovis</i>	29	5	1	1	4	n.d.	1	0	1	n.d.	n.d.
<i>Streptococcus dysgalac.</i>	80	5	0	0	4	n.d.	1	1	1	n.d.	n.d.
<i>Streptococcus equi zoo.</i>	188	4-5	1	1	4-5	n.d.	1-2	1	1	n.d.	n.d.
<i>Streptococcus suis</i>	154	4-5	1	1	4	n.d.	1	1	1	n.d.	n.d.
<i>Streptococcus suis</i>	159	4-5	1	0	4-5	n.d.	0	1	2	n.d.	n.d.
<i>Streptococcus suis</i>	07-4547	4-5	n.d.	n.d.	4-5	n.d.	0	0	0	n.d.	n.d.
<i>Streptococcus suis</i>	07-5146	5	n.d.	n.d.	4-5	n.d.	0	0	0	n.d.	n.d.
<i>Streptococcus suis</i>	07-5150	4-5	n.d.	n.d.	4	n.d.	0	0	0	n.d.	n.d.
<i>Streptococcus suis</i>	07-5171	4-5	n.d.	n.d.	4	n.d.	0	0	0	n.d.	n.d.
<i>Streptococcus suis</i>	07-5286	4	n.d.	n.d.	4	n.d.	0	0	1	n.d.	n.d.
<i>Streptococcus uberis</i>	2834/ 7D	5	1	1	4	1	1	1	1	n.d.	n.d.
<i>Streptococcus uberis</i>	2952/ 15A	5	1	1	4	1	1	1	1	n.d.	n.d.
<i>Streptococcus uberis</i>	2957/ 7B	5	1	1	4	1	1	1	2	n.d.	n.d.
<i>Streptococcus uberis</i>	MÄ 117	4	1	1	4	1	1	1	1	1	1
<i>Streptococcus uberis</i>	MÄ 118	5	1	1	5	1	1	1	2	1	1
<i>Streptococcus uberis</i>	20	5	1	1	4	n.d.	1	1	1	n.d.	n.d.
<i>Streptococcus uberis</i>	Ä 23	4-5	n.d.	n.d.	4	n.d.	1	1	1	n.d.	n.d.
<i>Streptococcus uberis</i>	ÄS 27	5	n.d.	n.d.	4	n.d.	1	1	1	n.d.	n.d.
<i>Streptococcus uberis</i>	ÄS 29	5	n.d.	n.d.	4	n.d.	0	0	1	n.d.	n.d.

Anhang

Spezies	ID-Nummer	EUB 338	Staphy	Sau	Strept	Straga	ENC 221	ENF 191	ENU 140	EBAC 1790	ESC 468
<i>Streptococcus uberis</i>	ÄS 38	5	n.d.	n.d.	4	n.d.	1	0	1	n.d.	n.d.
<i>Streptococcus uberis</i>	6845/ B	5	1	1	4	1	1	1	1	n.d.	n.d.
<i>Streptococcus uberis</i>	6848/ D	5	1	1	4	1	1	1	1	n.d.	n.d.
<i>Streptococcus uberis</i>	6851/ A	5	1	1	4	1	1	1	1	n.d.	n.d.
<i>Streptococcus uberis</i>	2809/ 24B	5	1	1	4	1	1	1	1	n.d.	n.d.
<i>Streptococcus uberis</i>	2816/1 A	5	1	1	4	1	1	1	1	n.d.	n.d.
<i>Streptococcus uberis</i>	2853/ 27D	5	1	1	5	1	1	1	1	n.d.	n.d.
<i>Streptococcus uberis</i>	6952/ D	5	1	1	4	1	1	1	1	n.d.	n.d.
<i>Streptococcus uberis</i>	2831/ 23D	5	1	1	4	1	1	1	1	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus aureus</i>	07-191	5	4-5	5	1	n.d.	1	1	1	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus aureus</i>	07-2943	5	4	5	1	n.d.	1	1	1	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus aureus</i>	2822/ 43D	4-5	4-5	4-5	1	1	1	1	1	1	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	2824/ 37D	5	5	5	1	1	1	1	2	1	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	6833/ B	5	5	5	1	1	1	1	1	1	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	2847/ 66C	5	5	5	1	1	1	1	1	0	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	2853/ 23D	5	5	4-5	1	1	1	1	1	0	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	6948/ C	5	5	5	1	1	1	1	1	1	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	2921/ 20D	5	5	5	1	1	1	1	1	1	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	2936/24D	5	5	5	1	1	1	1	1	1	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	55	5	4	4	0	n.d.	1	1	2	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	4	4-5	4-5	1	n.d.	1	1	1	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus aureus</i>	114	4-5	4-5	4-5	1	n.d.	1	0	1	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus aureus</i>	115	4-5	4-5	4-5	1	n.d.	1	0	1	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus chromo.</i>	7	5	5	0	1	n.d.	1	0	1	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus chromo.</i>	134	4-5	4-5	1	1	n.d.	1	0	1	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus chromo.</i>	MKNS 60	5	4	1	1	n.d.	1	1	1	1	1
<i>Staphylococcus epider.</i>	79	4	4	1	0	n.d.	0	1	1	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus epider.</i>	137	4	4	0	1	n.d.	1	1	2	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus epider.</i>	K3	5	4	1	1	n.d.	1	1	2	1	1
<i>Staphylococcus haemol.</i>	K8	5	4	1	1	n.d.	1	1	1	1	1
<i>Staphylococcus hyicus</i>	217	4-5	4-5	0	0	n.d.	0	0	0	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus hyicus</i>	216	4-5	4-5	0	1	n.d.	1	1	1	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus hyicus</i>	253	5	5	1	1	n.d.	1	1	2	1	1
<i>Staphylococcus pseud.</i>	68	4-5	4-5	0	1	n.d.	1	1	1	n.d.	n.d.

Anhang

Spezies	ID-Nummer	EUB 338	Staphy	Sau	Strept	Straga	ENC 221	ENF 191	ENU 140	EBAC 1790	ESC 468
<i>Staphylococcus pseud.</i>	78	4-5	4-5	0	1	n.d.	1	1	1	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus pseud.</i>	201	4-5	n.d.	n.d.	1	n.d.	1	1	1	n.d.	n.d.
<i>Staphylococcus simula.</i>	135	4-5	4-5	1	1	n.d.	0	1	0	n.d.	n.d.
<i>Escherichia coli</i>	MEc 101	5	1	2	1	1	1	1	n.d.	5	5
<i>Escherichia coli</i>	MEc 103	5	1	1	1	1	1	1	n.d.	5	5
<i>Escherichia coli</i>	MEc 104	5	1	1	1	1	1	1	n.d.	5	5
<i>Escherichia coli</i>	MEc 105	5	1	2	1	0	1	1	n.d.	5	5
<i>Klebsiella oxytoca</i>	202	5	1	1	1	n.d.	1	1	n.d.	5	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	106	5	1	0	1	n.d.	1	1	n.d.	5	1
<i>Pseudomonas aerugin.</i>	DSM 1117	5	1	1	1	n.d.	1	1	n.d.	1	1
<i>Pantoea agglomerans</i>	242	4	1	1	1	n.d.	1	1	n.d.	5	1
<i>Proteus vulgaris</i>	62	4	1	1	1	n.d.	1	1	2	1	1
<i>Serratia liquefaciens</i>	167	5	1	1	1	n.d.	1	1	2	5	1
<i>Salmonella spezies</i>	Diagn. Stamm	4	1	1	1	n.d.	1	1	n.d.	4	1
<i>Listeria monocytogenes</i>	Diagn. Stamm	4	1	1	1	n.d.	1	1	1	1	1
<i>Histophilus somni</i>	AH 20	5	2	1	1	n.d.	1	1	n.d.	1	1
<i>Histophilus somni</i>	ATCC 700025	5	2	1	1	n.d.	1	1	n.d.	1	1
<i>Bordetella bronchisept.</i>	07-4541	5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	1
<i>Bordetella bronchisept.</i>	07-4588	5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	1
<i>Pasteurella multocida</i>	07-5432	5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	1
<i>Pasteurella multocida</i>	07-5910	5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1	1

n.d.: nicht durchgeführt

9. 7 Einzelergebnisse der Savinase-Auswertung von Mastitismilchproben

Milchproben (n = 50)		Ergebnis der Gramfärbung		GKZ 1-9 x 10 ^x KBE/ml
		Erregermenge nach Tabelle 2		
Proben- nummer	Tagebuch- nummer	vor Savinase	nach Savinase	
105	08-3384 A	-	-	≤ 3
108	08-3388 C	-	-	≤ 3
109	08-3418 A	-	-	≤ 3
110	08-3447 B	-	-	≤ 3
114	08-3485 B	-	-	≤ 3
115	08-3515 D	-	-	≤ 3
103	08-3382 D	-	-	3
107	08-3386 C	-	-	3
122	08-3626 B	-	-	3
127	08-3638 A	-	-	3
131	08-3662 B	-	-	3
134	08-3997 B	-	-	3
90	08-0618-765	-	(+)	4
100	08-3337 D	-	(+)	4
106	08-3385 D	+	++	4
126	08-3635 D	-	(+)	4
130	08-3657 B	-	-	4
10	1569-07	-	(+)	5
111	08-3448 D	(+)	+	5
118	08-3545 D	-	-	5
119	08-3593 B	-	(+)	5
120	08-3608 A	-	(+)	5
121	08-3608 D	-	(+)	5
123	08-3630 B	(+)	+	5
125	08-3634 A	-	(+)	5
129	08-3655 C	-	-	5
40	07-4080	(+)	++++	6
54	07-0321-735	-	+	6
62	08-0416	-	(+)	6
65	08-2230	-	(+)	6
78	08-3040	-	+	6
85	08-3763	++	+++	6
89	08-0618-381	-	-	6
112	08-3478 B	+	++	6

Anhang

Milchproben (n = 50)		Ergebnis der Gramfärbung		GKZ 1-9 x 10 ^x KBE/ml
		Erregermenge nach Tabelle 2		
Proben- nummer	Tagebuch- nummer	vor Savinase	nach Savinase	
113	08-3484 B	+	++	6
58	07-0516-289	(+)	++	7
66	08-2231	+	++	7
71	08-2622	+	++	7
88	08-0521-727	+	++	7
101	08-3363 D	+	++	7
102	08-3367 A	++	+++	7
124	08-3632 A	++	+++	7
15	07-2852	+++	++++	8
27	07-3793	++	+++	8
30	07-3886	++	+++	8
59	07-0601-213	++	+++	8
87	08-3898	++	+++	8
99	08-3330 A	+++	++++	8
63	08-0443	+++	++++	9
97	08-2775	+++	++++	9

10 Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D. gilt mein besonderer Dank für die jederzeit gewährte Unterstützung und motivierenden Worte bei der Vollendung dieser Arbeit, die weitere Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Vertretung dieser Arbeit vor dem Promotionsausschuss.

Herrn Prof. Dr. Dr. Erwin Märtlbauer gilt mein Dank für die freundliche Aufnahme im Institut und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes für den Beginn meiner Arbeit.

Ganz besonders möchte ich Frau PD Dr. Christiane Werckenthin danken. Ohne ihre fachliche Unterstützung, ihre kompetente und nicht zuletzt ihre überaus hilfsbereite Betreuung wäre diese Arbeit nur schwer durchführbar gewesen.

Herrn Dr. Sven Poppert, Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg, danke ich ganz herzlich für die freundliche Einweisung in die FISH, für das Überlassen der Sequenzen der Sondenkandidaten SUB 196, APYO183 und HPS 1436 und für verschiedene Sonden zu Beginn meiner Arbeit.

Ebenfalls danken möchte ich Frau Frau Angelika Gerber, Frau Elisabeth Kügele und Frau Gabriele Platzer für das geduldige Sammeln und Aufbewahren von Proben und Stämmen im Bereich der Diagnostik und Frau Hilke Hubert für die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft im Bereich der Forschung.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Dr. Robert Fux. Seine hilfsbereite und freundschaftliche Unterstützung hat nicht unwesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Auch bei Herrn Dr. Georg Wolf möchte ich mich für die vielen aufmunternden Worte während meiner Arbeit bedanken.

Danksagung

Ganz herzlich danke ich Herrn Gunther Tripke, der mich mit allerlei Sonderanfertigungen für die Durchführung meiner Arbeit handwerklich unterstützt hat.

Ebenso möchte ich allen anderen Mitarbeitern des Instituts danken.

Ein herzliches Dankeschön auch an Frau Wolf vom Dekanat der Tierärztlichen Fakultät sowie an alle Mitarbeiter der Rechnerbetriebsgruppe für die freundliche und schnelle Hilfe in allen Notlagen.

Ein ganz herzlicher Dank geht an Frau Dr. P. Kremer, Frau Dr. S. Seidl und Dr. W. Petzl, Lehr- und Versuchsgut der Tierärztlichen Fakultät der LMU München, für die hilfsbereite Unterstützung.

Ebenso möchte ich Frau Dr. R. Huber-Schlenstedt und Herrn Dr. A. Gangl, Tiergesundheitsdienst Bayern e.V. und Frau I. Blaha, Landeslabor Schleswig-Holstein, für die freundliche Unterstützung danken.

Herrn Dr. M. Schneidereit, Bundesverband für Tiergesundheit e.V. sowie Akademie für Tiergesundheit e.V., Bonn, möchte ich für das entgegengebrachte Vertrauen und die finanzielle Unterstützung im Rahmen des BfT-GermVet-Monitorings sowie des AFT-Projektes zur FISH danken.

Schlussendlich möchte ich meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Freunden danken, dass sie mich immer wieder ermutigt haben.