Aus der
Abteilung für Vergleichende Medizin
(Leiter: Prof. Dr. J. Schmidt)
des GSF - Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg

Vorgelegt über
den Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropatholgie
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl)
am Institut für Tierpathologie
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Optimierung des Nachweises von murinen *Helicobacter*-Infektionen in Versuchstierhaltungen

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximillians-Universität München

von
Karen Jacobsen
aus Kiel

München, 2004

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent:	Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl
Korreferent:	Prof. Dr. M. Goldberg

Tag der Promotion: 23. Juli 2004

Für Hedi, Hans-Peter
und Carsten

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1	**Einleitung**	**1**
1.1	**Fragestellung**	**6**
2	**Literatur**	**8**
2.1	**Die Gattung *Helicobacter***	**8**
2.2	**Murine *Helicobacter* spp.**	**10**
2.2.1	*H. muridarum*	10
2.2.2	*H. hepaticus*	11
2.2.3	*H. rodentium*	12
2.2.4	*H. typhlonius*	12
2.2.5	*Flexispira rappini*	13
2.2.6	*H. bilis*	13
2.3	**Nachweis von murinen *Helicobacter* spp.**	**14**
2.3.1	Nachweismethoden	14
2.3.2	Nachweis muriner *Helicobacter* spp. mittels PCR	15
3	**Material und Methoden**	**18**
3.1	**Material**	**18**
3.1.1	Verbrauchsmaterial	18
3.1.2	Chemikalien	18
3.1.3	Primer	19
3.1.4	Puffer	20
3.1.5	Kits	21
3.1.6	Bakterienkulturmedien	22
3.1.7	Bakterien	23
3.1.8	Versuchstiere	24

3.2 Methoden 24
3.2.1 Gewinnung und Beurteilung der Bakterien für in vivo-Infektionen 24
3.2.2 Infektion von Mäusen 25
3.2.3 Organentnahme 25
3.2.4 DNA-Präparation aus Organproben 26
3.2.5 DNA-Präparation aus Kotproben 26
3.2.6 DNA-Präparation von *Helicobacter*-DNA 27
3.2.7 Bestimmung der DNA-Konzentration und -Qualität 27
3.2.8 Beimpfen von Organ-DNA mit *Helicobacter*-DNA (DNA-DNA-Spike) 28
3.2.9 Polymerase-Kettenreaktion 28
3.2.10 DNA-Gelelektrophorese 31
3.2.11 Sequenzanalyse von PCR-Produkten 31
3.2.12 Überprüfung der Signifikanz von Daten 32

4 Ergebnisse 33

4.1 Vergleich der Sensitivität der nested und single-step PCR 33
4.1.1 Vergleich der Sensitivität der nested und single-step PCR: DNA-Titration 35
4.1.2 Vergleich der Sensitivität der nested und single-step PCR: DNA-DNA-Spike 37
4.1.3 Vergleich der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus gelagerter Proben-DNA und dem Produkt der PCR 1 39

4.2 Wahl des geeigneten Probenmaterials 43
4.2.1 Kotuntersuchung 45
4.2.2 Untersuchung verschiedener Organproben 46
4.2.3 Untersuchung von Magen-, Jejunum- und Dickdarmproben mit und ohne Inhalt 47
4.2.4 Vergleich der Ergebnisse der Organuntersuchung einzelner Mäuse und der Untersuchung von Sammelkot aus den entsprechenden Käfigen 50
4.2.5 Sequenzierung von PCR-Produkten 51

4.3 Infektionsüberwachung von Mauskolonien 54
4.3.1 *Helicobacter*-Status der Zuchtpaare 55
4.3.2 Kotuntersuchung der Nachkommen 56
4.3.3 Untersuchung des Zäkums der Nachkommen: Stichprobenuntersuchung 57
4.3.4 Vergleich des *Helicobacter*-Status von Zuchtpaaren und Nachkommen 58
4.3.5 Vergleich der Ergebnisse aus Kotuntersuchung und Stichprobenuntersuchung 59

5 Diskussion 62

6 Zusammenfassung 76

7 Summary 77

8 Literaturverzeichnis 78

9 Anhang 85

1 Einleitung

Versuchstiere dienen als standardisierte Modelle zur Beantwortung von biomedizinischen Fragestellungen und deren Übertragung auf den Menschen. Sie müssen hohen Qualitätsanforderungen entsprechen. Von besonderer Bedeutung ist dabei die mikrobiologische Qualität der Tiere. Es gibt eine Vielzahl vom Viren, Bakterien und Parasiten, die Krankheiten bei Versuchstieren auslösen. Die meisten Infektionen verlaufen dabei klinisch inapparent. Versuchsergebnisse können davon beeinflusst werden, obwohl die infizierten Tiere häufig keine spezifischen Krankheitssymptome zeigen. Die Verwendung solcher Versuchstiere in biomedizinischen Experimenten kann sich vor allem auf die Aussagekraft, die Reproduzierbarkeit, die Interpretation und die Streuung von Versuchsergebnissen auswirken. Um die Zahl der im Versuch verwendeten Tiere möglichst gering zu halten und um Wiederholungen von Tierversuchen zu vermeiden, sollten nur mikrobiologisch standardisierte Tiere in Versuchen eingesetzt werden. Solche Tiere sollten eine möglichst einheitliche mikrobiologische Qualität haben und frei von spezifischen Pathogenen (spezifisch pathogenfrei; SPF) sein.

Die mikrobiologische Qualität von Versuchstieren wird durch das sogenannte Hygiene-Monitoring kontrolliert. Unter Hygiene-Monitoring versteht man die regelmäßige, standardisierte Untersuchung von Versuchstieren bzw. von entsprechenden Versuchstiereinheiten. In Europa wird das Hygiene-Monitoring in der Regel entsprechend den Empfehlungen der FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Association) durchgeführt [1, 2]. In dieser Empfehlung sind alle derzeit bekannten Infektionserreger aufgelistet, auf die die Versuchstiereinheiten untersucht werden sollten. Ferner werden die Untersuchungsintervalle und die für die jeweiligen Erreger geeignetsten Untersuchungsmethoden empfohlen.

Derartige Empfehlungen wurden von der FELASA erstmals 1996 herausgegeben [1]. Bei deren Novellierung im Jahr 2002 wurde die jährliche Untersuchung von Nagern auf *Helicobacter* spp. erstmals mit aufgenommen. Dem lag zugrunde, dass in den letzten Jahren in der tierexperimentellen Forschung zahlreiche Einflüsse auf Versuchsergebnisse insbesondere durch Infektionen mit murinen *Helicobacter* spp. bekannt geworden sind [3].

So wurden z.B. bei einigen mit murinen *Helicobacter* spp. infizierten Mausstämmen Veränderungen am Dickdarm beobachtet. Diese haben Ähnlichkeit mit

Dickdarmveränderungen bei Menschen mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (inflammatory bowel disease; IBD). Einerseits nutzten Wissenschaftler deswegen mit murinen *Helicobacter* spp. experimentell infizierte Mäuse als Modell für diese Erkrankung des Menschen [4-7]. Andererseits besteht bei persistierenden *Helicobacter*-Infektionen von Versuchsmäusen, die in solchen Versuchen verwendet werden, die Gefahr, dass die damit erzielten Versuchsergebnisse verfälscht werden und nicht aussagekräftig sind.

Untersuchungen zur Pathogenese von *Helicobacter pylori (H. pylori)* wurden häufig an experimentell infizierten Tieren durchgeführt [8-11]. Durch die weite Verbreitung von *Helicobacter*-Infektionen bei verschiedenen Labormausstämmen ist es möglich, dass Mäuse, die in solchen Versuchen eingesetzt werden, schon vor Versuchsbeginn latent mit murinen *Helicobacter* spp. infiziert sind. Dabei kann es in Folge von Kreuzreaktionen zwischen der experimentellen Infektion mit *H. pylori* und der eventuell vorhandenen natürlichen Infektion mit anderen murinen *Helicobacter* spp. zu Fehlinterpretationen der Versuchsergebnisse kommen.

Bei einigen Mausstämmen, die mit *H. hepaticus* infiziert sind, zeigt sich z. B. eine Veränderung der zellulären Struktur der Leber sowie eine erhöhte Konzentration von Leberenzymen im Serum [12]. Darüber hinaus treten chronisch aktive Hepatitiden und sekundär damit verbunden eine erhöhte Inzidenz von Lebertumoren auf [13]. In welchem Umfang sich Infektionen mit anderen murinen *Helicobacter* spp. auf Versuchsergebnisse auswirken, ist bisher nicht bekannt. Allerdings ist davon auszugehen, dass aufgrund der chronischen Entzündungsreaktionen im Verdauungsapparat der Einfluss auf Reproduzierbarkeit und Aussagekraft von Versuchsergebnissen erheblich ist. Aus diesen Gründen ist es für das Tierexperiment in der Maus entscheidend, eine Infektion mit murinen *Helicobacter* spp. vor Versuchsbeginn ausschließen zu können.

Zuverlässigkeit und Sensitivität einer *Helicobacter*-Diagnostik erfordern die Auswahl und korrekte Durchführung einer geeigneten Nachweismethode. Als Nachweismethode für murine *Helicobacter* spp. wird in der Regel die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction; PCR) angewendet. Diese Methode ist schnell, sensitiv und spezifisch. Allerdings hat es sich in der Praxis gezeigt, dass ein zweifelsfreier *Helicobacter*-Nachweis nicht regelmässig gelingt. Für routinemäßige Untersuchungen von *Helicobacter*-Infektionen in Labormäusen wird generell möglichst frischer Kot verwendet. Dazu genügen wenige Pellets.

Bei einer vergleichenden Studie wurden zum Beispiel Kotproben von 20 Mäusen, die mit mindestens einer murinen *Helicobacter* spp. infiziert waren, an drei unterschiedliche Laboratorien geschickt. Diese untersuchten die Proben mittels PCR, und jedes Labor wies in unterschiedlich vielen Proben *Helicobacter*-spezifische DNA nach. Wichtige Ergebnisse der Studie sind in Tabelle 1 zusammengefasst [14].

Tabelle 1: *Helicobacter*-Nachweis verschiedener Laboratorien mittels PCR nach Dew et al. (1997)

	Labor 1	Labor 2	Labor 3
Ergebnis*	**0/20**	**20/20**	**13/20**
nachgewiesen	*H. hepaticus*	*H. hepaticus*	*Helicobacter* spp.

*Zahl der positiven Proben / Zahl der Proben untersucht

In der SPF-Zuchtkolonie der Versuchstierhaltung des GSF – Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit machten wir bei der *Helicobacter*-Diagnostik ähnliche Beobachtungen. Bei der Untersuchung von Kotproben derselben Tiere durch ein Untersuchungslabor im Abstand von vier Wochen erhielten wir unterschiedliche Ergebnisse zu beiden Zeitpunkten. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Ergebnisse der Untersuchung derselben Tiere bei der *Helicobacter*-Diagnostik zu unterschiedlichen Zeitpunkten

	Probenentnahme	
	Tag 0	Tag 28
Tier-Nr.	PCR-Ergebnis	PCR-Ergebnis
1	-	-
2	-	+
3	-	+
4	-	+
5	-	-
6	-	+
7	-	+
8	-	+
9	-	+
10	-	+
positive Proben	**0/10**	**8/10**

Kotproben von denselben Tieren wurden 14 Tage später noch einmal gesammelt und gleichzeitig von zwei kommerziellen Laboratorien und in unserem Labor mit der PCR-Methode untersucht. Alle drei Laboratorien kamen wie in der Studie von Dew et al. bei der Untersuchung von Proben derselben Tiere zu unterschiedlichen Ergebnissen. Diese Ergebnisse sind kurz in Tabelle 3 zusammengefasst. Unabhängig von der Möglichkeit einer Neuinfektion zwischen Tag 0 und Tag 28 der Probennahme (Tab. 2) weisen diese Befunde (Tab. 3) auf ein Dilemma in der *Helicobacter*-Diagnostik hin.

Tabelle 3: PCR-Ergebnisse von zwei kommerziellen Laboratorien und von unserem Labor bei der Untersuchung derselben Proben

	Labor 1	Labor 2	Labor 3
Tier-Nr.	PCR-Ergebnis	PCR-Ergebnis	PCR-Ergebnis
1	-	-	-
2	-	-	-
3	+	+	-
4	+	-	-
5	+	-	-
6	-	-	-
7	-	-	-
8	-	+	-
9	+	-	-
10	+	-	-
positive Proben	**5/10**	**2/10**	**0/10**

Die Schwierigkeiten beim Nachweis muriner *Helicobacter*-Infektionen können verschiedene Gründe haben.

Die Auswahl der Tiere für die Probenentnahme aus einer Mauskolonie könnte Einflüsse auf die Untersuchungsergebnisse haben. Dabei spielt zum Beispiel das Alter der Tiere eine wichtige Rolle. Neugeborene bzw. junge Tiere einer Kolonie sind möglicherweise für den Nachweis besonders geeignet, da sie noch keine konkurrierende Darmflora besitzen und ihr Immunsystem noch nicht vollständig entwickelt ist [15, 16]. Dementsprechend wäre auch möglich, dass ältere Tiere mit einem ausgereiften Immunsystem die Infektion erfolgreich kontrollieren und ein sicherer Nachweis deswegen nicht immer möglich ist. Außerdem ist es denkbar, dass ältere Tiere für den *Helicobacter*-Nachweis eher geeignet sind als Jungtiere, da durch das Persistieren der Infektion die Bakterien sich erst ab einem gewissen Alter der Maus so vermehrt haben, dass die Infektion nachweisbar ist [17]. Beeinflusst werden könnten Untersuchungsergebnisse auch durch den Mausstamm, bzw. Genotyp oder durch das Geschlecht der Tiere. In einer Studie von Whary et al. wurde gezeigt, dass C57BL/6 Mäuse im Vergleich zu A/JCr Mäusen bei experimenteller Infektion mit *H. hepaticus* zwar nur geringgradigere Hepatitiden ausbildeten, aber gleichzeitig höhere Besiedelungsraten als A/JCr Mäuse im Zäkum aufwiesen [18]. In einer früheren Studie von Ward et al. wurde berichtet, dass *H. hepaticus* in manchen Mausstämmen (A/JCr, C3H/HeNCr, SJL/NCr, BALB/cAnNCr, *scid*/NCr) chronisch

aktive Hepatitiden und sogar Lebertumore auslöste. Andere Mausstämme (C57BL/6NCr, B6C3F1, Nacktmäuse mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund) schienen wiederum gegen die Ausbildung von Hepatitiden resistent zu sein [13]. Darüber hinaus wurden Lebertumore nur bei männlichen Mäusen festgestellt [19].

Auch die Wahl des Probenmaterials kann den *Helicobacter*-Nachweis stark beeinflussen. Für die DNA-Präparation werden häufig Kot, die Leber oder verschiedene Darmabschnitte eingesetzt. In Kot und Darminhalt finden sich regelmäßig PCR-Inhibitoren. Dabei handelt es sich vorrangig um komplexe Polysaccharide, welche bei der PCR die Wirkung der *Taq* Polymerase hemmen und somit falsch-negative Ergebnisse verursachen können [20].

Auch die Methode der DNA-Präparation selbst kann die Qualität der gewonnen DNA und dadurch die PCR-Ergebnisse entscheidend beeinflussen. Bei der Lysierung des Probenmaterials wird die DNA zwar freigesetzt, aber erst durch eine anschließende Aufreinigung der Probe kann die DNA von anderen Bestandteilen der Probe abgetrennt und ein sehr reines DNA-Isolat gewonnen werden. Als Faustregel gilt auch hier: je reiner die Proben-DNA, desto aussagekräftiger ist die damit durchgeführte PCR.

Für den Nachweis einer *Helicobacter*-Infektion mittels PCR hat die Wahl der Primer einen entscheidenden Einfluss. Derzeit werden generell zwei Gruppen von Primern verwendet**.** Bei der ersten Gruppe handelt es sich um Primer, die Gattungs-spezifisch sind [21, 22]. Wenn durch Verwendung dieser Primer ein spezifisches PCR-Produkt generiert wird, ist dies der Hinweis auf die Anwesenheit von DNA einer der fünf bisher bekannten prävalenten murinen *Helicobacter* spp. in der Proben-DNA.

Die zweite Gruppe umfasst Primer, die jeweils für eine *Helicobacter*-Spezies ein spezifisches Produkt bilden [23-26]. Wenn beim Einsetzen dieser Primer die PCR ein spezifisches Produkt generiert, kann man auf die Anwesenheit dieser bestimmten murinen *Helicobacter*-Spezies in der Proben-DNA schließen. Über das Vorhandensein anderer muriner *Helicobacter* spp. in der Proben-DNA lässt sich bei Verwendung dieser zweiten Gruppe von Primern allerdings keine Aussage machen.

1.1 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Nachweismethode für murine *Helicobacter* spp. in Mauskolonien zu optimieren und ein zuverlässiges, standardisiertes Diagnoseverfahren für Routineuntersuchungen von Mauskolonien zu etablieren. Um

dieses Ziel zu erreichen, wurden eine nested PCR für murine *Helicobacter* spp. etabliert und folgende Fragen bearbeitet:

- Ist die nested PCR sensitiver als die von kommerziellen Laboratorien normalerweise durchgeführte single-step PCR?
- Welches Probenmaterial ist für den Nachweis von murinen *Helicobacter* spp. am besten geeignet?
- Wie lässt sich das Hygiene-Monitoring einer Mauskolonie bezüglich Infektionen mit murinen *Helicobacter* spp. am effizientesten durchführen?

Um diese Fragen zu bearbeiten, wurden in-vitro Versuche und Infektionsversuche mit Mäusen durchgeführt.

2 Literatur

2.1 Die Gattung *Helicobacter*

Die Gattung *Helicobacter* umfasst eine Gruppe von gram-negativen Bakterien, die als einfach gebogene oder spiralförmige Stäbchen in mikroaerophiler Atmosphäre wachsen. In ungünstigem Millieu, z. B. bei Trockenheit der Platte, kommt es zur Ausbildung kokkoider Formen. *Helicobacter* spp. konnten aus dem Verdauungstrakt einiger Vogelarten und vieler Säugetiere inklusive des Menschen isoliert werden. In Tabelle 4 werden einige bisher bekannte *Helicobacter* spp. exemplarisch dargestellt. Die *Helicobacter* spp. werden anhand ihrer charakteristischen Morphologie und ihrer biochemischen Eigenschaften unterschieden. Von den bisher bekannten murinen *Helicobacter* spp. sind diese in der Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 4: *Helicobacter*-Spezies verschiedener Säugetiere

Name	Vorkommen	Isoliert aus	Literatur
H. bilis	Maus	Leber, Zäkum, Kolon	[24]
H. canis	Hund	Fäzes	[27]
H. cetorum	Wal	Magen, Fäzes	[28]
H. felis	Katze	Magen	[29]
H. heilmanii	Mensch	Magen	[30]
H. hepaticus	Maus	Leber, Zäkum, Kolon	[31, 32]
H. mesocricetorum	Hamster	Fäzes	[33]
H. muridarum	Maus, Ratte	Ileum, Zäkum	[34]
H. mustelae	Frettchen	Magen	[35, 36]
H. pullorum	Huhn, Mensch	Leber, Duodenum, Zäkum	[37]
H. pylori	Mensch	Magen	[38]
H. rodentium	Maus	Zäkum, Kolon, Fäzes	[25]
H. trogontum	Ratte	Kolon	[39]
H. typhlonius	Maus	Fäzes	[40]
Flexispira rappini	Maus	Ileum, Zäkum, Kolon	[41]

Tabelle 5: Eigenschaften muriner *Helicobacter* spp

		H. bilis	***H. hepaticus***	***H. muridarum***	***H. rodentium***	***H. typhlonius***
Enzymaktivität						
Oxidase		+	+	+	+	+
Katalase-Produktion		+	+	+	+	+
Urease		+	+	+	-	-
Indoxylazetat-Hydrolyse		-	+	+	-	-
Hippurat-Hydrolyse		-	-	-	-	-
H_2S-Produktion		+	+	-	k. A.*	-
Nitrat-Reduktion		+	+	-	+	k. A.*
Antibiotika-Resistenz						
Cephalothin		+	+	+	+	+
Nalidixinsäure		+	+	+	+	-
Metronidazol		-	-	k. A.*	k. A.*	k. A.*
Morphologie						
Geißeln	Anzahl	3 - 14	1	10 - 14	1	1
	bescheidet	+	+	+	-	+
	Verteilung	bipolar	bipolar	bipolar	bipolar	bipolar
periplasmatische Zilien		+	-	+	-	-
Größe (µm)		0,5 x 4 - 5	0,2 – 0,3 x 1,5 - 5	0,5 – 0,6 x 3,5 - 5	0,3 x 1,5 - 5	0,3 x 2,0 – 3,0
Literatur		[24]	[32]	[34]	[25]	[40]

*k. A.; keine Angaben

2.2 Murine *Helicobacter* spp.

Helicobacter-Infektionen der Maus erfolgen in der Regel auf dem fäkal-oralen Weg [19, 42]. Genauere Kenntnisse über den Verlauf der Infektion sind bisher nicht bekannt. Alle bisher bekannten murinen *Helicobacter*-Spezies wurden aus Dickdarmabschnitten oder der Leber isoliert. Im Dickdarm besiedeln sie vor allem die Schleimhautkrypten [32]. Die Infektion verläuft, abhängig vom Mausstamm, meist klinisch inapparent und persistiert. In immundefizienten Mäusen treten als klinische Symptome gelegentlich Rektumvorfälle auf [43]. Eine Therapie ist schwierig. In zwei Studien wurde gezeigt, dass eine Therapie mit Antibiotika vorübergehend erfolgreich sein kann. Durch die Behandlung von natürlich mit *H. hepaticus* infizierten Mäusen mit einer Tripeltherapie mit Amoxicillin kombiniert mit Metronidazol und Bismut per os dreimal täglich über einen Zeitraum von zwei Wochen konnte man die Infektion so bekämpfen, dass einen Monat nach der letzten Behandlung in keinem behandelten Tier *H. hepaticus* nachgewiesen werden konnte [44, 45]. Diese Behandlung ist allerdings sehr zeit- und arbeitsaufwändig. Es ist bisher weder untersucht worden, ob die Bakterien wirklich vollständig aus allen Tieren einer Kolonie eliminiert werden, noch ob die Besiedelung mit den Bakterien durch die Behandlung möglicherweise nur vorübergehend unter die Nachweisgrenze verschoben wird. Außerdem gibt es Tierversuche, insbesondere Toxizitätsstudien, in denen eine medikamentöse Behandlung der Tiere nicht möglich ist und sich eine Antibiotika-Therapie deshalb ausschließt.

2.2.1 *H. muridarum*

H. muridarum wurde als erste murine *Helicobacter* -Spezies bereits 1983 isoliert [46]. Philips und Lee isolierten spiralförmige Bakterien einheitlicher Morphologie aus der Darmschleimhaut von Wistar-Ratten und BALB/c-Mäusen auf *Campylobacter*-Selektiv-Medium unter mikroaerophilen Bedingungen. Sie beobachteten eine auffallende Dichte dieser Bakterien im Ileum. Nach experimenteller Inokulation des Isolats in gnotobiotische Mäuse wurde die höchste Bakteriendichte in Zäkum und Kolon festgestellt. Im Ileum hingegen wurden nur wenige Bakterien in einzelnen Tieren vorgefunden. Die Autoren schlossen daraus, dass bei fehlender konkurrierender Darmflora der Dickdarm das bevorzugte Milieu ist [46]. Die

Charakterisierung und Klassifizierung dieser Spezies erfolgte erst zehn Jahre später [34].

1992 wurde *H. muridarum* auch in der Magen-, Dünndarm- und Dickdarmschleimhaut von 6 – 8 Wochen alten BALB/c-Mäusen nachgewiesen. Bei diesen Untersuchungen korrelierte das Vorkommen dieses Bakteriums im Magen mit dem Auftreten von Gastritiden [47].

In älteren Mäusen wurde auch eine Besiedelung der Magenschleimhaut mit *H. muridarum* festgestellt [48]. Eine mögliche Begründung liegt in der mit fortschreitendem Alter abnehmenden Zahl der für die Bildung der Magensäure verantwortlichen Belegzellen [48]. Außerdem wurde beobachtet, dass es in mit *H. muridarum* natürlich infizierten Mäusen bei experimenteller Infektion mit gastrischen *Helicobacter* spp. (z. B. *H. felis*) zur Ausdehnung der Besiedelung durch *H. muridarum* vom Dickdarm auf den Magen kommt. Diese Beobachtung wurde einer damit einhergehenden Veränderung des Magen-Milieus zugeschrieben [49]. Jiang et al. haben beobachtet, dass die künstliche Infektion genetisch veränderter Mauslinien mit *H. muridarum* Dickdarmveränderungen auslöste, die dem Krankheitsbild der IBD des Menschen ähnelten [7]. Daher werden solche Versuche mit *H. muridarum* als Tiermodell für Morbus Crohn und Kolitis ulzerosa genutzt.

2.2.2 *H. hepaticus*

Erstmalig wurde man im National Cancer Institut – Frederick Cancer Research and Development Center (NCI-FCRDC), USA, auf diesen Erreger aufmerksam, als im Rahmen einer toxikologischen Langzeitstudie chronische, aktive Hepatitiden in der unbehandelten Kontrollgruppe auftraten. Innerhalb kürzester Zeit kam es in bestimmten Mausstämmen (A/JCr, C3H/HeCr, BALB/cAnNCr, *scid*/NCr) bei bis zu 100% der männlichen Tiere zu histologisch ausgeprägten Hepatitiden. Ausserdem wurden fokale Nekrosen und subakute, fokale, nichteitrige Entzündungen der Leber beobachtet [13, 19, 31]. Im Gegensatz dazu zeigten Mäuse anderer Stämme (C57Bl/6NCr, Nacktmäuse mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund) keine Leberveränderungen. In männlichen A/JCr-Mäusen, die älter als ein Jahr waren, entwickelten sich hepatozelluläre Tumoren [12, 13, 19].

Abgesehen von der Leber konnte *H. hepaticus* auch im Dickdarm nachgewiesen werden. In immundefizienten Mäusen, wie z. B. T-Zell-defekte Nacktmäuse oder

scid-Mäuse *(*severe combined immunodeficiency*; scid)* ohne funktionierende B- und T-Zellen mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund, löste eine Infektion mit *H. hepaticus* Typhlitis, Kolitis und Proktitis aus. Ferner wurde ein erhöhtes Auftreten von Rektumvorfällen beobachtet [43]. *H. hepaticus* kann wie *H. muridarum*, *H. bilis*, und *H. typhlonius* bei experimenteller Infektion verschiedener, genetisch veränderter Mauslinien zu der IBD des Menschen sehr ähnlichen Darmveränderungen führen, und wird deswegen ebenfalls als Tiermodell für diese Erkrankungen genutzt [4, 50, 51].

2.2.3 *H. rodentium*

H. rodentium wurde entdeckt, als bei Routineuntersuchungen einer Mauskolonie eine Urease-negative *Helicobacter*-Spezies isoliert wurde. Bis zu diesem Zeitpunkt war keine Urease-negative *Helicobacter*-Spezies in Mäusen bekannt. Aufgrund der Analyse des 16S rRNA Gens und seiner morphologischen sowie biochemischen Eigenschaften, wurde diese Bakterienspezies der Gattung *Helicobacter* zugeordnet [25]. Außerdem wurde das Auftreten von Durchfällen in einer Zuchtkolonie von genetisch veränderten *scid*-Mäusen mit *H. bilis* und *H. rodentium* in Verbindung gebracht [52].

2.2.4 *H. typhlonius*

H. typhlonius wurde von Fox et al. aus genetisch veränderten Mäusen mit IBD-ähnlichen Darmveränderungen isoliert. Mitarbeiter dieser Gruppe konnten zeigen, dass diese Spezies auch in anderen Mausstämmen, wie *scid*/NCr oder A/JCr, dieselben Symptome hervorruft [5]. Kurz danach wurde *H. typhlonius* von Franklin et al. aus den Fäzes von BALB/c Mäusen isoliert [40]. Eine künstliche Infektion mit diesem Isolat löste in *scid*-Mäusen dieselben Symptome aus, die schon von Fox et al. beschrieben worden waren [5, 26]. 2001 wurde *H. typhlonius* morphologisch und biochemisch charakterisiert und der Gattung *Helicobacter* zugeordnet [40].

2.2.5 *Flexispira rappini*

1993 wurde *Flexispira rappini* aus dem distalen Ileum, Zäkum und Kolon von drei Wochen alten, weiblichen CFW Mäusen isoliert [41]. Neuere Daten zeigten, dass *Flexispira rappini* acht verschiedene Taxa umfasst, die ebenfalls der Gattung *Helicobacter* zuzuordnen sind. Diese Gruppe, die bisher als *Flexispira rappini* bezeichnet wurde, wurde nach einem Vorschlag von Dewhirst et al. in *Helicobacter* sp. *flexispira* mit entsprechender Taxon-Nummer umbenannt [53].

2.2.6 *H. bilis*

Diese *Helicobacter*-Spezies wurde aus der Leber und dem Dickdarm klinisch inapparent infizierter Mäuse der Stämme C57BL/6, DBA/2 und BALB/c in einem Alter zwischen 19 und 27 Monaten isoliert. Die Mäuse zeigten chronische Hepatitiden [24]. In einer Kolonie von genetisch veränderten *scid*-Mäusen wurden gehäuft Durchfälle beobachtet, welche einer Koinfektion mit *H. bilis* und *H. rodentium* zugeschrieben werden konnten. In den Mäusen wurden gleichzeitig entzündungsbedingte Hyperplasien des Zäkums und des Kolons beobachtet [52].
Veränderungen der Leber schienen bei künstlich mit *H. bilis* infizierten *scid*-Mäusen geschlechtsspezifisch zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufzutreten. Bei männlichen Mäusen entwickelten sich schon nach drei Monaten chronisch aktive Hepatitiden, bei weiblichen Tieren erst nach sechs Monaten [54].
Eine gezielte Infektion verschiedener genetisch veränderter Mäuse mit *H. bilis* führte zu IBD-ähnlichen Dickdarmveränderungen. Wie bei *H. muridarum*, *H. hepaticus* und *H. typhlonius* werden solche Tierversuche mit *H. bilis* ebenfalls als Tiermodell für die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen des Menschen benutzt [6, 55].
H. bilis scheint auch bei anderen Tierarten vorzukommen. Diese *Helicobacter*-Spezies konnte aus immundefizienten Nacktratten isoliert werden, welche durch proliverative bis ulcerative Typhlitis, Kolitis und Proktitis aufgefallen waren [56]. Bei einer Untersuchung, in der das Vorkommen und die Morphologie von im Magen vorkommender Bakterien in Hundepopulationen beurteilt wurde, konnte aus dem Magen eines Hundes *H. bilis* isoliert werden [57]. Auch in den Fäzes von Katzen konnte *H. bilis* nachgewiesen werden [58]. Beim Menschen wurde *H. bilis* im

Zusammenhang mit Gallenblasenentzündungen und Gallenblasenkarzinomen nachgewiesen [59, 60].

2.3 Nachweis von murinen *Helicobacter* spp.

2.3.1 Nachweismethoden

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, eine Infektion von Mäusen mit *Helicobacter* spp. zu diagnostizieren. Dazu zählt der direkte Nachweis durch Isolierung und Kultur, durch Histologie oder mittels PCR. Der indirekte Nachweis einer humoralen Immunantwort durch ein Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ist ebenfalls möglich.

Bei der Isolierung werden meist Proben von Zäkum oder Kolon entnommen und unter Zugabe von physiologischer Kochsalzlösung homogenisiert. Danach lässt man die unlöslichen Bestandteile sedimentieren. Da im Darm zahlreiche Bakterien vorkommen, die schneller als *Helicobacter* spp. wachsen, kann man den Überstand vor dem Aufbringen auf den Nährboden filtrieren. Bei der Filtration wird der Überstand mit einer Spritze durch einen Vorsatzfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm gedrückt. Bakterien, die größer als *Helicobacter* spp. sind, werden von der Filtermembran zurückgehalten. Dadurch wird das Aufbringen anderer Darmbakterien eingeschränkt. Um zusätzlich das Wachstum anderer Darmbakterien zu unterdrücken, können den Nährböden Antibiotika zugegeben werden [61]. Trotz dieser Maßnahmen ist es äußerst schwierig, eine Reinkultur zu erreichen.

Die histologische Untersuchung umfasst die Hämatoxillin-Eosin Färbung zum Nachweis von entzündlichen Veränderungen in Leber und Dickdarm. Auch die modifizierte Steiner-Versilberung von Leber, Gallenblase und -gängen und Dickdarmabschnitten wird angewendet, um die spiralförmigen Bakterien sichtbar zu machen [62, 63]. Ein großer Nachteil der Histologie ist der Arbeits- und Zeitaufwand, da vom gesamten Dickdarm Präparate angefertigt und untersucht werden müssen. Außerdem können die murinen *Helicobacter* spp. anhand einer Silberfärbung nicht differenziert werden.

Für die Etablierung eines ELISA zum Nachweis von Serumantikörpern gegen *Helicobacter* spp. wurden verschiedene Varianten der Antigenpräparation publiziert. Am einfachsten ist die Verwendung eines Bakterienlysats als Antigen. Die Spezifität sowie die Sensitivität dieses Antigens scheinen jedoch gering zu sein [13, 19, 42].

Um die Spezifität und die Sensitivität zu erhöhen, können Proteinextrakte aus der Bakterienmembran als Antigen eingesetzt werden [64]. Ferner wurde ein membran-assoziiertes, immunogenes Protein charakterisiert und kloniert [65]. Wenn diese Antigene im ELISA einsetzt werden, kann zwar die Spezifität erhöht werden, die Sensitivität bleibt jedoch gering. Außerdem scheint sich in einer frühen Phase der Infektion die humorale Immunantwort nicht zuverlässig mit dem ELISA nachweisen zu lassen [66]. Aufgrund dieser Nachteile wird der ELISA selten für die Diagnostik von *Helicobacter*-Infektionen angewandt.

Am häufigsten wird der Nachweis von murinen *Helicobacter* spp. mit der PCR durchgeführt. Dabei werden *Helicobacter*-spezifische DNA-Sequenzen im Probenmaterial nachgewiesen. Die PCR ist eine schnelle und spezifische Methode, so dass sie auch für die Untersuchung eines größeren Probenumfanges geeignet ist. Sie scheint zudem sensitiver als die Isolierung und Kultur, die histologische Untersuchung oder der ELISA zu sein [66, 67].

2.3.2 Nachweis muriner *Helicobacter* spp. mittels PCR

Für den Nachweis von Infektionen mit murinen *Helicobacter* spp. dient häufig ein Abschnitt des Gens für die bakterielle, ribosomale 16S RNA (16S rRNA). Dieses Gen ist bei vielen Bakterien innerhalb einer Spezies hochkonserviert. Deswegen kann mit dieser Gensequenz die Differenzierung verschiedener *Helicobacter*-Spezies durchgeführt werden [68-70]. Auch alle bisher bekannten murinen *Helicobacter* spp. können anhand dieser Gensequenz differenziert werden [71]. Dieses Gen umfasst bei den bisher bekannten murinen *Helicobacter* spp. zwischen ca. 1400 und 1600 bp. Es gibt auf diesem Gen einerseits Abschnitte, die bei allen bisher bekannten murinen *Helicobacter* spp. identisch sind. Dadurch ist es möglich mit Primern, die an einem solchen Abschnitt binden, in einer PCR ein Gattungs-spezifisches PCR-Produkt zu erhalten, welches gleichzeitig alle bisher bekannten murinen *Helicobacter* spp. nachweist. Die Differenzierung der Spezies ist dabei nicht möglich. Mähler et al. etablierten eine Gattungs-spezifische PCR, welche allerdings *H. rodentium* nicht detektiert und gleichzeitig jeweils ein spezifisches PCR-Produkt für *H. bilis* und ein gemeinsames spezifisches PCR-Produkt für *H. muridarum*, *H. hepaticus* und *Flexispira rappini* amplifiziert [67]. Dass die Gattungs-spezifische PCR von Mähler et al. auch *H. typhlonius* detektiert, wurde bei direkten Vergleichen der Sequenz des

16S rRNA-Gens von *H. typhlonius* mit den Sequenzen der Primer von mir festgestellt. Eine Gattungs-spezifische PCR für den Nachweis aller bisher bekannten, murinen *Helicobacter* spp. wurde von Riley et al. und Beckwith et al. publiziert [21, 22].

Andererseits existieren auf dem Gen für die bakterielle 16S rRNA auch Abschnitte, die nur für eine einzelne murine *Helicobacter*-Spezies charakteristisch sind. Werden Primer eingesetzt, die sich an solche Abschnitte anlagern, erhält man bei der PCR ein Spezies-spezifisches PCR-Produkt. Man erhält also Informationen darüber, ob DNA einer bestimmten murinen *Helicobacter*-Spezies sich definitiv in der Proben-DNA befindet. Deswegen wird die Möglichkeit der Spezies-spezifischen PCR hauptsächlich dafür genutzt, um gezielt eine bestimmte murine *Helicobacter* -Spezies in einer Mauskolonie zu identifizieren. Spezies-spezifische PCR-Methoden sind für *H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. typhlonius* und *H. rodentium* veröffentlicht worden [23-26]. Die Lage der jeweiligen Abschnitte der spezifischen PCR-Produkte innerhalb des 16S rRNA-Gens ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

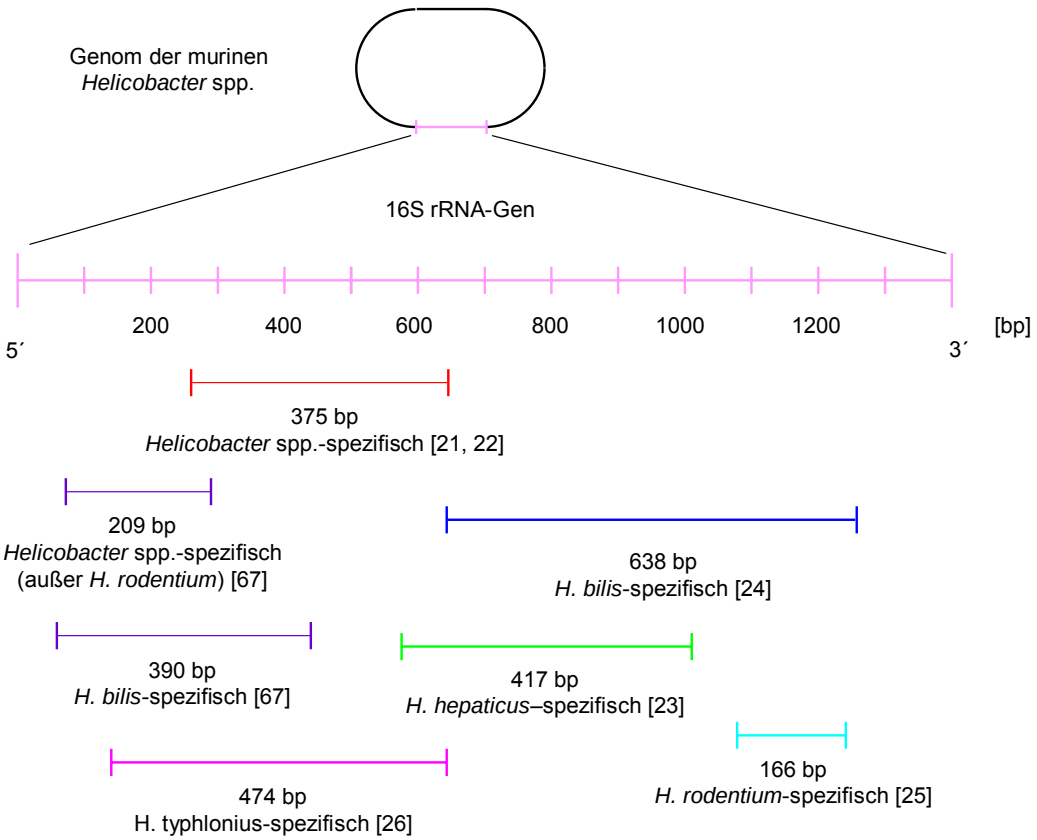


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Lage der Abschnitte der spezifischen PCR-Produkte innerhalb des 16S rRNA-Gens

Außer der Spezies-spezifischen PCR ist die Restriktionsenzym-Analyse eine weitere Methode, um murine *Helicobacter* spp. zu unterscheiden. Das Gattungs-spezifische PCR-Produkt wird dabei mit speziellen Restriktionsenzymen verdaut. Je nachdem von welcher murinen *Helicobacter* spp. das PCR-Produkt abstammt, erhält man unterschiedlich große, diagnostische DNA-Fragmente [21].

Da die murinen *Helicobacter* spp. bei der Kultur auf den Nährböden schwärmend wachsen und keine Kolonien bilden, ist eine Quantifizierung der Bakterien sehr schwierig. Eine indirekte Quantifizierung kann durch eine real-time PCR erfolgen. Dabei entsteht durch spezifische Bindung der mit fluoreszierenden Markern gekoppelten Primer an den entsprechenden Abschnitt der Proben-DNA eine Fluoreszenz, deren Intensität gemessen wird. Durch Vergleich mit einem Standard kann auf die Anzahl der Kopien der spezifischen Ziel-DNA in der fraglichen Probe geschlossen werden. Diese PCR-Methode wurde für den Nachweis von *H. hepaticus* und *Helicobacter spp.* beschrieben [72, 73].

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verbrauchsmaterial

Alle Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Eppendorf (Wessling-Berzdorf), Biozym (Hess. Oldendorf) oder Nunc (Karlsruhe) bezogen.

3.1.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien, soweit nicht anders angegeben, wurden von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Merck (Darmstadt) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

3.1.3 Primer

Sämtliche verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen.

Tabelle 5: Verwendete Primer

Bezeichnung	**Nucleotidsequenz (5' – 3')**	**Tm [°C]**	**Länge des PCR-Produktes [bp]**	**Spezifität**
H1f	5'-TAG TGT AAA ACG ACG GCC AGT AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'	73,5	1604	bakterielles 16S rRNA-Gen (PCR 1)
H1604r	5'-TAG CAG GAA ACA GCT ATG ACA CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT-3'	71,4		bakterielles 16S rRNA-Gen (PCR 1)
H418f	5'-CTA TGA CGG GTA TCC GCC-3'	58,2	375	*Helicobacter*-Genus-spezifisch (PCR 2)
H793r	5'-ATT CCA CCT ACC TCT CCC A-3'	56,7		*Helicobacter*-Genus-spezifisch (PCR 2)

Die Nukleotide des dNTP-Mix für die PCR stammten von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Roth).

Tabelle 6: Zusammensetzung des dNTP-Mix

Bezeichnung	Zusammensetzung	Verwendung
2 mM dNTP-Mix	1 Volumen 100 mM dATP	Durchführung der PCR
	1 Volumen 100 mM dCTP	
	1 Volumen 100 mM dGTP	
	1 Volumen 100 mM dTTP	
	46 Volumen $Aqua_{bidest.}$	

3.1.4 Puffer

Tabelle 7: Verwendete Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	Verwendung
TBE-Puffer (10x)	0,9 M TRIS	Laufpuffer für DNA-Agarosegele
	0,9 M Borsäure	
	0,02 M EDTA, pH 8,0	
PBS	137 mM NaCl	Waschpuffer, Suspension der Bakterien
	2,7 mM KCl	
	4,3 mM Na_2HPO_4	
	1,4 mM KH_2PO_4, pH 7,3	

3.1.5 Kits

Alle in dieser Arbeit verwendeten Kits wurden von Qiagen (Hilden) bezogen.

Tabelle 8: Verwendete Kits

Bezeichnung	Verwendung
QIAamp® DNA mini Kit	Präparation von DNA aus Organproben
QIAamp® DNA Stool mini Kit	Präparation von DNA aus Kotproben
DNeasy™ tissue Kit	Präparation von DNA aus Bakteriensuspensionen
QIAquick® PCR Purification Kit	Aufreinigung von PCR-Produkten aus PCR-Reaktionsansätzen für Sequenzierungen
QIAquick® Gel Extraction Kit	Aufreinigung von PCR-Produkten aus Agarosegelen für Sequenzierungen
Taq DNA Polymerase	Durchführung von PCR

3.1.6 Bakterienkulturmedien

Tabelle 9: Bakterienkulturmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller	Verwendung
selektive Pferdeblutagar-Platten	40 g Blutagar-Basis Nr. 2	Oxoid (Wesel)	Kultur von *Helicobacter* spp.
	→ in 1 l $Aqua_{bidest.}$ lösen		
	autoklavieren		
	50 ml Pferdeblut, defibriniert	Fiebig-Nährstofftechnik (Idstein-Niederauroff)	
Zusätze (pro 1 l Blutagar-Basis Nr. 2)	Amphotericin B 2,5 mg	Sigma	
	Polymyxin B-Sulfat 2,5 mg	Sigma	
	Trimethoprim-Lactat 5 mg	Sigma	
	Vancomycin 12 mg	Oxoid	
	→ in 8,4 ml $Aqua_{bidest.}$ lösen, steril filtrieren		
Einfriermedium	3,7 g Brain heart infusion agar	Becton-Dickinson (Heidelberg)	Kryokonservierung von *Helicobacter* spp. bei -80°C
	→ in 100 ml $Aqua_{bidest.}$ lösen		
	31 g Glycerin	Sigma	
	autoklavieren		

3.1.7 Bakterien

Die in dieser Arbeit verwendeten *Helicobacter*-Spezies sind ATCC (American Type Culture Collection)-zertifiziert und wurden von der School of Microbiology und Immunology der Universität von New South Wales (Sydney, Australien) bezogen. Die Bakterien wurden auf selektiven Pferdeblutagarplatten bei 37°C in mikroaerophiler Atmosphäre (N_2:H:CO_2; 90:5:5) in Anaerobier-Systemen von Oxoid kultiviert. Die Bakterien wurden alle zwei bis drei Tage subkultiviert, indem Bakterien von bewachsenen Pferdeblutagarplatten mit einer sterilen Einmal-Impföse auf frische Platten übertragen wurden. Für die Kryokonservierung wurden die Bakterien von jeweils einer Pferdeblutagarplatte mit ca. 1 ml des speziellen Einfriermediums und einem sterilen Glasspatel geschabt, in ein Kryoröhrchen überführt und bei -80°C gelagert. Eine Qualitätskontrolle der Bakterien wurde jeweils vor der Subkultivierung, vor dem Einfrieren und vor den *Helicobacter*-DNA-Präparationen durchgeführt. Dazu wurde das Wachstum der Bakterien auf den Pferdeblutagarplatten makroskopisch beurteilt. Bei der Beurteilung wurde auf die gleichmässige Verteilung des Bakterienfilms und auf den Feuchtigkeitsgrad der Platte geachtet. Ein ungleichmässiger Bakterienfilm oder eine trockene Platte deuteten darauf hin, dass ein grosser Anteil der Bakterien eine kokkoide Form angenommen hatte.
Mikroskopisch wurden die Morphologie und Beweglichkeit der Bakterien jeder Platte bewertet. Dazu wurden Nativpräparate angefertigt und im Hellfeld mit einem 100x Objektiv in Ölimmersion betrachtet. Der Anteil kokkoid geformter Bakterien wurde abgeschätzt und die Beweglichkeit geprüft. Bei Bakterien, die eingefroren wurden oder für DNA-Präparationen dienten, durften höchstens 10 bis 15% der Bakterien kokkoid geformt sein. Ausserdem sollten sie gut vorwärtsbeweglich sein.

3.1.8 Versuchstiere

Spezifisch-pathogenfreie C3H/HeJ-Mäuse wurden vom Jackson Laboratory (Bar Habor, Maine, USA) bezogen. Die Tiere wurden in der Abteilung für Vergleichende Medizin der GSF unter Barrierebedingungen in individuell –belüfteten Käfigsystemen (Ventirack^{TM}, Biozone, Margate, UK) gezüchtet und gehalten. Die Infektionsüberwachung erfolgte durch Sentinels. Bei den Sentinels handelte es sich um Mäuse aus derselben Kolonie, die separat jeweils für zwölf Wochen in einem so genannten Sentinelkäfig gehalten wurden. Während dieser Zeit wurden die Sentinels auf 2/3 gebrauchter Einstreu aus allen anderen Käfigen und 1/3 frischer Streu gehalten. Jeweils nach Ablauf der 12 Wochen wurden diese Tiere stellvertretend für die restliche Kolonie makroskopisch-anatomisch, parasitologisch und mikrobiologisch untersucht. Der *Helicobacter*-Status wurde zusätzlich durch regelmässige Stichprobenuntersuchungen von Zäkumproben und Untersuchungen von Sammelkot der C3H/HeJ-Kolonie kontrolliert.

3.2 Methoden

3.2.1 Gewinnung und Beurteilung der Bakterien für *in vivo*-Infektionen

Die Bakterien für Infektionsexperimente wurden jeweils vor dem Experiment zwei- bzw. dreimal subkultiviert. Pro Experiment wurden zwischen 35 und 45 dicht bewachsene Pferdeblutagarplatten (Durchmesser 10 cm) eingesetzt. Die Bakterien wurden mit ca. 1 ml sterilem PBS mit sterilen Glasspateln von den Pferdeblutagarplatten abgeschabt und in 50 ml Falcon Röhrchen (Becton Dickinson) gesammelt. Danach wurden sie bei 3000 x *g* für 20 min zentrifugiert. Die Pellets wurden mit ca. 5 ml PBS resuspendiert und in einem 50 ml Falcon Röhrchen zusammengeführt. Danach wurden sie erneut bei 3000 x *g* für 20 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und für die Quantifizierung das Nassgewicht des Bakterienpellets bestimmt. Das Bakterienpellet wurde im ersten Infektionsversuch in 3 ml und im zweiten Infektionsversuch in 5 ml PBS resuspendiert.
Für die photometrische Quantifizierung wurde aus dieser Bakteriensuspension ein

100 µl Aliquot entnommen und 1:100 verdünnt. Anschliessend wurde die Optische Dichte (OD) dieser Verdünnungen bei einer Wellenlänge von 600 nm mit einem Photometer (CE 1010, Cecil Instruments, Cambridge, UK) bestimmt.
Die Qualität der Bakterien wurde wie unter 3.1.7 beschrieben makroskopisch und stichprobenartig mikroskopisch beurteilt. Bei Bakterien, die in einem Infektionsexperiment verwendet wurden, durften höchstens 40% der Bakterien kokkoid geformt sein. Ausserdem musste in dieser Fraktion deutliche Vorwärtsbewegung erkennbar sein.
Nach der Infektion der Mäuse wurde die Beweglichkeit der Bakterien noch einmal überprüft. Nur bei gleichbleibender Beweglichkeit wurden Infektionsexperimente als erfolgreich eingestuft. Zusätzlich wurde von einem weiteren Aliquot des Inokulums ein Präparat Gram-gefärbt, um das Vorliegen einer morphologisch erkennbaren Monokultur zu kontrollieren.

3.2.2 Infektion von Mäusen

Die Infektion der Mäuse erfolgte durch dreimalige orogastrale Inokulation der Bakterien im Abstand von jeweils zwei Tagen mit Knopfkanülen. Pro Maus wurden jeweils 200 µl der Bakteriensuspension mit Hilfe einer 1 ml Eimalspritze inokuliert. Die Negativkontrollen wurden mit der entsprechenden Menge PBS inokuliert.

3.2.3 Organentnahme

Bestecke wurden vor der Verwendung für die Organentnahme für 20 min bei 180°C sterilisiert. Danach wurde zur Entfernung von DNA-Resten aus vorangegangenen Präparationen das Besteck über Nacht in eine DNA-Dekontaminationslösung (RNAse away reagent, Gibco BRL, Karlsruhe) eingelegt, danach mit $Aqua_{bidest.}$ gespült und ein zweites Mal sterilisiert.
Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation euthanasiert und auf dem Rücken fixiert. Das Fell über dem Abdomen wurde mit 70 %igem Alkohol desinfiziert und die Haut abpräpariert.
Bei der Organentnahme im ersten Infektionsexperiment wurde für jede Organprobe ein separates Besteck benutzt. Folgende Proben wurden in folgender Reihenfolge

entnommen: ein hirsekorngrosses Stück Muskel, ein hirsekorngrosses Stück Leber einschließlich Gallenblase, ein Viertel des Magens aus der Fundusregion, 1 cm Jejunum, 1 cm Zäkum, 1 cm Kolon, 1 cm Rektum. Von Magen, Jejunum, Zäkum, Kolon und Rektum wurde zusätzlich jeweils eine zweite Probe entnommen und in sterilem PBS gewaschen, um den Magen- bzw. Darminhalt zu entfernen. Mit diesem Vorgehen sollte der Einfluss von Magen- bzw. Darminhalt auf die PCR-Ergebnisse überprüft werden.
In dem zweiten Infektionsexperiment wurde bei der Entnahme der Organproben jeweils ein neues Besteck pro Tier benutzt. Die Proben wurden in folgender Reihenfolge präpariert: ein hirsekorngrosses Stück Muskel, ein hirsekorngrosses Stück Leber, 1 cm Zäkum, 1 cm Kolon, 1 cm Rektum. Der Darminhalt wurde bei keiner Probe entfernt. Alle Proben wurden bis zur DNS-Präparation bei –20°C gelagert.

3.2.4 DNA-Präparation aus Organproben

Die DNA-Präparation erfolgte mit dem QIAamp DNA mini Kit® entsprechend dem Protokoll des Herstellers für DNA-Gewinnung aus Gewebe. Die DNA wurde mit 100 µl AE-Puffer von der Kieselgel-Säule des Kits eluiert.

3.2.5 DNA-Präparation aus Kotproben

Die DNA-Präparation aus Kotproben erfolgte mit dem QIAamp DNA Stool mini Kit®. Kot wurde mit sterilen Einmalpinzetten aus den jeweiligen Käfigen gesammelt. Von diesem Sammelkot wurden danach jeweils 180-190 mg (entspricht ca. 10 bis 30 Pellets) in einem 2 ml Reaktionsgefäß eingewogen. Abweichend von den Angaben des Herstellers wurden 1,9 ml ASL-Puffer verwendet, Die Proben wurden für 60 min bei 70°C geschüttelt. Die DNA wurde mit 100 µl AE-Puffer von der Kieselgel-Säule des Kits eluiert.

3.2.6 DNA-Präparation von *Helicobacter*-DNA

Zunächst wurden die Bakterien makroskopisch und mikroskopisch wie unter 3.1.7 beschrieben beurteilt. Dann wurden die Bakterien mit ca. 1 ml sterilem PBS und einem sterilen Glasspatel von den Pferdeblutagarplatten abgelöst. Die Bakteriensuspension einer Platte wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und 10 min bei 5000 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterien-Pellet in 180 µl ATL-Puffer resuspendiert. Die weitere Präparation erfolgte mit dem DNeasy tissue Kit® entsprechend dem Protokoll des Herstellers für DNA-Gewinnung aus Gewebe. Die DNA wurde mit 100 µl AE-Puffer von der Kieselgel-Säule eluiert.
Die *Helicobacter*-DNA wurde wie unter 3.2.7 beschrieben quantifiziert und die Qualität beurteilt. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm $A_{260/280}$ sollte zwischen 1,8 und 2 liegen.
Dann wurde die gelöste DNA in 10er Verdünnungsschritten bis zu einer Stufe von 10^{-10} verdünnt. Dazu wurden jeweils 10 µl der nächst höheren Verdünnung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 90 µl $Aqua_{bidest}$ aufgefüllt.

3.2.7 Bestimmung der DNA-Konzentration und -Qualität

Von der zu untersuchenden DNA-Probe wurden jeweils 10 µl abgenommen und 1:10 mit $Aqua_{bidest}$ verdünnt. Die Absorption dieser Verdünnung wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm photometrisch (DU® 530 Life science, UV/Vis Spectrophotometer, Beckmann Instruments, München) bestimmt. Bei reiner DNA liegt das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm $A_{260/280}$ zwischen 1,8 und 2,0. Die DNA-Konzentration (in µg/ml) wurde nach folgender Formel berechnet.

Konzentration der DNA (µg/ml) = Absorption bei 260 nm x 10 (Verdünnungsfaktor) x 50

3.2.8 Beimpfen von Organ-DNA mit *Helicobacter*-DNA (DNA-DNA-Spike)

Zur Herstellung so genannter gespikter Gewebe-DNA Proben wurden aus *Helicobacter*-freien C3H/HeJ Mäusen Zäkumproben entnommen. Daraus wurde die DNA wie unter 3.2.4 ausgeführt präpariert.
Pro herzustellende Verdünnungstufe wurde die DNA eines Zäkums präpariert. Die eluierte Zäkum-DNA mehrerer Proben wurde gepoolt und wie unter 3.2.7 beschrieben quantifiziert. Dann wurden jeweils 90 µl dieser Lösung mit Zäkum-DNA in 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt und mit jeweils 10 µl der entsprechenden *Helicobacter*-DNA-Verdünnungsstufe gemischt. Zäkumproben wurde nicht direkt mit der Bakteriensuspension beimpft, da Ergebnisse solcher Studien bisher in der Literatur nicht beschrieben wurden und deswegen keine Vergleichswerte existieren.

3.2.9 Polymerase-Kettenreaktion

Die Analyse der Proben wurde mit Hilfe einer zweistufigen Polymerase-Kettenreaktion, einer sogenannten nested PCR, durchgeführt. In einem ersten Amplifikationsschritt (PCR 1) wurde zunächst die universelle Sequenz des bakteriellen 16S rRNA-Gens vervielfacht. Anschliessend wurde aus dem Reaktionsansatz der PCR 1 in einer zweiten Reaktion (PCR 2) nach der Methode von Riley et al. das *Helicobacter*-Genus-spezifische Produkt selektiv amplifiziert [21].
Bei einem Teil der Proben wurde das *Helicobacter*-Genus-spezifische Produkt direkt aus der DNA-Probe amplifiziert. Die Reaktionen wurden in einem Heiz-Kühlblocksystem (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Nach der PCR wurden die Reaktionsansätze bis zur Gelelektrophorese bei 4°C gelagert.

Tabelle 10: Reaktionsansatz für die PCR 1

	Menge
DNA-Probe	1 µl
H1f (vergleiche Tabelle 5) 10 µM	1 µl
H1604r (vergleiche Tabelle 5) 10 µM	1 µl
dNTP-Mix 2 mM	3 µl
10 x PCR-Puffer	3 µl
5 x Q-Solution	6 µl
$MgCl_2$ 25 mM	1 µl
Taq DNA Polymerase 5 U/µl	0,4 µl
H_2O_{bidest}	ad 30 µl

Tabelle 11: Temperatur-Zeit-Bedingungen für die PCR 1
(Amplifikation des bakteriellen 16S rRNA-Gens)

Zyklenzahl	**Temperatur [°C]**	**Zeit [Min:Sec]**	**Bemerkung**
1 x	95	4:00	Initiale Denaturierung
40 x	95	1:00	Denaturierung
	70	1:15	Primer-Hybridisierung
	72	1:30	Elongation
1 x	72	10:00	Finale Elongation

Tabelle 12: Reaktionsansatz für die PCR 2

	Menge
DNA-Probe[1]	1 µl
H418f (vergleiche Tabelle) 10 µM	1 µl
H793r (vergleiche Tabelle) 10 µM	1 µl
dNTP-Mix 2 mM	3 µl
10 x PCR-Puffer	3 µl
5 x Q-Solution	6 µl
$MgCl_2$ 25 mM	1,8 µl
Taq DNA Polymerase 5 U/µl	0,5 µl
H_2O_{bidest}	ad 30 µl

[1]PCR-Produkt der PCR 1 oder *Helicobacter*-DNA-Verdünnungsstufen

Tabelle 13: Temperatur-Zeitbedingungen für die PCR 2

(Amplifikation des *Helicobacter*-Genus-spezifischen Abschnitts)

Zyklenzahl	**Temperatur [°C]**	**Zeit [Min:Sec]**	**Bemerkung**
1 x	94	4:00	Initiale Denaturierung
40 x	94	0:45	Denaturierung
	53	1:00	Primer-Hybridisierung
	72	1:15	Elongation
1 x	72	10:00	Finale Elongation

3.2.10 DNA-Gelelektrophorese

Für die Analyse der PCR-Produkte wurden jeweils 10µl eines Reaktionsansatzes mit der entsprechenden Menge des 6 x DNA-Ladepuffers (MBI Fementas) vermischt und in einem 1,5 %igen TBE-Agarosegel untersucht. Um die DNA im UV-Illuminator sichtbar zu machen, wurde zu 150 ml Gel im noch flüssigen Zustand 20 µg Ethidiumbromid in wässriger Lösung gegeben. Zur Größenbestimmung der PCR-Produkte wurde ein entsprechender DNA-Längenstandard (pUC-Mix, Marker 8, MBI Fermentas) eingesetzt. Die Elekrophorese erfolgte in einer horizontalen Gelkammer bei einer Feldstärke von $140^{V}/_{cm}$. Danach wurden die Gele in einem UV-Illuminator visualisiert und photographiert.

3.2.11 Sequenzanalyse von PCR-Produkten

Für die Sequenzierung von PCR-Produkten wurden diese direkt aus dem Reaktionsansatz mit dem QIAquick PCR Purification Kit® aufgereinigt. Wenn bei der Visualisierung des Agarosegels mehrere Banden erkennbar waren, wurde die fragliche diagnostische Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit® aufgereinigt. Das aufgereinigte Produkt wurde mit jeweils 30 µl EB-Puffer von der Kieselgel-Säule eluiert. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma Sequiserve (Vaterstetten). Routinemässig wurde der 3´-Primer für die Sequenzierung verwendet. Wenn die Sequenzen schlecht zu lesen waren, wurde eine zweite Sequenzierung unter Verwendung des 5´-Primers durchgeführt.
Um die Spezifität der ermittelten Sequenzen zu überprüfen, wurden sie mit den Sequenzdaten der Gen-Bank des National Center for Biotechnology Information (Bethesda, Maryland, USA) verglichen (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Um die Spezifität von Sequenzen noch zusätzlich zu verifizieren, wurden PCR-Produkte auch direkt mit der entsprechenden Sequenz des 16S rRNA-Gens von *H. bilis* verglichen.

3.2.12 Überprüfung der Signifikanz von Daten

Mit dem Fisher-Test (http://www.matforsk.no/ola/Fishertest.htm) wurde der p-Wert berechnet. Die Signifikanz von ermittelten Daten wurde anhand des p-Werts bewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Vergleich der Sensitivität von nested und single-step PCR

Für den routinemäßigen Nachweis von murinen *Helicobacter* spp. durch kommerzielle Untersuchungslaboratorien ist derzeit die single-step PCR, die von Riley et al. publiziert wurde, die Methode der Wahl [21]. Bei einer single-step PCR erfolgt die Amplifizierung des *Helicobacter*-spezifischen Produktes in einem PCR-Schritt. Die Erfahrungen in unserem Labor zeigten, dass verschiedene kommerzielle Untersuchungslaboratorien von Aliquots ein und der derselben Kotprobe unterschiedliche Ergebnisse erzielten. Einer der Hauptgründe dafür lag aus unserer Sicht in unterschiedlichen Nachweisgrenzen bei den Untersuchungen auf eine *Helicobacter*-Infektion, so dass hauptsächlich falsch-negative Ergebnisse erarbeitet wurden.

Um die Nachweisgrenze für diese PCR Methode festzustellen, stellten Riley et al. verschiedene Verdünnungen von *H. hepaticus*- und *H. muridarum*-DNA her und setzten diese Verdünnungen als Probe in ihre PCR ein. Beim Durchführen der PCR mischten sie jedem Reaktionsansatz 1,25 g Zäkum-DNA *Helicobacter*-freier Tiere bei. Ihre single-step PCR erreichte bei dieser Studie eine Nachweisgrenze von 5 pg *Helicobacter*-DNA [21]. Das entspricht ca. 3500 Kopien des Genoms von *H. hepaticus* [72, 75].

In einer weiteren Studie von Beckwith et al., deren PCR-Bedingungen sich an die von Riley et al. publizierte Methode anlehnten, lag die Nachweisgrenze der single-step PCR bei 100 fg *H. bilis*-, *H. hepaticus*- oder *H. muridarum*-DNA, was 70 Kopien des *H. hepaticus*-Genoms gleichkommt. Dem Reaktionsansatz wurden 5 µl DNA, die aus dem Kot *Helicobacter*-freier Tiere isoliert worden war, zugefügt [22].

Um die Sensitivität der PCR für die *Helicobacter*-Diagnostik zu verbessern, wurde in dieser Arbeit ein grundsätzlich anderer Ansatz gewählt und anstelle der single-step PCR eine nested PCR etabliert. Im Vergleich zur single-step PCR wird bei dieser nested PCR zunächst in einem ersten PCR-Schritt die universelle Sequenz des 16S rRNA-Gens amplifiziert. In einem zweiten PCR-Schritt wird dann selektiv ein *Helicobacter*-spezifischer Abschnitt amplifiziert. Der *Helicobacter*-spezifische Abschnitt liegt innerhalb des Bereichs, der im ersten PCR-Schritt vervielfacht wurde. Der zweite PCR-Schritt der nested PCR entspricht in dieser Arbeit der nach Riley et

al. modifizierten single-step PCR. Die Unterschiede zwischen nested und single-step PCR sind in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

Bei der nested PCR werden zwei aufeinander folgende, verschachtelte PCR-Schritte durchgeführt. Jeder PCR-Schritt umfasst jeweils 40 Zyklen. Im Vergleich zu single-step PCR erfolgt die doppelte Anzahl von Zyklen. Außerdem wird schon im ersten PCR-Schritt der nested PCR selektiv nur die Sequenz des bakteriellen 16S rRNA-Gens amplifiziert, wodurch nur die bakterielle Ziel-DNA vervielfacht wird. Aufgrund dieser Tatsachen müsste die Sensitivität der PCR theoretisch steigen und die Nachweisgrenze der nested PCR sollte niedriger als die Nachweisgrenze der single-step PCR sein.

Um die nested PCR zu validieren, wurde ihre Nachweisgrenze mit der Nachweisgrenze der single-step PCR verglichen. Dazu wurden mehrere Endpunkt-Titrationen mit *H. bilis*- und *H. hepaticus*-DNA durchgeführt. Pro *Helicobacter*-Spezies wurden eine DNA-Titration und ein DNA-DNA-Spike durchgeführt. Bei der DNA-Titration wurde *Helicobacter*-DNA titriert, und die DNA-Verdünnungen wurden als Proben in nested und single-step PCR eingesetzt. Beim DNA-DNA -Spike wurden die Verdünnungsstufen der titrierten *Helicobacter*-DNA mit einer definierten Menge von Zäkum-DNA, die aus Zäkumproben mit Inhalt *Helicobacter*-freier Mäuse isoliert wurde, vermischt, und dieses Gemisch ebenfalls als Probe in die nested und die single-step PCR eingesetzt. Es wurde DNA von *H. bilis* und *H. hepaticus* verwendet und die Versuche wurden zweimal durchgeführt.

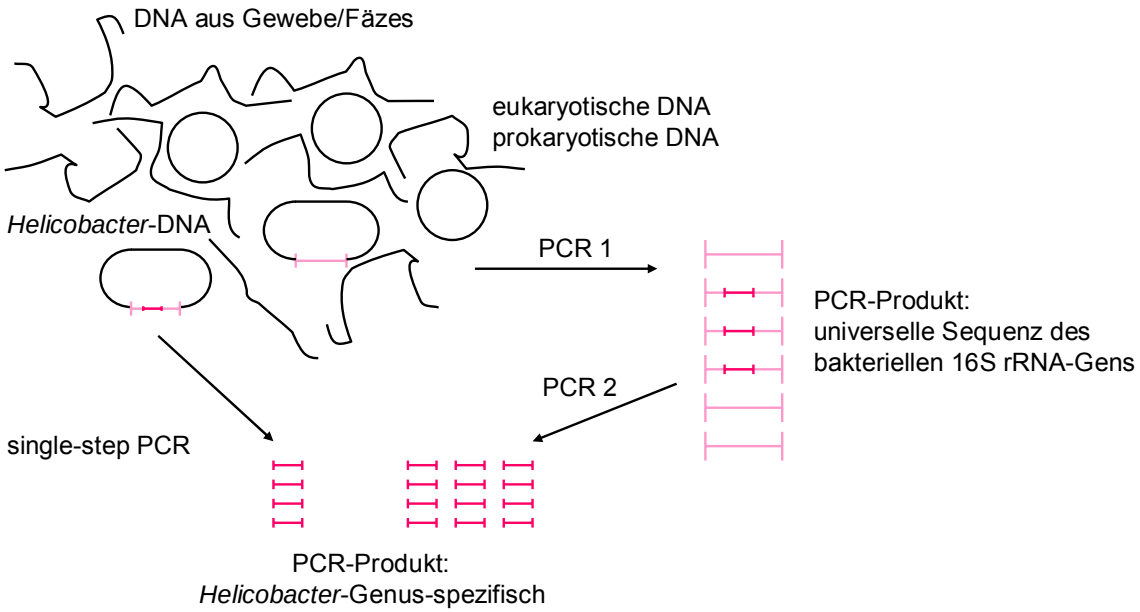


Abbildung 2: Schematische Darstellung der nested PCR im Vergleich zur single-step PCR

4.1.1 Vergleich der Sensitivität von nested und single-step PCR: DNA-Titration

Um die Sensitivität der nested PCR mit der Sensitivität der single-step PCR vergleichen zu können, wurden verschiedene Verdünnungsstufen von *Helicobacter*-DNA als Proben in die nested und in die single-step PCR eingesetzt und die Nachweisgrenze beider Methoden bestimmt.

Die DNA von *H. bilis* und *H. hepaticus* wurde präpariert und quantifiziert. Bei der Quantifizierung ergaben sich für die beiden DNA-Präparationen von *H. bilis* eine Konzentration von 340 µg/ml bzw. 640 µg/ml. Für die beiden DNA-Präparationen von *H. hepaticus* ergaben sich Konzentrationen von 120 µg/ml bzw. 220 µg/ml. Danach wurden die DNA-Präparationen in 10er Verdünnungsschritten bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-10} verdünnt. Unmittelbar nach der Verdünnung wurden die nested PCR und die single-step PCR parallel angesetzt. Durch das Ansetzten der PCR direkt nach der Proben-Präparation sollte ein negativer Einfluss der Lagerung der DNA auf deren Qualität ausgeschlossen werden. Die Nachweisgrenze der nested

PCR und der single-step PCR wurden nach Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel festgestellt. Sie wurde bei der Verdünnungsstufe festgelegt, die bei der Darstellung der DNA unter dem UV-Licht noch eine deutlich erkennbare Bande entsprechender Größe lieferte.

Die Nachweisgrenze mit *H. bilis*-DNA lag für die nested PCR bei 340 fg bzw. 64 fg und für die single-step PCR bei 3400 fg bzw. 640 fg. Das entsprach bei der nested PCR ca. 240 bzw. 50 Kopien des Genoms von *H. hepaticus* und bei der single-step PCR ca. 2400 bzw. 500 Kopien. Da die Größe des gesamten Genoms von *H. bilis* bisher nicht bekannt ist, wurde diesen Berechnungen die Grösse des Genoms von *H. hepaticus* zu Grunde gelegt [72, 75]. Für *H. hepaticus*-DNA lag die Nachweisgrenze der nested PCR bei 10 fg bzw. 220 fg und bei der single-step PCR bei 1000 fg bzw. 2200 fg. Das kam bei der nested PCR ca. 7 bzw. 150 Kopien und bei der single-step PCR ca. 700 bzw. 1500 Kopien gleich. Insgesamt zeigte sich bei drei Versuchsansätzen, dass die Nachweisgrenze der nested PCR zehnmal niedriger lag als die Nachweisgrenze der single-step PCR. In einem vierten Versuchsansatz lag die Nachweisgrenze der nested PCR hundertmal niedriger als die Nachweisgrenze der single-step PCR. Die Ergebnisse aller vier Versuchsansätze sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Auf der Abbildung 3 ist beispielhaft das Gelbild einer repräsentativen DNA-Titration mit *H. bilis*-DNA dargestellt. Die Konzentration der *Helicobacter*-DNA betrug 640 µg/ml.

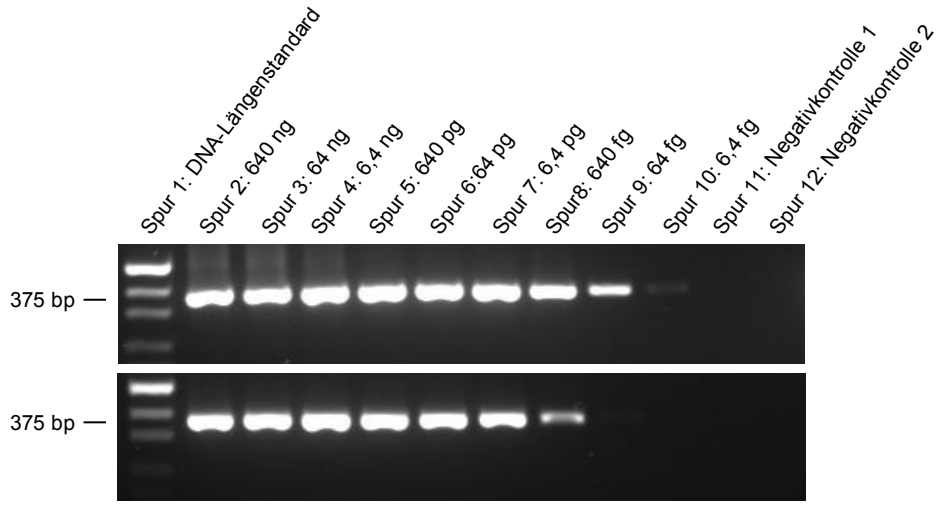


Abbildung 3: Endpunkt-Titration: DNA-Titration
Das obere Gelbild stellt die Ergebnisse der nested PCR dar. Auf dem unteren Agarosegel wurden die PCR-Produkte der single-step PCR aufgetragen. Die PCR-Produkte der DNA-Verdünnungen sind entsprechend der absteigenden DNA-Konzentration aufgetragen.
Für die Negativkontrolle 1 wurde in die PCR 1 Wasser eingesetzt. Sie wurde in der PCR 2 noch einmal mitgeführt. Bei der Negativkontrolle 2 handelt es sich um die Wasserkontrolle, die lediglich in die PCR 2 eingesetzt wurde.

Tabelle 14: Nachweisgrenze von nested und single-step PCR: DNA-Titration

	Nachweisgrenze [fg]	
Helicobacter-Spezies	nested PCR	single-step PCR
H. bilis	340	3400
	64	640
H. hepaticus	10	1000
	220	2200

4.1.2 Vergleich der Sensitivität von nested und single-step PCR: DNA-DNA-Spike

Der Vergleich der Sensitivität von nested und single-step PCR erfolgte auch durch einen DNA-DNA-Spike. Im Gegensatz zur DNA-Titration wurde beim DNA-DNA-Spike *Helicobacter*-DNA mit Zäkum-DNA Helicobacter-freier Tiere gemischt. Dieses

Gemisch wurde als Probe in die nested und die single-step PCR eingesetzt und die Nachweisgrenze beider Methoden bestimmt. Durch die Zugabe von Zäkum-DNA wurden Bedingungen simuliert, wie sie bei der normalen *Helicobacter*-Diagnostik vorherrschen. Die Ergebnisse sind dadurch eher auf reale Bedingungen übertragbar.

Zunächst wurde Zäkum-DNA *Helicobacter*-freier Mäuse präpariert und die Abwesenheit *Helicobacter*-spezifischer DNA mit nested und single-step PCR kontrolliert. Die Zäkum-DNA-Proben wurden gepoolt und quantifiziert. Es ergaben sich für die ersten beiden Versuchsansätze eine DNA-Konzentration von 310 µg/ml und für die zweiten Versuchsansätze eine DNA-Konzentration von 510 µg/ml. Diese DNA-Lösung wurden zwölfmal auf jeweils 90µl aliquotiert und pro Aliquot wurden jeweils 10 µl der entsprechenden *Helicobacter*-DNA-Verdünnungsstufen aus der DNA-Titration hinzugefügt. Dadurch blieb die absolute Menge der Zäkum-DNA bei jeder Verdünnungsstufe gleich, nur die relative Menge der *Helicobacter*-DNA veränderte sich. Dementsprechend wurden jedem Reaktionsansatz 280 ng bzw. 460 ng Zäkum-DNA *Helicobacter*-freier Mäuse zugefügt. Unmittelbar nach der Zugabe der jeweiligen *Helicobacter*-DNA zu der Zäkum-DNA wurden die nested und die single-step PCR parallel durchgeführt. Wiederum wurde die Nachweisgrenze für beide Methoden wie unter 4.1.1 beschrieben bestimmt. Sie lag mit *H. bilis*-DNA für die nested PCR bei 3,4 pg bzw. 0,64 pg und für die single-step PCR bei 3,4 pg bzw. 6,4 pg. Das entsprach bei der nested PCR ca. 2400 bzw. 450 Kopien und bei der single-step PCR ca. 2400 bzw. 4500 Kopien, wobei wiederum die Größe des Genoms von *H. hepaticus* zu Grunde lag [72, 75]. Für *H. hepaticus*-DNA lag die Nachweisgrenze der nested PCR bei 1 pg bzw. 0,22 pg und bei der single-step PCR bei 10 pg bzw. 2,2 pg. Das kam bei der nested PCR ca. 700 bzw. 150 Kopien und bei der single-step PCR ca. 7000 bzw. 1500 Kopien gleich. Bei einem Versuchsansatz mit *H. bilis* und bei zwei Versuchsansätzen mit *H. hepaticus* zeigte sich, dass die Nachweisgrenze der nested PCR zehnmal niedriger lag als die Nachweisgrenze der single-step PCR. Bei einem Versuchsansatz mit *H. bilis* stimmten die Nachweisgrenze der nested PCR mit der Nachweisgrenze der single-step PCR überein. Die Ergebnisse dieser vier Versuchsansätze sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Auf der Abbildung 4 ist beispielhaft das Gelbild eines repräsentativen DNA-DNA-Spikes mit *H. hepaticus* dargestellt. Die Konzentration der *Helicobacter*-DNA betrug 290 µg/ml.

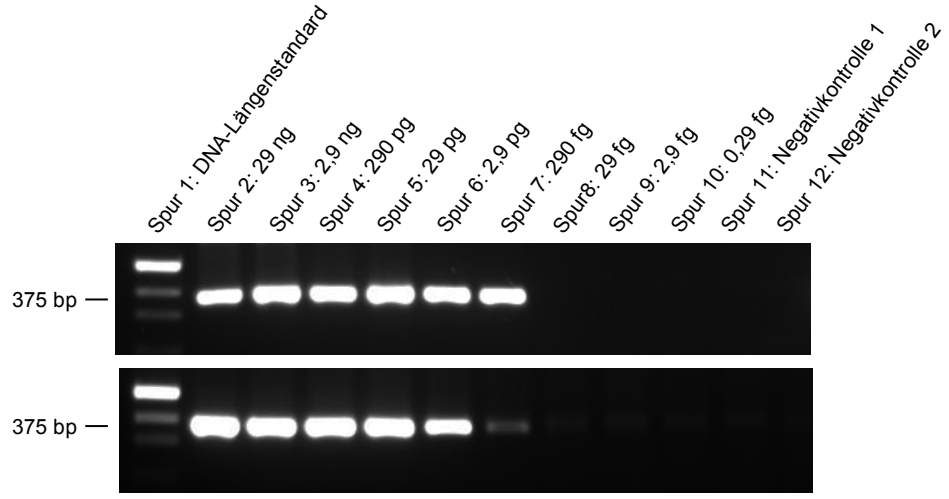


Abbildung 4: Endpunkt-Titration: DNA-DNA-Spike
Das obere Gelbild stellt die Ergebnisse der nested PCR dar. Auf dem unteren Agarosegel wurden die PCR-Produkte der single-step PCR aufgetragen. Die PCR-Produkte der DNA-Verdünnungen sind entsprechend der absteigenden DNA-Konzentration aufgetragen.
Für die Negativkontrolle 1 wurde in die PCR 1 Wasser eingesetzt. Sie wurde in der PCR 2 noch einmal mitgeführt. Bei der Negativkontrolle 2 handelt es sich um die Wasserkontrolle, die lediglich in die PCR 2 eingesetzt wurde.

Tabelle 15: Nachweisgrenze von nested und single-step PCR: DNA-DNA-Spike

	Nachweisgrenze [pg]	
Helicobacter-Spezies	nested PCR	single-step PCR
H. bilis	3,4	3,4
	0,64	6,4
H. hepaticus	1	10
	0,22	2,2

4.1.3 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus gelagerter Proben-DNA und dem Produkt der PCR 1

Bei Untersuchungen von *Helicobacter*-Infektionen in Versuchstierhaltungen kommt es vor, dass Proben vor der weiteren Verwendung einige Tage lagern. Da sich die

Lagerung von Proben-DNA auf die DNA-Qualität auswirken kann und deswegen aus gelagerter Proben-DNA möglicherweise falsch-negative PCR-Ergebnisse generiert werden oder sich nicht reproduzieren lassen, wurde die Reproduzierbarkeit von PCR-Ergebnissen aus gelagerter Proben-DNA mit der Reproduzierbarkeit von PCR-Ergebnissen aus dem gelagerten PCR-Produkt der PCR 1 verglichen. DNA-Proben und das PCR-Produkt der PCR 1 aus diesen Proben wurden über einen bestimmten Zeitraum gelagert. Regelmäßig wurde die vollständige nested PCR aus den gelagerten DNA-Proben bzw. die PCR 2 aus dem gelagerten PCR-Produkt durchgeführt, die Nachweisgrenze festgestellt und mit der Nachweisgrenze vom Tag der DNA-Präparation verglichen.

Alle Verdünnungsstufen aus den Endpunkt-Titrationen wurden verwendet. Alle DNA-Proben der DNA-Titration, des DNA-DNA-Spikes und das PCR-Produkt aus dem Reaktionsansatz der PCR 1 vom Tag der DNA-Präparation (Tag 0) wurden bei 4°C gelagert. Über einen Zeitraum von 21 Tagen wurde aus den gelagerten DNA-Proben der entsprechenden Verdünnungsstufen der DNA-Titration und des DNA-DNA-Spikes einmal wöchentlich eine nested PCR angesetzt. Parallel dazu wurde die PCR 2 aus dem gelagerten PCR-Produkt der PCR 1 der entsprechenden Verdünnungsstufen angesetzt und die Nachweisgrenze wie unter 4.1.1 beschrieben, bestimmt.

In der Untersuchung, bei der DNA-Proben eingesetzt wurden, die aus der DNA-Titration mit *H. bilis*-DNA stammten, zeigte sich im ersten Versuchsansatz, dass die Nachweisgrenze zu allen Zeitpunkten bei 0,34 pg lag und zwar unabhängig davon, ob gelagerte Proben-DNA oder das gelagerte PCR-Produkt der PCR 1 in die nested PCR bzw. die PCR 2 eingesetzt wurden.

Im zweiten Versuchsansatz lag die Nachweisgrenze beim Einsetzen von gelagerter Proben-DNA in die nested PCR am Tag 0 bei 0,064 pg, am Tag 7 bei 6,4 pg und am Tag 14 und 21 bei 0,0064 pg. Im Vergleich dazu lag die Nachweisgrenze beim Einsetzen des gelagerten PCR-Produktes der PCR 1 in die PCR 2 zu allen Zeitpunkten bei 0,064 pg.

In der zweiten Untersuchung, bei der DNA-Proben aus der DNA-Titration mit *H. hepaticus*-DNA eingesetzt wurden, ergab sich im ersten Versuchsansatz am Tag 0 eine Nachweisgrenze beim Einsetzen von gelagerter Proben-DNA in die nested PCR von 0,01 pg, am Tag 7 von 1 pg, am Tag 14 von 0,1 pg und am Tag 21 von 10 pg. Im

Vergleich dazu lag die Nachweisgrenze beim Einsetzen des gelagerten PCR-Produktes der PCR 1 in die PCR 2 zu allen Zeitpunkten bei 0,01 pg.
Im zweiten Versuchsansatz lag die Nachweisgrenze beim Einsetzen von gelagerter Proben-DNA in die nested PCR am Tag 0 bei 0,22 pg und am Tag 7, 14 und 21 bei 22 pg. Die Nachweisgrenze beim Einsetzen des gelagerten PCR-Produktes der PCR 1 in die PCR 2 lag im Gegensatz dazu zu allen Zeitpunkten bei 0,22 pg.
In der dritten Untersuchung, bei der DNA-Proben, die aus dem DNA-DNA-Spike mit *H. bilis*-DNA stammten, eingesetzt wurden, lag die Nachweisgrenze im ersten Versuchsansatz beim Einsetzen von gelagerter Proben-DNA in die nested PCR am Tag 0, 7 und 21 jeweils bei 3,4 pg. Am Tag 14 lag sie bei 0,34 pg. Im Gegensatz dazu lag die Nachweisgrenze beim Einsetzen des gelagerten PCR-Produktes der PCR 1 in die PCR 2 zu allen Zeitpunkten bei 3,4 pg.
Im zweiten Versuchsansatz lag die Nachweisgrenze beim Einsetzen von gelagerter Proben-DNA in die nested PCR am Tag 0 und 14 bei 0,64 pg. Am Tag 7 und 21 lag die Nachweisgrenze bei 6,4 pg. Im Vergleich dazu lag die Nachweisgrenze beim Einsetzen des gelagerten PCR-Produktes der PCR 1 in die PCR 2 zu allen Zeitpunkten bei 0,64 pg.
In der vierten Untersuchung, bei der DNA-Proben aus dem DNA-DNA-Spike mit *H. hepaticus*-DNA eingesetzt wurden, ergab sich im ersten Versuchsansatz beim Einsetzen von gelagerter Proben-DNA in die nested PCR am Tag 0 und 21 eine Nachweisgrenze von 1,2 pg. Am Tag 7 und 14 lag sie bei 12 pg. Die Nachweisgrenze beim Einsetzen des gelagerten PCR-Produktes der PCR 1 in die PCR 2 lag im Vergleich dazu zu allen Zeitpunkten bei 1,2 pg. Im zweiten Versuchsansatz lag die Nachweisgrenze beim Einsetzen von gelagerter Proben-DNA in die nested PCR am Tag 0, 14 und 21 bei 0,22 pg. Am Tag 7 lag die Nachweisgrenze bei 2,2 pg. Beim Einsetzen des gelagerten PCR-Produktes der PCR 1 in die PCR 2 lag die Nachweisgrenze im Gegensatz dazu zu allen Zeitpunkten bei 0,22 pg.
Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass sich beim Einsatz des gelagerten PCR-Produktes der PCR 1 in die PCR 2 in allen Versuchsansätzen die Ergebnisse vom Tag 0 bei allen drei Nachuntersuchungen (Tag 7, Tag 14 und Tag 21) reproduzieren ließen. Im Gegensatz dazu gab es Schwankungen der PCR-Ergebnisse bei Durchführung der nested PCR aus den gelagerten DNA-Proben. Alle Ergebnisse sind in den Tabellen 16 bis 19 zusammengefasst.

Tabelle 16: Reproduzierbarkeit der Ergebnisse: DNA-Titration (*H. bilis*)

	Nachweisgrenze [pg]			
	Versuch 1		Versuch 2	
Zeitpunkt	Proben-DNA	PCR-Produkt der PCR 1	Proben-DNA	PCR-Produkt der PCR 1
Tag 0	0,34		0,064	
Tag 7	0,34	0,34	6,4	0,064
Tag 14	0,34	0,34	0,0064	0,064
Tag 21	0,34	0,34	0,0064	0,064

Tabelle 17: Reproduzierbarkeit der Ergebnisse: DNA-Titration (*H. hepaticus*)

	Nachweisgrenze [pg]			
	Versuch 1		Versuch 2	
Zeitpunkt	Proben-DNA	PCR-Produkt der PCR 1	Proben-DNA	PCR-Produkt der PCR 1
Tag 0	0,01		0,22	
Tag 7	1	0,01	22	0,22
Tag 14	0,1	0,01	22	0,22
Tag 21	10	0,01	22	0,22

Tabelle 18: Reproduzierbarkeit der Ergebnisse: DNA-DNA-Spike (*H. bilis)*

	Nachweisgrenze [pg]			
	Versuch 1		Versuch 2	
Zeitpunkt	Proben-DNA	PCR-Produkt der PCR 1	Proben-DNA	PCR-Produkt der PCR 1
Tag 0	3,4		0,64	
Tag 7	3,4	3,4	6,4	0,64
Tag 14	0,34	3,4	0,64	0,64
Tag 21	3,4	3,4	6,4	0,64

Tabelle 19: Reproduzierbarkeit der Ergebnisse: DNA-DNA-Spike (*H. hepaticus)*

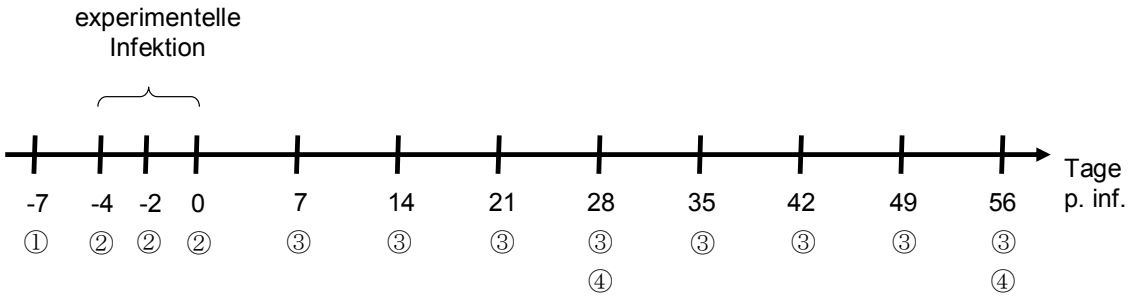
	Nachweisgrenze [pg]			
	Versuch 1		Versuch 2	
Zeitpunkt	Proben-DNA	PCR-Produkt der PCR 1	Proben-DNA	PCR-Produkt der PCR 1
Tag 0	1,2		0,22	
Tag 7	12	1,2	2,2	0,22
Tag 14	12	1,2	0,22	0,22
Tag 21	1,2	1,2	0,22	0,22

Da die Nachweisgrenze der nested PCR am Tag der DNA-Präparation durchschnittlich zehnmal niedriger lag als die Nachweisgrenze der single-step PCR zum selben Zeitpunkt, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit für den Nachweis von *Helicobacter* spp. die nested PCR verwendet.
Außerdem wurde die nested PCR direkt nach der DNA-Präparation durchgeführt und das PCR-Produkt der PCR 1, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sicher zu stellen, bei 4°C gelagert.

4.2 Wahl des geeigneten Probenmaterials

Für den Nachweis von *Helicobacter* spp. in Mauskolonien kann unterschiedliches Probenmaterial verwendet werden. Dazu gehören verschiedene Abschnitte des Magen-Darmtraktes, die Leber und als nicht-invasive Maßnahme bei der Probengewinnung Kot. Um der Frage nachzugehen, in welchem Probenmaterial *Helicobacter* spp. am verlässlichsten nachgewiesen werden können, wurden *Helicobacter*-freie Mäuse experimentell infiziert und unterschiedliches Probenmaterial dieser Mäuse gezielt untersucht.
Dazu wurden sechs bis acht Wochen alte, männliche, *Helicobacter*-freie C3H/HeJ Mäuse experimentell dreimal im Abstand von zwei Tagen mit *H. bilis* infiziert. Das Nassgewicht des Bakterienpellets aus dem die Suspension für die Infektion hergestellt wurde betrug pro experimentelle Infektion jeweils 279, 401 und 815 mg. Die OD der entsprechenden Bakteriensuspensionen betrug, 1:100 verdünnt, bei einer Wellenlänge von 600 nm 0,223, 0,125 und 0,462. Diese Art der Quantifizierung muriner *Helicobacter* spp. ist üblich, da die Bakterien auf Nährböden keine Kolonien

bilden, sondern schwärmend wachsen. Die Abwesenheit von *Helicobacter* spp. in diesen Mäusen wurde durch eine Untersuchung von gesammeltem Kot aus allen Käfigen überprüft. Zusätzlich wurde stichprobenartig jeweils eine Maus aus jedem Käfig getötet und jeweils eine Zäkumprobe entnommen. Das Zäkum von *Helicobacter*-infizierten Mäusen wird als Ort mit der höchsten Konzentration dieses Keimes angesehen [21]. Nach der experimentellen Infektion wurde über einen Zeitraum von acht Wochen wöchentlich Sammelkot aus jedem Käfig untersucht.
Außerdem wurden 28 und 56 Tage p. inf. jeweils zwei Proben von Magen, Jejunum, Zäkum, Kolon und Rektum entnommen. Jeweils eine Probe wurde in PBS gespült, um den Magen- bzw. Darminhalt zu entfernen. Dadurch sollten der Einfluss des Magen- bzw. Darminhaltes auf die Untersuchungsergebnisse überprüft werden.
Mit der Entfernung des Magen- Darminhaltes sollte theoretisch der relative Anteil der Bakterien in den Schleimhautkrypten erhöht werden. Außerdem besteht die Möglichkeit, PCR-Inhibitoren auf diese Weise zu entfernen. Bei PCR-Inhibitoren handelt es sich hauptsächlich um komplexe Polysaccharide, die eventuell im Magen- bzw. Darminhalt vorkommen können [20].
Eine Probe aus der Oberschenkelmuskulatur wurde zusätzlich als nicht-Ziel Gewebe von *Helicobacter* spp. zur Kontrolle entnommen. Als Negativkontrolle wurden gleichaltrige männliche C3H/HeJ Mäuse mit PBS inokuliert. Der Versuchsaufbau ist schematisch in Abbildung 5 dargestellt.



Legende:

① Kontrolle der Abwesenheit von *Helicobacter* spp. in den Mäusen vor Versuchsbeginn
② experimentelle Infektion
③ Kotuntersuchung
④ Organuntersuchung der Hälfte der Tiere

Abbildung 5: Versuchsaufbau für die Ermittlung des geeigneten Probenmaterials

4.2.1 Kotuntersuchung

Die experimentell infizierten C3H/HeJ Mäuse wurden in drei Käfigen zu jeweils vier bzw. drei Mäusen gehalten. Über den Untersuchungszeitraum von 56 Tagen wurde wöchentlich eine Untersuchung von Sammelkot aus jedem Käfig durchgeführt.
In zwei dieser drei Käfige wurde über den gesamten Zeitraum zu jedem Zeitpunkt *H. bilis* im Kot nachgewiesen. Im dritten Käfig wurde *H. bilis* über den gesamten Versuchszeitraum nicht nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 20: Nachweis von *H. bilis* mittels Kotuntersuchung

Gruppe	Tag 28 p. inf.	Tag 56 p. inf.	insgesamt
	Käfige mit positiven Ergebnis / insgesamt untersuchte Käfige		
Versuchsgruppe (*H. bilis*)	2/3	2/3	2/3
Kontrollgruppe (PBS)	0/3	0/3	0/3

4.2.2 Untersuchung verschiedener Organproben

Nach der experimentellen Infektion konnte *H. bilis* am Tag 28 p. inf. in Zäkum-, Kolon- und Rektumproben jeweils mit Inhalt von 2 von 5 untersuchten Tieren nachgewiesen werde. Am Tag 56 p. inf. konnte in 1 Magenprobe und 4 Zäkumproben jeweils mit Inhalt von 6 untersuchten Tieren *H. bilis* nachgewiesen werden. Die diagnostischen Banden im Gelbild hatten eine Größe von ca. 375 bp und waren deutlich erkennbar. Während bei der Untersuchung des Zäkums mit Inhalt der Mäuse sowohl am Tag 28 als auch am Tag 56 deutliche Banden erkennbar waren, ergaben am Tag 56 p. inf. in 1 Kolon- und allen Rektumproben jeweils mit Inhalt der 6 untersuchten Mäuse jeweils schwächere Banden. In Muskel, Leber und Jejunum mit Inhalt war *H. bilis* zu keinem Zeitpunkt nachweisbar. Aufgrund der geringen Tierzahlen wurde keine statistische Auswertung vorgenommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 dargestellt.

In der Negativkontrolle wurde bei einer mit PBS inokulierten Maus ein positives Ergebnis in der Leber festgestellt. Die Sequenzierung dieses PCR-Produktes ergab die Diagnose: *H. hepaticus*.

Tabelle 21: Nachweis von *H. bilis* in verschiedenen Organproben

Gruppe	Organ	Tag 28 p. inf.	Tag 56 p. inf.	insgesamt
		deutlich positiver Nachweis/ insgesamt untersucht, (schwach positiver Nachweis/ insgesamt untersucht)		
Versuchsgruppe (*H. bilis*)	Muskel	0/5	0/6	0/11
	Leber	0/5	0/6	0/11
	Magen	0/5	1[1]/6	1/11
	Jejunum	0/5	0/6	0/11
	Zäkum	2/5	4/6	6/11
	Kolon	2/5	3/6, (1/6)	5/11, (1/11)
	Rektum	2/5	0/6, (4/6)	2/11, (4/11)
Negativkontrolle (PBS)	Muskel	0/5	0/5	0/10
	Leber	1[2]/5	0/5	1/10
	Magen	0/5	0/5	0/10
	Jejunum	0/5	0/5	0/10
	Zäkum	0/5	0/5	0/10
	Kolon	0/5	0/5	0/10
	Rektum	0/5	0/5	0/10

[1]bei der Sequenzierung des PCR-Produkts wurde *H. bilis* festgestellt

[2] bei der Sequenzierung des PCR-Produkts wurde *H. hepaticus* festgestellt

4.2.3 Untersuchung von Magen-, Jejunum- und Dickdarmproben mit und ohne Inhalt

In den mit *H. bilis* infizierten C3H/HeJ Mäusen wurde am Tag 28 p. inf. in Zäkum, Kolon und Rektum sowohl mit als auch ohne Darminhalt in jeweils 2 von 5 Mäusen *H. bilis* nachgewiesen.

Am Tag 56 p. inf. wurde in Zäkumproben von 4 von 6 Mäusen jeweils mit und ohne Inhalt *H. bilis*. nachgewiesen. In Kolonproben ohne Inhalt wurde in 4 von 6 in Kolonproben mit Inhalt in 3 von 6 Mäusen *H. bilis* nachgewiesen. In den Rektumproben ohne Inhalt wurde in 3 von 6 Mäusen *H. bilis* nachgewiesen. Alle diagnostischen Banden waren auf den Gelbildern deutlich erkennbar. Die Untersuchung von Rektumproben mit Inhalt ergab keine deutlichen Banden. Schwächere Banden ergaben sich bei der Untersuchung in 1 von 6 Kolon und 4 von 6 Rektumproben mit Inhalt, sowie in 1 der 6 untersuchten Rektumproben ohne Inhalt.

Bei der Untersuchung konnte in 1 von 6 Magenproben *H. bilis* detektiert werden. Ansonsten wurde bei der Untersuchung von Magen und Jejunum *H. bilis* in den 11 untersuchten Mäusen zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen. In Mäusen der Negativkontrolle wurde *H. bilis* in Magen- oder Darmproben weder mit noch ohne Inhalt nachgewiesen. Aufgrund der geringen Tierzahlen wurde keine statistische Auswertung vorgenommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 dargestellt.

Diese Untersuchungen zeigten, dass in den Zäkumproben aller Mäuse, in denen *H. bilis* detektiert werden konnte, unabhängig von der Untersuchung mit oder ohne Inhalt *H. bilis* deutlich und sicher nachweisbar war. Daraus schließe ich, dass das Zäkum als Organprobe für den Nachweis von *H. bilis* die höchste Aussagekraft besitzt.

Abbildung 6 zeigt beispielhaft die Ergebnisse der Untersuchung einer Maus aus der Versuchsgruppe am Tag 28 p. inf.

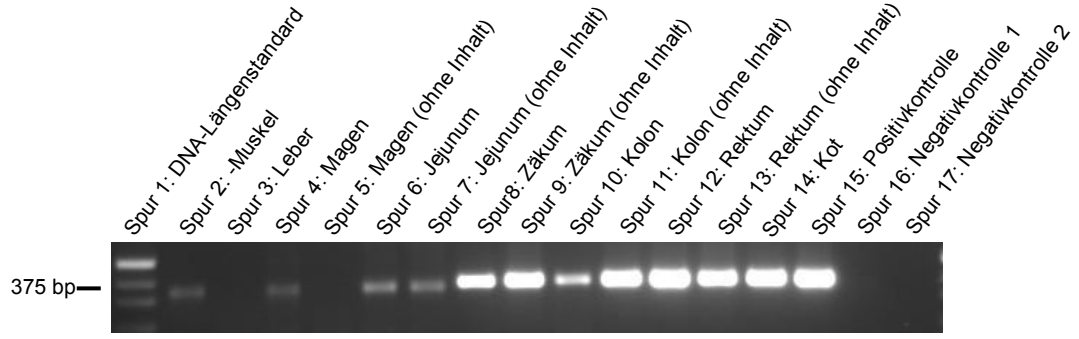


Abbildung 6: PCR-Analyse der Proben einer mit *H. bilis* experimentell infizierten Maus (Tag 28 p. inf.)
Die PCR-Produkte von Organproben und das PCR-Produkt der Kotuntersuchung wurden aufgetragen.
Als Positivkontrolle wurde reine *H. bilis*-DNA benutzt. Für die Negativkontrolle 1 wurde in die PCR 1 Wasser eingesetzt. Sie wurde in der PCR 2 noch einmal mitgeführt. Bei der Negativkontrolle 2 handelt es sich um die Wasserkontrolle, die lediglich in die PCR 2 eingesetzt wurde.

Auf der Abbildung 7 sind die Untersuchungsergebnisse einer Maus der Versuchsgruppe vom Tag 56 p. inf. beispielhaft dargestellt.

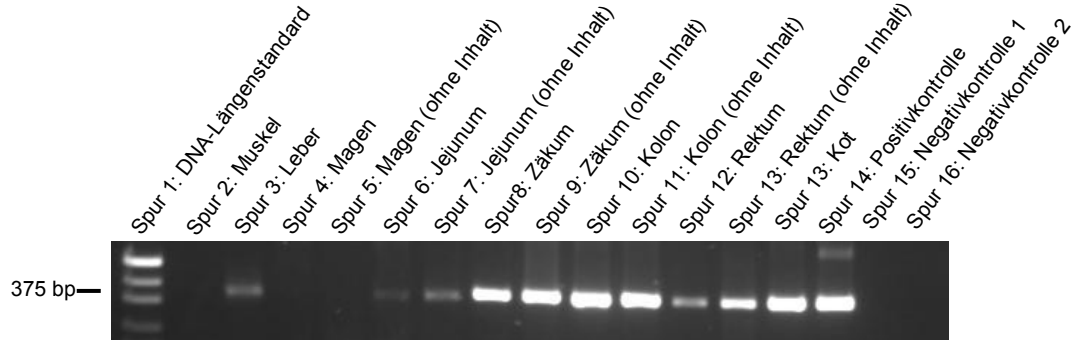


Abbildung 7: PCR-Analyse der Proben einer mit *H. bilis* experimentell infizierten Maus (Tag 56 p. inf.)
Die PCR-Produkte von Organproben und das PCR-Produkt der Kotuntersuchung wurden aufgetragen.
Als Positivkontrolle wurde reine *H. bilis*-DNA benutzt. Für die Negativkontrolle 1 wurde in die PCR 1 Wasser eingesetzt. Sie wurde in der PCR 2 noch einmal mitgeführt. Bei der Negativkontrolle 2 handelt es sich um die Wasserkontrolle, die lediglich in die PCR 2 eingesetzt wurde**.**

Tabelle 22: Nachweis von *H. bilis* in Magen-, Jejunum- und Dickdarmproben mit und ohne Inhalt

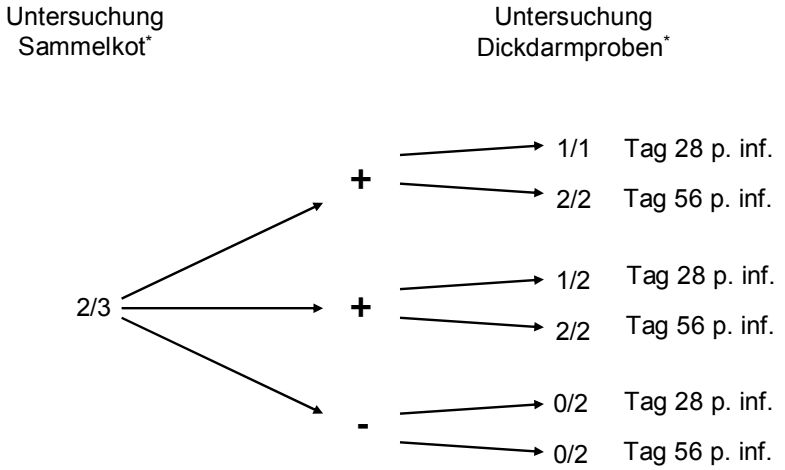
Gruppe	Organ	Tag 28 p. inf.	Tag 56 p. inf.	insgesamt
		deutlich positiver Nachweis / insgesamt untersucht, (schwach positiver Nachweis / insgesamt untersucht)		
Versuchsgruppe (*H. bilis*)	Magen	0/5	1/6	1/11
	Magen (gespült)	0/5	0/6	0/11
	Jejunum	0/5	0/6	0/11
	Jejunum (gespült)	0/5	0/6	0/11
	Zäkum	2/5	4/6	6/11
	Zäkum(gespült)	2/5	4/6	6/11
	Kolon	2/5	3/6, (1/6)	5/11, (1/11)
	Kolon (gespült)	2/5	4/6	6/11
	Rektum	2/5	0/6, (4/6)	2/11, (4/11)
	Rektum (gespült)	2/5	3/6, (1/6)	5/11, (1/11)
Negativkontrolle (PBS)	Magen	0/5	0/5	0/10
	Magen (gespült)	0/5	0/5	0/10
	Jejunum	0/5	0/5	0/10
	Jejunum (gespült)	0/5	0/5	0/10
	Zäkum	0/5	0/5	0/10
	Zäkum(gespült)	0/5	0/5	0/10
	Kolon	0/5	0/5	0/10
	Kolon(gespült)	0/5	0/5	0/10
	Rektum	0/5	0/5	0/10
	Rektum (gespült)	0/5	0/5	0/10

4.2.4 Vergleich der Ergebnisse der Organuntersuchung einzelner Mäuse und der Untersuchung von Sammelkot aus den entsprechenden Käfigen

28 Tage p. inf. wurden Organproben (Leber, Magen, Jejunum, Zäkum, Kolon, Rektum) von drei Mäusen aus 2 Käfigen untersucht, in denen im Sammelkot *H. bilis* nachgewiesen worden war. In zwei dieser drei Mäuse wurde in Dickdarmproben *H. bilis* nachgewiesen. 56 Tage p. inf. wurden die Organproben der jeweils restlichen zwei Mäuse aus denselben Käfigen untersucht. Im Sammelkot aus diesen beiden Käfigen konnte auch zu diesem Zeitpunkt *H. bilis* detektiert werden. Im Gegensatz zum Tag 28 wurde in den Dickdarmproben aller vier untersuchten Mäuse ebenfalls *H. bilis* nachgewiesen.

In dem Käfig der Versuchsgruppe, der vier experimentell mit *H. bilis* infizierte Mäuse enthielt, in dem aber im Sammelkot kein *H. bilis* nachgewiesen werden konnte, wurde weder 28 Tage noch 56 Tage p. inf. in einer Organprobe *H. bilis* festgestellt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 schematisch dargestellt.



*angegeben als: infiziert / inokuliert

Abbildung 8: Vergleich der Ergebnisse der Organuntersuchung und der Kotuntersuchung

4.2.5 Sequenzierung von PCR-Produkten

Um die Infektion zu bestätigen und zu überprüfen, ob die Tiere tatsächlich erfolgreich mit *H. bilis* infiziert worden waren, wurden sieben Tage nach künstlicher Infektion der C3H/HeJ Mäuse aus allen Käfigen Kot gesammelt und untersucht. Die Proben von zwei Käfigen aus der Versuchsgruppe lieferten die diagnostische Bande von ca. 375 bp. Die PCR-Produkte dieser Proben wurden aufgereinigt und zur Sequenzierung geschickt. Die aufgeschlüsselte Sequenz wurde bei einer Genbank-Recherche auf ihre Übereinstimmung mit bekannten Gensequenzen verglichen und analysiert. Unter den ersten 15 Sequenzen mit größter Homologie befanden sich zehnmal Übereinstimmungen mit der Sequenz von *H. bilis* und fünfmal Übereinstimmungen mit uncharakterisierten Sequenzen von *Helicobacter* spp. Bei einem direkten Vergleich der Sequenz des PCR-Produktes mit der Sequenz des entsprechenden Abschnitts des 16S rRNA-Gens von *H. bilis* ergab sich eine Übereinstimmung von 100% (Abbildung 8). Diese Ergebnisse liessen darauf schließen, dass die diagnostischen Banden von ca. 375 bp auf die experimentelle Infektion mit *H. bilis* zurückzuführen war. Mindestens jeweils ein Tier aus zwei Käfigen der Versuchsgruppe hat *H. bilis* mit dem Kot ausgeschieden.

Das PCR-Produkt der Proben-DNA der Leber einer Maus aus der Kontrollgruppe zeigte im Agarosegel eine deutliche spezifische Bande von ca. 375 bp. Um zu untersuchen, ob diese Bande *Helicobacter*-spezifisch ist, wurde dieses PCR-Produkt aufgereinigt und sequenziert. Unter den ersten 15 Sequenzen mit größter Homologie befand sich dreimal Übereinstimmungen mit der Sequenz von *H. hepaticus* und 13mal Übereinstimmungen mit uncharakterisierten Sequenzen von *Helicobacter* spp. Bei einem direkten Vergleich der Sequenz des PCR-Produktes mit der Sequenz des entsprechenden Abschnitts des 16S rRNA-Gens von *H. hepaticus* ergab sich eine Übereinstimmung von 100%. Bei dem Vergleich mit der Sequenz des entsprechenden Abschnitts des 16S rRNA-Gens von *H. bilis* zeigten sich im Fall von fünf Basen Abweichungen (Abbildung 10).

Diese Ergebnisse belegen, dass sich in der fraglichen Leberprobe mit großer Wahrscheinlichkeit *H. hepaticus*-spezifische DNA befand.

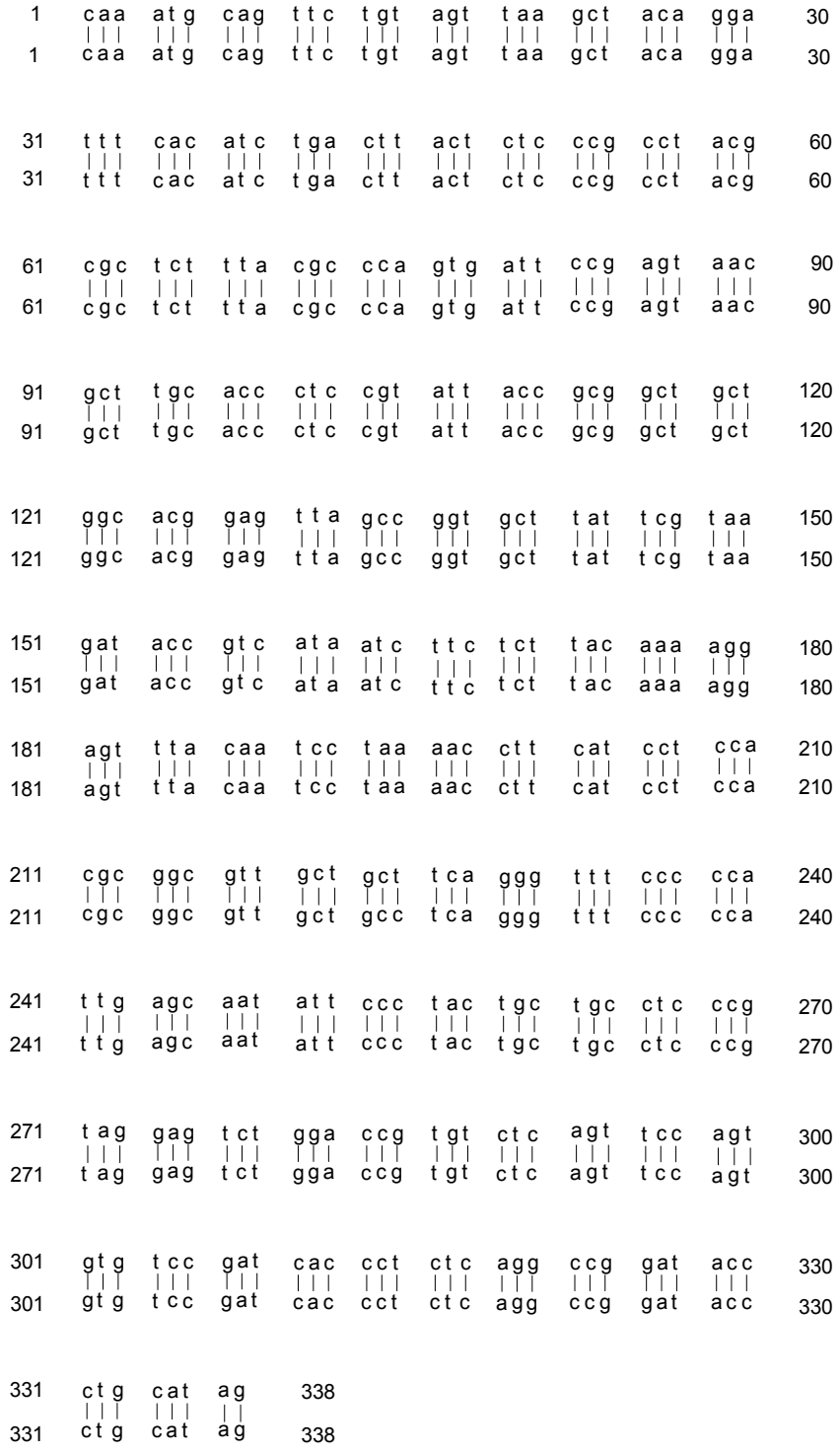


Abbildung 9: Vergleich der Basensequenz des PCR-Produktes aus der Kot-DNA mit der entsprechenden Basensequenz von *H. bilis*

Die obere Basensequenz stellt die Sequenz des PCR-Produktes aus reiner *H. bilis*-DNA generiert dar. Bei der unteren Basensequenz handelt es sich um die Sequenz des PCR-Produktes, welches aus der Kotuntersuchung der Versuchsgruppe vom Tag 7 p. inf. stammt. Die Sequenzen umfassen nur 338 bp, da die den Primern analogen Basenfolgen am Anfang und Ende der Sequenzen fehlen.

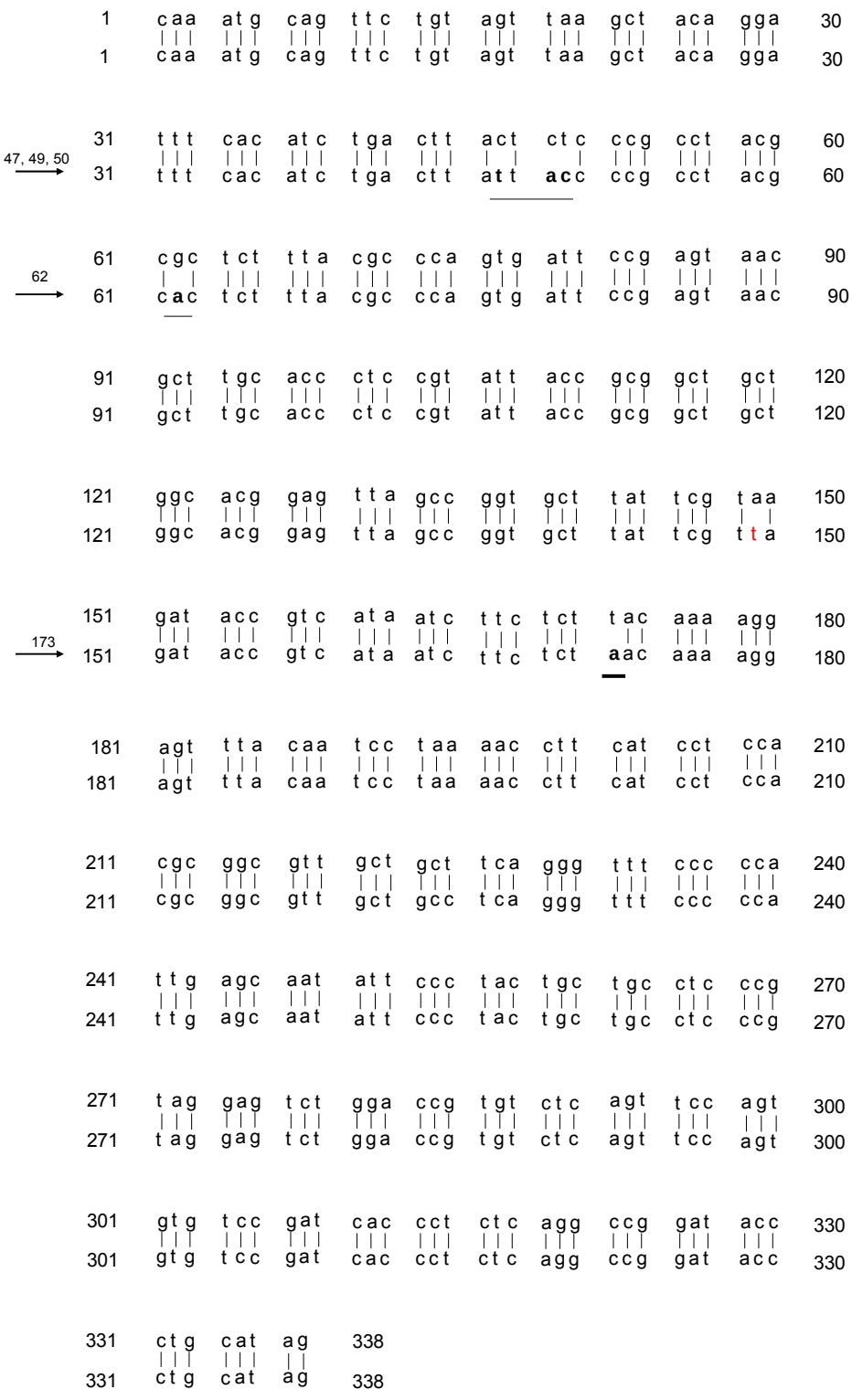


Abbildung 10: Vergleich der Basensequenz des fraglichen PCR-Produktes mit der Basensequenz von *H. bilis*

Die obere Basensequenz stellt die Sequenz des PCR-Produktes generiert aus reiner *H. bilis*-DNA *dar.* Bei der unteren Basensequenz handelt es sich um die Sequenz des PCR-Produktes, welches aus der Leber eines Tieres der mit PBS inokulierten Kontrollgruppe am Tag 28 p. inf. stammt. Die Sequenzen umfassen nur 338 bp, da die den Primern analogen Basenfolgen am Anfang und Ende der Sequenzen fehlen. Die abweichenden Basen werden durch die Pfeile gekennzeichnet. Die Nummern der abweichenden Basen sind über den Pfeilen angegeben.

4.3 Infektionsüberwachung von Mauskolonien

In vielen Versuchstierhaltungen wird das Hygiene-Monitoring mit Hilfe von Sentinels durchgeführt. Sentinels dienen der Infektionsüberwachung einer Mauskolonie, bzw. zeigen den mikrobiologischen Status der zu überwachenden Kolonie an. Es handelt sich dabei um Mäuse, deren mikrobiologischer Status bekannt und von höchster Qualität ist. Diese Mäuse werden über einen gewissen Zeitraum mit potentiell infektiösem Material, meistens gebrauchte Einstreu aus der zu überwachenden Kolonie, in Kontakt gebracht und nach einer gewissen Expositionszeit stellvertretend für die restliche Kolonie untersucht.

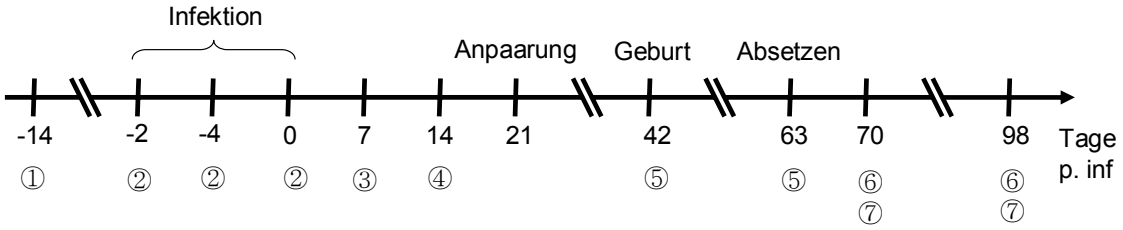
Obwohl *H. hepaticus* durch gebrauchte Einstreu auf Sentinels übertragen wird erscheint im Vergleich dazu *H. bilis* durch ein Hygiene-Monitoring mit so genannten Einstreu-Sentinels zu erfassen als weniger verlässlich [76, 77]. Deswegen sollte durch einen Infektionsversuch eine besser geeignete Methode der Infektionsüberwachung von Mauskolonien bezüglich *H. bilis* gefunden werden.

Zu diesem Zweck wurden *Helicobacter*-freie weibliche C3H/HeJ Mäuse experimentell mit *H. bilis* infiziert und 21 Tage p. inf. mit *Helicobacter*-freien Männchen angepaart. Die Abwesenheit von *Helicobacter* spp. in diesen Mäusen wurde jeweils 14 Tage vor der experimentellen Infektion bzw. vor der Anpaarung durch eine Untersuchung von Sammelkot aus allen Käfigen überprüft. Zusätzlich wurde aus jedem Käfig ein Tier stichprobenartig entnommen und dessen Zäkum untersucht.

Zu diesem Zweck wurden insgesamt 20 Weibchen im Alter von neun bis elf Wochen dreimal im Abstand von zwei Tagen experimentell infiziert. Das Nassgewicht des Bakterienpellets, aus dem die Suspension für die Infektion hergestellt wurde, betrug pro experimentelle Infektion jeweils 698, 640 und 738 mg. Die OD der entsprechenden Bakteriensuspensionen betrug, 1:100 verdünnt, bei einer Wellenlänge von 600 nm 0,103, 0,135 und 0,084. Diese Art der Quantifizierung wurde gewählt, da die Bakterien auf Nährböden keine Kolonien bilden, sondern schwärmend wachsen. Alle Zeitangaben, soweit nicht anders angegeben, beziehen sich auf den Tag der letzten Infektion der Weibchen.

Sieben Tage nach der letzten Infektion wurde *H. bilis* in vier Käfigen im Sammelkot von jeweils vier weiblichen Mäusen nachgewiesen. Diese 16 Weibchen wurden danach einzeln gesetzt. Im Kot aller 16 Weibchen wurde 14 Tage p. inf. *H. bilis* nachgewiesen. 21 Tage p. inf. wurden diese 16 Weibchen mit *Helicobacter*-freien

Männchen angepaart. 14 der 16 Zuchtpaare brachten Nachkommen. Die beiden Zuchtpaare, die keine Nachkommen gebracht hatten, wurden nicht untersucht.
Als Negativkontrolle wurden Weibchen mit PBS inokuliert. Der zeitliche Ablauf des Versuches ist in Abbildung 11 schematisch dargestellt.



Legende:

① Kontrolle der Abwesenheit von *Helicobacter* spp. in den Mäusen vor Versuchsbeginn
② Infektion der Weibchen mit *H. bilis*
③ Kotuntersuchung der Weibchen (Sammelkot aus den Käfigen)
④ Kotuntersuchung der einzelnen Weibchen (Kot von Einzeltieren)
⑤ Kotuntersuchung der Zuchtpaare
⑥ Kotuntersuchung der Nachkommen
⑦ Untersuchung des Zäkums von jeweils der Hälfte der Nachkommen und der Zuchtpaare

Abbildung 11: Versuchsaufbau für die geeignete Infektionsberwachung einer Mauskolonie

4.3.1 *Helicobacter*-Status der Zuchtpaare

Direkt nach der Geburt (42 Tage p. inf.) und unmittelbar vor dem Absetzen (63 Tage p. inf) der Jungtiere wurde im Sammelkot der 14 Zuchtpaare, die Nachkommen hatten, *H. bilis* nachgewiesen. Das Zäkum der ersten Hälfte der Zuchtpaare wurde 70 Tage p. inf. untersucht. 98 Tage p. inf. wurde das Zäkum der zweiten Hälfte der Zuchtpaare untersucht. Im Zäkum aller Weibchen und bei 12 von 13 (92%) der Männchen konnte *H. bilis* nachgewiesen werden. Eines der 14 Männchen war zu diesem Zeitpunkt gestorben und konnte deswegen nicht untersucht werden.
Im Zäkum der mit PBS schein-infizierten Kontrollmäuse wurden *Helicobacte*r spp. nicht nachgewiesen.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 23: Nachweis von *H. bilis* im Zäkum der Zuchtpaare

Tage p. inf.		Weibchen	Männchen	gesamt
70	Versuchsgruppe* *(H. bilis)*	8/8	8/8	16/16
	Kontrollgruppe* (PBS)	0/3	0/3	0/6
98	Versuchsgruppe* *(H. bilis)*	6/6	4/5	10/11
	Kontrollgruppe* (PBS)	0/3	0/3	0/6

*angegeben als: infiziert / inokuliert

4.3.2 Kotuntersuchung der Nachkommen

Im o.g. Versuch wurden 49 Männchen und 42 Weibchen geboren und jeweils 21 Tage p. p. abgesetzt. Dabei wurden männliche und weibliche Nachkommen eines Wurfes in getrennten Käfigen zu jeweils ein bis drei Mäusen pro Käfig gehalten.
Im Sammelkot von 28 Tage alten Mäusen wurde in 12 von insgesamt 15 untersuchten Käfigen mit männlichen und in 12 von insgesamt 15 untersuchten Käfigen mit weiblichen Mäusen *H. bilis* nachgewiesen. Zu diesem Zeitpunkt wurden aus allen Käfigen ingesamt 47 Mäuse für die Untersuchung des Zäkums euthanasiert.
Im Sammelkot von 56 Tage alten Mäusen wurde in 10 von 12 untersuchten Käfigen mit männlichen und in 8 von 10 untersuchten Käfigen mit weiblichen Mäusen *H. bilis* nachgewiesen. Die restlichen 44 Mäuse wurde für die Untersuchung des Zäkums euthanasiert.
Im Sammelkot der Kontrollmäuse deren Mütter mit PBS schein-infiziert worden waren, wurde *H. bilis* nicht nachgewiesen.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

Tabelle 24: Ergebnisse der Kotuntersuchung der Nachkommen

Tage p. inf.		Weibchen	Männchen	insgesamt	%
70	Versuchsgruppe* *(H. bilis)*	12/15	12/15	24/30	80
	Kontrollgruppe* (PBS)	0/4	0/4	0/8	0
98	Versuchsgruppe* *(H. bilis)*	8/10	10/12	18/22	82
	Kontrollgruppe* (PBS)	0/5	0/5	0/10	0

* angegeben als: Käfige mit positiven Ergebnis / insgesamt untersuchte Käfige

4.3.3 Untersuchung des Zäkums der Nachkommen: Stichprobenuntersuchung

Jeweils die Hälfte der Mäuse aus dem o.g. Versuch wurde im Alter von 28 und 56 Tagen euthanasiert, das entspricht 70 bzw. 98 Tage nach der letzten experimentellen Infektion deren Mütter. 47 der 28 Tage alten Mäuse wurden untersucht und bei 15 Weibchen und 16 Männchen (31/47; 66%) *H. bilis* im Zäkum nachgewiesen. Die restlichen 44 Mäuse wurden im Alter von 56 Tagen untersucht. Bei 17 Weibchen und 17 Männchen (34/44; 77%) wurde *H. bilis* im Zäkum nachgewiesen. In den Kontrollmäusen wurde *H. bilis* nicht nachgewiesen.
Die Ergebnisse der sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 25: Ergebnisse der Untersuchung des Zäkums der Nachkommen

Tage p. inf.		Weibchen	Männchen	insgesamt	%
70	Versuchsgruppe* *(H. bilis)*	15/22	16/25	31/47	66
	Kontrollgruppe* (PBS)	0/5	0/5	0/10	0
98	Versuchsgruppe* *(H. bilis)*	17/20	17/24	34/44	77
	Kontrollgruppe* (PBS)	0/6	0/7	0/13	0

*angegeben als: infiziert / inokuliert

4.3.4 Vergleich des *Helicobacter*-Status von Zuchtpaaren und Nachkommen

Im Sammelkot aller Zuchtpaare und im Zäkum von 14/14 (100%) Muttertieren bzw. im Zäkum von 12/13 (92%) Vatertieren konnte *H. bilis* nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu war der Nachweis von *H. bilis* nur im Sammelkot von 24 der 30 (80%) Käfige mit Nachkommen dieser Zuchtpaare möglich. Bei der direkten Untersuchung von Zäkumproben der Nachkommen konnte in 65 von insgesamt 91 (71%) untersuchten Mäusen *H. bilis* detektiert werden. Dass in den erwachsenen Männchen *H. bilis* häufiger (92%) als in den Nachkommen (71%) nachgewiesen werden konnte, ist nicht signifikant ($p < 0,2$).
Dementsprechend geben Ergebnisse, die man bei der Untersuchung älterer Tiere bzw. von Zuchtpaaren erhält, sicherer Auskunft über den *Helicobacter*-Status von Mauskolonien als die Untersuchung von jüngeren Tieren bzw. Nachkommen.

4.3.5 Vergleich der Ergebnisse aus Kotuntersuchung und Stichprobenuntersuchung

Bei der Untersuchung der Nachkommen aus dem o.g. Versuch im Alter von 28 Tagen konnte im Sammelkot aus 24 von insgesamt 30 untersuchten Käfigen (80%) *H. bilis* detektiert werden. Bei der direkten Untersuchung von Zäkumproben zufällig ausgewählter Nachkommen konnte in 31 der 47 untersuchten Mäuse (66%) *H. bilis* nachgewiesen werden. Mäuse, in denen der Nachweis im Zäkum nicht möglich war, stammten auch aus Käfigen, in denen bei der Untersuchung von Sammelkot *H. bilis* nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse sind zusammengefasst in Abbildung 12 dargestellt.

Bei der Untersuchung der 56 Tage alten Nachkommen wurde in 34 von 44 untersuchten Mäusen (77%) im Zäkum *H. bilis* nachgewiesen. Zu diesem Zeitpunkt wurde in allen Käfigen, in denen *H. bilis* im Sammelkot detektiert worden war und in denen mindestens in einer Maus *H. bilis* im Zäkum nachgewiesen worden war, *H. bilis* auch in den anderen untersuchten Mäusen aus demselben Käfig nachgewiesen. In zwei Käfigen wurde 56 Tage p. inf. zwar im Sammelkot *H. bilis* nachgewiesen, aber nicht im Zäkum der aus diesem Käfig untersuchten Mäuse. Die Ergebnisse von diesem Untersuchungszeitpunkt sind in Abbildung 13 dargestellt.

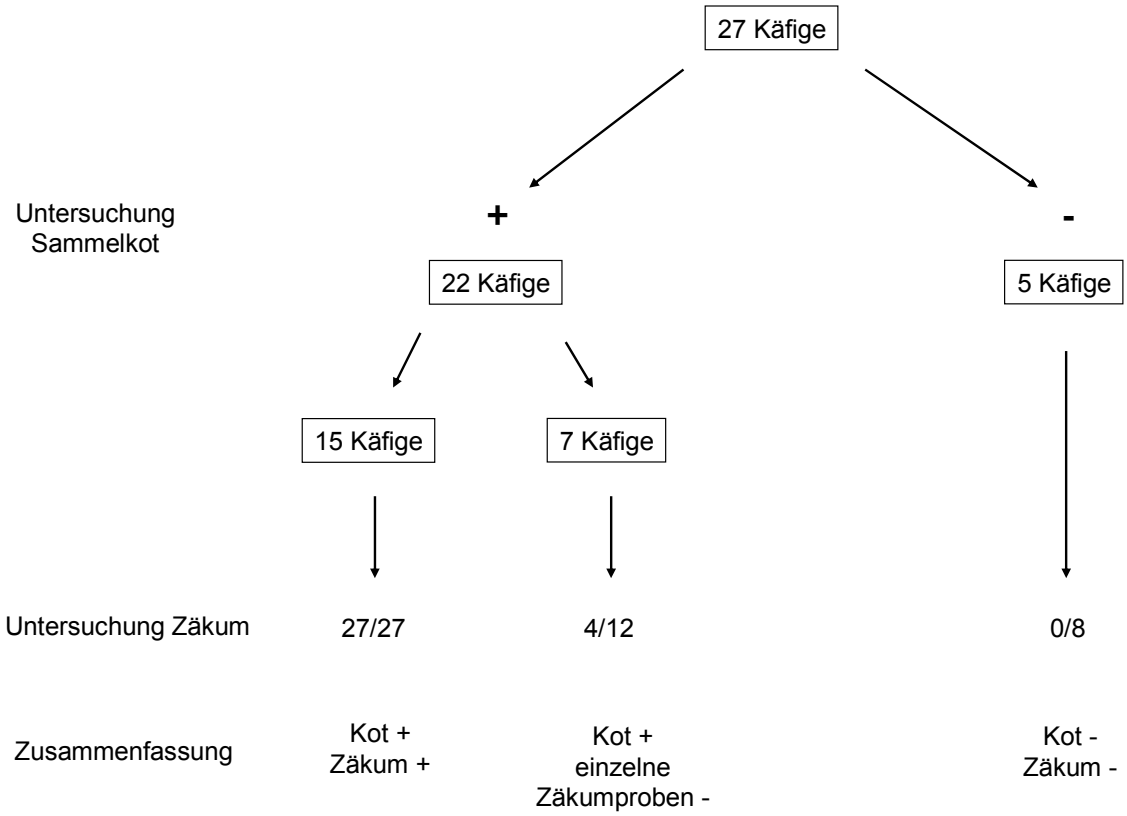


Abbildung 12: Vergleich Kotuntersuchung mit der Stichprobenuntersuchung (Tag 28 p. p.)
Schematischer Vergleich der Ergebnisse der Kotuntersuchung und der Ergebnisse der Untersuchung des Zäkums einzelner Nachkommen 28 Tagen p. p. Mäuse wurden als Stichproben aus 22 der insgesamt 24 Käfige entnommen, in denen *H. bilis* nachgewiesen wurde.

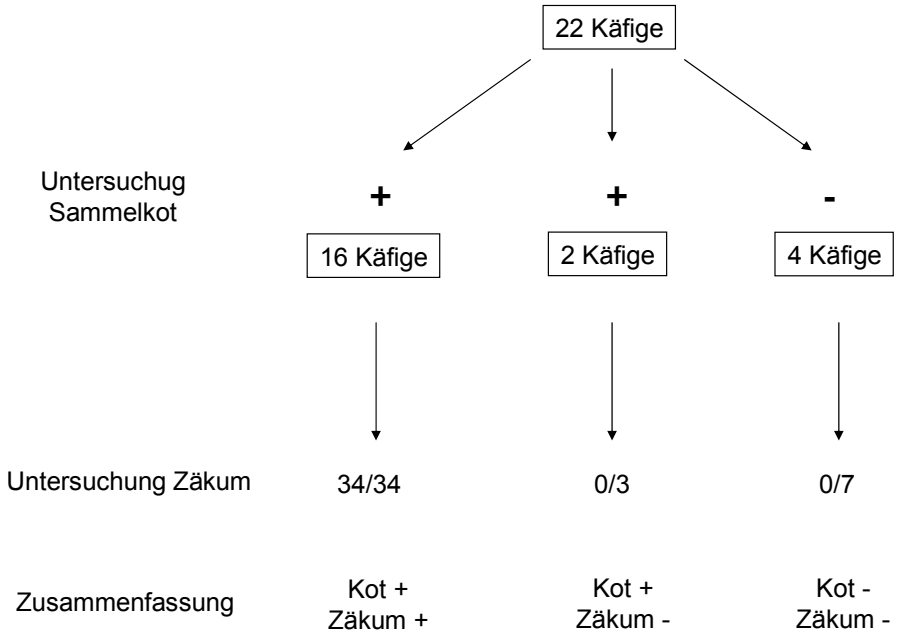


Abbildung 13: Vergleich Kotuntersuchung mit der Stichprobenuntersuchung (Tag 56 p. p.)
Schematischer Vergleich der Ergebnisse aus der Kotuntersuchung und der Ergebnisse der Untersuchung des Zäkums der Nachkommen 56 Tage p. p.

5 Diskussion

Murine *Helicobacter* spp. können abhängig vom Mausstamm zu persistierenden, klinisch inapparenten Infektionen bis zu schweren Erkrankungen von Mäusen führen. Die Infektion kann somit Veränderungen in den Mäusen hervorrufen, die Ergebnisse von Tierversuchen unterschiedlich beeinflussen können. Die Reproduzierbarkeit, die Interpretation und die Aussagekraft der Versuchsergebnisse können bei dem Einsetzen solcher Mäuse in einen Tierversuch stark eingeschränkt sein. Deswegen ist es notwendig, *Helicobacter*-freie Mäuse für Tierexperimente zur Verfügung stellen zu können. Das ist aber nur möglich, wenn *Helicobacter*-Infektionen in Versuchstierhaltungen verlässlich nachgewiesen werden können.
Zielsetzung dieser Arbeit war es, das Nachweisverfahren für murine *Helicobacter* spp. in Versuchstierhaltungen zu optimieren.
Es wurde zunächst eine nested PCR etabliert. Bei dieser nested PCR wird die Zielsequenz in zwei aufeinander folgende PCR-Schritte amplifiziert, wobei jeder PCR-Schritt jeweils 40 Amplifikationen umfasst. Im Vergleich zur single-step PCR erfolgt die doppelte Anzahl von Zyklen. Außerdem wird schon im ersten PCR-Schritt der nested PCR selektiv nur die Sequenz des bakteriellen 16S rRNA-Gens amplifiziert, wodurch nur die bakterielle Ziel-DNA vervielfacht wird. Aus diesem Grund wurde angenommen, dass die nested PCR im Vergleich zur herkömmlichen single-step PCR sensitiver sein müsste.
Die Optimierung des Nachweises schloss weiterhin die Beantwortung der Frage nach dem am besten geeigneten Probenmaterial für die PCR ein. Zusätzlich war es das Ziel herauszufinden, welche Mäuse für die Probenentnahme aus Mauskolonien ausgewählt werden sollten, um eine effiziente Infektionsüberwachung einer Mauskolonie bezüglich *Helicobacter*-Infektionen zu erreichen. Um diese Fragestellungen zu untersuchen, wurden *Helicobacter*-freie Mäuse experimentell mit *H. bilis* infiziert.

Sensitivität des *Helicobacter*-Nachweises

Die nested PCR, die in dieser Arbeit etabliert wurde, wies bei der DNA-Titration eine Nachweisgrenze auf, die für *H. bilis*- und *H. hepaticus*-DNA zwischen 10 und 340 fg lag. Das entspricht dem Nachweis von ca. 7 bzw. 240 Kopien des *H. hepaticus*-Genoms [72, 75]. Die Nachweisgrenze der single-step PCR lag bei diesem Versuch

zwischen 640 und 3400 fg, was wiederum ca. 500 bzw. 2400 Kopien gleichkommt. Durchschnittlich war die nested PCR bei der DNA-Titration um den Faktor 10 sensitiver als die single-step PCR und in einem Fall sogar um den Faktor 100. Diese Ergebnisse zeigen, dass man mit der nested PCR tatsächlich geringere Mengen von spezifischer *Helicobacter*-DNA in DNA-Proben nachweisen kann als mit der single-step PCR. Da bei der DNA-Titration reine *Helicobacter*-DNA verwendet wurde, ist die Übertragung der Ergebnisse auf die praktische *Helicobacter*-Diagnostik allerdings nur beschränkt möglich.

In der Praxis werden vor allem DNA-Proben von verschiedenen Abschnitten des Magen-Darm-Traktes, der Leber und von Fäzes eingesetzt, die dementsprechend nicht nur *Helicobacter*-DNA, sondern auch eukaryotische DNA, DNA anderer Darmbakterien und eventuell Nahrungsbestandteile beinhalten. Durch diese Bestandteile der Probe könnte der Ablauf der PCR und ihre Ergebnisse beeinflusst werden. Um praxisnähere Bedingungen zu schaffen, wurde deswegen ein sogenannter DNA-DNA-Spike durchgeführt. Bei diesem Versuch wurde jedem PCR-Reaktionsansatz nicht nur unterschiedlich verdünnte *Helicobacter*-DNA als Proben-DNA zugefügt, sondern auch 460 ng bzw. 280 ng Zäkum-DNA *Helicobacter*-freier Mäuse. Die Nachweisgrenze der nested PCR lag bei dem DNA-DNA-Spike für *H. bilis*- und *H. hepaticus*-DNA zwischen 0,22 pg und 3,4 pg, was ca. 150 bzw. 2400 Kopien des Genoms von *H. hepaticus* entspricht. Die single-step PCR wies eine Nachweisgrenze auf, die zwischen 2,2 pg und 10 pg lag. Das entspricht ca. 1500 bzw. 7000 Kopien. Wie schon bei der DNA-Titration gezeigt, war die nested PCR auch beim DNA-DNA-Spike durchschnittlich um den Faktor 10 sensitiver als die single-step PCR.

Die Hypothese, dass eine nested PCR aufgrund der zwei PCR-Schritte mit jeweils 40 Zyklen tatsächlich sensitiver ist als eine single-step PCR, wurde also sowohl in der DNA-Titration als auch im DNA-DNA-Spike bestätigt. Auf der 41. wissenschaftlichen Tagung der Gesellschaft für Versuchstierkunde in Göttingen stellte ich in einem Vortrag dar, dass bei der Anwendung der nested PCR in der praktischen *Helicobacter*-Diagnostik auch in Kotproben von Mäusen *Helicobacter* spp. nachgewiesen werden können, in denen mit der single-step der Nachweis nicht möglich ist, sondern die single-step PCR falsch-negative Ergebnisse liefert [Jacobsen et al. Manuskript in Vorbereitung]. Diese Ergebnisse zeigten, dass die nested PCR auch für die praktische *Helicobacter*-Diagnostik relevant ist.

Wenn man die Ergebnisse der nested und der single-step PCR bei der DNA-Titration mit den Ergebnissen beim DNA-DNA-Spike vergleicht, stellt man darüber hinaus fest, dass die Nachweisgrenze von nested und single-step PCR bei der DNA-Titration durchschnittlich zehnmal niedriger liegt als beim DNA-DNA-Spike. Diese Beobachtung könnte auf den Einfluss anderer Bestandteile der Probe wie z.B. Nahrungsbestandteile oder murine DNA zurückzuführen sein, die u. a. mit den Primern in Wechselwirkung treten oder die *Taq* Polymerase hemmen können. Beim ersten PCR-Schritt der nested PCR könnte vor allem bakterielle DNA anderer Darmbakterien eine Rolle spielen, da Primer verwendet werden, die an eine Sequenz binden, die nicht nur *Helicobacter*-spezifisch ist, sondern auch im Genom anderer Darmbakterien vorkommt. Folglich kommt es zu einer kompetitiven Situation bei der Anlagerung der Primer zwischen den entsprechenden Sequenzen der murinen *Helicobacter* spp. und den entsprechenden Sequenzen anderer Bakterienspezies.
Einen Einfluss könnten auch Nahrungsbestandteile auf den Ablauf der PCR bzw. die PCR-Ergebnisse ausüben. Auch bei der Aufreinigung der DNA mit Hilfe von Kieselgel-Säulen befinden sich in der eluierten DNA noch DNA-fremde Bestandteile [20]. Einige Nahrungsbestandteile können die Aktivität der *Taq* Polymerase beeinträchtigen und werden deswegen als PCR-Inhibitoren bezeichnet. Dabei handelt es sich vor allem um komplexe Polysaccharide pflanzlichen Ursprungs [20]. Diese Polysaccharide sind möglicheweise bereits in Bestandteilen der Nagerdiät enthalten.
Bei Wiederholungsuntersuchungen in der routinemäßig durchgeführten *Helicobacter*-Diagnostik wurde häufig beobachtet, dass positive PCR-Ergebnisse aus der entsprechenden gelagerten Proben-DNA nicht reproduziert werden können. Bei den hier beschriebenen Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit von PCR-Ergebnissen wurde nachgewiesen, dass sich die Ergebnisse bis zu drei Wochen aus dem bei 4°C gelagerten Reaktionsansatz des ersten PCR-Schrittes der nested PCR zu 100% reproduzieren lassen. Aus der gelagerten Proben-DNA war das nicht regelmäßig möglich gewesen. Eine mögliche Begründung wäre, dass die Proben-DNA durch DNAsen degradiert wird. Theoretisch müssten sich in der gelagerten Proben-DNA mehr DNAsen befinden als im gelagerten PCR-Produkt der PCR 1. Denn beim Pipetieren des Reaktionsansatzes der PCR 1 wurde nur 1 µl der Proben-DNA dem Reaktionsansatz, der insgesamt 30 µl umfasste, zugefügt. Die Proben-DNA inklusive der eventuell vorkommenden DNAsen wurde also 1:30 verdünnt. Außerdem kann

davon ausgegangen werden, dass DNAsen beim Durchlaufen der 40 Zyklen der PCR 1 bei 95°C denaturiert werden. Dadurch müsste das PCR-Produkt der PCR 1 bei Lagerung stabiler als die Proben-DNA und eine Reproduktion der Ergebnisse eher möglich sein.

Darüber hinaus kommt es im PCR-Produkt des ersten PCR-Schritts durch die 40fache Amplifikation zu einer Anreicherung *Helicobacter*-spezifischer Sequenzen. Je mehr *Helicobacter*-spezifische DNA-Abschnitte sich in einer Probe befindet, deste höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass beim Ansetzen der PCR diese *Helicobacter*-spezifischen DNA-Abschnitte in den Untersuchungsansatz pipetiert werden und man ein positives Ergebnis erhält bzw. reproduziert.

Wenn gelagerte Proben-DNA in die nested PCR eingesetzt wurde, lag die Nachweisgrenze bei der DNA-Titration zwischen 6,4 fg und 22 pg und bei dem DNA-DNA-Spike zwischen 0,22 pg und 12 pg. In drei Fällen wurde festgestellt, dass die Nachweisgrenze der nested PCR aus der gelagerten Proben-DNA um den Faktor 10 niedriger lag als die Nachweisgrenze am Tag der DNA-Präparation (Tag 0). Diese Ergebnisse könnten darauf zurückzuführen sein, dass sich in der gelagerten Proben-DNA zwar nur noch wenig spezifische *Helicobacter*-DNA befindet, diese aber in diesen drei Fällen beim Erstellen des Reaktionsansatzes zufällig pipetiert wurde. Diese Möglichkeit wird in Abbildung 14 verdeutlicht.

Für die Optimierung der *Helicobacter*-Diagnostik schließe ich daraus, dass eine nested PCR generell Vorteile gegenüber einer einfachen PCR aufweist und somit als Methode der Wahl angesehen werden kann. Wird dabei der erste PCR-Schritt sofort nach der DNA-Präparation durchführt, kann eine weitere Degradierung der Ziel-DNA verhindert werden. Die Lagerung des PCR-Produktes der PCR 1 ermöglichte anschließend eine vollständige Reproduktion der Ergebnisse zu einem späteren Zeitpunkt und könnte deswegen als „Konservierung“ der Probe bezeichnet werden.

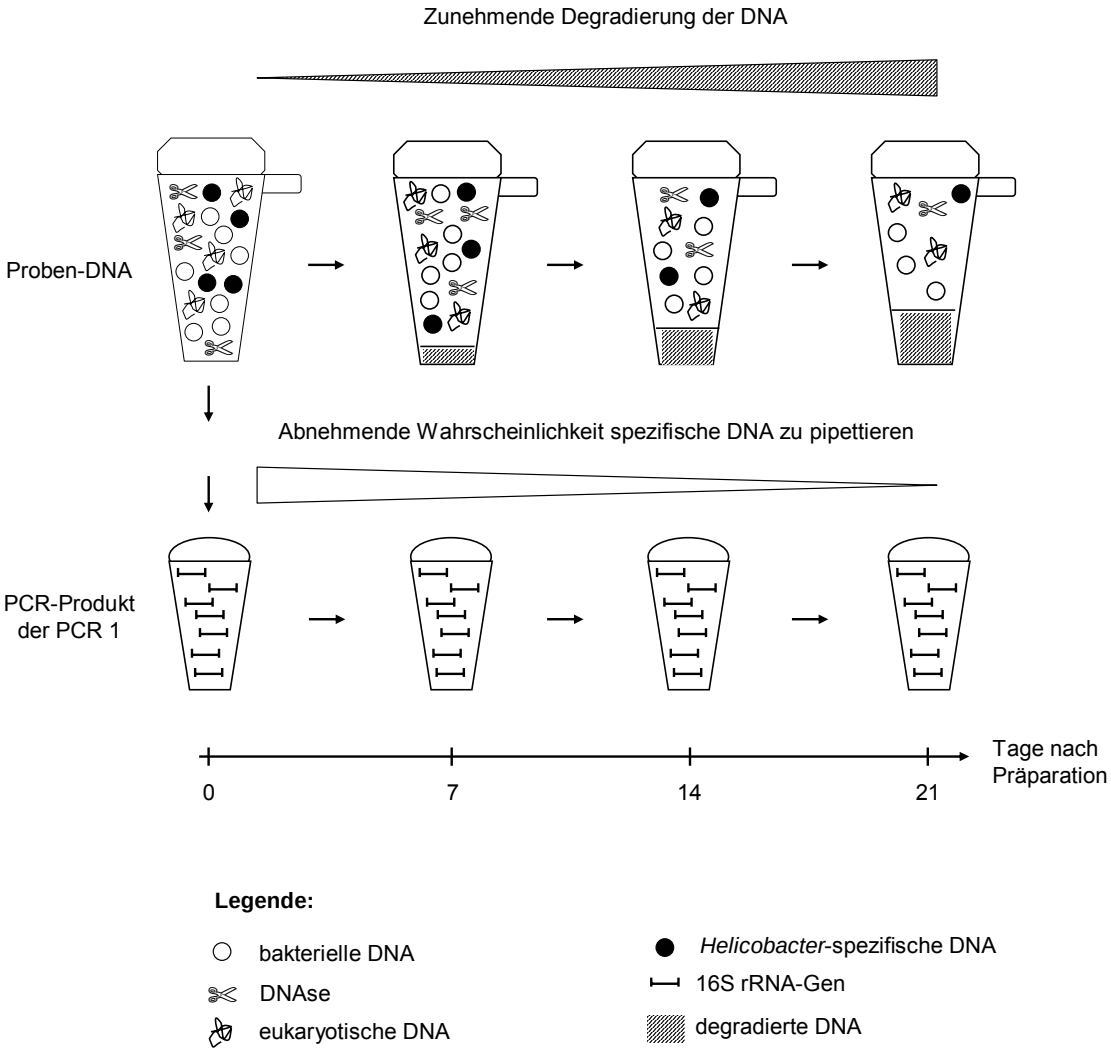


Abbildung 14: Schematische Darstellung einer DNA-Probe bei der *Helicobacter*-Diagnostik
Verdeutlicht werden soll die Veränderung der Proben-DNA über die Zeit. Nach 21 Tagen ist nur noch eine geringe Menge *Helicobacter*-spezifische DNA in der Probe. Das PCR-Produkt der PCR 1 bleibt hingegen unverändert stabil.

Wahl des Probenmaterials

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Organprobe sich als Probenmaterial für DNA-Präparation am besten eignet, und ob die Entfernung der Ingesta bei Proben des Magen-Darm-Traktes einen positiven Einfluss auf den Nachweis hat. Zu diesem Zweck wurden Proben von Magen, Jejunum, Zäkum, Kolon und Rektum mit Inhalt untersucht. Zusätzlich wurde jeweils eine zweite Probe dieser

Organe entnommen. Bei diesen Proben wurde der Magen bzw. Darminhalt entfernt und nur das Gewebe untersucht.

In mit *H. bilis* experimentell infizierten Mäusen wurde in zwei von fünf Mäusen 28 Tage p. inf. die Infektion mittels PCR nachgewiesen. *H. bilis* wurde dabei in diesen Mäusen in allen Abschnitten des Dickdarms diagnostiziert. Dieser Nachweis war unabhängig davon, ob in Zäkum-, Kolon- und Rektumprobe der Darminhalt entfernt worden war. In Magen- und Dünndarmproben, sowie in Leberproben konnte *H. bilis* nicht nachgewiesen werden.

56 Tage p. inf. wurde die Infektion in Zäkum-, Kolon- und Rektumproben von vier von insgesamt sechs Mäusen nachgewiesen. In den Zäkumproben war ein deutlicher Nachweis möglich, unabhängig davon, ob der Inhalt entfernt worden war. Bei einer der vier Kolonproben und bei allen vier Rektumproben, die zusammen mit dem Inhalt untersucht wurden, lieferte die Untersuchung nur schwache Banden entsprechender Größe. Alle vier Kolonproben und drei der vier Rektumproben, deren Darminhalt entfernt worden war, generierten hingegen deutliche diagnostische Banden. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass sich bei der Untersuchung der Kolon- und Rektumproben die Entfernung des Darminhaltes positiv auf die PCR-Ergebnisse auswirkt. Diese Beobachtung könnte daran liegen, dass der Darminhalt die PCR-Analyse durch PCR-Inhibitoren beeinträchtigt. Außerdem könnte durch die Entfernung des Darminhaltes auch das Verhältnis der Menge spezifischer *Helicobacter*-DNA zur gesamten DNA Menge in der Probe erhöht werden.

Durch ihre Geißeln verfügen murine *Helicobacter* spp. über eine starke Beweglichkeit [32]. Deutlich wird das bei der Kultivierung dieser Bakterienspezies, indem diese ein schwärmendes Wachstum auf den Nährböden zeigen. Durch ihre Beweglichkeit können sie bis in die Krypten der Dickdarmschleimhaut selektiv vordringen. Aus den Schleimhautkrypten werden sie bei der Entfernung des Darminhaltes durch Spülen wahrscheinlich nicht oder nur in geringem Umfang heraus gewaschen, so dass ihr relativer Anteil in der Probe beim Entfernen der Ingesta ansteigt.

Die Entfernung des Darminhaltes bei Zäkumproben hatte keinen Einfluß auf die Ergebnisse. Dies könnte daran liegen, dass das Zäkum möglicherweise ein bevorzugter Besiedelungsort von *H. bilis* ist. Dadurch kämen die Bakterien sowohl in der Zäkumschleimhaut als auch im Inhalt in besonders grosser Menge vor. Demzufolge wäre die Bakterienkonzentration im Zäkum so hoch, dass eventuelle negative Effekte des Darminhalts bei der PCR Durchführung keine Rolle spielen.

Andere Dickdarmabschnitte, wie das Kolon können von *H. bilis* ebenfalls besiedelt werden [24]. Möglicherweise sind jedoch hier die Bedingungen für das Wachstum von *H. bilis* nicht so günstig. Außerdem werden die Bakterien regelmäßig mit dem Kot ausgeschieden, so dass sich hier keine hohe Konzentration aufbauen kann. Bei der in dieser Arbeit angewandten DNA-Präparation wird die DNA selektiv von Kieselgel-Säulen gebunden. Nicht gebundene Bestandteile werden durch zwei Waschschritte weitgehend entfernt. Bei anderen Methoden der DNA-Präparation würde sich deswegen die Entfernung des Darminhaltes möglicherweise noch deutlicher bemerkbar machen, da sich z. B. bei einer einfachen Lysierung der Probe, bei der die DNA nicht selektiv gebunden wird, mehr DNA-fremde Bestandteile in der Proben-DNA befinden.

H. bilis wurde abgesehen vom Dickdarm auch aus der Leber isoliert [24]. Bei unseren Untersuchungen konnten wir in keiner Leberprobe der experimentell infizierten Mäuse *H. bilis* nachweisen, obwohl der Bereich der Leber, der als Probe entnommen wurde, die Gallenblase einschließt. Das könnte am C3H/HeJ Mausstamm, der in dieser Arbeit verwendet wurde, dem Alter der Mäuse oder dem Geschlecht, sowie dem Untersuchungszeitpunkt nach der Infektion liegen. So wurde *H. bilis* aus der Leber von 19 bis 27 Monate alten C57BL/6, DBA/2 und BALB/c Mäusen isoliert [24]. Durch *H. bilis* bedingte Leberveränderungen traten nach experimenteller Infektion bei männlichen *scid*-Mäusen frühestens nach drei Monaten, bei weiblichen Mäusen jedoch erst nach sechs Monaten auf [54]. Avenaud et al. zeigten, dass *H. hepaticus* in der Leber experimentell infizierter A/J Mäusen zu späteren Untersuchungszeitpunkten häufiger nachgewiesen werden konnte als zu einem früheren Zeitpunkt nach der Infektion [78].

In einer der Leberproben der zehn Mäuse aus der mit PBS schein-infizierten Kontrollgruppe wurde *H. hepaticus* nachgewiesen. Eine Erklärung für diesen Befund wäre die Übertragung der Infektion mit *H. hepaticus* von anderen Mäusen im Haltungsbereich auf die Mäuse der Kontrollgruppe dieses Versuches. Diese Möglichkeit ist eher unwahrscheinlich, da die Mäuse in IVC-Systemen gehalten wurden und jeweils vor allen anderen Mäusen in diesem Haltungsbereich unter Verwendung von sterilen Pinzetten in einer Klasse 2 Umsetzstation umgesetzt wurden. Diese Faktoren sollten laut Whary et al. eine Übertragung von *H. hepaticus* effizient verhindern [79].

Als zweite Möglichkeit wäre in Erwägung zu ziehen, dass die Mäuse schon vor Beginn des Versuchs mit *H. hepaticus* infiziert waren. Dagegen spricht die Tatsache, dass der *Helicobacter*-Status sämtlicher im Versuch eingesetzter Mäuse vor Beginn des Experiments mittels Kotuntersuchung überprüft worden war. Zusätzlich wurde stichprobenartig aus jedem Käfig eine Maus entnommen und deren Zäkum untersucht. Darüber hinaus wurde der *Helicobacter*-Status der C3H/HeJ-Kolonie, aus der die in dem Versuch verwendeten Mäuse stammten, ca. alle drei Monate durch Kotuntersuchungen überwacht und Zäkumproben aller Weibchen aus aufgelösten Zuchtpaaren mit Nachkommen wurden regelmäßig untersucht. In keiner der untersuchten Proben ergab sich ein Hinweis auf eine Infektion mit murinen *Helicobacter* spp. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Probe durch die bei der Probenentnahme verwendeten Bestecke mit *H. hepaticus* spezifischer DNA kontaminiert wurde, denn Scheren und Pinzetten wurden vor dem Einsatz in dem Versuch auch für die Probenentnahme in anderen Haltungsbereichen der GSF benutzt, in denen *H. hepaticus* nachgewiesen wurde. Die Bestecke wurden zwar nach jedem Gebrauch gereinigt und bei 180 °C für 20 min sterilisiert. Dennoch erscheint es möglich, dass vor allem kleine DNA-Bruchstücke über das Besteck übertragen wurden. Dieser eine positive Befund in der Leberprobe einer Kontrollmaus führte dazu, dass bei allen späteren Organentnahmen das Besteck nach der Reinigung und der Hitzesterilisation zusätzlich in eine DNA-Dekontaminationslösung (Gibco BRL) über Nacht eingelegt und danach erneut sterilisiert wurde. Nach Einführung dieser Maßnahme wurden in Organproben von Mäusen aus Kontrollgruppen keine murinen *Helicobacter* spp. mehr diagnostiziert.

Bei einer der elf experimentell infizierten Mäusen konnte *H. bilis* außer in Dickdarmproben auch in der Magenprobe nachgewiesen werden. Wie schon bei der positiven Probe in den Kontrollmäusen erläutert, könnte eine Kontamination der Magenprobe bei der Organentnahme durch das Besteck erfolgt sein. Die betreffende Magenprobe wurde 56 p. inf. entnommen. Bestecke, die bei dieser Entnahme verwendet wurden, wurden vor Gebrauch nicht nur gereinigt und sterilisiert, sondern auch mit einer DNA-Dekontaminationslösung (Gibco BRL) behandelt. Deswegen erscheint diese Ursache eher unwahrscheinlich. Die zweite Möglichkeit könnte durchaus eine Besiedelung der Magenschleimhaut durch *H. bilis* infolge der Inokulation darstellen. Die einzige murine *Helicobacter*-Spezies, die bisher im Magen

von Mäusen nachgewiesen werden konnte, ist *H. muridarum* [47]. Dass *H. bilis* prinzipiell fähig ist, die Magenschleimhaut zu besiedeln, beschrieb Eaton, der *H. bilis* aus dem Magen eines Hundes isolierte [57]. Eine Besiedelung des Magens scheint jedoch nur bei Änderungen des Magen-Milieus zu erfolgen [48]. Bei der orogastralen Inokulation der Mäuse mit einer Knopfkanüle könnte jedoch auch eine lokale Läsion gesetzt worden sein, der eine Besiedelung mit *H. bilis* folgte.

Zusammenfassend bedeuten diese Ergebnisse für die Optimierung der *Helicobacter*-Diagnostik, dass eine Infektion mit *H. bilis* in allen Abschnitten des Dickdarms nachgewiesen werden kann. Im Gegensatz dazu wurde *H.bilis*, bis auf eine Ausnahme, weder im Magen, noch im Dünndarm oder der Leber nachgewiesen, obwohl die Leberprobe die Gallenblase, einen durchaus üblichen Replikationsort von *H.bilis*, beinhaltete [24].

Das Zäkum scheint als Organprobe für den Nachweis von *H. bilis* die größte Aussagekraft zu besitzen. Es lieferte die mit der experimentellen Infektion am weitesten übereinstimmenden Ergebnisse unabhängig davon, ob die Probe mit oder ohne Inhalt untersucht wurde.

Auf Grund der Ergebnisse mit den Kontrollmäusen erscheint es unabdingbar, Bestecke für die Entnahme von Organproben nicht nur zu reinigen und zu sterilisieren, sondern sie auch durch eine entsprechende Behandlung mit einer Dekontaminationslösung von möglichen Kontaminationen mit *Helicobacter*-spezifischer DNA zu befreien.

Hygiene-Monitoring

Das Hygiene-Monitoring von Versuchstiereinheiten wird häufig mit Hilfe von Einstreu-Sentinels durchgeführt. Diese Mäuse werden über einen gewissen Zeitraum mit potentiell infektiösem Material, d. h. auf gebrauchter Einstreu (Einstreu-Sentinels) der zu überwachenden Kolonie gehalten, in Kontakt gebracht und nach einer gewissen Expositionszeit stellvertretend für die restliche Kolonie untersucht.

Einige murine Infektionserreger können mit dieser Methode verlässlich nachgewiesen werden [80-82]. Insbesondere bei der Überwachung von IVC-Haltungen sind Einstreu-Sentinels eine praktikable Methode, da jeder Käfig eines IVC-Systems eine eigene mikrobiologische Einheit darstellt. Auch für *H. hepaticus* ist die Überwachung mit Einstreu-Sentinels eine geeignete Methode [76]. Whary et al. zeigten jedoch, dass eine *H. bilis*-Infektion beim Hygiene-Monitoring durch Einstreu-

Sentinels wenig verlässlich erfasst wird. In dieser Studie wurde erst nach sechs Monaten und nur im Zäkum von einem von insgesamt sechs untersuchten Einstreu-Sentinels *H. bilis* nachgewiesen [77]. Da das Hygiene-Monitoring mit Einsteu-Sentinels bezüglich *H. bilis* nicht optimal funktioniert, stellt die Untersuchung von Stichproben eine wichtige Alternative dar. Bei Stichprobenuntersuchungen muss darauf geachtet werden, dass für den Nachweis geeignete Mäuse ausgewählt werden. Z. B. eignen sich für den Nachweis von Oxyuren Jungtiere besonders, da ihre Parasitenlast höher als bei alten Mäusen ist [2]. Auch bei wie vielen Mäusen die Infektion in der Kolonie vorkommt ist von Bedeutung. Dazu muss entsprechend der Bestandsgröße und der Inzidenz im Bestand eine ausreichende Zahl von Mäusen untersucht werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, eine alternative Methode zum Hygiene-Monitoring mit Einstreu-Sentinels zu entwickeln. Es sollten nicht nur die geeigneten Mäuse inklusive des geeigneten Probenmaterials für einen sensitiven und zuverlässigen Nachweis festgestellt werden, sondern der Verbrauch von Versuchstieren sollte auch entsprechend des 3R-Konzeptes (Reduce, Reduct, Refine) von Russel und Burch, welches u. a. eine Reduzierung von in Experimenten eingesetzten Versuchstieren vorsieht, auf ein Minimum beschränkt werden [83]. Außerdem sollte die Methode möglichst zeit- und kosteneffizient durchgeführt werden können.

Bei der Auswahl der Mäuse für die Stichprobenuntersuchung war der Einfluss des Alters von besonderem Interesse. Einerseits könnten Jungtiere auf Grund ihrer speziellen Situation im Magen-Darmkanal besonders geeignet für den Nachweis von *H. bilis* sein. Im Gegensatz zu älteren Mäusen hat sich bei der Geburt im Dickdarm noch keine konkurrierende Bakterienflora ausgebildet [15, 16]. Wenn Jungtiere durch den Kontakt zur Mutter und durch die Aufnahme des mütterlichen Kots eine Bakterienflora ausbilden, gleichzeitig aber die Mutter durch den Kot auch *H. bilis* überträgt, könnte man davon ausgehen, dass sich die *Helicobacter*-Infektion schneller und stärker ausprägt, als wenn *H. bilis* auf eine adulte Maus übertragen wird, die schon eine ausgebildete Darmflora besitzt, welche auf die Besiedlung mit *H. bilis* wahrscheinlich hemmende Auswirkungen hat. *H. bilis* müsste folglich in jungen Mäusen zu einem früheren Zeitpunkt nachweisbar sein als in älteren. In älteren Mäusen könnte der *Helicobacter*-Nachweis durch die Ausbildung einer effektiven Immunantwort und eine dadurch reduzierte Vermehrung der Keime zusätzlich

erschwert sein. Im Gegensatz dazu ist es auch möglich, dass der Nachweis in älteren Mäusen besser gelingt als in jungen, da *H. bilis* sich nur sehr langsam vermehrt und die Nachweisgrenze dadurch erst nach einer gewissen Zeitspanne p. inf. erreicht würde.

Abgesehen von der Wahl der entsprechenden Altersgruppe sollten zum Zweck der Überwachung einer Mauskolonie die Untersuchung von Sammelkot mit der direkten Untersuchung von Einzeltieren kombiniert und die Ergebnisse verglichen werden. Bei der Untersuchung von Sammelkot werden Kotpellets aus einem Käfig gesammelt und untersucht. Man erhält dadurch Informationen über den *Helicobacter*-Status aller Mäuse aus einem Käfig gleichzeitig. Bei der Einzeltieruntersuchung werden einzelne Mäuse nach dem Zufallsprinzip aus einem Käfig ausgewählt. Ob dieses Ergebnis Informationen über alle Mäuse im Käfig liefert und ob dieses Ergebnis sensitiver als das Ergebnis der Kotuntersuchung ist, war ebenfalls Gegenstand dieser Untersuchungen. Dazu wurden Weibchen experimentell mit *H. bilis* infiziert und mit *Helicobacter*-freien Männchen angepaart. Dass sich alle Nachkommen dieser Zuchtpaare von der Geburt bis zum Absetzen in Käfigen befanden, in denen *H. bilis* ausgeschieden wurde, wurde durch eine Kotuntersuchung zu diesen Zeitpunkten nachgewiesen. Nach der Geburt und vor dem Absetzen wurde im Sammelkot aus den Käfigen aller 14 Zuchtpaare mit Nachkommen *H. bilis* nachgewiesen.
Zäkumproben der Zuchtpaare wurden 70 und 98 Tage p. inf. untersucht. Bei dieser direkten Untersuchung wurde in allen Weibchen, jedoch nur in 92% (12/13) der Männchen *H. bilis* nachgewiesen.
28 Tage nach der Geburt lies sich im Sammelkot von 80% (24/30) der Käfige mit Nachkommen *H. bilis* nachwiesen, in Zäkumproben von einzelnen Mäusen jedoch nur in 66% (31/47). 56 Tage post partum wurde *H. bilis* in Sammelkot in 82% (18/22) der Käfige und in 77% (34/44) der Zäkumproben von einzelnen Mäusen nachgewiesen.
Bei diesen Untersuchungen wurde *H. bilis* in den Männchen der Zuchtpaare häufiger nachgewiesen als in ihren Nachkommen, obwohl diese Beobachtungen statistisch nicht signifikant waren ($p < 0,2$).
Bei den angepaarten Weibchen konnte von einer hohen Infektionsrate ausgegangen werden, da sie experimentell mit einer hohen Dosis infiziert worden waren. Die Beobachtung, dass im Zäkum der Männchen (92%) *H. bilis* häufiger als in den

Nachkommen (72%) nachgewiesen wurde, könnte damit zusammenhängen, dass die Mäuse unterschiedlich lange Zeit mit den experimentell infizierten Weibchen verbracht haben. Eine zweite mögliche Erklärung wäre, dass die Mäuse unterschiedlich lange Zeit hatten, um eine nachweisbare Infektion aufzubauen. Die Männchen wurden sieben bzw. elf Wochen nach dem ersten Kontakt mit den infizierten Weibchen untersucht und waren den kompletten Zeitraum mit dem jeweiligen Weibchen im gleichen Käfig. Die Nachkommen hingegen verbrachten aber nur drei Wochen mit dem jeweiligen experimentell infizierten Weibchen und wurden spätestens vier bzw. acht Wochen nach der frühesten möglichen Infektion untersucht. Allerdings hatten die Nachkommen nach dem Absetzen teilweise zu Wurfgeschwistern Kontakt, die bereits eine nachweisbare Infektion entwickelt hatten.

Den Einfluss des Kontaktes bzw. die Kontaktdauer zu nachweisbar infizierten Mäusen auf den Nachweis einer Infektion belegt auch eine Studie von Singletary et al. Darin wurde gezeigt, dass im Zäkum aller Nachkommen von mit *H. hepaticus* experimentell infizierten C57BL/6 Mäusen *H. hepaticus* nachgewiesen werden konnte, wenn man die Nachkommen mindestens 9 Tage bei der Mutter ließ und dann die restliche Aufzucht einer *Helicobacter*-freien Amme überließ. Beließ man die Nachkommen nur 2 Tage bei der Mutter, gelang der Nachweis nur in 60% der Nachkommen. Die Nachkommen wurden 42 Tage p. p. untersucht [17].
Dass das Alter der Mäuse bzw. die Untersuchungszeitpunkt nach einer Infektion eine Rolle beim Nachweis zu spielen scheint, zeigen die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen. 28 Tage p. p. konnte *H. bilis* im Zäkum nicht aller Nachkommen nachgewiesen werden, selbst wenn in Zäkumproben von Mäusen aus demselben Käfig *H. bilis* nachgewiesen worden war. Wenn dagegen 56 Tage p. p. in einer Maus aus einem Käfig *H. bilis* nachgewiesen werden konnte, konnte auch in den Zäkumproben der anderen Mäuse aus dem Käfig *H. bilis* nachgewiesen werden. Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass für die Stichprobenuntersuchung insbesondere für die Einzeltieruntersuchung mindestens 56 Tage alte Mäuse ausgewählt werden sollten.

Eine weitere wichtige Erkenntnis aus diesem Infektionsversuch ist die größere Sensitivität der Kotuntersuchung gegenüber der Einzeltieruntersuchung. Der Nachweis durch eine Untersuchung von Sammelkot ist bereits möglich, wenn noch

nicht alle Mäuse im Käfig infiziert sind. Dadurch kann eine Infektion mit der Kotuntersuchung schon zu einem früheren Zeitpunkt als mit der Einzeltieruntersuchung nachgewiesen werden.

Dafür sprechen auch folgende Ergebnisse aus einem anderen Versuch: In den Käfigen mit *H. bilis* experimentell infizierten, männlichen C3H/HeJ Mäusen konnte schon eine Woche p. inf. und über den gesamten Untersuchungszeitraum von acht Wochen wöchentlich mit der Kotuntersuchung die Infektion nachgewiesen werden, obwohl 28 Tage p. inf. einzelne Mäuse noch negativ waren. Die Gründe für eine höhere Sensitivität der Untersuchung von Sammelkot gerade in einer frühen Phase einer Infektion könnten darin liegen, dass eine größere Probenmenge als bei der DNA-Präparation aus Zäkumproben eingesetzt und dadurch relativ mehr *Helicobacter*-DNA isoliert wird. Dass bei der DNA-Präparation aus Kot mehr Probenmaterial als bei der DNA-Präparation aus Zäkumproben eingesetzt wird, liegt in der Durchführung der DNA-Präparation mit Hilfe der Kits entsprechend den Angaben des Herstellers begründet. Für die höhere Sensitivität der Kotuntersuchung im Gegensatz zur Untersuchung von Zäkumproben sprechen auch Ergebnisse aus der Untersuchung der 56 Tage alten Nachkommen von zwei Käfigen. In beiden Käfigen konnte mit der Kotuntersuchung *H. bilis* nachgewiesen werden, aber im Zäkum keiner der drei aus diesen Käfigen untersuchten Mäuse. Außerdem wird bei der Kotuntersuchung im Vergleich zur Einzeltieruntersuchung mit großer Wahrscheinlichkeit Kot und damit Probenmaterial aller Mäuse aus einem Käfig eingesetzt. Man erhält folglich eine Information darüber, ob mindestens eine Maus im Käfig *H. bilis* ausscheidet. Eine Aussage darüber, um welche Maus es sich dabei handelt, kann dadurch jedoch nicht gemacht werden. Ein Vorteil der Kotuntersuchung ist aber nicht nur, dass sie umfassendere Ergebnisse liefert, sondern auch dass bei dieser Methode keine Versuchstiere verbraucht werden.

Diese Ergebnisse bedeuten für die Optimierung der *Helicobacter*-Diagnostik, dass für den Nachweis von *H. bilis* in Mauskolonien primär ältere Mäuse untersucht werden sollten. Außerdem steht der *Helicobacter*-Diagnostik mit der Kotuntersuchung eine Methode zur Verfügung, die einen frühen Nachweis ermöglicht, die eine zuverlässige Aussage über mehrere Mäuse liefert und die keine Tiere verbraucht.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Infektionsversuchen wurden die Mäuse ausschließlich in IVC-Systemen gehalten. Bei dieser Haltungsform stellt jeder Käfig eine eigene mikrobiologische Einheit dar. Dadurch werden bei korrekter Handhabung

Kreuzkontaminationen verhindert. Diese Haltungsform könnte allerdings auch einen Einfluss auf den Nachweis von murinen *Helicobacter*-Infektionen bei Einzeltieren haben, weil sich eine Infektion innerhalb eines Käfigs möglicherweise schlechter von Maus zu Maus überträgt. Der 120fache Luftwechsel in den Käfigen pro Stunde, der bei unseren Infektionsversuchen in dem IVC-System herrschte, könnte sich auf die Tenazität von *H. bilis* negativ ausgewirkt haben. Durch die hohe Luftwechselrate sinkt die Luftfeuchtigkeit und dadurch trocknen Mikroorganismen schneller aus. Generell wissen wir nicht, ob mit dem Kot ausgeschiedene *H. bilis* noch infektiös sind, denn mit der PCR wird lediglich die spezifische DNA nachgewiesen. Ob sich die Ergebnisse auf andere Haltungsformen übertragen lassen, müsste in einer vergleichenden Studie überprüft werden.

In allen Infektionsversuchen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurde *H. bilis* verwendet. Inwiefern sich diese Ergebnisse auf andere murinen *Helicobacter* spp. übertragen lassen, kann nicht generell gesagt werden und bedarf weiterer Untersuchungen. Möglich wäre weiterhin, dass der Genotyp der Mäuse bzw. der Mausstamm Einfluss auf die Nachweisbarkeit von *Helicobacter*-Infektionen hat. So wurde von Whary et al. gezeigt, dass C57BL/6 Mäuse zwar keine Hepatitiden bei einer Infektion mit *H. hepaticus* entwickeln, stattdessen aber einen höheren Besiedelungsgrad im Dickdarm aufwiesen [18]. Für diese Arbeit standen nur *Helicobacter*-freie C3H/HeJ Mäuse zur Verfügung. Welcher Mausstamm für den *Helicobacter*-Nachweis mit Einstreu-Sentinels am besten geeignet ist, müsste ebenfalls in einer entsprechenden weiterführenden Studie untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Infektionen von Versuchsmäusen mit murinen *Helicobacter* spp. verlaufen in der Regel klinisch inapparent, sie können jedoch in verschiedenen Mausstämmen chronische Entzündungen im Magen-Darm-Trakt oder der Leber hervorrufen und dadurch Versuchsergebnisse entscheidend beeinflussen. Deswegen müssen *Helicobacter*-Infektionen in Versuchstieren zuverlässig nachgewiesen werden können, um infizierte Tiere auszuschließen.

Ziel dieser Arbeit war es, den Nachweis muriner *Helicobacter*-Infektionen zu optimieren. Zu diesem Zweck wurde eine nested PCR etabliert. Diese war im Vergleich zur single-step PCR, der in kommerziellen Untersuchungslabors üblicherweise angewandten Methode, um den Faktor 10 sensitiver. Das PCR-Produkt des ersten PCR-Schrittes war im Gegensatz zur Proben-DNA über 3 Wochen bei 4°C stabil lagerbar. Es stand somit jederzeit für Wiederholungsuntersuchungen ohne Qualitätsverlust zur Verfügung.

Experimentelle Infektionen *Helicobacter*-freier Mäuse mit *H. bilis* zeigten, dass Zäkum und Kot als Untersuchungsmaterial die höchste Aussagekraft besitzen. Ein Nachweis von *H. bilis* war im Kot bereits eine Woche nach einer Infektion möglich. Rektum und Kolon waren als Untersuchungsmaterial ebenfalls geeignet, die Entfernung des Darminhaltes vor der Untersuchung verbesserte die Sensitivität und die Spezifität des Nachweises in diesen Organen. In der Leber experimentell infizierter Mäuse war *H. bilis* zu keinem Zeitpunkt nachweisbar.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass für das Hygiene-Monitoring von Mauskolonien die Untersuchung von Sammelkot aus Mauskäfigen die Methode der Wahl darstellt. Der Nachweis von *H. bilis* im Kot war bereits in einer frühen Phase der Infektion möglich und als nicht-invasive Maßnahme trägt diese Methode dem Tierschutz Rechnung. Diese Methode war aussagekräftiger als die Untersuchung von Proben des Magen-Darmtraktes einzelner Mäuse, weil dadurch repräsentative Aussagen über alle Mäuse aus dem gleichen Käfig möglich waren. Für Untersuchungen auf *H. bilis* sollten bevorzugt ältere Tiere bzw. Zuchtpaare verwendet werden, um gleichzeitig auch Aussagen über den *Helicobacter*-Status der Nachkommen machen zu können. Die Übertragung der Ergebnisse auf andere murine *Helicobacter*-Spezies und der Einfluss von Genotyp und Haltungsbedingungen auf den Nachweis bleiben zu klären.

7 Summary

Optimisation of the detection of murine *Helicobacter* infections in animal facilities

Helicobacter infections of laboratory mice are often clinically inapparent. However, they may cause chronic inflammation in susceptible mouse strains and thus may lead to misinterpretation of data. In order to exclude infected mice from in vivo studies, it is important to provide means to unequivocally identify infections with murine *Helicobacter* spp. The purpose of this thesis was to optimise the diagnostic method for *Helicobacter* infections. It was shown that a nested PCR was ten times more sensitive than the single-step PCR which is the common PCR method of commercial laboratories. In contrast to the stored DNA, the PCR product of the first step of the nested PCR was stable for over three weeks when stored at 4°C. It is possible to use this stored PCR Product to reproduce results any time.

With experimentally-induced infection of *Helicobacter*-free mice, we demonstrated, that caecum and faeces should be preferred for detection of *H. bilis*. In this material *H. bilis* was detected one week after infection. Colon and rectum are also suitable for the detection of *H. bilis.* Analysis of these samples showed that removal of contents increased sensitivity. *H. bilis* was not detected in the liver of infected mice at any point in time.

Furthermore, the results indicate that faecal samples should be analysed when mouse colonies are monitored. Detection of *H. bilis* is possible at an early stage of infection and analysis of faeces instead of tissues contributes to animal welfare. Moreover analysis of faecal samples is more meaningful because it generates representative data for all animals in one cage. Older mice or old breeding pairs should be used for *Helicobacter* diagnostic because they also provide information about the infection status of their offspring.

It is not clear to which extent the results can be extrapolated to other murine *Helicobacter* spp. Furthermore, the influence of genotype and housing conditions on the diagnosis of *Helicobacter* infections should be investigated in more detail.

8 Literaturverzeichnis

1. Rehbinder, C., et al., FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, gerbil, guinea pig and rabbit experimental units. Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group on Animal Health accepted by the FELASA Board of Management, November 1995. *Lab Anim*, 1996. 30(3): p. 193-208.
2. Nicklas, W., et al., Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim*, 2002. 36(1): p. 20-42.
3. Implications of infectious agents on results of animal experiments. Report of the Working Group on Hygiene of the Gesellschaft fur Versuchstierkunde--Society for Laboratory Animal Science (GV-SOLAS). *Lab Anim*, 1999. 33 Suppl 1: p. S39-87.
4. Cahill, R.J., et al., Inflammatory bowel disease: an immunity-mediated condition triggered by bacterial infection with *Helicobacter hepaticus*. *Infect Immun*, 1997. 65(8): p. 3126-31.
5. Fox, J.G., et al., A novel urease-negative *Helicobacter* species associated with colitis and typhlitis in IL-10-deficient mice. *Infect Immun*, 1999. 67(4): p. 1757-62.
6. Burich, A., et al., *Helicobacter*-induced inflammatory bowel disease in IL-10- and T cell-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001. 281(3): p. G764-78.
7. Jiang, H.Q., et al., Monoassociation of SCID mice with *Helicobacter muridarum*, but not four other enterics, provokes IBD upon receipt of T cells. *Gastroenterology*, 2002. 122(5): p. 1346-54.
8. Lee, A. and F. Buck, Vaccination and mucosal responses to *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther*, 1996. 10 Suppl 1: p. 129-38.
9. Lee, A., Prevention of *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 1996. 215: p. 11-5.
10. Blanchard, T.G., S.J. Czinn, and J.G. Nedrud, Host response and vaccine development to *Helicobacter pylori* infection. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1999. 241: p. 181-213.

11. Blanchard, T.G., et al., Severe inflammation and reduced bacteria load in murine *helicobacter* infection caused by lack of phagocyte oxidase activity. *J Infect Dis*, 2003. *187*(10): p. 1609-15.
12. Fox, J.G., et al., Chronic proliferative hepatitis in A/JCr mice associated with persistent Helicobacter hepaticus infection: a model of *helicobacter*- induced carcinogenesis. *Infect Immun*, 1996. 64(5): p. 1548-58.
13. Ward, J.M., et al., Chronic active hepatitis and associated liver tumors in mice caused by a persistent bacterial infection with a novel *Helicobacter* species. *J Natl Cancer Inst*, 1994. 86(16): p. 1222-7.
14. Dew, J.A., L.G. Clifton, B.L. Sander, and R.P. Reynolds, Comparison of results of *Helicobacter* tests performed by commercial laboratories. *Contemp. Topics Lab. Anim. Sci.*, 1997. 36: p. 60.
15. Good, R.A. and B.W. Papermaster, Ontogeny and Phylogeny of Adaptive *Immunity. Adv Immunol*, 1964. 27: p. 1-115.
16. Rotimi, V.O. and B.I. Duerden, The development of the bacterial flora in normal neonates. *J Med Microbiol*, 1981. 14(1): p. 51-62.
17. Singletary, K.B., C.A. Kloster, and D.G. Baker, Optimal age at fostering for derivation of *Helicobacter hepaticus*-free mice. *Comp Med*, 2003. 53(3): p. 259-64.
18. Whary, M.T., et al., Long-term colonization levels of *Helicobacter hepaticus* in the cecum of hepatitis-prone A/JCr mice are significantly lower than those in hepatitis-resistant C57BL/6 mice. *Comp Med*, 2001. 51(5): p. 413-7.
19. Ward, J.M., et al., Chronic active hepatitis in mice caused by *Helicobacter hepaticus*. *Am J Pathol*, 1994. 145(4): p. 959-68.
20. Monteiro, L., et al., Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. J Clin Microbiol, 1997. 35(4): p. 995-8.
21. Riley, L.K., et al., Identification of murine *helicobacters* by PCR and restriction enzyme analyses. *J Clin Microbiol*, 1996. 34(4): p. 942-6.
22. Beckwith, C.S., et al., Fecal PCR assay for diagnosis of *Helicobacter* infection in laboratory rodents. *J Clin Microbiol*, 1997. 35(6): p. 1620-3.
23. Shames, B., et al., Identification of widespread *Helicobacter hepaticus* infection in feces in commercial mouse colonies by culture and PCR assay. *J Clin Microbiol*, 1995. 33(11): p. 2968-72.

24. Fox, J.G., et al., *Helicobacter bilis* sp. nov., a novel *Helicobacter* species isolated from bile, livers, and intestines of aged, inbred mice. *J Clin Microbiol*, 1995. 33(2): p. 445-54.
25. Shen, Z., et al., *Helicobacter rodentium* sp. nov., a urease-negative *Helicobacter* species isolated from laboratory mice. *Int J Syst Bacteriol*, 1997. 47(3): p. 627-34.
26. Franklin, C.L., et al., Enteric lesions in SCID mice infected with "*Helicobacter typhlonicus*," a novel urease-negative *Helicobacter* species. *Lab Anim Sci*, 1999. 49(5): p. 496-505.
27. Stanley, J., et al., *Helicobacter canis* sp. nov., a new species from dogs: an integrated study of phenotype and genotype. *J Gen Microbiol*, 1993. 139 (Pt 10): p. 2495-504.
28. Harper, C.G., et al., *Helicobacter cetorum* sp. nov., a urease-positive *Helicobacter* species isolated from dolphins and whales. *J Clin Microbiol*, 2002. 40(12): p. 4536-43.
29. Lee, A., et al., Isolation of a spiral-shaped bacterium from the cat stomach. *Infect Immun*, 1988. 56(11): p. 2843-50.
30. Chone, L., et al., [*Helicobacter heilmannii*: new spiral shaped bacterium that may be responsible for ulcerated gastritis]. *Gastroenterol Clin Biol*, 1995. 19(4): p. 447-8.
31. Donovan, J.C., et al., *Helicobacter*-associated hepatitis of mice. *Lab Anim Sci*, 1993. 43(5): p. 403.
32. Fox, J.G., et al., *Helicobacter hepaticus* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice. *J Clin Microbiol*, 1994. 32(5): p. 1238-45.
33. Simmons, J.H., et al., *Helicobacter mesocricetorum* sp. nov., A novel Helicobacter isolated from the feces of Syrian hamsters. *J Clin Microbiol*, 2000. 38(5): p. 1811-7.
34. Lee, A., et al., *Helicobacter muridarum* sp. nov., a microaerophilic helical bacterium with a novel ultrastructure isolated from the intestinal mucosa of rodents. *Int J Syst Bacteriol*, 1992. 42(1): p. 27-36.
35. Fox, J.G., et al., Gastric colonization by *Campylobacter pylori* subsp. mustelae in ferrets. *Infect Immun*, 1988. 56**(**11): p. 2994-6.

36. Fox JG, C.T., Goodwin CS, Taylor NS, Edmonds P, Sly LI, Brenner DJ, *Campylobacter mustelae*, a new species resulting from the elevation of *Campylobacter pylori* subsp. mustelae to species status. *Int J Syst Bacteriol*, 1989. 39: p. 301-3.
37. Stanley, J., et al., *Helicobacter pullorum* sp. nov.-genotype and phenotype of a new species isolated from poultry and from human patients with gastroenteritis. *Microbiology*, 1994. 140 (Pt 12): p. 3441-9.
38. Marshall, B.J. and J.R. Warren, Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 1984. 1(8390): p. 1311-5.
39. Mendes, E.N., et al., *Helicobacter trogontum* sp. nov., isolated from the rat intestine. *Int J Syst Bacteriol*, 1996. 46(4): p. 916-21.
40. Franklin, C.L., et al., *Helicobacter typhlonius* sp. nov., a Novel Murine Urease-Negative *Helicobacter* Species. *J Clin Microbiol*, 2001. 39(11): p. 3920-6.
41. Schauer, D.B., N. Ghori, and S. Falkow, Isolation and characterization of "*Flexispira rappini*" from laboratory mice. *J Clin Microbiol*, 1993. 31(10): p. 2709-14.
42. Fox, J.G., et al., Persistent hepatitis and enterocolitis in germfree mice infected with *Helicobacter hepaticus*. *Infect Immun*, 1996. 64(9): p. 3673-81.
43. Ward, J.M., et al., Inflammatory large bowel disease in immunodeficient mice naturally infected with *Helicobacter hepaticus*. *Lab Anim Sci*, 1996. 46(1): p. 15-20.
44. Foltz, C.J., et al., Evaluation of antibiotic therapies for eradication of *Helicobacter hepaticus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995. 39(6): p. 1292-4.
45. Foltz, C.J., et al., Evaluation of various oral antimicrobial formulations for eradication of *Helicobacter hepaticus*. *Lab Anim Sci*, 1996. 46(2): p. 193-7.
46. Phillips, M.W. and A. Lee, Isolation and characterization of a spiral bacterium from the crypts of rodent gastrointestinal tracts. *Appl Environ Microbiol*, 1983. 45(2): p. 675-83.
47. Queiroz, D.M., et al., Spiral bacterium associated with gastric, ileal and caecal mucosa of mice. *Lab Anim*, 1992. 26(4): p. 288-94.
48. Fox, J.G., The expanding genus of *Helicobacter*: pathogenic and zoonotic potential. *Semin Gastrointest Dis*, 1997. 8(3): p. 124-41.

49. Lee, A., et al., Long term infection of the gastric mucosa with *Helicobacter* species does induce atrophic gastritis in an animal model of *Helicobacter* pylori infection. *Zentralbl Bakteriol*, 1993. 280(1-2): p. 38-50.
50. von Freeden-Jeffry, U., et al., IL-7 deficiency prevents development of a non-T cell non-B cell-mediated colitis. *J Immunol*, 1998. 161(10): p. 5673-80.
51. Kullberg, M.C., et al., *Helicobacter hepaticus* triggers colitis in specific-pathogen-free interleukin-10 (IL-10)-deficient mice through an IL-12- and gamma interferon-dependent mechanism. *Infect Immun*, 1998. 66(11): p. 5157-66.
52. Shomer, N.H., et al., *Helicobacter bilis*/*Helicobacter rodentium* co-infection associated with diarrhea in a colony of scid mice. *Lab Anim Sci*, 1998. 48(5): p. 455-9.
53. Dewhirst, F.E., et al., '*Flexispira rappini*' strains represent at least 10 Helicobacter taxa. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000. 50 Pt 5: p. 1781-7.
54. Franklin, C.L., et al., Enterohepatic lesions in SCID mice infected with *Helicobacter bilis*. *Lab Anim Sci*, 1998. 48(4): p. 334-9.
55. Maggio-Price, L., et al., *Helicobacter bilis* infection accelerates and *H. hepaticus* infection delays the development of colitis in multiple drug resistance-deficient (mdr1a-/-) mice. *Am J Pathol*, 2002. 160(2): p. 739-51.
56. Haines, D.C., et al., Inflammatory large bowel disease in immunodeficient rats naturally and experimentally infected with *Helicobacter bilis*. *Vet Pathol*, 1998. 35(3): p. 202-8.
57. Eaton, K.A., et al., Prevalence and varieties of *Helicobacter* species in dogs from random sources and pet dogs: animal and public health implications. *J Clin Microbiol*, 1996. 34(12): p. 3165-70.
58. Shen, Z., et al., Coinfection of enteric *Helicobacter spp*. and *Campylobacter spp*. in cats. *J Clin Microbiol*, 2001. 39(6): p. 2166-72.
59. Fox, J.G., et al., Hepatic *Helicobacter* species identified in bile and gallbladder tissue from Chileans with chronic cholecystitis. *Gastroenterology*, 1998. 114(4): p. 755-63.
60. Matsukura, N., et al., Association between *Helicobacter bilis* in Bile and Biliary Tract Malignancies: H. bilis in Bile from Japanese and Thai Patients with Benign and Malignant Diseases in the Biliary Tract. *Jpn J Cancer Res*, 2002. 93(7): p. 842-7.

61. Russell, R.J., et al., Use of antibiotics to prevent hepatitis and typhlitis in male scid mice spontaneously infected with *Helicobacter hepaticus*. *Lab Anim Sci*, 1995. 45(4): p. 373-8.
62. Garvey, W., A. Fathi, F. Bigelow, Modified Steiner for the demonstration of spirochetes. *J Histotechnol*, 1985. 8: p. 15-17.
63. Patel, J.R., A variation of the modified Steiner. *Histologic*, 1993. 23: p. 39-40.
64. Livingston, R.S., et al., Serodiagnosis of *Helicobacter hepaticus* infection in mice by an enzyme- linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*, 1997. 35(5): p. 1236-8.
65. Livingston, R.S., et al., Cloning and expression of an immunogenic membrane-associated protein of *Helicobacter hepaticus* for use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1999. 6(5): p. 745-50.
66. Hodzic, E., et al., Evaluation of diagnostic methods for *Helicobacter bilis* infection in laboratory mice. *Comp Med*, 2001. 51(5): p. 406-12.
67. Mähler, M., et al., Comparison of four diagnostic methods for detection of *Helicobacter* species in laboratory mice. *Lab Anim Sci*, 1998. 48(1): p. 85-91.
68. Lane, D.J., et al., Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. 82(20): p. 6955-9.
69. Edwards, U., et al., Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res*, 1989. 17(19): p. 7843-53.
70. Weisburg, W.G., et al., 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*, 1991. 173(2): p. 697-703.
71. Dewhirst, F.E., J.G. Fox, and S.L. On, Recommended minimal standards for describing new species of the genus *Helicobacter*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000. 50 Pt 6: p. 2231-7.
72. Ge, Z., et al., Fluorogenic PCR-Based Quantitative Detection of a Murine Pathogen, *Helicobacter hepaticus. J Clin Microbiol*, 2001. 39(7): p. 2598-602.
73. Drazenovich, N.L., et al., Detection of rodent *Helicobacter* spp. by use of fluorogenic nuclease polymerase chain reaction assays. *Comp Med*, 2002. 52(4): p. 347-53.
74. Karkas, J., A. McCullen, A. Smith, and A. R. Banknieder, *Helicobacter* and PCR testing: what do the results really mean? *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.*, 2000. 30: p. 94-95.

75. Suerbaum, S., et al., The complete genome sequence of the carcinogenic bacterium *Helicobacter hepaticus*. *Proc Natl Acad Sci U S A, 2003.* 100(13): p. 7901-6.
76. Livingston, R.S., et al., Transmission of *Helicobacter hepaticus* infection to sentinel mice by contaminated bedding. *Lab Anim Sci*, 1998. 48(3): p. 291-3.
77. Whary, M.T., et al., Monitoring sentinel mice for *Helicobacter hepaticus*, *H rodentium*, and *H bilis* infection by use of polymerase chain reaction analysis and serologic testing. *Comp Med*, 2000. 50(4): p. 436-43.
78. Avenaud, P., et al., Natural history of *Helicobacter hepaticus* infection in conventional A/J mice, with special reference to liver involvement. *Infect Immun*, 2003. 71(6): p. 3667-72.
79. Whary, M.T., Containment of *Helicobacter hepaticus* by use of husbandry practices. *Comp Med*, 2000. 50(6): p. 584.
80. Thigpen, J.E., et al., The use of dirty bedding for detection of murine pathogens in sentinel mice. *Lab Anim Sci*, 1989. 39(4): p. 324-7.
81. Dillehay, D.L., N.D. Lehner, and M.J. Huerkamp, The effectiveness of a microisolator cage system and sentinel mice for controlling and detecting MHV and Sendai virus infections. *Lab Anim Sci*, 1990. 40(4): p. 367-70.
82. Homberger, F.R. and P.E. Thomann, Transmission of murine viruses and mycoplasma in laboratory mouse colonies with respect to housing conditions. *Lab Anim*, 1994. 28(2): p. 113-20.
83. Russell, W.M.S.a.B., R.L., The Principles of Humane Experimental Technique. *Methuen*, London, 1959.

9 Anhang

Liste der verwendeten Abkürzungen

ATCC	American Type Culture Collection
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxynukleic acid)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
H. bilis	*Helicobacter bilis*
H. hepaticus	*Helicobacter hepaticus*
H. muridarum	*Helicobacter muridarum*
H. pylori	*Helicobacter pylori*
H. rodentium	*Helicobacter rodentium*
H. typhlonius	*Helicobacter typhlonius*
IBD	inflammatory bowel disease
IVC	individual ventilated cage system
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Saline (phosphate-buffered saline)
p. inf.	nach der Infektion (post infectionem)
p. p.	nach der Geburt (post partum)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure (ribosomal ribonucleic acid)
scid	severe combined immunodeficiency
SPF	spezifisch pathogenfrei
spp.	Spezies
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheiten (Units)

Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Schmidt dafür danken, dass er mir ermöglicht hat, in der Abteilung für Vergleichende Medizin der GSF meine Dissertationsarbeit anzufertigen. Viele Schwierigkeiten konnten mit seiner Hilfe gelöst werden, dadurch bekam dieses Projekt zu wichtigen Zeitpunkten entscheidende Impulse.

Herrn Prof. Dr. Schmahl möchte ich für die Betreuung dieser Arbeit am Institut für Tierpathologie der Veterinärmedizinischen Fakultät danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Patricia Wilhelm. Sie hat dieses Projekt betreut. Sie hat mich in die selbstständige wissenschaftliche Arbeit eingeführt, indem sie mich mit unvergleichlichem Engagement gefordert und unterstützt hat. Unsere Zusammenarbeit wird mir unvergesslich bleiben.

Dank möchte ich auch allen anderen Mitarbeitern der Abteilung für Vergleichende Medizin aussprechen. Insbesondere sind Herr Dr. Markus Brielmeier, Frau Dr. Esther Mahabir, Frau Stefanie Kern und Frau Cornelia Fieder herauszustellen.

Ich möchte mich bei Frau Dr. Karin Seidel bedanken. Sie hat nicht unerheblich zu diesem Projekt beigetragen, indem sie mir die Primer für die Amplifikation der universellen Sequenz des bakteriellen 16S rRNA-Gens zur Verfügung stellte und darüber hinaus die beiden *Helicobacter*-Spezies vermittelte.

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mir so großen Rückhalt gegeben haben, und meinem Bruder Carsten dafür, dass er mir, wann immer ich ihn brauchte, mit Rat zur Seite gestanden hat.

Lebenslauf

Name:	Karen Jacobsen
Geburtsdatum:	16.9.1975
Geburtsort:	Kiel
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Eltern:	Hedwig Jacobsen, geb. Reichel
	Hans-Peter Jacobsen

Schulausbildung:

1986 bis 1995:	Domschule Schleswig
1982 bis 1986:	Grundschule Graßlfing

Berufsausbildung:

1995 bis 2001:	Studium der Veterinärmedizin an der Universität Leipzig
Februar 2001:	Approbation als Tierärztin
seit Mai 2001:	Dissertation in der Abteilung für Vergleichende Medizin des GSF- Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit, München