

Molekularmethoden als Nachweis, Spezifizierung und Subtypisierung von *Campylobacter* spp.

Dr. Trudy M. Wassenaar (Mainz)

Einleitung

Campylobacter jejuni ist weltweit eine der häufigsten Ursachen der menschlichen Enteritis. In einigen europäischen Ländern hat es *Salmonellen* als die Hauptverursacher von bakterieller Enteritis ersetzt (Notermans, 1994). Der größte epidemiologische Risikofaktor für *Campylobacteriose*, soweit identifiziert, ist der Verzehr von Geflügelprodukten. Daher betrifft dieses Problem direkt die Geflügelindustrie. Die Forderung nach einer schnellen und einfachen Erkennung von *Campylobacter* in Hühner- und Geflügelprodukten wächst ständig. Kürzlich wurden Molekularmethoden entwickelt, die potentiell die klassischen bakteriologischen Methoden ersetzen können. Die meisten molekularen Methoden, die auf "polymerase chain reaction" (PCR) basieren, sind schnell, einfach und verlässlich. Jedoch ist es notwendig, die Empfindlichkeit und Spezifität der entwickelten Methoden zur Erkennung und Spezifizierung zu bewerten. Die zur Zeit erfolgreichsten verfügbaren Methoden sind hier zusammengefasst.

Man hat seit langem erkannt, dass *Campylobacter* extrem variabel im Phänotyp und auch, wie kürzlich bekannt wurde, im Genotyp sind. Eine Anzahl von Genotypisierungstechniken ist zur genetischen Subtypisierung der *Campylobacter* entwickelt worden. Dieser Beitrag konzentriert sich auf die meist verbreitetsten- oder vielversprechendsten dieser Techniken. Eine Auswahl der verfügbaren Literatur ist hier angegeben. Zur Klassifikation von Molekular-Subtypisierungsmethoden und im Hinblick auf allgemeine Hintergrundinformation wird der Leser auf Vaneechoutte (1996) verwiesen.

Nachweis und Spezifizierung von thermophilen *Campylobacter* Spezies durch Molekulartechniken

Der Nachweis von Mikroorganismen durch PCR wurde schon vor langer Zeit als die moderne Alternative zur bakteriologischen Kultur vorausgesagt. Es hat über 15 Jahre gedauert, geeignete Kulturmethoden für *Campylobacter* zu identifizieren (und diese sind wahrscheinlich immer noch nicht optimal). So wird es einige Zeit dauern, bis die beste PCR-Nachweismethode gefunden wird.

In Kürze: PCR ist die Amplifikation (Multiplikation der DNA Menge) eines spezifischen DNA-Fragments, welche Gebrauch von spezifischen Oligonukleotiden und einer DNA Polymerase macht, die extrem thermostabil ist (normalerweise Taq Polymerase). Diese Methode ist sehr wirkungsvoll und kann sehr sensitiv sein. Jedoch müssen, abhängig von der Art der Probe, verschiedene Probleme gelöst werden. Bei der Nahrungsmittelproduktion wird aufgrund einer niedrigen Anzahl von Organismen eine Voranreicherung benötigt, und die Präsenz von wirksamen PCR Hemmern benötigt robuste PCR-Protokolle (Thunberg et al., 2000).

Reinigungsverfahren zur Entfernung von PCR-Hemmern sind effektiv, verursachen jedoch zusätzliche Arbeit (Wang et al., 1999). Die Anzahl der *Campylobacterien* in Fäkalien kann variieren und das Vorhandensein einer großen Anzahl anderer Mikroorganismen erfordert eine hohe Spezifität. Um lebensfähige Organismen und keine toten Bakterien nachzuweisen und um höhere Sensitivität zu erreichen, wird gegebenenfalls eine Voranreicherung benötigt, welche den Vorteil

von PCR als eine schnelle Einschrittmethode stark reduziert. Die Frage, ob es wünschenswert ist lebensfähige aber keine kultivierbaren Formen nachzuweisen, wird noch debattiert. Zur Zeit ist die Tendenz dahingehend, diese beschädigten Organismen zu ignorieren, da Simulationsexperimente im Labor nahelegen, dass das Kolonisierungspotential vor (und nicht nach) der Kultivierbarkeit verloren geht (Fearnley et al., 1996). Die Debatte ist jedoch noch nicht abgeschlossen (Cappelletti et al., 1999).

Einige der *Campylobacter* spp. entwickelten PCR Nachweisverfahren sind fähig, einzelne Spezies zu unterscheiden. Andere Methoden weisen *C. jejuni* und *C. coli* nach, ohne diese unterscheiden zu können, und in einigen weiteren Methoden ist *C. lari* ebenfalls eingeschlossen. Die meisten Methoden basieren auf der Amplifikation von (Fragmenten von) Flagellin- oder ribosomalen Genen. In einigen der beschriebenen Methoden wurde das Zielgen für die Spezies-spezifische Amplifikation mittels Hybridisierungsexperimenten ausgewählt und nicht weiter charakterisiert. Eine Auswahl der derzeitigen vorhandenen Molekularnachweismethoden ist in Tabelle 1 zusammengefasst.

Die beschriebenen Methoden variieren in ihrer Komplexität von einer einzelnen PCR direkt am Probenmaterial bis zur Anreicherung und/oder Filtration, Amplifikation und Gelelektrophorese, gefolgt von Southern blotting (oder spot blots) und Hybridisierung. Eine vergleichende Studie, die alle oder wenigstens einige dieser Methoden einschließt, ist nach meinem Wissen zurzeit nicht verfügbar. Obwohl einige der Methoden sehr ähnlich sind (viele benutzen Flagellin Gene als Zielgene, es werden jedoch unterschiedliche Primer benutzt), sind mir keine Initiativen zur Standardisierung der molekularen Nachweismethoden bekannt. Momentan kann nicht festgelegt werden, welche der beschriebenen Methoden besser ist. Bei einer Vergleichsstudie war die Artenbestimmung mittels PCR mindestens so sensitiv wie klassisch biochemische Techniken (Steinbrückner et al., 1999).

Spezifizierung innerhalb der thermophilen *Campylobacterien* ist auch durch andere molekulare Methoden als PCR möglich, obwohl keine von diesen bisher in zahlreichen Labors eingesetzt wurde. In einer der Veröffentlichungen wurden Southern blots mit einer nicht identifizierten Sonde hybridisiert, die spezifischen Banden für *C. jejuni* und *C. coli* erzeugt (Korolik et al., 1995). Jedoch ist eine Spezies-spezifische PCR einfacher, um diese Stämme zu differenzieren. Hybridisierung von Southern blots mit Spezies-spezifischen Sonden, die aus rRNA-Genen stammen, wurden ebenso beschrieben (Tenover et al., 1990). Die Methode, bekannt als NASBA ("nucleic acid sequenced based amplification"), basiert auf einer Taq-unabhängigen Amplifikation bei Raumtemperatur und kann für die Artenbestimmung benutzt werden, wenn eine Hybridisierung folgt (Uyttendaele et al., 1994). Atypische thermophile *Campylobacterien* können als *C. jejuni* oder *C. coli* (oder keiner von diesen) mittels slot-blot Hybridisierung identifiziert werden (Ng et al., 1987). Ein zeitgemäßerer Ansatz ist die Spezies-spezifische Hybridisierung von PCR Produkten, die mit degenerierten Primern erzeugt wurden (Al Rashid et al., 2000). Die beschriebenen Methoden müssen ihren Wert erst noch in Routinelabors unter Beweis stellen.

Tabelle 1: Ein Vergleich von Molekularmethoden für Nachweis und Speziesbestimmung von thermophilen Campyloacter spp.

Proben-Material	Spezies*	Zielgen	Nachweisgrenze	Bemerkungen	Referenzen
PCR- abhängige Methoden					
Milch- produkte	jejuni+coli	FlaA+B	Mit roher Milch, sensitiver als Kulturmethoden	Nahrungsmittelproben wurden behandelt, um Bakterien freizu- setzen aber nicht angereichert	Allmann 1995
Stuhl, Wasser	jejuni+coli	flaA	30-60 CFU/Assay im Stuhl, 10-100 CFU/100 ml Wasser	für Wasser, Filtration notwendig	Oyofa 1992-1993
Hühnereinstreu	jejuni	flaA	Mit Trockenkot, sensitiver als Kulturmethoden	Anreicherung notwendig	Itoh 1995
Wasser	jejuni+coli	flaA+B	10-20 CFU/ml	Filtration notwendig	Kirk 1994
Wasser	jejuni	flaA	30 CFU/100 ml	Anreicherung notwendig	Hernandez 1995
Hühnerfleisch Spülwasser	jejuni+coli+lari	16S rRNA	25 CFU/g Fleisch	Anreicherung und Hybridisierung notwendig	Giesendorf 1992
DNA von Reinkulturen	jejuni+coli+ lari+upsaliensis, oder jejuni, coli, lari, upsaliensis	23S rRNA	12 CFU/Assay	Bestimmung abhängig von der Wahl der Primer	Eyers 1993 Ferner 1999
Hühnerfleisch	jejuni, coli	rRNA intergenetic spacer		Hybridisierung zur Bestimmung notwendig	O'Sullivan 2000
Zell-Lysate von Reinkulturen	jejuni	Membranprotein- gen mapA	24 CFU/Assay	Das Protein, das von diesem Gen kodiert ist, ist auch immunogen	Stucki 1995
DNA von Reinkulturen	jejuni, coli	Hippurikase, Aspartokinase		Eine 3-Schritte PCR als Nachweis und Bestimmung	Linton 1997
DNA von Reinkulturen	jejuni, coli, lari, upsaliensis, arcobacter	glyA	200 CFU/Assay	Degenerierte Primer für Nachweis, Hybridisierung und Bestimmung	Al Rashid 2000
Lysierte Zellen von angereichertem Spülwasser von Schlachtkörpern	jejuni	nicht identifiziert	nicht vorhanden	Filtration, Kultivierung notwendig	Winters 1995
DNA von Reinkulturen	jejuni	nicht identifiziert	1 CFU	Hybridisierung notwendig	Stonnet 1993
DNA von Reinkulturen	jejuni, coli, lari	nicht identifiziert	nicht vorhanden	RAPD PCR gefolgt von Hybridisierung	Giesendorf 1993
PCR unabhängige Methoden					
Reinkulturen	jejuni+coli+lari oder jejuni, coli, lari	16S rRNA	6 CFU in Anwesenheit von 4x10 ⁶ CFU Gram negativ Bakterien	Hybridisierung, Bestimmung ist von der Probe abhängig	Uyttendael 1994
Reinkulturen	jejuni+coli+lari	nicht bestimmt	nicht zutreffend	Ein-Schritt DNA Hybridisierung	Tenover 1990
DNA von Reinkulturen	jejuni, coli	nicht zutreffend	nicht zutreffend	slot blot Hybridisierung zur Bestimmung von atypischen Campylobacter	Ng 1987
DNA von Reinkulturen	jejuni, coli	nicht identifiziert	nicht zutreffend	Southern blot Hybridisierung	Korolik 1995
*wenn mehrere Spezies nachgewiesen sind, die nicht differenziert werden können, sind diese mit "+" markiert. Bei Nennung nur einer Spezies ist die Methode für diese Spezies spezifisch. Wenn die Methode zwischen den Spezies eine Differenzierung erlaubt, sind diese mit " , " markiert.					

Typisierung von Campylobacter Subspezies

Die Vielfalt der biochemischen- und phänotypischen Eigenschaften innerhalb der Spezies Campylobacter sind seit langem bekannt. Früher wurden phänotypische Unterschiede zwischen den Isolaten benutzt, um Subtypisierungsschemata zu entwickeln. Bei Salmonella und anderen Enterobacteriaceae erwies sich die Serotypisierung als nützlich. Daher wurde in den 80er Jahren eine Serotypisierung für Campylobacter entwickelt (Penner und Hennessy, 1980; Lior et al., 1982). Das Serotypisierungsschema, basierend auf hitzestabilen (HS) Antigenen (Penner und Hennessy, 1980) wird immer noch in einigen Labors benutzt und umfasst über 60 Serotypen. Weitere Phänotypische Subtypisierungsschemata, die noch im Gebrauch sind, sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Jede dieser Methoden hat ihre eigenen Vor- und Nachteile. Der auffälligste Nachteil der phänotypischen Subtypisierung ist im allgemeinen, dass sie von der Expression eines charakteristischen Phänotyps abhängig ist, die durch die Kulturbedingungen, das Alter der Kultur, etc. beeinflusst werden kann. Weitere Nachteile:

- ein relativ hoher Prozentsatz von Stämmen, die wegen mangelnder Expression eines Phänotyps nicht typisierbar sind,
- die aufwendige Pflege und Qualitätskontrolle von Seren und Phagensammlungen,
- Schwierigkeiten in der Kompatibilität (s. Tabelle 3 zur Erklärung der Terminologie in diesem Zusammenhang).

Da die meisten phänotypischen Eigenschaften auf irgendeine Weise durch Unterschiede im Genom repräsentiert sind, ist die genotypische Differenzierung eine folgerichtige Alternative. Die Vorteile sind offensichtlich: Genotypen sind im

allgemeinen stabil und unabhängig von Kulturbedingungen oder Expressionen von Antigenen. Die genetischen Methoden haben eine höhere Typisierbarkeit als phänotypische Methoden; Computer gestützte Technologien erlauben eine hohe Kompatibilität.

Ein Vergleich der gegenwärtig genutzten Genotypisierungsmethoden ist in Tabelle 2 zusammengefasst. Die meisten Methoden weisen eine gute Typisierbarkeit als auch gute Reproduzierbarkeit auf. Genotypische Methoden können in Methoden, die von einem einzelnen Locus (oder mehreren Loci) innerhalb des Genoms und Methoden, die vom gesamten Genom abhängen, unterteilt werden. Einige Methoden verlassen sich auf die Ab- oder Anwesenheit von Restriktionsschnittstellen, andere Methoden basieren auf PCR Amplifikation. Leider sind einige, im Prinzip identische Methoden, unter verschiedenen Namen bekannt, und verschiedene Methoden werden mit sowohl gleichen als auch irreführenden Namen bezeichnet (siehe Vaneechootte, 1996).

Unten aufgeführt ist eine kurze Beschreibung der herkömmlichsten genotypischen Methoden, die unter ihren gebräuchlichen Namen und Synonymen bekannt sind. Die bestehende Literatur ist überwältigend, und da kürzlich eine Überarbeitung stattfand, sind keine Referenzen angegeben; statt dessen wird der Leser auf Wassenaar und Newell (2000) hingewiesen.

Tabelle 2: Ein Vergleich der für C. jejuni entwickelten phänotypischen- und genotypischen Nachweismethoden

Phänotypische Methoden	Typisierbarkeit	Differenzierungspotential	Reproduzierbarkeit	Dauer	Kosten	Spezifische Nachteile • Spezifische Vorteile
HS Serotypisierung	80 %	durchschnittlich	gut	<1 Tag	niedrig	Produktion, Pflege und Qualitätskontrolle der Serumsammlung sind teuer und zeitaufwendig • Methode über 15 Jahre in Gebrauch
Phagentypisierung	60-80 %	niedrig	gut	<1 Tag	niedrig	Verlust oder Veränderung des Phagentyps ist nicht ungewöhnlich
Biotypisierung	keine Daten vorhanden	niedrig	niedrig	<1 Tag	niedrig	Ergebnis kann zweideutig sein.
Genotypische Methoden	Typisierbarkeit	Differenzierungspotential	Reproduzierbarkeit	Dauer	Kosten	Spezifische Nachteile • Spezifische Vorteile
fla Typisierung	100 %	befriedigend	gut	<1 Tag	niedrig	Nur ein genetischer locus wurde untersucht, der genetisch instabil sein könnte • kann für Multiplex PCR kombiniert werden
PFGE	100 %	gut	gut	3-4 Tage	durchschnittlich	Spezialgeräte notwendig • zzt. meist verwendete Methode
Ribotypisierung	keine Daten vorhanden	niedrig	gut	3-4 Tage	durchschnittlich	Nicht allgemein verwendet
RAPD	80 %	durchschnittlich	niedrig	<1 Tag	niedrig	Reproduzierbarkeit zwischen Laboren ist problematisch
AFLP	100 %	gut	gut	2-3 Tage	durchschnittlich	Spezialgeräte notwendig

Tabelle 3: Erklärung zur Terminologie dieser Arbeit

Terminologie	Erklärung	Synonym
Differenzierungspotential	Die Fähigkeit zur Differenzierung zwischen genetisch unabhängigen Stämmen	Spezifität, Auflösung
Reproduzierbarkeit	Die Fähigkeit duplizierte Proben zu identifizieren	Verlässlichkeit
Typisierbarkeit	Prozentsatz aller getesteten Stämme, die einen Typ ergeben	Sensitivität
Kompatibilität	Die Möglichkeit direkt das Ergebnis mit dem anderer Labors zu vergleichen	
Klon	Die gesamte Nachkommenschaft eines Klons ist genetisch mit seinem Vorfahren identisch	Stamm
Panmiktisch	Eine Population, die, aufgrund von "DNA Neuorganisation" durch sexuelle Reproduktion nicht klonal ist.	
Genetische Instabilität	Eine signifikante Veränderung eines Genotyps im ansonsten klonalen Nachwuchs	

Flagellin typing (fla typing)

Diese Methode basiert auf "restriction fragment length polymorphism (RFLP)" von PCR Produkten, die aus Flagellin-genen (fla) von *C. jejuni* stammen. In Kürze: Es werden fla spezifische PCR Primer benutzt, um ein PCR Fragment zu erhalten, welches mit Restriktionsenzymen gespalten wird. Das durch Agarosegel Elektrophorese erlangte Bandenmuster wird durch die Wahl der Primer und der genutzten Restriktionsenzyme bestimmt. Die Fragmente werden in einer Größenordnung von 0,1-1 Kilobasenpaare (kbp) erzeugt. Da *C. jejuni* zwei Flagellin-gene enthält (die im Genom benachbart sind), kann die PCR, abhängig vom Primer, entweder ein oder zwei fla Gene erkennen. Die Primer wurden so ausgewählt, dass sie stark konservierte Sequenzen binden (die Sequenz zwischen den Primern sind jedoch sehr variabel). Diese Primer können auch für *C. coli* und *C. upsaliensis* eingesetzt werden. Die verschiedenen fla Typisierungsschemata differieren hauptsächlich durch die Wahl der Primer und Enzyme. Die Typisierbarkeit kann dadurch verbessert werden, dass reine DNA statt Zell-Lysate benutzt werden, was jedoch arbeitsintensiver ist. Das Differenzierungspotential kann durch Anwendung von mehr als einem Restriktionsenzym erhöht werden. Um fla Typisierungsschemata zu standardisieren, wurde ein consensus PCR Primerset vorgeschlagen (Wassenaar und Newell, 2000). Ein europäisches Konsortium (CAMPYNET) hat eine Standardisierung der Enzymwahl und der Nomenklaturen eingeleitet (Campynet, 1999).

Puls Field Gel Elektrophorese (PFGE)

Diese Methode ist auch bekannt als "genomic fingerprinting" oder "macrorestriction profiles". Sie basiert auf der An- oder Abwesenheit von Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme, die mit niedriger Häufigkeit im Genom schneiden. PFGE ist von der kompletten chromosomalen DNA abhängig, die mit einer schützenden Gelsubstanz isoliert wurde, um Scherkräfte zu vermeiden. Nach der Spaltung wird die DNA unter Verwendung einer speziellen Apparatur, die ein pulsierendes elektrisches Feld erzeugt, auf Agarose Gelen analysiert. Auf diese Weise können große Fragmente (20-200 kbp lang) getrennt werden. Das erhaltene Bandenmuster hängt von der Wahl der Restriktionsenzyme und der elektrophoretischen Bedingungen ab, von denen beides noch standardisiert werden muß (Campynet, 1999).

PFGE ist eine der meist genutzten Methoden und wird oft als

der "gold standard" zu Genotypisierung dargestellt, obwohl es keinen eindeutigen Vorteil dieser Methode gegenüber anderen gibt und die Methode sehr arbeitsaufwendig ist. Manche Stämme sind nicht typisierbar, da sie eine DNAse produzieren. Dieses Problem kann durch Adaption der Methode gelöst werden. Das Differenzierungspotential kann durch die Verwendung von mehr als einem Restriktionsenzym verbessert werden. Eine kleine Anzahl von Stämmen hat DNA, die durch die im allgemeinen verwendeten Enzyme nicht spaltbar ist, vermutlich auf Grund von Restriktions/Modifikationssystemen. Diese Stämme können manchmal durch Verwendung alternativer Enzyme typisiert werden.

Ribotyping

Diese Methode basiert auf der Ab- und Anwesenheit von Restriktionsschnittstellen in oder in der Nähe der drei ribosomalen Loci, die mittels Southern blot Hybridisierung sichtbar gemacht werden. In Kürze: Chromosomale DNA wird isoliert, gespalten und auf Agarosegelen aufgetrennt. Von diesen Gelen wird ein Southern blot hergestellt (eine Blaupause der aufgetrennten DNA Banden auf einem Nitrozellulosefilter), der mit einem markierten DNA Fragment hybridisiert wird, das spezifisch für ribosomale RNA (rRNA) Gene ist. Das rRNA spezifische markierte Fragment (die Sonde) wird gewöhnlich mittels PCR hergestellt. Das erhaltene Bandenmuster hängt von der Wahl der Restriktionsenzyme und der Wahl des markierten Fragments ab, das aus den für die 16S rRNA, 23S rRNA codierenden Genen erzeugt werden kann. Die Methode ist sehr arbeitsaufwendig und das Differenzierungspotential ist relativ niedrig. Der Grund hierfür ist nicht vollständig verstanden. Im Vergleich zu anderen Spezies (z. B. Salmonella), wo ribotyping ein hervorragendes Differenzierungspotential bewies, enthält *C. jejuni* weniger ribosomale Gen-loci (drei im Vergleich zu fünf bei Salmonella). Die Fragmente, die durch ribotyping detektiert werden können, haben eine Länge von 0,5 - 5 kbp und die Auflösung der Gele ist schlechter als die der Gele für fla typing. Ribotyping wurde nicht so intensiv eingesetzt wie fla typing oder PFGE. Ein automatisches Gerät (kommerziell unter dem Namen "Riboprinter" erhältlich) ermöglicht einen hohen Probendurchsatz ohne viel Arbeitsaufwand, jedoch zu hohen Kosten für Gerät und Material.

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Diese Methode, auch "Arbitrarily Primed PCR fingerprinting (AP-PCR)" genannt, basiert auf PCR, amplifiziert jedoch keine spezifischen loci. Statt dessen werden arbiträre Primer eingesetzt, um zufällig verteilte Fragmente zu amplifizieren. Die Amplifikationsbedingungen sind von niedriger Stringenz, so dass Fragmente amplifiziert werden können, auch wenn die Primer nicht perfekt passen. Die resultierenden PCR Produkte werden durch Argarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, und die erhaltenen Muster (bestehend aus Banden mit stark variierender Intensität) hängen von der Anwesenheit, Orientierung und Lokalisation der Primerbindungsstellen ab.

Das Hauptproblem der RAPD ist der Mangel an Reproduzierbarkeit. Die für die PCR benötigte niedrige Stringenz macht die Methode sehr sensitiv gegenüber den experimentellen Bedingungen (Reinheit und Konzentration der DNA, Inhibitoren, PCR-Gerät, etc.). Die ursprüngliche Methode benutzte einen Primer, aber es wurden für *Campylobacter* auch Varianten beschrieben, die zwei Primer benutzen, von denen einer spezifisch für enterobakterielle, repetitive Sequenzen ist (REP Primers). Eine klassische REP PCR amplifiziert Fragmente zwischen repetitiven Sequenzen, an die die REP Primer mit hoher Spezifität binden. Da solche repetitive Sequenzen in *Campylobacter* nicht vorkommen, kann eine klassische REP PCR nicht verwendet werden und die Primer werden statt dessen bei niedriger Stringenz eingesetzt, was der RAPD ähnelt. Der Mangel an Reproduzierbarkeit, schränkt die Kompatibilität der Methode deutlich ein, weshalb RAPD hauptsächlich in Einzellabors eingesetzt wird, aus denen gute Ergebnisse bekannt gegeben wurden. Die Methode ist schnell und einfach.

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Diese Genotypisierungsmethode sollte nicht mit Methoden verwechselt werden, die die Bandengröße der PCR Produkte bestimmen (PCR RFLP), bekannt unter demselben Namen. In der AFLP wird eine Kombination von PCR Amplifikation und Restriktionsenzymerkennung auf relativ komplexe Weise verwendet. Chromosomale DNA wird isoliert und mit zwei Restriktionsenzymen gespalten, die relativ häufig schneiden. Nach der Ligation von Linkern wird ein Teil dieser Fragmente auf raffinierte Weise mittels einer PCR amplifiziert, in der die Restriktionsschnittstellen als primerspezifische Sequenzen mit Zusatz von einem oder mehr spezifischen Nucleotiden dienen.

Der Unterschied zu PFGE ist, dass die erhaltenen Fragmente wesentlich kleiner (50-500 bp) sind und dass sie auf Acrylamid Gelen mit hoher Auflösung analysiert werden. Der Unterschied zu RAPD ist, dass die PCR Reaktion unter stringenten Bedingungen ausgeführt wird, was in einer hohen Reproduzierbarkeit resultiert. Die Methode ist relativ neu, aber die Kompatibilität erwies sich als hoch. Automatisiertes Lesen der Gele und Datenprozessierung durch Computer trug wesentlich dazu bei, die Ergebnisse zu objektivieren und die hohe Zahl der generierten Banden ermöglicht einen gewissen Spielraum in der Bandenvariation aufgrund des Ausgleichs von Artefakten. AFLP zeigt eine exzellente Typisierbarkeit und hohes Differenzierungsvermögen und wird wohl der "gold standard" der Zukunft werden. Jedoch werden spezielle Gerätschaften zur Acrylamid Elektrophorese und zum automatisierten Lesen der Gele benötigt und die Methode ist langsam, obwohl ein hoher Durchsatz möglich ist.

Andere Methoden

Einige Genotypisierungsmethoden für *Campylobacter* wurden kürzlich entwickelt oder angewandt. Die meisten davon sind Abwandlungen der PCR RFLP, d. h. sie ähneln dem fla typing, benutzen jedoch andere Zielgene. Eine vielversprechende Entwicklung ist die Kombination von Zielgenen in einer Multiplex PCR (Ragimbeau et al., 1998; Denis et al., 1999), die das Differenzierungsvermögen im Vergleich zu individuellen PCR RFLP Methoden erheblich erhöht. Ein anderer Ansatz ist die Multi-Locus Sequenzierung (MLST). Die beste ist die letzere Methode, um die genetischen Beziehungen verschiedener Linien und Klone zu bestimmen. Sie ist jedoch nicht optimal für epidemiologische Studien.

Genotypisierungs- und Phänotypisierungsmethoden im Vergleich

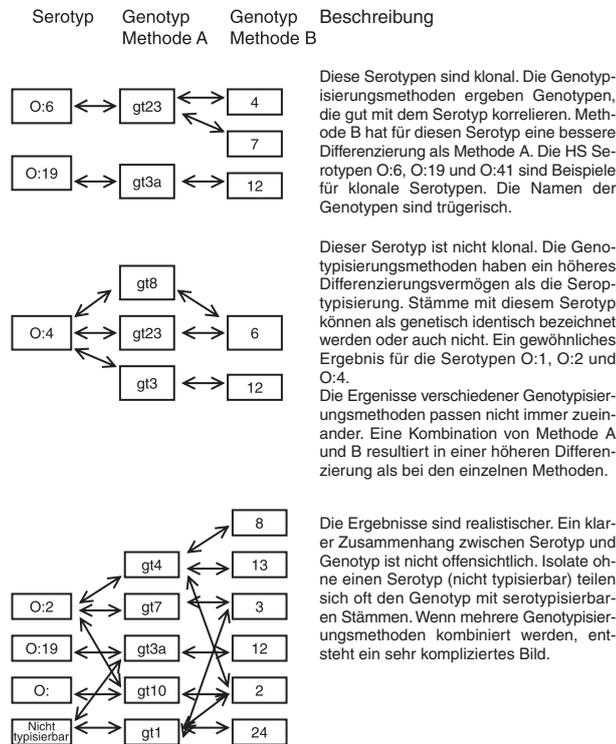
Das Differenzierungspotenzial der Genotypisierungsmethoden ist üblicherweise besser als die phänotypischen Methoden, was sich in der größeren Anzahl der verschiedenen erzielten Subtypen widerspiegelt. Ein Vorteil der genotypischen gegenüber den phänotypischen Daten ist die Möglichkeit der Benutzung für phylogenetische Analysen, so dass die relative genetische Verwandtschaft zwischen den verschiedenen Subtypen untersucht werden kann. Sie machen es möglich, nicht nur festzustellen, dass zwei Isolate verschieden sind, sondern auch wie verschieden sie sind. Dies ist mit Phänotypisierung nicht möglich.

Alle hier aufgelisteten Methoden wurden angewendet, um Isolate verschiedenen Ursprungs zu vergleichen (Human, Animal und manchmal aus der Umwelt) und alle geprüften Methoden konnten Ausbruchstämme von Isolaten unterscheiden, die nicht damit in Beziehung stehen. Einige Studien verglichen verschiedene Genotypisierungsmethoden in Beziehung auf ihr Differenzierungspotential und Typisierbarkeit, während viele Studien diese ebenso im Vergleich zu HS Serotypisierung prüften. Die auffälligste Erkenntnis war, dass serotypische- und genotypische Daten, die mit verschiedenen Methoden erzielt wurden, nicht immer zusammenpassen. Das ist in Abbildung 1 dargestellt.

Der Grund für die mangelnde Korrelation ist, dass einige Serotypen klonal sind (alle Isolate, die zu diesem Serotyp gehören sind genetisch identisch oder fast identisch), während andere nicht klonal aber panmikotisch sind. Nicht klonale Populationen können durch sexuelle Reproduktion entstehen, bei der DNA Fragmente verschiedener Stämme rekombinieren. So können die genetischen loci für die HS Antigene in Stämmen mit einem anderen genetischen Hintergrund anwesend sein, so dass der Serotyp nicht länger an den Genotyp gebunden ist (gemäß Bestimmung durch unabhängige Methoden für genetische HS loci). Für die klonalen Serotypen korreliert ein gegebener Serotyp mit einem gegebenen Genotyp, wenn beide Methoden ein vergleichbares Differenzierungspotential besitzen.

Eine Genotypisierungsmethode mit höherem Differenzierungspotential wird Isolate vom identischen Serotyp unterscheiden (Abb. 1). Wenn zwei Genotypisierungsmethoden verglichen werden, wird die Methode mit dem höchsten Differenzierungspotential eine scheinbar homogene genotypische Truppe - bestimmt mit einer Methode niedriger Differenzierung - unterteilen. Für eine panmikotische Population wird es keine Korrelation zwischen Serotyp und Genotyp oder zwischen Genotypen, die durch andere Methoden bestimmt wurden, geben. AFLP scheint die beste Korrelation

Abbildung 1: Schematische Repräsentation eines Vergleichs von Ergebnissen, die mit Serotypisierung und zwei unabhängigen Genotypisierungsmethoden erreicht wurden



zwischen Serotyp und Genotyp zu erzeugen (B. Duim, J.A. Wagenaar und T. M. Wassenaar, unveröffentlichte Daten) und ist für phylogenetische Analysen am besten geeignet. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich, dass AFLP eine hohes Differenzierungspotential mit einer hohen Zahl von Banden aus dem gesamten Genom kombiniert, was eine verlässliche phylogenetische Analyse ermöglicht.

Genetische Instabilität

Es ist offensichtlich, dass Genotypen von bakteriellen Isolaten über längere Zeit stabil bleiben müssen, um von Nutzen sein zu können. Glücklicherweise ist das fast immer der Fall. Genotypen ändern sich nicht, wenn die Isolate gelagert, kultiviert oder in vivo passagiert werden. Jedoch wurde in Ausnahmefällen genetische Instabilität (eine Änderung des Genotyps in der ansonsten klonalen Nachkommenschaft) bei *Campylobacter* beschrieben und konnte mit verschiedenen Genotypisierungsmethoden nachgewiesen werden (Wassenaar et al., 2000). Beispielsweise ist es unter Laborbedingungen möglich, dass vollständige *fla* Typen zwischen Stämmen ausgetauscht werden, wodurch die Korrelation zwischen *fla* Typ und dem Rest des Genoms verloren geht, oder dass Rekombinationen innerhalb des *fla* locus in einer Änderung des *fla* Genotyps der ansonsten klonalen Nachkommenschaft resultiert (Wassenaar et al., 1995). Es bleibt zu untersuchen, ob und wie häufig solche Ereignisse unter natürlichen Bedingungen vorkommen.

Es wurde ebenfalls beobachtet, dass PFGE Genotypen innerhalb einer klonalen Linie sich aufgrund von Rekombinationen, Insertionen, Deletionen und Punktmutationen ändern können (siehe Referenzen: Wassenaar et al., 2000). Nochmals, die Häufigkeit von solchen Ereignissen ist nicht be-

kannt und kann von Stamm zu Stamm unterschiedlich sein. Abhängig von ihrer Häufigkeit müssen solche Ereignisse nicht unbedingt wichtig für Kurzzeit-Epidemiologie, wie z.B. horizontale Verbreitung innerhalb einer Hühnerfarm oder Identifizierung möglicher Kontaminationsquellen, sein. Für Langzeitstudien wird jedoch empfohlen, zwei unabhängige Techniken, entweder genotypische oder phänotypische (oder eine Kombination von beiden) mit einem ausreichenden Differenzierungspotentialverhalten zu verwenden, um mögliche Effekte der genetischen Instabilität zu korrigieren. Der Gebrauch zweier Methoden kompensiert den möglichen Differenzierungsmangel einzelner Methoden. Wassenaar et al. (2000) hat Beispiele beschrieben, wie durch genetische Instabilität verursachte Ergebnisse mit Hilfe von Beobachtungen erkannt und differenziert werden können, die aus der Anwesenheit unabhängiger und verschiedener Genotypen resultieren.

Abschließende Bemerkungen

Die in der Literatur beschriebenen Methoden zum molekularen Nachweis und zur Bestimmung von *Campylobacter* spp. sind vielversprechend, aber weitere Auswertungen und Vergleiche sind notwendig, um die beste Methode für die praktische Anwendung auszuwählen. Da molekulare Nachweismethoden schnell und verlässlich sind, wird erwartet, dass ihre Anwendung in Routinelabors schnell zunehmen wird. Molekulare Typisierung hat sich bereits in epidemiologischen Studien mit einer großen Zahl von Proben bewährt (Lawson, 1999).

Eine Standardisierung der Genotypisierungstechniken ist notwendig, um eine Kompatibilität zwischen den Labors zu ermöglichen. Die meisten genetischen Methoden zur Subtypisierung erfordern Kultivierung und/oder DNA Isolierung und können daher nicht direkt mit molekularen Nachweismethoden kombiniert werden. Das Flagellin könnte theoretisch das Ziel sowohl für Detektion als auch für Subtypisierung sein. Genetische Subtypisierung kann offenlegen, welche Subpopulationen von Bakterien hauptsächlich in Hühnern- und Geflügelprodukten zu finden sind, und ob diese sich von den Subpopulationen, die in Mensch und Umwelt gefunden werden, unterscheiden. Subtypisierung kann weiterhin zur Identifikation von Kontaminationsquellen eingesetzt werden und somit bei der Umsetzung effektiver Bekämpfungsstrategien helfen.

Danksagung

Ich danke Dr. W.F. Jacobs-Reitsma für Ihre Anmerkungen und Hilfe bei der Vorbereitung dieses Manuskripts.

Übersetzung aus dem Englischen: Dr. Frank Fehler

Literaturverzeichnis

- Allmann, M., Hšfelein, C., Kšppel, E., Lŷthy, J, Meyer, R., Niederhauser, C., Wegmŷller, B., Candrian, U. (1995): Polymerase chain reaction for detection of pathogenic microorganisms in bacteriological monitoring of dairy products. *Res. Microbiol.* 146:85-97
- AlRashid S., Dakuna, I., Louie, H., Ng, D., Vandamme, P., Johnson, W., Chan, V.L. (2000): Identification of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *Arco-bacter butzleri*, and *A. butzleri*-like species based on the *glyA* gene. *J. Clin. Microbiol.* 38:1488-1494
- CAMPYNET Website (1999): (Online) www.svs.dk/campynet
- Cappelier J.M., Minet J., Magras C., Colwell R.R., Federighi M. (1999): Recovery in embryonated eggs of viable but nonculturable *Campylobacter jejuni* cells and maintenance of ability to adhere to HeLa cells after resuscitation. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5154-5157
- Denis M., Soumet C., Rivoal K., Ermel G., Blivet D., Salvat G., Colin P. (1999): Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 29:406-410
- Eyers, M., Chapelle, S., Van Camp, G., Goossens, H., De Wachter, R. (1993): Discrimination among thermophilic *Campylobacter* species by polymerase chain reaction amplification of 23S rRNA gene fragments. *J. Clin. Microbiol.* 31:3340-3343
- Fearnley C., Ayling R., Cawthraw S., Newell DG. (1996): The formation of viable but nonculturable *Campylobacter jejuni* and their failure to colonise one-day-old chicks. In : Newell DG, Ketley JM and Feldman RA (eds) *Campylobacters Helicobacters and related organisms*. Plenum Press, 101-104
- Fermer C., Engvall E.O. (1999): Specific PCR identification and differentiation of the thermophilic campylobacters, *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*. *J. Clin. Microbiol.* 37:3370-3373
- Giesendorf, B.A.J., Quint, W.G.V, Henkes, M.H.C., Stegeman, H., Huf, F.A., Niesters, H.G.M. (1992): Rapid and sensitive detection of *Campylobacter* spp. in chicken products by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environm. Microbiol.* 58:3804-3808
- Giesendorf, B.A.J., Van Belkum, A., Koeken, A., Stegeman, H., Henkes, M.H.C., Van der Plas, J., Goossens, H., Niesters, H.G.M., Quint, W.G.V. (1993): Development of species-specific DNA probes for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lari* by polymerase chain reaction fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 31:1541-1546
- Gonzales, I., Gonzalez, K.A., Grant, P.T., Richardson, S.F., Park, Collins, M.D. (1997): Specific identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using a PCR test based on the *ceuE* gene encoding a putative virulence determinant. *J. Clin. Microbiol.* 35:759-763
- Hernandez, J., Alonso, J.L., Fayos, A., Amaros, I., Owen, R.J. (1995): Development of a PCR assay combined with a short enrichment culture for detection of *Campylobacter jejuni* in estuarine surface waters. *FEMS Microbiol. Lett.* 127:201-206
- Itoh, R., Saitoh, S., Yatsuyanagi, J. (1995): Specific detection of *Campylobacter jejuni* by means of polymerase chain reaction in chicken litter. *J. Vet. Med. Sci.* 57:125-127
- Kirk, R., Rowe, M.T. (1994): A PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in water. *Letters Appl. Microbiol.* 19:301-303
- Korolik, V., Moorthy, L., Coloe, P.J. (1995): Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains by using restriction endonuclease DNA profiles and DNA fragment polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* 33:1136-1140
- Lawson, A.J., Logan, J. M.J., O'neill, G L., Desai, M., Stanley, J. (1999): Large-scale survey of *Campylobacter* species in human gastroenteritis by PCR and PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Clin. Microbiol.* 37:3860-3864
- Linton, D., Lawson, A.J., Owen R.J., Stanley J. (1997): PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *J. Clin. Microbiol.* 35:2568-2572
- Lior, H., Woodward, D.L., Edgar, J.A., Laroche, J., Gill, P. (1982): Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. *J. Clin. Microbiol.* 15:761-768
- Ng, L.-K., Stiles, M.E., Taylor, D.I. (1987): Classification of *Campylobacter* strains using DNA probes. *Molec. Cell. Probes* 1:233-243
- Notermans, S. (1994): Epidemiology and surveillance of *Campylobacter* infections. pp 35-44. In: Report on a WHO consultation on epidemiology and control of campylobacteriosis. WHO/CDS/PH/94.135. World Health Organization, Geneva, Switzerland
- O'Sullivan, N.A., Fallon, R., Carroll, C., Smith, T., Maher, M. (2000): Detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in broiler chicken samples using a PCR/DNA probe membrane based colorimetric detection assay. *Mol. Cell. Probes* 14:7-16
- Oyofa, B.A., Thornton, S.A., Burr, D.H., Trust, T.J., Pavlovskis, O.R., Guerry, P. (1992): Specific detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30:2613-2619
- Oyofa, B., Rollins, D.M. (1993): Efficacy of filter types for detecting *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental water samples by polymerase chain reaction. *Appl. Environm. Microbiol.* 59:4090-4095
- Penner, J.L., Hennessy, N. (1980): Passive haemagglutination technique for serotyping *Campylobacter jejuni* on the basis of soluble heat stable antigens. *J. Clin. Microbiol.* 12:732-737
- Ragimbeau, C., Salvat, G., Colin, P., Ermel, G. (1998): Development of a multiplex PCR gene fingerprinting method using *gyrA* and *pflA* polymorphisms to identify genotypic relatedness within *Campylobacter jejuni* species. *J. Appl. Microbiol.* 85:829-838
- Steinbrŷckner, B., Hšrter, G., Pelz, K., Kist, M. (1999): Routine identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from human stool samples. *FEMS Microbiol Lett* 179:227-232
- Stonnet, V., Guesdon, J.-L. (1993): *Campylobacter jejuni*: specific oligonucleotides and DNA probes for use in polymerase chain reaction-based diagnosis. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* 7:337-344

- Stucki, R., Frey, J., Nicolet, J., Burnens, A.P. (1995): Identification of *Campylobacter jejuni* on the basis of a species-specific gene that encodes a membrane protein. *J. Clin. Microbiol.* 33:855-859
- Tenover, F.C., Carlson, L., Barbagallo, S., Nachamkin, I. (1990): DNA probe culture confirmation assay for identification of thermophilic *Campylobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* 28:1284-1287
- Thunberg R.L., Tran T.T., Walderhaug M.O. (2000): Detection of thermophilic *Campylobacter* spp. in blood-free enriched samples of inoculated foods by the polymerase chain reaction. *J. Food Prot.* 63:299-303
- Uyttendaele, M., Schukkink, R., Van Gemen, B., Debevere, J. (1994): Identification of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari* by the nucleic acid amplification system NASBA. *J. Appl. Bacteriol.* 77:694-701
- Vaneeshootte, M. (1996): DNA fingerprinting techniques for microorganisms. A proposal for classification and nomenclature. *Molec. Biotechn.* 6:115-142
- Wang H., Farber J.M., Malik N., Sanders G. (1999): Improved PCR detection of *Campylobacter jejuni* from chicken rinses by a simple sample preparation procedure. *Int. J. Food Microbiol.* 52:39-45
- Wassenaar, T. M., Fry, B.N. and Van der Zeijst, B.A.M. (1995): Variation of the flagellin gene locus of *Campylobacter jejuni* by recombination and horizontal gene transfer. *Microbiology* 141:95-101
- Wassenaar, T.M., Newell, D.G. (2000): Genotyping of *Campylobacter* spp. *Appl. Environm. Microbiol.* 66:1-9
- Wassenaar, T.M., On, S.L.W., Meinersmann, R.J. (2000): Genotyping and the consequences of genetic instability. pp 369-380. In: *Campylobacter*, 2nd Ed. Edited by I. Nachamkin and M.J. Blaser. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Winters, D.K. Slavik, M.F. (1995): Evaluation of a PCR based assay for specific detection of *Campylobacter* in chicken washes. *Molec. Cell. Probes* 9:307-310