**Zeitschrift:** Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires

**Herausgeber:** Gesellschaft Schweizer Tierärztinnen und Tierärzte

**Band:** 138 (1996)

**Heft:** 3

**Artikel:** Identifikation und Diagnostik von Taylorella equigenitalis mittels einer DNA-Amplifikationsmethode (PCR)

**Autor:** Miserez, R. / Frey, J. / Krawinkler, M.

**DOI:** https://doi.org/10.5169/seals-589891

**Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

**Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

**Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

**Download PDF:** 01.11.2025

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch**

*Institut für Veterinärbakteriologie der Universität Bern*

# Identifikation und Diagnostik von *Taylorella equigenitalis* mittels einer DNA-Amplifikationsmethode (PCR)

*R. Miserez, J. Frey, M. Krawinkler, J. Nicolet*


## Zusammenfassung

Eine PCR-Methode zur Identifikation von *Taylorella equigenitalis* wurde entwickelt. Die verwendeten Oligonukleotid-Primer basieren auf der DNA-Sequenz des *rrs* Genes von *T. equigenitalis*, das für die 16S ribosomale RNA kodiert. Die Untersuchungen von 21 Stämmen von *T. equigenitalis* aus England, USA und der Schweiz ergaben ein Amplifikationsprodukt von 410 Basenpaaren mit identischem *Sau*3A Restriktionsprofil. Die experimentell bestimmte Nachweisgrenze von *T. equigenitalis* betrug in Mischung mit häufig vorkommenden Kontaminanten 50 bis 500 Keime. Aufgrund der Untersuchungen von Mischkulturen aus 60 Tupferproben, welche im Rahmen der Überwachung der ansteckenden Gebärmutterentzündung der Pferde und Esel (Eidgenössische Tierseuchenverordnung Artikel 59) untersucht wurden, sowie aufgrund von experimentellen Wiederauffindungsversuchen und zwei positiven Fällen aus der Diagnostik schliessen wir, dass die PCR-Analyse eine sichere Methode zur Identifikation von *T. equigenitalis* Stämmen und für den Nachweis von *T. equigenitalis* in Mischkulturen ist. Aufgrund preliminärer vielversprechender Resultate scheint diese Methode auch für den *in vitro* Direktnachweis von *T. equigenitalis* in klinischem Material anwendbar zu sein.


***Schlüsselwörter: Taylorella equigenitalis* – CEM – PCR – Diagnostik**


## Identification and diagnostic of *Taylorella equigenitalis* by a method of DNA-amplification (PCR)

A polymerase chain reaction (PCR) for identification of *Taylorella equigenitalis* was developed. The oligonucleotide primers are based on the DNA sequence of the *rrs* gene of *T. equigenitalis,* encoding for the 16S ribosomal RNA. Analysis of 21 strains of *T. equigenitalis* from England, USA and Switzerland showed an amplification product of 410 bp with identical *Sau*3A restriction profile. The sensitivity of the PCR-Assay was estimated to detect 50 to 500 bacteria of *T. equigenitalis* in a mixture with frequently found contaminants. Further analysis of culture from 60 genital swabs, taken in the course of the control of the contagious equine metritis in horses and donkeys, of experimental assays as well as of two positive cases from the diagnostic showed that this PCR-assay can be used to identify and to detect strains of *T. equigenitalis.* In addition, preliminary results indicate that the method is also applicable for direct *in vitro* establishment of the presence of *T. equigenitalis* in clinical samples.


***Key words: Taylorella equigenitalis* – CEM – PCR – diagnostic**

## Einleitung

Die ansteckende Gebärmutterentzündung der Pferde und Esel, in englischer Sprache Contagious Equine Metritis (CEM) genannt, ist eine bakteriell bedingte Genitalinfektion und wird durch *Taylorella equigenitalis* verursacht. Diese Erkrankung ist erstmals 1977 in England beschrieben worden (Crowhurst, 1977). Die taxonomische Stellung des Erregers war lange unklar, das Bakterium wurde zuerst von Taylor et al. (1978) als *Haemophilus equigenitalis* benannt, und dann neu auf Grund der DNA Basen Zusammensetzung und Daten von DNA-DNA Hybridisierungen als neue Gattung *Taylorella*, Spezies *Taylorella equigenitalis*, bezeichnet (Sugimoto et al., 1983). *Taylorella equigenitalis* verursacht bei der Stute eine akute Endometritis mit je nach Schweregrad serösem bis mukopurulentem Vaginalausfluss, Unfruchtbarkeit und Frühaborten (Timoney et al., 1978). Die Symptome treten kurz nach dem Deckakt auf. Bei Hengsten werden keine klinischen Symptome beobachtet (Powell D.G., 1981). Bei *T. equigenitalis* handelt es sich um ein gramnegatives, kokkobazilläres, unbewegliches,

nichtfermentatives Stäbchen, einzig eine Katalase, Phosphatase und Oxydase sind vorhanden (Taylor et al., 1978).
Die Probenentnahme für bakteriologische Untersuchungen erfolgt bei der Stute mittels Tupfer in der Fossa clitoridis, in der Cervix uteri und im Corpus uteri, beim Hengsten im Präputium, in der Fossa urethralis und in der Urethra. Wichtig für die Isolierung ist das Verwenden von geeigneten Transportmedien (Tupfer in kohlehaltigem Medium). Die Züchtung erfolgt unter mikroaerophilen Bedingungen (5–10% $CO_2$-Atmosphäre) bei 37 °C während mindestens 48–72 Stunden (Endablesung nach 6 Tagen) auf Schokolade- oder Eugon-Agar supplementiert mit Antibiotika. Die Identifikation basiert auf Immunfluoreszenzmikroskopie oder Objektträger-Agglutination mittels eines spezifischen Antiserums. Trotz der Verwendung von Spezialnährböden und der Zugabe von verschiedenen Antibiotika wächst aufgrund einer starken Kontamination der Entnahmestellen in der Kultur eine Mischflora, die einerseits das langsame Wachstum von *T. equigenitalis* hemmt und andererseits das Erkennen des Keimes beeinträchtigt. Da die traditionellen Kultur- und Identifikationsmethoden viel Erfahrung voraussetzen und so für die Untersuchungslaboratorien einen Unsicherheitsfaktor darstellen, prüften wir im Rahmen eines Überwachungsprogrammes die Anwendung einer Polymerasekettenreaktion (PCR), unter der Verwendung der DNA-Sequenz des *rrs* Genes, das für die 16S rRNA codiert (Bleumink-Pluym et al., 1993). Diese Methode wurde für die Identifikation von verdächtigen Isolaten und die Suche von *T. equigenitalis* in Mischkulturen angewendet. Die Studie sollte auch die Grundlagen für den Direktnachweis des Erregers in klinischem Material schaffen.

## Material und Methoden

### Bakterienstämme

In der Tabelle 1 sind die getesteten Stämme von *T. equigenitalis* aufgeführt.
Als Kontrolle für die Spezifität der Methode wurden 10 Stämme von *Bordetella bronchiseptica*, phylogenetisch eng verwandt mit *T. equigenitalis*, verwendet: Nr. 361 isoliert aus Kaninchen, Nr. 4424 aus Schwein, Nr. 835 aus Katze, Nr. 277 aus Hund (Isolate von Prof. Knud B. Pedersen, National Veterinary Laboratory, Kopenhagen, Dänemark), D 1482/66 (Isolat, unser Institut), D 25/64 (Isolat, unser Institut), D 1961/68 (Isolat, unser Institut), D 65/94 (Pferd, unser Institut), D 570/94 (Pferd, unser Institut), S 115/94 (Schwein, unser Institut).

### Diagnostisches Untersuchungsmaterial

Tupferproben in Transportmedium (mit Holzkohle, Transwab[R] MW 171, Medical Wire and Equipment Co. Ltd., Corsham, Wilts., England) von 19 Hengsten und 3 Stuten (insgesamt 22 Fälle mit 68 Tupferproben), welche im Rahmen der Überwachung der ansteckenden Gebärmutterentzündung der Pferde und Esel (Eidgenössische Tierseuchenverordnung Artikel 59) untersucht wurden.
Proben von 8 infizierten Stuten, die anlässlich einer experimentellen Infektion (Vanat, 1990) gewonnen wurden. Das Untersuchungsmaterial wurde mittels Salivetten (Watterollen) bei den Stuten in der Vagina und in der Cervix uteri entnommen, danach mit 2 ml Phosphatpuffer eluiert, zentrifugiert (3000 × g während 10 Minuten bei 4 °C) und das Sediment in PBS bei -20 °C gelagert.

*Tabelle 1: Verwendete Stämme von* Taylorella equigenitalis

| Identifikation | Quelle der Isolierung |
|---|---|
| ZH 1205/89 Sr * | Dr. L. Corboz, Inst. f. Veterinärbakteriologie, Zürich, CH |
| 485/89 | Dr. G. Stucker, Diavet, Bäch, CH |
| FR/89 | Prof. J.H. Penseyres, Kant. Vet.-Amt Fribourg, CH |
| Glovelier/88 | Inst. f. Veterinärbakteriologie, Bern, CH |
| D 2945/88 | Inst. f. Veterinärbakteriologie, Bern, CH |
| D 4862/88 | Inst. f. Veterinärbakteriologie, Bern, CH |
| D 2873/88 | Inst. f. Veterinärbakteriologie, Bern, CH |
| D 4164/88 | Inst. f. Veterinärbakteriologie, Bern, CH |
| D 1951/88 | Inst. f. Veterinärbakteriologie, Bern, CH |
| D 2580/88 | Inst. f. Veterinärbakteriologie, Bern, CH |
| D 4290/88 | Inst. f. Veterinärbakteriologie, Bern, CH |
| CEM19/94 (Ponyhengst) | Inst. f. Veterinärbakteriologie, Bern, CH |
| CEM208/94 (Importhengst) | Inst. f. Veterinärbakteriologie, Bern, CH |
| England A | Dr. Mary McIntosh, Newmarket, England |
| England B | Dr. Mary McIntosh, Newmarket, England |
| England EC | Dr. Mary McIntosh, Newmarket, England |
| England R | Dr. Mary McIntosh, Newmarket, England |
| England V | Dr. Mary McIntosh, Newmarket, England |
| USA Kystrain Sr * | Prof. P.J. Timoney, Lexington, Kentucky, USA |
| USA 3056 | Prof. P.J. Timoney, Lexington, Kentucky, USA |
| 11184 | NCTC (National Collections of Type Cultures, London, England) |

* Sr Streptomycin-resistenter Stamm

### Kulturelle Isolierung von *T. equigenitalis*

Für die Isolierung wurden zwei Nährböden verwendet: Schokolade-Agar mit 10% «schokoladisiertem» (bei 80 °C erhitztem) Pferdeblut, supplementiert mit Streptomycin (200 µg/ml) und Actidion (100 µg/ml), sowie Eugon Agar mit 10% «schokoladisiertem» Pferdeblut, supplementiert mit Trimethoprim (40 µg/ml), Clindamycin (200 µg/ml), Amphotericin B (200 µg/ml). Dieser Agar dient zur Erfassung Streptomycin-empfindlicher Stämme.
Die Tupfer wurden ausgestrichen und die Platten während 6 Tagen bei 37 °C in 5% $CO_2$-Atmosphäre bebrütet.

Die Ablesung der Platten erfolgte jeweils am 3. und 6. Tag nach der Beimpfung. Die Identifikation von *T. equigenitalis* erfolgte durch folgende kulturelle Eigenschaften: Oxidase-Reaktion, Katalase-Reaktion, Gramfärbung, Umzüchtung und Kultivierung sowohl in aerober- als auch in 5% $CO_2$-Atmosphäre, Objektträger-Agglutination und Immunfluoreszenz mit spezifischem Antiserum (Von Kaninchen, immunisiert mit dem Referenzstamm *T. equigenitalis* NCTC 11184).

### Wiederauffindungsversuche

Der Referenzstamm (NCTC 11184) aus Schokolade-Agar Kultur wurde in sterile, physiologische NaCl suspendiert und in einer 10er Verdünnungsreihe titriert. Von den einzelnen Verdünnungen wurde eine PCR-Analyse und parallel dazu eine Keimzahlbestimmung auf Schokolade-Agar durchgeführt. Weiter wurden Tupfer in jede einzelne Verdünnung eingetaucht und anschliessend während 48 Stunden im Transportmedium (Transwab$^R$ MW 171) bei Raumtemperatur gelagert. Von diesen Tupfern wurde direkt eine PCR-Analyse sowie eine Kultur auf Schokolade-Agar durchgeführt.
Um eine Mischinfektion zu simulieren, wurde eine konstante Keimzahl ($10^{10}$ Keime/ml) von zwei häufig vorkommenden Kontaminanten, die auch kulturell *T. equigenitalis* gleichen (gramnegativ und grampositiv, beide Oxidase positiv, aber nicht weiter identifiziert), in der Titration verwendet und zusammen mit dem austitrierten Referenzstamm von *T. equigenitalis*, in einer Keimzahl von $10^8$ Keimen/ml bis zu 10 Keimen/ml, suspendiert. Wiederum wurden die einzelnen Verdünnungen in der PCR-Analyse getestet. Zur Erstellung von künstlich infizierten Tupferproben wurden Tupfer in jede einzelne Verdünnung eingetaucht und anschliessend während 48 Stunden im Transportmedium (Transwab$^R$ MW 171) bei Raumtemperatur gelagert. Von diesen Tupfern wurde direkt eine PCR-Analyse und eine Kultur auf Schokolade-Agar und auf Eugon-Agar durchgeführt.

### Vorbereitung der Proben für die PCR-Analyse

Die Lysate für die PCR-Analyse der Kulturen von Tupferproben des diagnostischen Untersuchungsmaterials, sowie die Lysate der Titrationsreihen der Wiederauffindungsversuche mit dem Referenzstamm von *T. equigenitalis* in Mischung mit zwei Kontaminanten, wurden wie folgt zubereitet: Nach einer Inkubationszeit von 6 Tagen wurden von beiden Nährböden jeweils ca. 10 Kolonien von der Mischkultur (An der Stelle beim Übergang vom Rasen zu den Einzelkolonien) in 450 µl Lysispuffer (10 mM Tris-HCl pH 9,0, 50 mM KCl, 0,01% [w/v] Gelatine, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,1% Triton X-100, 1,7 µM SDS, 0,05 mg/ml Proteinase K, 32 mM 1,4 Dithiothreitol) suspendiert und lysiert. Die Lysierung erfolgte durch eine Inkubation während 60 Minuten bei 37 °C. Für die Inaktivierung der Proteinase K wurde danach das Lysat während 5 Minuten bei 95 °C erhitzt.

Von den Reinkulturen auf Schokolade-Agar oder auf Eugon-Agar der Stämme von *T. equigenitalis*, der Stämme von *B. bronchiseptica* und den Stämmen verschiedener Spezies wurden nach einer Inkubationszeit von 6 Tagen jeweils 2–3 Kolonien in 450 µl Lysispuffer suspendiert und lysiert. Zudem wurden 50 µl von jeder Verdünnung der Titrationsreihen der Wiederauffindungsversuche in 450 µl Lysispuffer pipettiert und lysiert. Die Tupferproben aus den Titrationsreihen der Wiederauffindungsversuche wurden nach der 48stündigen Lagerung im Transportmedium bei Zimmertemperatur in 450 µl Lysispuffer eluiert und lysiert. Aus dem Eluat der Salivetten der experimentellen Infektion wurden 40 µl des Sediments in 400 µl Lysispuffer verbracht und lysiert.

### DNA-Methoden

Die PCR-Reaktion erfolgte in einem automatisierten Thermocycler (Perkin-Elmer Modell 9600). Die verwendeten Oligonukleotid-Primer basieren auf der DNA-Sequenz des *rrs* Genes von *T. equigenitalis*, das für die 16S rRNA kodiert (Genbank X 68645; Bleumink-Pluym et al., 1993): Primer 1 (Positionen 48 bis 67), TAAGGAGAGCTTGCTTTTCT; Primer 2 (Positionen 458 bis 439), AGCAGTCCATGGTATTAACA. Die Länge des Amplifikationsproduktes beträgt 410 Basenpaare. Die Reaktionen wurden in einem Volumen von 50 µl durchgeführt: 2,5 µl Lysat wurden zu 47,5 µl *Taq*-PCR Mix zugegeben (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 0,005% Tween 20, 0,005% NP-40 Detergens, jeweils 170 µM von jedem dNTP, jeweils 0,25 µM der Oligonukleotid-Primer). Pro Reaktion wurden 1,25 Einheiten *Taq* Polymerase (Boehringer Mannheim, Deutschland) zugegeben. Folgende Zeiten und Temperaturen wurden für die Amplifikation gewählt: die Denaturierung erfolgte während 30 Sekunden bei 94 °C, die Anlagerung während 30 Sekunden bei 52 °C, die Elongation während 30 Sekunden bei 72 °C. Total wurden 35 Zyklen durchgeführt. 10 µl des PCR-Produktes wurden auf einem 1% Agarose Gel (Multi purpose agarose, Boehringer Mannheim, Deutschland) analysiert, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter Ultraviolett Licht sichtbar gemacht. Als Molekulargewichtsstandard wurde λ Phag DNA, welche mit dem Restriktionsenzym *Hind*III verdaut wurde, verwendet.
Die PCR-Produkte mehrerer Stämme von *T. equigenitalis* wurden mit dem Restriktionsenzym *Sau*3A verdaut und auf einem 3% Agarose Gel (MetaPhor™ Agarose, FMC BioProducts, Rockland, USA) analysiert, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter Ultraviolett Licht sichtbar gemacht.

## Resultate

### Identifikation von *T. equigenitalis* aus Kulturen

Die Reinkulturen der verschiedenen Stämme von *T. equigenitalis*, sowohl die Streptomycin-resistenten als auch

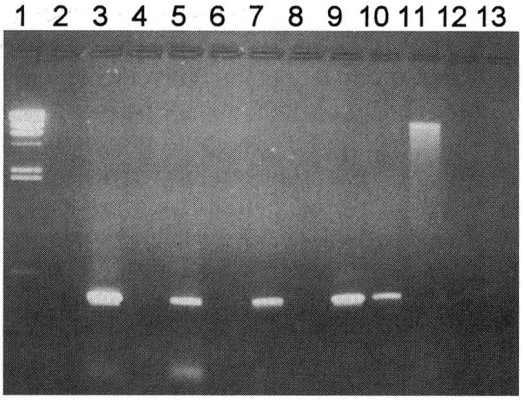


*Abbildung 1: Agarose Gelelektrophorese von PCR-Produkten: Reinkulturen verschiedener Stämme von* T. equigenitalis, B. bronchiseptica *und von Kontaminanten: 1. Molekülargewicht Standard, λ Phag DNA verdaut mit* HindIII *(23,1 kb, 9,4 kb, 6,6 kb, 4,4 kb, 2,3 kb, 2,0 kb, 0,56 kb). 2.-8. Verschiedene Stämme von* T. equigenitalis: *2. Referenzstamm der NCTC (11184). 3. Isolat aus der Schweiz (Glovelier/88,Streptomycin-empfindlich). 4. Isolat aus der Schweiz (ZH 1205/89, Streptomycin-resistent). 5. Isolat aus den USA (3056, Streptomycin-empfindlich). 6. Isolat aus den USA (Kystrain, Streptomycin-resistent). 7. Isolat aus England (England A). 8. Isolat aus England (England B). 9.* B. bronchiseptica *(D 65/94). 10. und 11. Zwei Kontaminanten. 12. Kontrolle mit Lysispuffer. 13. Kontrolle mit $H_20$.*

die Streptomycin-empfindlichen, zeigten alle bei der PCR-Analyse ein Amplifikationsprodukt von 410 Basenpaaren (Abbildung 1). Die Restriktionsenzymverdauung der PCR-Produkte mit dem Enzym *Sau*3A der fünf Stämme aus England, der zwei Stämme aus den USA, drei in der Schweiz isolierter Stämme und des Referenzstammes (NCTC 11184) ergab ein identisches Profil, das der Sequenz des rrs Genes entspricht. Es bestand kein Unterschied zwischen den Streptomycin-resistenten und den Streptomycin-empfindlichen Stämmen.
Stämme von *B. bronchiseptica* ergaben mit den verwendeten Primern ein unspezifisches Amplifikationsprodukt von 20 000 bp, welches eindeutig von der spezifischen Bande von 410 bp unterscheidbar war.
Die Bestimmung der Sensitivität der PCR-Methode in Suspensionen mit dem NCTC Referenzstamm ergab eine Nachweisgrenze zwischen 50 und 500 Keimen an *T. equigenitalis*, auch in Anwesenheit von Kontaminanten.
Die PCR-Analyse von den Mischkulturen auf Schokolade- und Eugon-Agar aus den verschiedenen Verdünnungen der Wiederauffindungsversuche ergab, wie in allen Fällen mit Taylorella in Suspension, eine positive Amplifikation von *T. equigenitalis*. Der Vergleich der Identifikation von *T. equigenitalis* aus diesen Mischkulturen mittels PCR-Analyse mit den traditionellen Identifikationsmethoden zeigte eine vollständige Übereinstimmung.

Zwei der 22 Fälle des diagnostischen Untersuchungsmaterials im Rahmen des Überwachungsprogrammes wurden als positiv für *T. equigenitalis* gefunden: Bei dem ersten Fall waren zwei von fünf Tupferproben sowohl kulturell als auch in der PCR-Analyse positiv; die restlichen drei Tupferproben dieses Falles waren mit beiden Methoden negativ. Bei dem zweiten Fall waren zwei Tupferproben sowohl kulturell als auch in der PCR-Analyse positiv; die dritte Tupferprobe war mit beiden Methoden negativ. Die insgesamt 120 Kulturen von 60 Tupferproben der verbliebenen 20 Fälle waren sowohl kulturell als auch in der PCR-Analyse negativ. Reinkulturen 18 verschiedener Bakterien, welche als Kontaminanten gewachsen waren, ergaben ein negatives Resultat in der PCR-Analyse.

## PCR-Direktnachweis aus diagnostischem Untersuchungsmaterial

Die PCR-Analyse von eluierten Tupferproben im Rahmen der Wiederauffindungsversuche, sowohl mit *T equigenitalis* alleine als auch in Gegenwart der zwei Kontaminanten, ergab eine positive Amplifikation mit einer Nachweisgrenze von 500 bis 5000 Keimen.
Eluate der acht Tupferproben positiver Tiere aus dem Überwachungsprogramm ergaben folgende Ergebnisse: Im ersten Fall, bei welchem zwei Tupferproben kulturell positiv waren, konnte *T. equigenitalis* direkt aus beiden

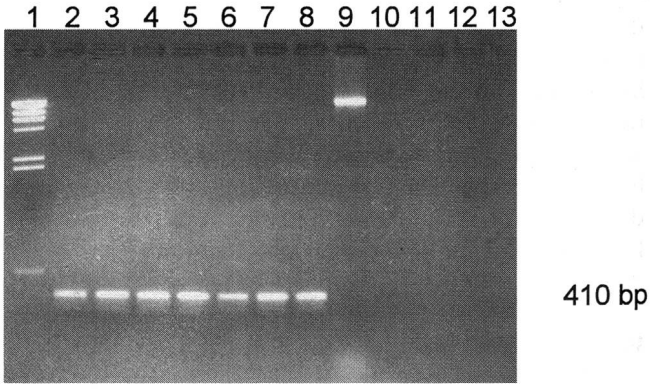


*Abbildung 2: Agarose Gelelektrophorese von PCR-Produkten direkt aus klinischem Material. Sediment von eluierten Zervix-Wattetupfern gewonnen während einer exp. Infektion: 1. Molekulargewicht Standard, λ Phag DNA verdaut mit* HindIII *(23,1 kb, 9,4 kb, 6,6 kb, 4,4 kb, 2,3 kb, 2,0 kb, 0,56 kb). 2. und 3. Pferd Nr.1: Entnahme vor bzw. nach (Tag 5) der exp. Infektion. 4. und 5. Pferd Nr.2: Entnahme vor bzw. nach (Tag 5) der exp. Infektion. 6. und 7. Pferd Nr.3: Entnahme vor bzw. nach (Tag 5) der exp. Infektion. 8. und 9. Pferd Nr.4: Entnahme vor bzw. nach (Tag 5) der exp. Infektion. 10.* T. equigenitalis *Referenzstamm der NCTC (11184). 11. B. bronchiseptica (D 65/94). 12. Kontrolle mit Lysispuffer. 13. Kontrolle mit $H_20$.*

Tupfereluaten mittels PCR-Analyse nachgewiesen werden; die restlichen drei Tupfereluate waren beim PCR-Direktnachweis negativ. Beim zweiten Fall ergab der PCR-Direktnachweis aus allen drei Tupfereluaten ein negatives Resultat.
Der PCR-Direktnachweis aus dem Material der experimentellen Infektion von 8 Stuten wurde mit dem konventionellen Kulturbefund verglichen (Abbildung 2). Das Material, welches einen Tag vor der Infektion entnommen wurde, war bei allen Tieren sowohl in der PCR-Analyse als auch in der Kultur negativ für *T. equigenitalis.* Das Material vom 5. Tag nach der Infektion war bei 5 Tieren sowohl bei der PCR-Analyse als auch in der Kultur positiv. Bei zwei Tieren ergab die PCR-Analyse ein positives Resultat, die Kultur jedoch ein negatives Resultat. Bei einem Tier waren beide Methoden negativ. Alle 8 Stuten zeigten klinische Symptome.

## Diskussion

Die vorgestellte PCR-Methode zur Identifikation von *T equigenitalis* basiert auf Oligonukleotid-Primern, welche auf der DNA-Sequenz des *rrs* Genes von *T. equigenitalis,* das für die 16S rRNA kodiert, basieren (Genbank X 68645; Bleumink-Pluym et al., 1993). Das Ziel der Untersuchung war die Eignung der Methode für die Identifikation von *T. equigenitalis* in Reinkulturen und aus Mischkulturen zu überprüfen und die Grundlagen für den Direktnachweis des Erregers in klinischem Material zu schaffen. Um die Aufbereitung der Proben so einfach und so schnell wie möglich zu gestalten, aber dennoch die Methode der PCR optimal einzusetzen, wurden die Proben in einem Lysispuffer nach einem standardisierten Protokoll lysiert. Die getesteten Stämme von *T. equigenitalis* aus den verschiedensten Gegenden (Schweiz, England, USA) und der Referenzstamm (NCTC 11 184) konnten mit der PCR-Analyse identifiziert werden.
Reinkulturen verschiedener Stämme von *B. bronchiseptica,* phylogenetisch eng verwandt mit *T. equigenitalis,* sowie zahlreiche übliche Kontaminanten ergaben ein negatives Resultat in der PCR-Analyse. Dies beweist die sehr gute Spezifität der Methode. Das unspezifische Fragment von ca. 20 000 bp, das bei *B. bronchiseptica* amplifiziert wird, wurde nicht weiter analysiert, da es sich von der spezifischen Bande bei 410 bp eindeutig unterscheiden lässt. Es ist zu erwähnen, dass ein Amplifikationsprodukt von 20 000 bp beim Gebrauch von *Taq* Polymerase kaum zu erwarten ist, doch wurde es immer mit genomischer DNA von verschiedensten *B. bronchiseptica* Stämmen aus verschiedensten Tierarten verstärkt.
Es zeigte sich weiter, dass die diagnostische Anwendung der PCR-Analyse zur Identifikation von *T. equigenitalis* aus einer Mischkultur ab Platte gleiche Resultate ergab wie die Identifikation mit den traditionellen Methoden, jedoch unter der Berücksichtigung grosser Erfahrung bei Verwendung der traditionellen Methoden. Die Sensitivität der Amplifikation aus Suspensionen war zufriedenstellend mit einer Nachweisgrenze von 50 bis 500 Keimen von *T. equigenitalis;* die Gegenwart einer massiven Kontamination beeinflusste die Sensitivität nicht.
Nach den bisherigen Erfahrungen ist die Methode der Polymerasekettenreaktion zur Identifikation von *T. equigenitalis* Stämmen und für den Nachweis von *T. equigenitalis* in Mischkulturen bei den konventionellen diagnostischen Verfahren geeignet.
Der PCR-Direktnachweis von *T. equigenitalis* aus Tupfereluaten von Suspensionen, mit *T. equigenitalis* alleine oder in Gegenwart von zwei Kontaminanten, ergab eine 10mal geringere Sensitivität im Vergleich zur Identifikation ab Reinkultur oder aus einer Mischflora ab Kultur auf Platte. Der PCR-Direktnachweis von *T. equigenitalis* aus Tupfereluaten von klinischem Material wäre wünschenswert, weil dadurch ein Zeitgewinn resultieren würde, und weil die konventionellen Methoden grosse Erfahrung voraussetzen. Erste Resultate erscheinen sehr vielversprechend. Beim Material der experimentellen Infektionen (Vanat, 1990) konnte in fast allen Fällen *T equigenitalis* direkt aus den Tupfereluaten nachgewiesen werden. Der Erfolg ist vermutlich durch die hohe Keimzahl in den Tupferproben bedingt. Die unterschiedlichen Resultate, positives Resultat im PCR-Direktnachweis hingegen negatives Resultat in der konventionellen Kultur, könnten darin begründet sein, dass die Keime abgestorben waren, ihre DNA aber noch vorhanden war. Der PCR-Direktnachweis von *T. equigenitalis* bei den zwei positiven Fällen im Rahmen des Überwachungsprogrammes gelang allerdings nur in einem Fall. Die Höhe der vorhandenen Keimzahl in den Tupferproben ist mit Sicherheit der entscheidende Faktor für den Erfolg des direkten Nachweises mittels PCR-Analyse. Zu beachten ist aber ebenso, ob erstens *T. equigenitalis* genügend aus den Tupferproben eluierbar ist und zweitens die angewendete Methode der Lysierung optimal ist. Der PCR-Direktnachweis aus klinischem Material bedarf einer passenden Methode zur Aufarbeitung der bakteriellen DNA und ist daher noch Gegenstand weiterer Untersuchungen. Die bisherigen Resultate zeigen jedoch gute Voraussetzungen für diese Anwendung in der Zukunft.

## Literatur

*Bleumink-Pluym N.M.C., Van Dijk L., Van Vliet A.H.M., Van der Giessen J.W.B., Van der Zeijst B.A.M.* (1993): Phylogenetic position of *T. equigenitalis* determined by analysis of amplified 16S ribosomal DNA sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. *43*, 618–621.

*Crowhurst R.C.* (1977): Genital infection in mares. Vet. Rec. *100*, 476.

*Croxton-Smith P., Benson J.A., Dawson F.L.M., Powell D.G.* (1978): A complement fixation test for antibody to the contagious equine metritis organism. Vet. Rec. *103*, 275–278.

*Powell D.G.* (1981): Contagious Equine Metritis. Adv. Vet. Sci. Comp. Med. *25*, 161–184.

*Sugimoto C., Isayama Y., Sakazaki R., Kuramochi S.* (1983): Transfer of *Haemophilus equigenitalis* Taylor et al. 1978 to the Genus *Taylorella* gen. nov. as *Taylorella equigenitalis* comb. nov. Curr. Microbiol. *9*, 155–162.

*Taylor C.E.D., Rosenthal R.O., Brown D.F.J., Lapage S.P., Hill L.R., Legros R.M.* (1978): The causative organism of contagious equine metritis 1977: proposal for a new species to be known as *Haemophilus equigenitalis*. Equine Vet. J. *10*, 148–152.

*Timoney P.J., Ward J., Mc Ardle J.F.* (1978): C.E.M. and the foaling mare. Vet. Rec. *102*, 246–247.

*Vanat I.* (1990): Evaluation d'un test ELISA pour le diagnostic de la métrite contagieuse équine. Vet.-Med. Diss. Bern.

*Korrespondenzadresse: Prof. J. Nicolet, Institut für Veterinärbakteriologie, Länggassstrasse 122, CH-3012 Bern*

DIE EDV-LÖSUNG FÜR GROSS- UND KLEINTIERPRAXEN:

OBLONDATA

DOS, MAC, WINDOWS.

Deutsch, Français, Italiano. Vielseitig, einfach, übersichtlich
...besser.

«DER SERVICE ENTSCHEIDET»

Amacker & Partner
INFORMATIK

Amacker & Partner, Aemtlerstrasse 30, CH-8003 Zürich, **Telefon: 01/463 12 36** - Telefax: 01/463 18 53