

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

**Entwicklung molekularbiologischer Nachweisverfahren zur
Lebend-Tot-Differenzierung von Bakterien des
Mycobacterium-tuberculosis-Komplexes in Lebensmitteln unter
besonderer Berücksichtigung der Gefährdungsbeurteilung von
Wildbret**

von Sonja Maria Rempel

aus Karlsruhe

München 2016

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis

Mitbetreuung durch
Priv.-Doz. Dr. Karin Schwaiger

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis

Korreferent/en: Prof. Dr. Armin M. Scholz

Tag der Promotion: 16. Juli 2016

Meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	aqua destillata
BCG	Bacille Calmette-Guérin
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
C	Cytosin
cm	Zentimeter
Ct	Cycle threshold
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DVC	Direct viable count
EFSA	European Food Safety Authority
EG	Europäische Gemeinschaft
EMA	Ethidium Monoazid
EMIDA	Emerging and Major Infectious Diseases of Livestock
ERA-Net	European Research Area-Net
et al.	(lat.) und andere
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
G	Guanin
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
HELI	hypothetische Helikase
IAC	Interne Amplifikationskontrolle (internal amplification control)
IS	Insertionselement
IST	internal transcribed spacer
KbE	Kolonie-bildende Einheiten
LED	light-emitting diode
LGL	Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
log ₁₀	dekadischer Logarithmus
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOTT	Mycobacteria other than tuberculosis
mRNA	messenger ribonucleic acid

MTC	<i>Mycobacterium-tuberculosis</i> -Komplex (<i>Mycobacterium-tuberculosis</i> -complex)
NASBA	nucleic acid sequence based amplification
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
NTM	nicht tuberkulöse Mykobakterien
OD	optische Dichte
p-Wert	Signifikanzwert
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
pH	potentia hydrogenii
PMA	Propidium Monoazid
RD	region of difference
RFU	Relative Fluoreszenzeinheit (relative fluorescence unit)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure (ribosomal ribonucleic acid)
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (reverse transcription polymerase chain reaction)
S	Svedberg
spp.	Spezies
StMUG	Bayerisches Staatsministerium für Umwelt und Gesundheit
subsp.	Subspezies
T	Thymin
Tab.	Tabelle
U	Umdrehung
UV	Ultraviolett
v-PCR	viability polymerase chain reaction
VBNC	viable but non-culturable
VO	Verordnung
WHO	World Health Organization
Δ	Delta: Symbol für die Differenz
°C	Grad Celsius
λ	Lambda
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
§	Paragraph

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literatur.....	3
2.1	Mykobakterien	3
2.1.1	Taxonomie und Eigenschaften	3
2.1.2	<i>Mycobacterium-tuberculosis</i> -Komplex (MTC).....	4
2.1.2.1	Mykobakterien des MTC.....	4
2.1.2.2	Vorkommen und Bedeutung	5
2.1.2.3	Pathogenese und Tenazität	6
2.1.2.4	Zoonotisches Potential	7
2.2	Rindertuberkulose beim Rotwild	9
2.2.1	Verbreitung	9
2.2.2	Pathologische Veränderungen und Besonderheiten	11
2.2.3	Bedeutung für den Verbraucherschutz	12
2.3	Nachweis von Erregern des <i>Mycobacterium-tuberculosis</i>-Komplexes in Fleisch ..	13
2.3.1	Mikroskopischer Nachweis	13
2.3.2	Kultureller Nachweis	13
2.3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	14
2.4	Lebend-Tot-Differenzierung von Bakterien	17
2.4.1	Kriterien zur Lebend-Tot-Differenzierung von Bakterien	17
2.4.2	Molekularbiologische Methoden	18
2.4.2.1	RNA-Nachweis	18
2.4.2.2	Nachweis der Membranintegrität	19
2.5	Verwendung der viability-PCR (v-PCR) für den Nachweis von Lebensmittelerregern	21
3	Material und Methoden	23
3.1	Material	23
3.1.1	Bakterienstamm	23
3.1.2	Fleischproben	23
3.1.3	Nährmedien.....	24
3.1.4	Chemikalien und Enzyme	25
3.1.5	Lösungen und Puffer	26

3.1.6	Primer	27
3.1.7	Labor-Kits.....	28
3.1.8	Verbrauchsmaterialien.....	28
3.1.9	Geräte.....	29
3.1.10	Software	30
3.2	Methoden.....	31
3.2.1	Etablierung der Propidium Monoazid Real-Time PCR zur Lebend-Tot-Differenzierung von Bakterien des <i>Mycobacterium-tuberculosis</i> -Komplexes in Wildbret.....	31
3.2.1.1	Anzucht von <i>Mycobacterium bovis</i> Bacille Calmette-Guérin-Pasteur	31
3.2.1.2	OD-Messung	31
3.2.1.3	Keimzahlbestimmung	31
3.2.1.4	Abtötung von <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur	31
3.2.1.5	Optimierung der Propidium Monoazid Behandlung zur Lebend-Tot-Differenzierung von <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur	32
3.2.1.5.1	PMA-Behandlung	32
3.2.1.5.2	DNA-Extraktion	35
3.2.1.5.3	Real-Time PCR.....	35
3.2.1.6	Anwendung der optimierten PMA Real-Time PCR auf <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur in Wildbret.....	36
3.2.1.6.1	Untersuchung des Wildbrets auf das Vorhandensein von Bakterien des <i>Mycobacterium-tuberculosis</i> -Komplexes.....	36
3.2.1.6.2	Unterdrückung der DNA-Amplifizierung von abgetöteten <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur Keimen in Wildbret durch die PMA-Behandlung in Abhängigkeit der KbE/ml	36
3.2.1.6.3	Eignung der PMA-Real-Time PCR zur Differenzierung von unterschiedlichen Anteilen lebender und toter Mykobakterien in Wildbret	37
3.2.1.7	Ermittlung der Nachweisgrenze von <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur in artifiziell kontaminiertem Wildbret mittels Real-Time PCR	38
3.2.1.7.1	Herstellung der mit <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur artifiziell kontaminierten Fleischproben.....	38
3.2.1.7.2	Molekularbiologische Untersuchung.....	38
3.2.1.8	Statistik	39

3.2.2	Untersuchung von Wildbret vom Rotwild aus der Region Oberallgäu (Bayern) auf das Vorhandensein von Bakterien des <i>Mycobacterium-tuberculosis</i> -Komplexes	39
3.2.2.1	Kulturelle Untersuchung.....	39
3.2.2.2	Real-Time PCR.....	40
3.2.2.3	Sequenzierung	40
4	Ergebnisse	43
4.1	Keimzahl von <i>Mycobacterium bovis</i> Bacille Calmette-Guérin-Pasteur bei einer optischen Dichte von 0,1	43
4.2	Einfluss verschiedener Variablen der Propidium Monoazid (PMA)-Methode auf die Lebend-Tot-Differenzierung von <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur.....	44
4.2.1	PMA-Konzentration.....	44
4.2.2	Inkubationszeit	47
4.2.3	Bestrahlungszeit	48
4.2.4	Inkubationstemperatur	50
4.2.5	Zugabe von Substanzen zur Destabilisierung der Zellmembran von <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur.....	53
4.2.6	Zweimalige PMA-Behandlung	55
4.3	Anwendung der optimierten PMA Real-Time PCR auf <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur in Wildbret	60
4.3.1	Unterdrückung der DNA-Amplifizierung von abgetöteten <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur Keimen in Wildbret-Homogenisat durch die PMA-Behandlung in Abhängigkeit der Kolonie-bildenden Einheiten (KbE) pro ml	60
4.3.2	Eignung der PMA Real-Time PCR zur Differenzierung von unterschiedlichen Anteilen lebender und toter Mykobakterien in Wildbret.....	62
4.4	Nachweisgrenze von <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur in artifiziell kontaminiertem Wildbret mittels Real-Time PCR	65
4.5	Vorkommen von Bakterien des MTC in Wildbret von Rotwild aus der Region Oberallgäu (Bayern)	67
5	Diskussion.....	69
5.1	Etablierung der Propidium Monoazid (PMA) Real-Time PCR zur Lebend-Tot-Differenzierung von Bakterien des <i>Mycobacterium-tuberculosis</i>-Komplexes in Wildbret	69
5.1.1	Optimierung der PMA Real-Time PCR an Reinkulturen von <i>Mycobacterium bovis</i> Bacille Calmette-Guérin-Pasteur	70
5.1.1.1	PMA-Konzentration	70

5.1.1.2	Inkubationszeit	71
5.1.1.3	Bestrahlungszeit	72
5.1.1.4	Inkubationstemperatur	73
5.1.1.5	Substanzen zur Membran-Destabilisierung	74
5.1.1.6	Zweimalige PMA-Behandlung	76
5.1.1.7	Optimierung der PMA Real-Time PCR	77
5.1.2	Anwendbarkeit der optimierten PMA Real-Time PCR an <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur in Wildbret.....	78
5.1.3	Nachweisgrenze von Bakterien des MTC in Wildbret mittels Real-Time PCR ...	81
5.2	Vorkommen von Bakterien des MTC in Wildbret von Rotwild aus der Region Oberallgäu (Bayern)	82
5.3	Schlussfolgerungen	83
6	Zusammenfassung	85
7	Summary	87
8	Literaturverzeichnis	89
9	Abbildungsverzeichnis.....	107
10	Tabellenverzeichnis.....	110
11	Anhang	114
12	Danksagung	123

1 Einleitung

Die Rindertuberkulose ist eine durch *Mycobacterium (M.) bovis* und *M. caprae* - beides Erreger des *M.-tuberculosis*-Komplexes (MTC) - hervorgerufene anzeigepflichtige Tierseuche (TIERSEUCHANZV, 2014). Durch das sehr breite Wirtsspektrum von *M. bovis* und *M. caprae* können diese Erreger auch den Menschen und andere Tierarten wie z. B. Rotwild infizieren und besitzen damit zoonotischen Charakter (SCHOEPF et al., 2012). Eine Bakterienübertragung auf den Menschen kann durch den direkten Kontakt mit infizierten Tieren oder durch Lebensmittel infizierter Tiere erfolgen (TORRES-GONZALEZ et al., 2013). Deutschland gilt seit 1997 als amtlich anerkannt frei von Rindertuberkulose (ENTSCHEIDUNG, 1999/467/EG). Innerhalb der letzten Jahre wurde jedoch ein vermehrtes Wiederauftreten der bovinen Tuberkulose bei Rindern in der Alpenregion verzeichnet. Dabei wurde eine Erregerübertragung durch Rotwild über den direkten Kontakt der Tiere auf den Alpenweiden vermutet (SCHOEPF et al., 2012).

In der Jagdsaison 2011/2012 wurde von den vier Alpennationen Deutschland, Österreich, Schweiz und Italien mit dem Monitoringprogramm ERA-Net „Tuberculosis in Alpine Wildlife“ begonnen. Laut den hierbei ermittelten Ergebnissen liegt die Prävalenz von *M. caprae* bei Rotwild in der Alpenregion lokal bei über 20 % (FINK et al., 2015). Es zeigte sich zudem, dass die für eine Tuberkulose typischen pathologisch-anatomischen Veränderungen in infiziertem Rotwild häufig fehlen, so dass die Tierkörper im Rahmen der Wildbretuntersuchung als gesundheitlich unbedenklich für den Menschen eingestuft werden (BÜTTNER et al., 2013). Daher besteht die Gefahr, dass Fleisch von Tuberkulose-infizierten Tieren für den menschlichen Verzehr in den Verkehr gelangt. Das hohe Infektionsrisiko, welches beim Kontakt mit Bakterien des MTC bestehen kann, wird durch deren Einstufung in die Risikogruppe 3 biologischer Arbeitsstoffe gemäß Anhang III der Richtlinie 2000/54/EG verdeutlicht (RICHTLINIE, 2000/54/EG). Inwieweit tatsächlich eine Kontamination des Wildbrets stattfindet, ist jedoch noch unklar.

Aufgrund des besonders langsamen Wachstums von bis zu acht Wochen von Bakterien des MTC ist die als „Goldstandard“ geltende kulturelle Untersuchung für frische Lebensmittel im Verdachtsfall kaum anwendbar (TYRRELL et al., 2012). Ebenfalls etablierte, schnelle molekularbiologische Verfahren, wie z. B. die PCR, geben wiederum keinen Aufschluss

darüber, ob es sich bei einem möglichen positiven Resultat um lebende oder tote Bakterien handelt (KIM et al., 2014). Das zur Risikobewertung von Lebensmitteln relevante Kriterium in Bezug auf Bakterien ist deren infektiöses Potential. Dieses geht nur von lebenden Mikroorganismen aus (STINGL et al., 2015).

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, ein schnelles und sensitives Verfahren zur Lebend-Tot-Differenzierung von Bakterien des MTC in Wildbret zu etablieren. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, Wildbretproben unter Berücksichtigung der aktuellen epidemiologischen Situation auf das Vorkommen von Bakterien des MTC zu untersuchen, um das hiervon ausgehende Gefährdungspotential objektiv einschätzen zu können.

2 Literatur

2.1 Mykobakterien

2.1.1 Taxonomie und Eigenschaften

Die Gattung Mykobakterien gehört zur Familie der Mycobacteriaceae, die der Ordnung Actinomycetales zugeordnet wird. Mykobakterien besitzen eine stäbchenförmige Morphologie und sind unbeweglich. Das Wachstum erfolgt aerob bis mikroaerophil, wobei eine Einteilung in schnell und langsam wachsenden Arten erfolgt (ADEKAMBI et al., 2004). Die DNA ist reich an Guanin und Cytosin, der Gehalt variiert zwischen 61 % und 71 % (SHINNICK et al., 1994). Mykobakterien gehören zu den grampositiven Bakterien. Aufgrund des speziellen Aufbaus der mykobakteriellen Zellwand sind sie für die Gramfärbung allerdings eher ungeeignet (TRIFIRO et al., 1990). Im Vergleich zu anderen grampositiven Bakterien ist der Peptidoglykanschicht zusätzlich ein Polymer aus Arabinose und Galactose aufgelagert, an welche langkettige Lipide gebunden sind (Abbildung 1).

Als wichtigste Lipide sind die reichlich in der Zellwand vorkommenden Mykolsäuren zu nennen. Diese Lipide verleihen den Mykobakterien ein wachsartiges Aussehen und bedingen deren Säurefestigkeit (SILHAVY et al., 2010). Daher wird bei Mykobakterien anstelle der Gramfärbung meist die Ziehl-Neelsen-Färbung verwendet (CHEN et al., 2012). Bei dieser Färbung wird die Säurefestigkeit der Mykobakterien ausgenutzt (SHOUB, 1923).

Die Mehrheit der Mykobakterien ist apathogen bzw. opportunistisch pathogen und wird in die Gruppe der „mycobacteria other than tuberculosis“ (MOTT) bzw. „nicht tuberkulöse Mykobakterien“ (NTM) eingeordnet. Diese sind ubiquitär in der Umwelt verbreitet und leben dort hauptsächlich saprophytisch. Ein bekannter Vertreter opportunistisch pathogener Arten aus dieser Gruppe ist *Mycobacterium (M.) avium*. Zu den obligat pathogenen Mykobakterien gehört *M. leprae*, der Erreger der Lepra, sowie die Mitglieder des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes (MTC) (JAGIELSKI et al., 2014).

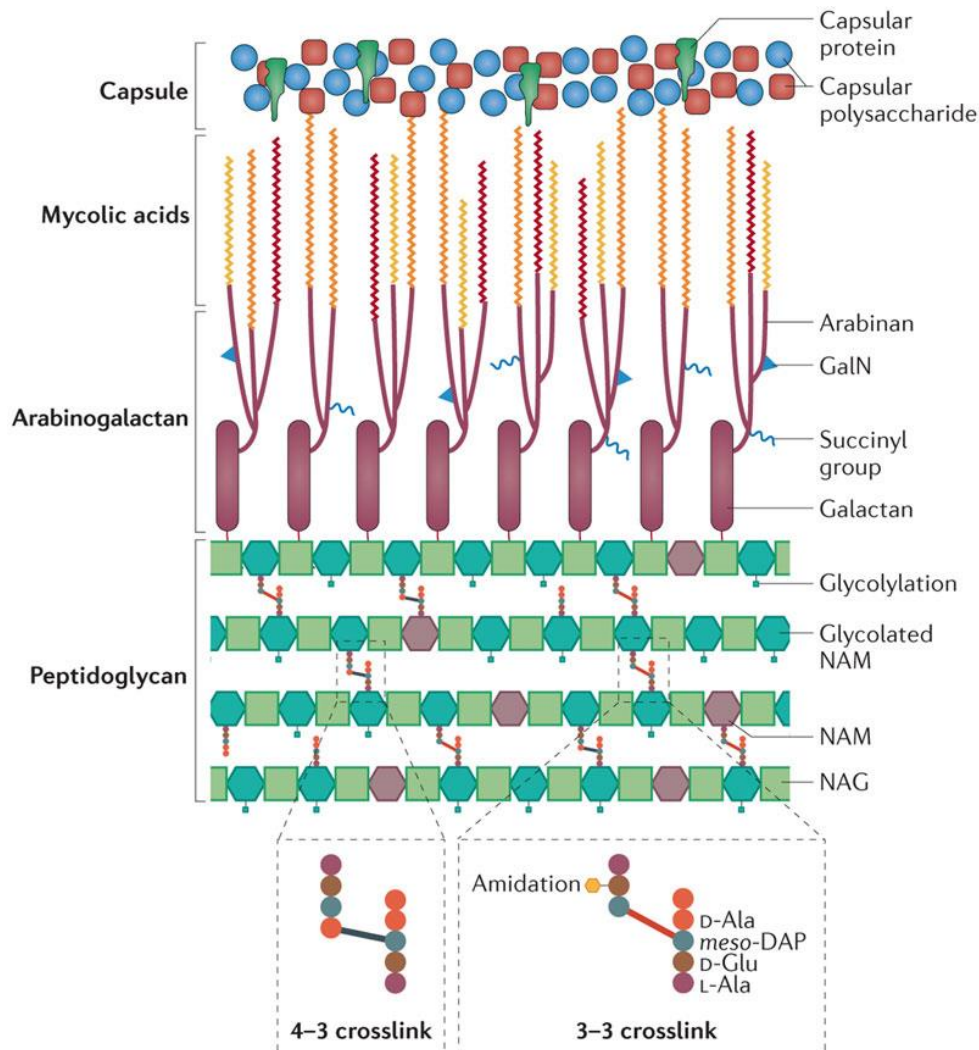


Abbildung 1: Schematische Darstellung der mykobakteriellen Zellwand (KIESER et al., 2014)

2.1.2 *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex (MTC)

2.1.2.1 Mykobakterien des MTC

Der *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex (MTC) umfasst sämtliche Mykobakterien, die bei Säugetieren Tuberkulose auslösen können. Folgende Vertreter des MTC sind bekannt (HUARD et al., 2006):

- *Mycobacterium (M.) tuberculosis*
- *M. bovis*
- *M. caprae*
- *M. bovis* Bacille Calmette-Guérin (BCG)
- *M. africanum*

- *M. canettii*
- *M. microti*
- *M. pinnipedii*

Als weitere Mitglieder des MTC werden *M. mungi* (ALEXANDER et al., 2010) und *M. orygis* (VAN INGEN et al., 2012) diskutiert. Obwohl die Mitglieder des MTC ein zu 99,9 % identisches Genom besitzen, unterscheiden sie sich in ihrer Wirtsspezifität, Pathogenität und Virulenz (BROSCH et al., 2002).

2.1.2.2 Vorkommen und Bedeutung

Mycobacterium (M.) tuberculosis ist weltweit der bedeutendste Erreger der Tuberkulose beim Menschen (WHO., 2014). Obwohl *M. tuberculosis* vor allem beim Menschen auftritt, sind durch diesen Erreger verursachte Tuberkulose-Erkrankungen gelegentlich auch bei Tieren, wie z. B. dem Rind, bekannt (THAKUR et al., 2012). Ein weiterer hauptsächlich beim Menschen vorkommender Tuberkulose-Erreger ist *M. africanum*, welcher jedoch fast ausschließlich auf die Region Westafrika beschränkt ist (ASANTE-POKU et al., 2015). In der Republik Dshibuti im Nordosten von Afrika konnte zudem *M. canettii* sporadisch als Tuberkulose-Erreger bei Menschen identifiziert werden (BLOUIN et al., 2014).

Nach dem Tierseuchenrecht gelten *M. bovis* und *M. caprae* als Erreger der Rindertuberkulose und sind anzeigepflichtig (TIERSEUCHANZV, 2014). Diese beiden Tuberkuloseerreger weisen allerdings ein sehr breites Wirtsspektrum auf. *M. bovis* wurde neben dem Rind unter anderem bei Mensch (THAKUR et al., 2012), Rotwild (LOPEZ-OLVERA et al., 2013), Rehwild, Fuchs (ZANELLA et al., 2008a), Wildschwein (MATOS et al., 2014) und Dachshund (TOMLINSON et al., 2015) gefunden. *M. caprae* wurde erst 2003 als eigene Spezies identifiziert (ARANAZ et al., 2003) und konnte unter anderem bei Rind, Wildschwein (DUARTE et al., 2008), Mensch (E. RODRIGUEZ et al., 2009), Rotwild (SCHOEPF et al., 2012), Kamel (PATE et al., 2006), Ziege (BEZOS et al., 2012) Schwein, Schaf und Fuchs (S. RODRIGUEZ et al., 2011) als Tuberkuloseerreger identifiziert werden. Bis dato wurde *M. caprae* vorwiegend aus Tieren in Deutschland, Österreich und Spanien isoliert (ARANAZ et al., 2003).

M. bovis Bacille Calmette-Guérin (BCG) ist ein im frühen 20. Jahrhundert von Albert Calmette und Camille Guérin im Institute Pasteur in Frankreich hergestellter Impfstamm gegen Tuberkulose. Die Attenuierung des Stammes wurde durch eine über 13 Jahre durchgeführte

Subkultivierung von *M. bovis* auf einem Medium aus Glycerol, Kartoffeln und Ochsen-galle erreicht. Durch kontinuierliche Subkultivierung sind inzwischen genetische Polymorphismen und dadurch verschiedene *M. bovis* BCG Stämme entstanden. Hierzu gehören beispielsweise *M. bovis* BCG-Pasteur und *M. bovis* BCG-Tokyo (SINGH et al., 2015). Die WHO empfiehlt die Impfung mit *M. bovis* BCG von Neugeborenen in Ländern, in denen hohe Tuberkulose-Prävalenzen vorherrschen. Betroffen sind hier vor allem Entwicklungsländer in Teilen Südostasiens und in Afrika südlich der Sahara (WHO, 2004). In Deutschland wird die Impfung von der Ständigen Impfkommision am Robert Koch-Institut aufgrund des geringen Ansteckungsrisikos für Tuberkulose seit 1998 nicht mehr empfohlen (ROBERT-KOCH-INSTITUT, 2014).

M. microti konnte in wenigen Fällen als Tuberkulose-Erreger beim Menschen identifiziert werden. Hauptsächlich wird dieser Erreger aber bei kleinen Nagetieren wie Wühlmäusen und Spitzmäusen gefunden (BONIOTTI et al., 2014). *M. pinnipedii* tritt vorwiegend bei Seehunden auf (LOEFFLER et al., 2014).

2.1.2.3 Pathogenese und Tenazität

Die Übertragung der Tuberkuloseerreger erfolgt über die Inhalation bakterienhaltiger Aerosole (TALIP et al., 2013), perkutan (ARA et al., 2000) oder oral (NUGENT et al., 2013). Die Krankheit kann sich als pulmonale Tuberkulose in der Lunge oder als extrapulmonale Tuberkulose in anderen Organen, der Haut, den Gelenken und Knochen sowie in den Hirnhäuten manifestieren (TALIP et al., 2013).

An der Eintrittspforte werden die Bakterien von Makrophagen aufgenommen. Mykobakterien können der Eliminierung in den Makrophagen jedoch entgehen. Hierdurch bildet sich ein Primärherd aus Mykobakterien in degenerierten Makrophagen, welche von anderen Zellen des Immunsystems umgeben werden. Der Primärherd wird zusammen mit gleichartig auftretenden Läsionen in den regionären Lymphknoten als Primärkomplex bezeichnet. Nach der Bildung des Primärkomplexes kann es zu latenten Infektionen ohne klinische Manifestation bis hin zu generalisierten Verlaufsformen, sogenannten Miliartuberkulosen, kommen. Hierbei spielt die Abwehrlage des infizierten Organismus eine entscheidende Rolle. Bei einem geschwächten Immunsystem können sich die Mykobakterien über die Blut- und Lymphbahn im Körper verteilen und in verschiedensten Geweben tuberkulöse Läsionen hervorrufen (KANEENE et al., 2004). Werden Tuberkuloseerreger von

erkrankten Organismen ausgeschieden, spricht man von einer infektiösen oder offenen Tuberkulose (PARRISH et al., 1998). Die Erregerausscheidung kann dabei je nach Manifestationsort über Aerosole der Atemluft (SMITH, 2003), Sekrete und Exkrete des Gastrointestinal- und Urogenitaltraktes (CORNER et al., 2012; PALMER et al., 2001) und über die Milch (FRANCO et al., 2013) erfolgen.

Aufgrund des speziellen Zellwandaufbaus sind Mykobakterien sehr widerstandsfähig gegenüber Umwelteinflüssen. Im Vergleich zu anderen nicht sporenbildenden Bakterien zeigen sie eine deutlich erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber Desinfektionsmitteln und Antiseptika (MCDONNELL et al., 1999). Untersuchungen mit experimentell beimpften Proben zeigten, dass *Mycobacterium bovis* bis zu 58 Tage in Wasser und bis zu 88 Tage in der Erde überleben kann. Vermehrte Sonneneinstrahlung sowie erhöhte Temperaturen verringerten dabei allerdings die Überlebensdauer der Mykobakterien (FINE et al., 2011). In Rohmilchkäse konnten Mykobakterien teilweise sogar bis zu 305 Tage überleben (ROWE et al., 2008).

2.1.2.4 Zoonotisches Potential

Die Übertragung der Tuberkulose zwischen Tier und Mensch ist grundsätzlich durch alle Mitglieder des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes (MTC) möglich. Für die meisten Vertreter des MTC sind aber nur vereinzelte Fälle beschrieben, in welchen die direkte Erregerübertragung von Tieren auf Menschen stattfand (FRITSCHKE et al., 2004; KIERS et al., 2008; PANTEIX et al., 2010). Im Jahr 2013 waren in Deutschland 97,5 % der nach Spezies differenzierten Tuberkulose-Erkrankungen bei Menschen auf *Mycobacterium (M.) tuberculosis* zurückzuführen (ROBERT-KOCH-INSTITUT, 2015). In Bezug auf Zoonosen spielt *M. tuberculosis* allerdings nur eine untergeordnete Rolle. Dieser Erreger wird hauptsächlich direkt zwischen Menschen übertragen (MORRISON et al., 2008). Das größte zoonotische Potential unter den Mitgliedern des MTC besitzen *M. bovis* und *M. caprae* (MULLER et al., 2013). Diese beiden Erreger können durch direkten Kontakt mit erkrankten Tieren oder über den Konsum von Lebensmitteln erkrankter Tiere auf den Menschen und umgekehrt übertragen werden (TORRES-GONZALEZ et al., 2013).

In der ersten Hälfte des zwanzigsten Jahrhunderts waren in Deutschland ca. 90 % der Rinderherden mit Tuberkulose infiziert. Die Rindertuberkulose wurde als eines der größten veterinärmedizinischen Probleme für das öffentliche Gesundheitswesen gesehen (MEISSNER, 1974). Ungefähr 10 % bis 30 % der humanen Tuberkulosefälle in Deutschland

waren damals auf *M. bovis* zurückzuführen (KUBICA et al., 2003). Nach Einführung der Pasteurisierung von Milch und der flächendeckenden Tuberkulin-Testung von Rindern mit anschließender Tötung positiver Reaktanten, ist die Bedeutung der Rindertuberkulose in Europa als Zoonose stark zurückgegangen (AYELE et al., 2004). Deutschland gilt mit der Entscheidung 97/76/EWG der Kommission seit 1997 als amtlich anerkannt frei von Rindertuberkulose (ENTSCHEIDUNG, 1999/467/EG). Dies bedeutet nach der Richtlinie 64/432/EWG, dass mindestens 99,9 % der Rinderbestände in sechs aufeinanderfolgenden Jahren jedes Jahr den Status der amtlich anerkannten Tuberkulosefreiheit erlangen müssen (RICHTLINIE, 64/432/EWG). Im Jahr 2013 waren noch 1,5 % der humanen Tuberkuloseerkrankungen in Deutschland auf *M. bovis* zurückzuführen.

Damit ist *M. bovis* immer noch der nach *M. tuberculosis* am zweithäufigsten identifizierte Erreger bei an Tuberkulose erkrankten Menschen in Deutschland (ROBERT-KOCH-INSTITUT, 2015). Bei diesen Fällen könnte es sich jedoch auch um alte Tuberkulose-Infektionen handeln, welche durch Altersreaktivierung oder Immunsuppression zum Ausbruch gekommen sind. Auch die Immigration Tuberkulose-infizierter Menschen aus Ländern mit hoher Rindertuberkulose-Prävalenz könnte zu den humanen Erkrankungsdaten mit *M. bovis* in Deutschland beitragen (THOEN et al., 2006). Weltweit spielt die bovine Tuberkulose eine bedeutendere Rolle als Zoonose. Vor allem in Entwicklungsländern, in welchen keine Tuberkulose-Kontrolle samt Fleischuntersuchung in Schlachthöfen und Milchpasteurisierung durchgeführt wird, ist die Rindertuberkulose weiterhin verbreitet (MULLER et al., 2013). Zudem ist eine Ansteckung mit Rindertuberkulose über Wildtiere möglich (X. J. MENG et al., 2009) (vgl. Abschnitt 2.1.2.2).

Die humanen Erkrankungsdaten durch *M. bovis* und *M. caprae* könnten höher liegen als angenommen. Häufig wird bei einer positiven Tuberkulose-Diagnose bei Menschen keine weitere Speziesdifferenzierung durchgeführt (THOEN et al., 2006). Diese Fälle fließen als *M. tuberculosis* in die Statistik ein (ACMSF, 2002).

Zudem ist bovine Tuberkulose des Menschen oft mit der extrapulmonalen Tuberkuloseform assoziiert, was auf eine orale Ansteckung über den Konsum kontaminierter Lebensmittel hinweisen könnte. Nicht alle Studien zur Speziesdifferenzierung bei humanen Tuberkulosefällen beziehen extrapulmonale Tuberkulosefälle mit ein. In solchen Studien sind die durch *M. bovis* oder *M. caprae* verursachten humanen Tuberkulosefälle prozentual

geringer vertreten als in Studien, in welchen extrapulmonale Tuberkuloseerkrankungen mit einbezogen wurden (MULLER et al., 2013). Der Anteil von *M. caprae* an humanen Tuberkulosefällen ist zudem schwer beurteilbar, da der Erreger erst seit 2003 als eigene Spezies geführt wird. Bei einer Auswertung von *M. bovis*-Humanisolaten der Jahre 1999 bis 2001 aus Deutschland erwiesen sich 31 % davon als *M. caprae*. Hierbei wurde ein deutliches Nord-Süd-Gefälle festgestellt. Mehr als 80 % der *M. caprae* Infektionen stammten aus Süddeutschland, nur in ca. 10 % der Fälle wurde *M. caprae* aus Proben aus Norddeutschland isoliert (KUBICA et al., 2003).

2.2 Rindertuberkulose beim Rotwild

2.2.1 Verbreitung

Bovine Tuberkulose ist beim Rotwild weltweit verbreitet und konnte bei diesem auf allen Kontinenten außer der Antarktis nachgewiesen werden. Hierbei sind die höchsten Prävalenzen mit teilweise bis zu 50 % bei Farmwild in Neuseeland zu finden. Bei frei lebendem Rotwild traten selten Prävalenzen von mehr als 20 % auf (MARTIN-HERNANDO et al., 2010). In Europa wird die Tuberkulose beim Rotwild auf Prävalenzen zwischen 1 % und 27 % geschätzt (WILSON et al., 2009). In Dänemark, Deutschland, Frankreich, Großbritannien, Irland, Österreich, Portugal, der Schweiz, Spanien, der Tschechischen Republik und Ungarn wurde bereits Tuberkulose bei Rotwild festgestellt. In Großbritannien ist die Verbreitung gering; bei Rotwild im Südwesten von England wurde eine Tuberkulose-Prävalenz von 1,2 % festgestellt (DELAHAY et al., 2007). Auf dem europäischen Festland hingegen ist Tuberkulose bei Rotwild häufiger zu finden. In Regionen Frankreichs und Spaniens konnten Prävalenzen von 24 % und 27 % beim dortigen Rotwild ermittelt werden (WILSON et al., 2009).

In den letzten Jahren wurden Monitoring-Programme zur Ermittlung der Tuberkulose-Prävalenz bei Rotwild in der Alpenregion durchgeführt, da dort ein vermehrtes Wiederauftreten der bovinen Tuberkulose bei Rindern beobachtet wurde (FLI, 2013). Vermutet wurde eine Erregerübertragung über Rotwild, da ein direkter oder indirekter Kontakt zwischen den Tieren auf den Alpenweiden nicht zu vermeiden ist (SCHOEPF et al., 2012). Ein epidemiologischer Zusammenhang zwischen Tuberkulose bei Wildtieren und Rindern ist bereits bekannt (O'BRIEN et al., 2011). In Deutschland wurde daher in den Jagdsaisons 2009/2010 sowie 2010/2011 das Rotwild in den bayerischen Regionen

Oberallgäu, Ostallgäu sowie Bad Tölz-Wolfratshausen auf Tuberkulose untersucht. Ab der Jagdsaison 2011/2012 wurde von den vier Alpegnationen Italien, Österreich, Schweiz und Deutschland das gemeinsame Tuberkulose-Monitoring Programm EMIDA ERA-Net „Tuberculosis in Alpine Wildlife“ entlang der Alpenkette durchgeführt. In Bayern wurden hierbei zusätzlich zu den Regionen Oberallgäu, Ostallgäu und Bad Tölz-Wolfratshausen noch die Regionen Miesbach, Garmisch-Partenkirchen, Traunstein, Rosenheim, Weilheim und Berchtesgadener Land untersucht. Das Vorkommen von *Mycobacterium caprae* beim Rotwild in einigen der untersuchten Regionen hat sich dabei bestätigt (Tabelle 1).

Unter den vier europäischen Alpegnationen war die Tuberkulose-Prävalenz beim Rotwild in Österreich mit lokal teilweise über 10 %, im oberen österreichischen Lechtal sogar mit über 20 %, am höchsten. In Bayern konnte in der an das österreichische Hot Spot Gebiet angrenzenden Region Oberallgäu/Ostallgäu eine Zunahme in der Prävalenz über die untersuchten Jagdsaisons hinweg festgestellt werden (FINK et al., 2015). In der Jagdsaison 2012/2013 lag die höchste Prävalenz in Bayern mit 5,3 % in der Region Oberallgäu. In dem direkt an das obere österreichische Lechtal angrenzenden Rappental im Oberallgäu konnte sogar eine Prävalenz von 13,7 % verzeichnet werden (BÜTTNER et al., 2013). Ab 2013 ging das Projekt über in ein durch das Bayerische Staatsministerium für Umwelt und Gesundheit (StMUG) veranlasstes bayerisches Tuberkulose-Rotwild-Monitoring entlang der bayerischen Alpenkette (LGL, 2013).

Tabelle 1: Monitoring-Ergebnisse über das Vorkommen von Tuberkulose beim Rotwild in verschiedenen bayerischen Regionen (BÜTTNER et al., 2013)

Jagdsaison	Projekt	Herkunft	Anzahl der untersuchten Tiere	Anteil positiver Tiere	
				Absolut	Relativ
2009/2010 und 2010/2011	Monitoring zur Feststellung der Verbreitung der Tbc beim Rotwild in den Lkr. OA, OAL und TÖL	OA	190	2	1,1 %
		OAL	95	0	0,0 %
		TÖL	48	1	2,1 %
		Gesamt	333	3	0,9 %
2011/2012	ERA-Net	OA + OAL	187	1	0,5 %
		TÖL, MB, GAP	91	2	2,2 %
		Gesamt	278	3	1,1 %
2012/2013 ¹	Ausgeweitetes EU-Projekt ERA-Net	Region 1: OA, OAL	528	28	5,3 %
		Region 2: TÖL, MB, GAP	225	5	2,2 %
		Region 3: TS, RO, WM, BGL	25	0	0,0 %
		Gesamt	778	33	4,2 %

¹ Stand 17. Juni 2013; Landkreisabkürzungen: OA Oberallgäu, OAL Ostallgäu, TÖL Bad Tölz/ Wolfratshausen, MB Miesbach, GAP Garmisch-Partenkirchen, TS Traunstein, RO Rosenheim, WM Weilheim, BGL Berchtesgadener Land

2.2.2 Pathologische Veränderungen und Besonderheiten

Durch Rindertuberkulose hervorgerufene Veränderungen in infiziertem Gewebe zeigen sich bei den meisten Tierarten üblicherweise in Form von Granulomen mit käsig-kalkigen Nekrosen (ZANELLA et al., 2008b). Pathologische Veränderungen sind meist an der Eintrittspforte der Erreger zu finden. Betroffen sind beim Rotwild neben den Retropharyngeallymphknoten und den abdominalen Lymphknoten vor allem auch die Tonsillen (MARTIN-HERNANDO et al., 2010). Die sichtbaren Veränderungen sind auf die Immunantwort des Organismus gegenüber der Gewebeinvasion der Bakterien

zurückzuführen (GORMLEY et al., 2006). Nicht sichtbare Tuberkuloseläsionen werden als „non visible lesions“ (NVL) bezeichnet (PARRA et al., 2008).

Mit Tuberkulose infiziertes Rotwild zeigt in der pathologisch-anatomischen Untersuchung häufig keine sichtbaren Läsionen. Sichtbare Veränderungen sind meist erst in späteren Krankheitsstadien zu finden (PALMER et al., 2002). Hier bildet Rotwild allerdings im Gegensatz zu anderen Tierarten oft sehr dünnwandige, teilweise bis zu 30 cm große Abszesse mit rahmigem Inhalt aus, ohne die sonst typischen käsige-kalkigen Nekrosen. Durch diese Abszesse neigt Rotwild zum Krankheitsbild der offenen Tuberkulose und einer damit einhergehenden Streuung der Erreger im ganzen Körper (ZANELLA et al., 2008b). Durch das relativ späte Auftreten von sichtbaren Läsionen besteht das Problem der Nichterkennung der Tuberkuloseerkrankung bei Rotwild. Dies zeigt sich daran, dass auf *Mycobacterium caprae* positiv getestetes Rotwild die Zahl der von Jägern als positiv eingestuften Tiere um ein Vielfaches übersteigt (BÜTTNER et al., 2013).

2.2.3 Bedeutung für den Verbraucherschutz

Es muss davon ausgegangen werden, dass eine Übertragung der Tuberkulose über Lebensmittel von Wildtieren stattfinden könnte (WILSON et al., 2009). Eine Ansteckung über den Konsum von Fleisch tuberkulosekranker Tiere muss generell in Betracht gezogen werden (SRIVASTAVA et al., 2008). Über Rindfleisch geht in Europa ein zu vernachlässigendes Risiko für die Ansteckung mit Tuberkulose aus (EFSA, 2003). Neben der geringen Prävalenz von Tuberkulose in den Rinderherden wird davon ausgegangen, dass die Tuberkulinisierung und die Fleischuntersuchung in den Schlachthöfen ausreichen, um das Risiko zufriedenstellend zu minimieren. An Tierkörpern müssen nach § 1 der „Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes“ bei Anwesenheit von typischen, makroskopisch sichtbaren, tuberkulösen Veränderungen weiterführende labordiagnostische Untersuchungen durchgeführt werden (vgl. Abschnitt 2.3.2 und 2.3.3) (RINDTBV, 2013). Die Beurteilung als „genusstauglich“ erfolgt nach Anhang I Abschnitt IV Kapitel IX der Verordnung (EG) 854/2004 nur bei Vorliegen eines negativen Ergebnisses (VERORDNUNG(EG)854/2004). Weist ein Tier bei der *post-mortem* Untersuchung keine auf Tuberkulose hinweisenden makroskopischen Veränderungen auf, wird das Tier als tauglich für den menschlichen Verzehr befunden. Da bei mit Tuberkulose infiziertem Rotwild häufig die typischen pathologisch-anatomischen Veränderungen fehlen, werden solche Tierkörper als gesundheitlich unbedenklich für den Menschen eingestuft. Durch das oftmalige Fehlen der sichtbaren makroskopischen Läsionen

ist davon auszugehen, dass Wildbret von mit Tuberkulose infiziertem Rotwild in den Handel gelangt (LUGTON et al., 1998).

2.3 Nachweis von Erregern des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes in Fleisch

In der Tiermedizin stehen verschiedene anerkannte Untersuchungsmethoden für den Nachweis von Bakterien des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes (MTC) zur Verfügung. Allerdings existiert keine allgemein anerkannte Methode zur Untersuchung von Fleisch auf das Vorhandensein von Tuberkuloseerregern (EFSA, 2003). Das Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) schreibt für den Nachweis von Rindertuberkulose-Erregern aus Gewebe wie Lymphknoten oder verändertem Organmaterial die „Amtliche Sammlung von Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Untersuchungsmaterial tierischen Ursprungs im Hinblick auf anzeigepflichtige Tierseuchen“ nach § 64 Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch vor (FLI, 2014; LFGB, 2015). Nach Ansicht der EFSA spricht nichts dagegen, diese Methoden an Fleisch anzupassen (EFSA, 2003).

2.3.1 Mikroskopischer Nachweis

Für den mikroskopischen Nachweis von Mykobakterien aus Gewebe werden Färbungen empfohlen, welche auf der Säurefestigkeit der Mykobakterien beruhen, wie beispielsweise die Färbung nach Ziehl-Neelsen (SINGHAL et al., 2015). Der mikroskopische Nachweis kann dabei direkt aus einem Gewebeabklatsch auf einem Objektträger durchgeführt werden und ist dadurch schnell und einfach durchzuführen. Unter dem Mikroskop wird das Vorhandensein säurefester Stäbchen nachgewiesen. Dadurch ist die Spezifität der Methode allerdings recht gering. Es ist nicht möglich, eine eindeutige Aussage über die genaue Bakterienspezies zu treffen, da unter anderem alle Mykobakterien-Arten sowie *Nocardia* spp. säurefest sind und somit durch diese Methode nachgewiesen werden (MURICY et al., 2014). Zudem ist die Sensitivität vergleichsweise gering. Für einen mikroskopischen Nachweis säurefester Bakterien sind mindestens 10^3 bis 10^4 Bakterien pro Milliliter nötig (PALOMINO, 2005). Eine Unterscheidung von lebenden und toten Bakterien ist mit dieser Methode nicht durchführbar (KIM et al., 2014).

2.3.2 Kultureller Nachweis

In der Tuberkulosedagnostik gilt der kulturelle Nachweis nach wie vor als Goldstandard (DO ROSARIO et al., 2014). Dabei kommt eine Kombination aus Flüssig- und Festnährmedien zum Einsatz. Das Wachstum der Bakterien ist in der Flüssigkultur schneller, allerdings besteht hier

im Vergleich zu Festnährmedien eine erhöhte Kontaminationsgefahr (ANTHONY et al., 2009; TYRRELL et al., 2012).

Die vom FLI in der amtlichen Methodensammlung empfohlenen Nährmedien sind die Festnährmedien Stonebrink und Löwenstein-Jensen sowie die Flüssignährmedien Kirchner und Middlebrook. Aufgrund der langen Generationszeiten der Tuberkuloseerreger kann eine Untersuchung der Proben frühestens nach acht Wochen abgeschlossen werden. Um eine Kontamination der Nährmedien mit schnellwachsender Begleitmikrobiota zu verhindern, wird das Untersuchungsmaterial vorher mit N-Acetyl-L-Cystein-NaOH (NALC) dekontaminiert (FLI, 2014). Durch die lange Dauer bis zur Ergebnisauswertung ist die kulturelle Methode jedoch ungeeignet für Proben, für welche kurzfristig ein Ergebnis benötigt wird, wie z. B. verdächtige Schlachthofproben (COURCOUL et al., 2014). Zudem können subletal geschädigte Bakterien oder Bakterien im sogenannten viable but non-culturable (VBNC) Status (vgl. Abschnitt 2.4.1) nicht kultiviert werden, wodurch die Gefahr falsch negativer Ergebnisse besteht (KANA et al., 2008).

2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist heutzutage die meistgenutzte auf Nukleinsäure basierende Methode und wird häufig zum Nachweis von Bakterien des MTC eingesetzt. In der Regel wird hierfür die Real-Time PCR verwendet (CARDOSO-TOSET et al., 2015; COSTA et al., 2015; THACKER et al., 2011). In sich wiederholenden Zyklen wird dabei die DNA von Ziel-DNA-Sequenzen vervielfältigt. Theoretisch können aus einer einzigen Ziel-DNA-Sequenz innerhalb weniger Stunden Millionen an Kopien synthetisiert werden. Die PCR wird dabei in drei Temperaturschritten durchgeführt. Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA bei einer Temperatur von 95 °C denaturiert, um Einzelstränge zu erhalten. Anschließend wird die Temperatur gesenkt (Annealing-Temperatur), damit die Primer an ihre komplementären Nukleotide der Ziel-DNA-Sequenz binden können. Daraufhin erfolgt bei einer Temperatur von 72 °C die Synthese der DNA-Stücke durch die DNA-Polymerase. Die DNA-Polymerase verlängert die Primer, indem sie Nukleotide anfügt, wodurch schließlich ein komplementärer DNA-Strang zu der Ziel-DNA-Sequenz entsteht. Der Zyklus mit den drei Temperaturschritten wird gewöhnlich 30- bis 50-mal wiederholt, wobei die synthetisierten Stränge jeweils wieder als Ziel-DNA-Sequenz dienen, von welchen komplementäre Stränge synthetisiert werden. Somit wird jeder DNA-Strang in jedem Zyklus verdoppelt, so dass die Synthese exponentiell verläuft (SWAMINATHAN et al., 1994).

Bei der Real-Time PCR erfolgt die Sichtbarmachung der Vervielfältigung der DNA durch Verwendung fluoreszenzmarkierter Sonden oder von Fluoreszenzfarbstoffen, welche an die DNA binden bzw. in die DNA eingelagert werden. Es existieren unterschiedliche Sondentypen und verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe. Gemeinsam ist allen, dass bei Vervielfältigung der DNA eine Änderung der Fluoreszenz eintritt. Diese Veränderung der Fluoreszenz wird mittels Fluoreszenzdetektoren gemessen und anhand dessen kann bestimmt werden, ob und wieviel DNA amplifiziert wurde (NAVARRO et al., 2015). Die Intensität der Fluoreszenz wird dabei als relative Fluoreszenzeinheit (RFU, engl. relative fluorescence unit) angegeben. Die Messung des Emissionsspektrums einer fluoreszierenden Verbindung ist stark von der Wellenlänge abhängig. Verschiedene Wellenlängen können nicht in gleichem Maße detektiert werden, so dass die Messung des Emissionsspektrums daher lediglich eine relative Fluoreszenzintensität als Funktion der Wellenlänge liefert (GRESSNER et al., 2012). Der sogenannte Ct-Wert (cycle threshold) gibt an, wann die Fluoreszenz erstmals exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt. Je mehr DNA in einer Probe vorhanden ist, desto früher steigt die Fluoreszenz über den Hintergrundwert an und desto niedriger ist folglich der Ct-Wert (GINGERAS et al., 2005) (Abbildung 2).

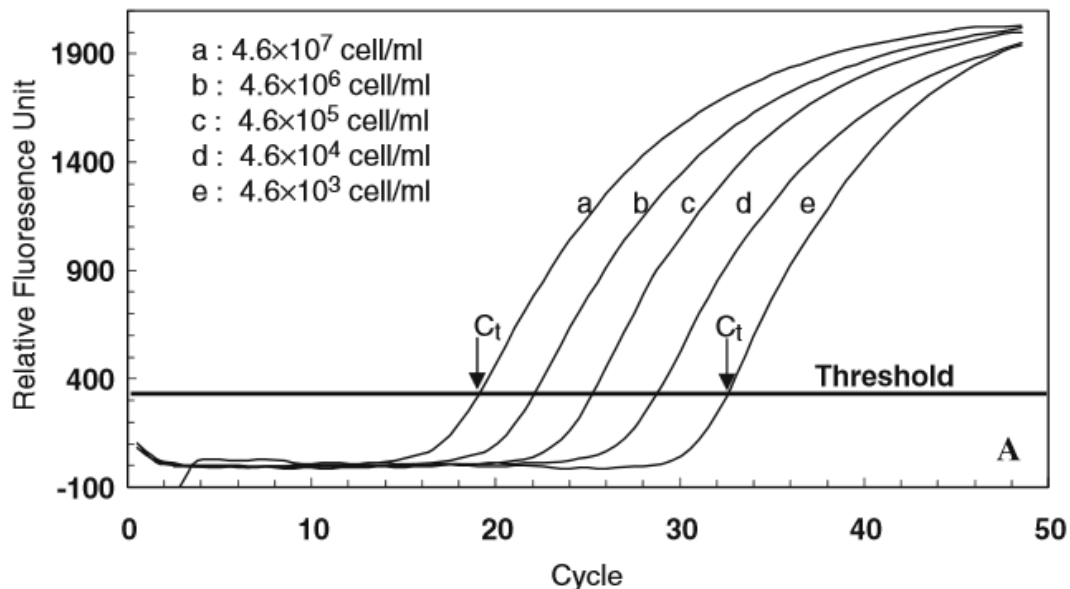


Abbildung 2: Beispiel der relativen Fluoreszenz-Intensität von fünf Verdünnungen einer Bakterienkultur (a bis e) im Verlauf der Amplifikationszyklen während der Real-Time PCR; je mehr Bakterien pro ml vorhanden sind, desto geringer ist der Ct (cycle threshold)-Wert (ZHANG et al., 2006)

Um falsch negative Resultate ausschließen zu können, sollte jedem PCR-Ansatz eine interne Amplifikationskontrolle (IAC) hinzugefügt werden. Hierbei wird parallel zu der eigentlichen Ziel-DNA-Sequenz eine zweite DNA-Sequenz mit einem dazu passenden Primerpaar hinzugegeben und amplifiziert. Kommt durch die IAC kein Fluoreszenzsignal zustande, hat die PCR nicht funktioniert. Falsch negative Resultate können zum einen durch technische Probleme, z. B. mit den Reagenzien oder den Temperaturprogrammen, bedingt sein. Zum anderen kann die PCR inhibiert werden (FLORES et al., 2009). Hierbei spielt vor allem die Inhibition der DNA-Polymerase eine Rolle. Eine ungenügende Aufreinigung der DNA und damit ein Vorhandensein von Inhibitoren wie z. B. Alkohol, Blut, Lipiden oder Proteinen kann die PCR hemmen (BAR et al., 2012).

Zum Nachweis von Bakterien des MTC eignen sich verschiedene genomische Zielsequenzen. Genabschnitte des 16S rRNA-Gens (RINGUET et al., 1999), des Insertionselements IS1081 (TAYLOR et al., 2007), der Hypothetischen Helikase (HELI) (J. G. RODRIGUEZ et al., 1995) oder der 16S-23S ITS-Region (ITS = internal transcribed spacer) (NASR ESFAHANI et al., 2012) wurden beispielsweise als Zielsequenzen für den PCR-Nachweis von Tuberkuloseerregern beschrieben. Eine Unterscheidung der einzelnen Mitglieder des MTC ist hierdurch allerdings nicht möglich, da diese genomischen Zielsequenzen eine zu große Ähnlichkeit zwischen den jeweiligen Mitgliedern des MTC aufweisen. Hierfür werden für die jeweiligen Spezies eigene DNA-Zielsequenzen verwendet, wie z. B. die region of difference 4 (RD4) für *Mycobacterium bovis* (TAYLOR et al., 2007; DOMOGALLA et al., 2013). Es sind verschiedene kommerziell erhältliche PCR-Kits zum Nachweis der Mitglieder des MTC auf dem Markt (CHO et al., 2011; COURCOUL et al., 2014; HUR et al., 2011). Das Nationale Referenzlabor für Tuberkulose des FLI hat für die zeitnahe Untersuchung von verdächtigen Gewebeprobe eine PCR mit dem Nachweis von zwei Genorten entwickelt, HELI und IS1081. Wenn beide Gensequenzen nachgewiesen werden, gilt die PCR als positiv (FLI, 2014). Die Real-Time PCR ist eine schnell durchzuführende Methode mit hoher Sensitivität und Spezifität (WATANABE PINHATA et al., 2015). Jedoch wird mit dieser Methode sowohl DNA von lebenden als auch von toten Bakterien nachgewiesen (KIM et al., 2014).

2.4 Lebend-Tot-Differenzierung von Bakterien

2.4.1 Kriterien zur Lebend-Tot-Differenzierung von Bakterien

Zur Unterscheidung von lebenden und toten Bakterien können verschiedene Kriterien herangezogen werden. Neben dem Wachstum auf Nährmedien werden die metabolische Aktivität von Zellen, das Vorhandensein von RNA und die Membranintegrität der Bakterien zur Lebend-Tot Differenzierung verwendet (Abbildung 3).

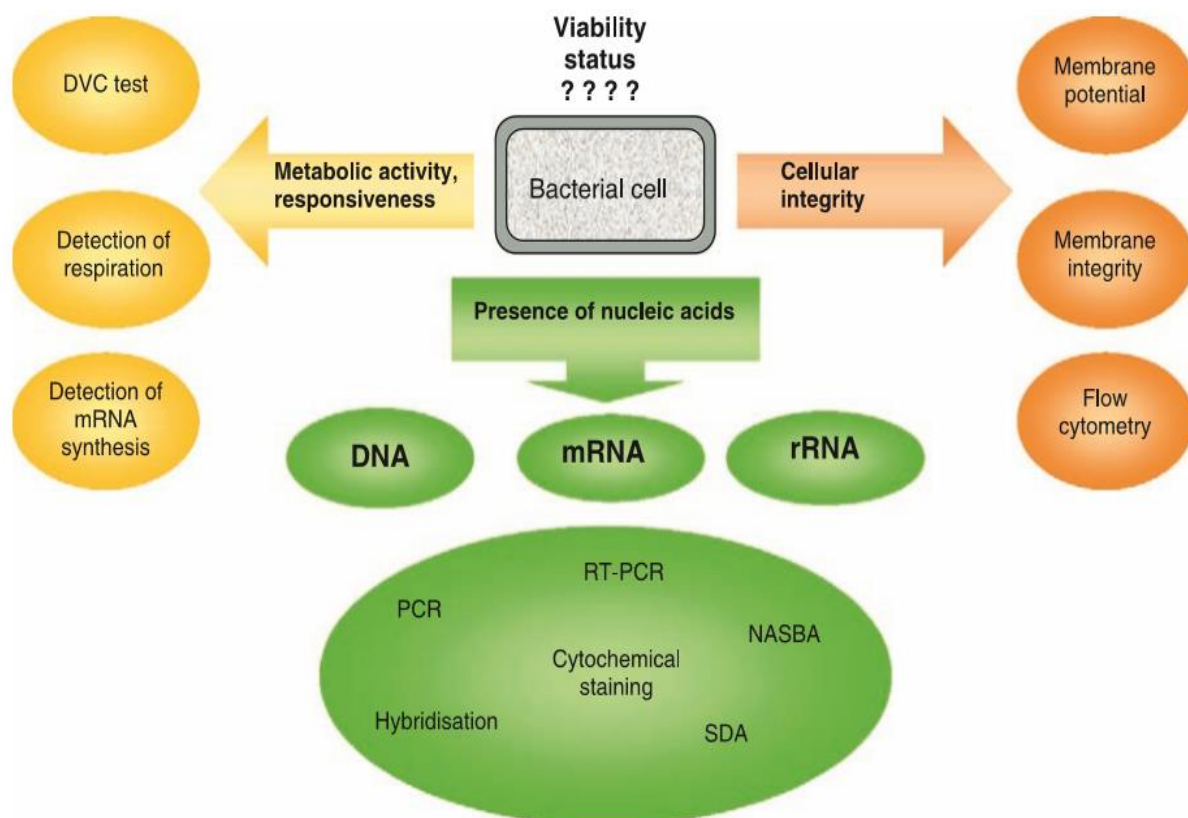


Abbildung 3: Schematische Darstellung von Methoden zur Lebend-Tot-Differenzierung von Bakterien (KEER et al., 2003)

Die Kultivierung von Bakterien auf Nährmedium galt lange Zeit als allgemein gültiges Kriterium für den Nachweis der Vitalität. Allerdings zeigen subletal geschädigte Bakterien und Bakterien im viable but non-culturable (VBNC) Status trotz vorhandener Vitalität kein Wachstum auf Nährmedien, was zu falsch negativen Ergebnissen führen kann (KEER et al., 2003). Der VBNC-Status konnte bereits für *Mycobacterium tuberculosis* beschrieben werden (OLIVER, 2010). In den VBNC-Status können Bakterien übergehen, wenn sich die

Umweltbedingungen zu ihrem Nachteil verändern. Nährstoffmangel, Änderungen der Temperatur oder des pH-Werts können so zum Beispiel den Übergang in den VBNC-Status einleiten. Dadurch können die Bakterien den nachteiligen Bedingungen entkommen. Sie zeigen dann im VBNC-Status u. a. eine zwar herabgesetzte, aber vorhandene Stoffwechselaktivität und besitzen eine intakte Zellmembran (FAKRUDDIN et al., 2013).

Zum Nachweis der metabolischen Aktivität als Vitalitätsmerkmal einer Zelle gibt es verschiedene Methoden. So kann z. B. durch die Hydrolyse des fluoreszierenden Redox-Farbstoffs 5-Cyano-2,3-ditotyltetrazoliumchlorid (CTC) respiratorische Aktivität mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops (G. G. RODRIGUEZ et al., 1992) oder Durchflusszytometers nachgewiesen werden. Da tote Bakterien metabolisch nicht mehr aktiv sind, wird der Farbstoff nicht zu fluoreszierenden Molekülen verstoffwechselt und die toten Bakterien sind somit nicht sichtbar (PINTO et al., 2015). Über das DVC-Verfahren („direct viable count“) kann ebenfalls metabolische Aktivität nachgewiesen werden. Die Bakterien werden für einige Stunden in Wasser und anschließend in einem nährstoffhaltigen Medium inkubiert. Diesem Medium ist ein DNA-Replikations-Inhibitor (z. B. Nalidixinsäure) zugegeben. Die Bakterien nehmen Nährstoffe auf und die Zellen verlängern sich, können sich allerdings nicht teilen. Die Elongation der lebenden Zellen ist unter dem Mikroskop sichtbar (BESNARD et al., 2000; KOGURE et al., 1979). Der Nachweis der metabolischen Aktivität mit CTC bzw. über das DVC-Verfahren ist unspezifisch und eignet sich daher nicht zur Differenzierung von einzelnen Bakterienspezies in Mischkulturen (MCFETERS et al., 1999).

2.4.2 Molekularbiologische Methoden

Der Nachweis von RNA sowie der Intaktheit der bakteriellen Membran zur Bestätigung der Vitalität von Bakterien kann mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden erbracht werden (KEER et al., 2003).

2.4.2.1 RNA-Nachweis

RNA wird von toten Zellen nicht mehr synthetisiert und im Gegensatz zu DNA nach dem Zelltod schnell abgebaut. Durch die geringe Halbwertszeit von RNA nach dem Zelltod weist das Vorhandensein von RNA besser auf die Präsenz von lebenden Zellen hin als die vergleichsweise länger vorhandene DNA. Insbesondere der Nachweis von mRNA wird als Vitalitätsparameter herangezogen, welche nur in metabolisch aktiven Zellen gebildet wird. Die hohe Labilität der mRNA hat allerdings wiederum den Nachteil, dass diese oft zu rasch

bei ungenügender Lagerung bzw. Bearbeitung von Proben oder einer Kontamination durch RNAsen abgebaut wird. Zudem ist die Expression von mRNA vom physiologischen Status der Zelle abhängig. Bei langsam wachsenden Bakterien kann die mRNA-Konzentration auch unter der Detektionsgrenze liegen. Durch diese Nachteile besteht die Gefahr von falsch negativen Ergebnissen. Falsch positive Ergebnisse sind ebenso möglich, wenn viele tote Bakterien in einer Probe vorhanden sind und sich dadurch noch mRNA-Reste in der Probe befinden (FITTIPALDI et al., 2012). Je nach Inaktivierungsverfahren und anschließender Art der Lagerung kann mRNA noch einige Zeit in toten Zellen persistieren (SHERIDAN et al., 1998). Der Nachweis von RNA kann durch die reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) (LI et al., 2010; MDIVANI et al., 2009) oder durch „nucleic acid sequence based amplification“ (NASBA) (COMPTON, 1991) erbracht werden.

2.4.2.2 Nachweis der Membranintegrität

Eine intakte Zellmembran wird als Kriterium zur Vitalität von Zellen verwendet (KEER et al., 2003). Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften von Zellmembranen können ionisierte Moleküle nicht durch diese diffundieren. Die Diffusion ionisierter Moleküle in Zellen ist somit ein Zeichen für eine geschädigte Zellwand und damit für den Verlust der Vitalität. Es existiert eine Reihe von fluorophoren Farbstoffen, mit deren Hilfe die Membranintegrität überprüft und dargestellt werden kann. Farbstoffe, wie z. B. Propidium Iodid, diffundieren durch geschädigte Zellmembranen und färben die Zellen hierdurch an. Diese Fluoreszenz kann in einem Fluoreszenzmikroskop oder einem Durchflusszytometer ausgewertet und daran die Vitalität der untersuchten Bakterienproben bestimmt werden (CAO-HOANG et al., 2008).

Die DNA interkalierenden Farbstoffe Ethidium Monoazid (EMA) und Propidium Monoazid (PMA) haben sich in Kombination mit der Real-Time PCR zur Lebend-Tot-Differenzierung von Bakterien als sogenannte viability-PCR (v-PCR) etabliert (FITTIPALDI et al., 2012; SOEJIMA et al., 2015). Die Farbstoffe werden den Bakteriensuspensionen vor der DNA-Extraktion zugegeben und diffundieren dann in membrangeschädigte Bakterien. Unter Photoaktivierung reagiert die Azidogruppe ($-N_3$) zu hochreaktivem Nitren, das kovalent an die DNA bindet. Durch diese irreversible Bindung an die DNA wird diese in einer anschließenden PCR nicht mehr amplifiziert (WAGNER et al., 2015) (Abbildung 4).

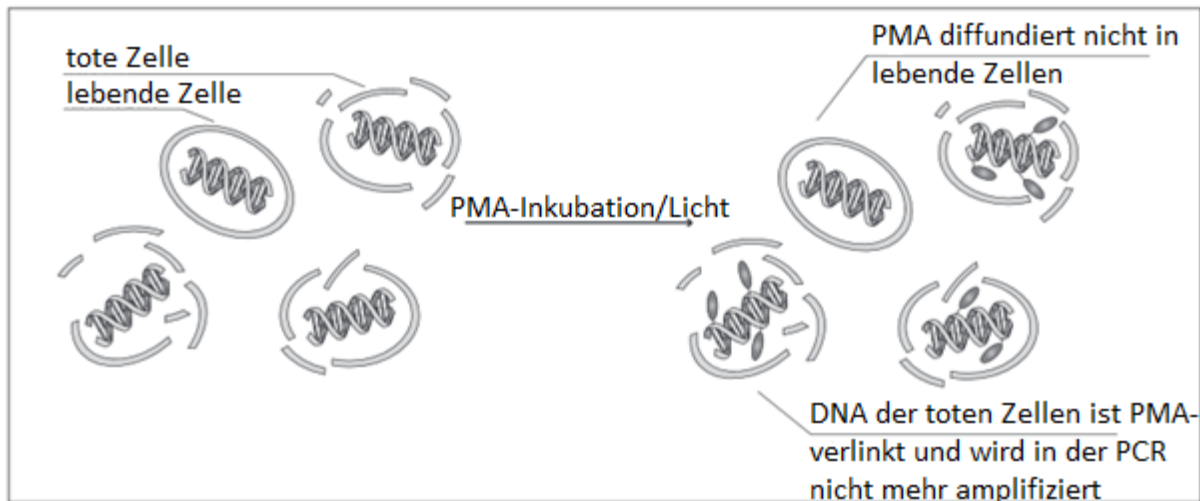


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Verlinkung der DNA membrangeschädigter Zellen mit PMA (nach DACKE et al., 2013)

Die Folge ist, dass nur noch die DNA vitaler Bakterien in der PCR vervielfältigt wird, da in diese der Farbstoff auf Grund der intakten Membran nicht diffundieren und an die DNA binden kann. EMA wird seit 2003 in Kombination mit der PCR zur Lebend-Tot-Differenzierung von Bakterien verwendet (NOGVA et al., 2003). PMA wurde 2006 als Alternative zu EMA entdeckt (NOCKER et al., 2006). Sowohl die EMA-PCR als auch die PMA-PCR wurden in den vergangenen Jahren an verschiedenen Bakterienspezies getestet und optimiert (BANIHASHEMI et al., 2012; MINAMI et al., 2012; PAN et al., 2007; XIAO et al., 2013; YANEZ et al., 2011).

Für EMA konnte eine sehr gute Diffusion in membrangeschädigte Bakterien festgestellt und die DNA-Amplifizierung toter Zellen dadurch in der PCR gut unterdrückt werden. Allerdings wurde ebenso eine erhöhte Diffusionsrate in lebende Bakterien festgestellt. Als Folge ergaben sich häufig falsch negative Ergebnisse, da die DNA-Amplifizierung in der PCR von lebenden Bakterien ebenfalls zum Teil unterdrückt wurde. Im Vergleich zu EMA zeigt PMA eine wesentlich geringere Diffusion in lebende Bakterienzellen; das bedeutet, mit diesem Farbstoff ist die Gefahr falsch negativer Ergebnisse deutlich geringer. Allerdings besteht bei PMA die Gefahr falsch positiver Ergebnisse, da PMA eine im Vergleich zu EMA geringere Diffusionsrate in membrangeschädigte Zellen aufweist. Die DNA von toten Bakterien wird dadurch trotz PMA-Behandlung in der PCR amplifiziert. Das unterschiedliche Diffusionsverhalten von PMA im Vergleich zu EMA in lebende bzw. tote Zellen wird mit der ungleichen Anzahl an positiven Ladungen der beiden Moleküle begründet. EMA verfügt über

eine einfache positive Ladung. Im Vergleich dazu ist PMA zweifach positiv geladen, wodurch die Diffusion von PMA in Zellen generell erschwert wird (NOCKER et al., 2006) (Abbildung 5). Sowohl bei EMA als auch bei PMA kann zudem durch das Vorhandensein von Schwebstoffen in der Probe und einer damit einhergehenden Trübung die Photoaktivierung negativ beeinflusst werden (WAGNER et al., 2008). Auch können Schwebstoffe den Farbstoff binden und dadurch die Diffusionsrate in die Zellen verringern (VARMA et al., 2009).

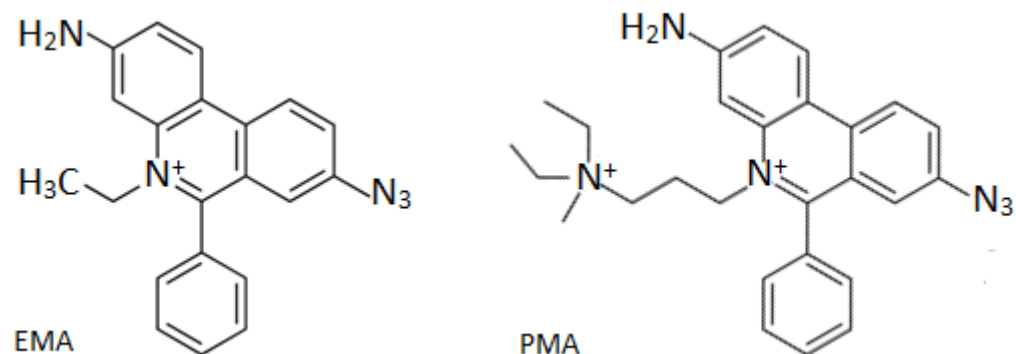


Abbildung 5: Links: Strukturformel von Ethidium Monoazid (EMA), das Molekül verfügt über eine einfache positive Ladung (nach ANONYMOUS, 2015b); rechts: Strukturformel von Propidium Monoazid (PMA), das Molekül ist zweifach positiv geladen (nach ANONYMOUS, 2015a)

2.5 Verwendung der viability-PCR (v-PCR) für den Nachweis von Lebensmittelinfektionserregern

Das zur Gefährdungsbeurteilung von Lebensmitteln relevante Kriterium in Bezug auf Bakterien ist deren infektiöses Potential. Dieses geht nur von lebenden Mikroorganismen aus (STINGL et al., 2015). Aufgrund der Dauer bis zur Ergebnisauswertung bei kulturellen Methoden wurden in den letzten Jahren vermehrt Versuche unternommen, um neue, schnellere Methoden zur Identifizierung von vitalen Bakterien in Lebensmitteln zu entwickeln. Die viability-PCR (v-PCR) unter der Verwendung von Ethidium Monoazid (EMA) bzw. Propidium Monoazid (PMA) war hierbei eine oftmals getestete Methode. Die Ergebnisse der v-PCR waren dabei unter anderem abhängig von der Probenmatrix und der jeweiligen Bakterienspezies. PCR-Inhibitoren, der pH-Wert oder die Menge an toten Bakterien in der Probenmatrix beeinflussten den Erfolg der v-PCR ebenso wie die

verwendete Konzentration von EMA und PMA oder die Temperatur während der Inkubation der Farbstoffe (ELIZAKUIVEL et al., 2014).

Die EMA-PCR wurde zur Lebend-Tot-Differenzierung von Bifidobakterien in probiotischem Joghurt (X. C. MENG et al., 2010), *Escherichia coli* in Hackfleisch (L. WANG et al., 2009) oder *Salmonella* spp. in Geflügelfleisch und Eiern (L. WANG et al., 2010) empfohlen. Für den Nachweis vitaler Bakterien wie *Staphylococcus aureus* in Milchpulver und Fleisch (Z. ZHANG et al., 2015b) oder *Vibrio parahaemolyticus* und *Listeria monocytogenes* in Meeresfrüchten (Z. ZHANG et al., 2015a) wurde die Verwendung der PMA-PCR priorisiert. Die Autoren konnten das PCR-Signal toter Bakterien durch den Einsatz der Farbstoffe vollständig unterdrücken, während lebende Zellen kaum bis gar nicht beeinflusst wurden. Auch JOSEFSEN et al. (2010) hatten mit der Verwendung von PMA bei *Campylobacter* spp. auf Geflügelschlachtkörpern eine vollständige Inhibition des PCR-Signals erreicht. Dieses Ergebnis konnten PACHOLEWICZ et al. (2013) mit ihrer Forschung allerdings nicht bestätigen. Trotz PMA-Behandlung trat ein PCR-Signal bei toten *Campylobacter* spp. auf. Die Autoren begründeten dies mit einer zu hohen Zahl toter Bakterien auf den Geflügelschlachtkörpern. LOVDAL et al. (2011) erreichten mit PMA keine vollständige Hemmung der DNA-Amplifizierung von durch Hitze abgetöteten *Listeria* spp. Daher rieten die Autoren von der Verwendung der PMA-PCR zum Nachweis lebender *Listeria* spp. in hitzebehandelten Lebensmitteln ab. Für FLEKNA et al. (2007) stellte die EMA-PCR ebenso keine geeignete Methode zur Lebend-Tot-Differenzierung der Lebensmittelinfektionserreger *Listeria monocytogenes* und *Campylobacter jejuni* dar. Der Farbstoff war hier zu stark in lebende Zellen diffundiert und hatte deren PCR-Signal gehemmt.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Bakterienstamm

Der Bakterienstamm *Mycobacterium (M.) bovis* Bacille Calmette-Guérin (BCG)-Pasteur stammte vom Nationalen Referenzzentrum für Mykobakterien, Forschungszentrum Borstel.

3.1.2 Fleischproben

Fleischproben zur Etablierung der PMA Real-Time PCR an Mykobakterien in Wildbret

Um die PMA Real-Time PCR an artifiziell mit Mykobakterien kontaminiertem Wildbret etablieren zu können, wurde Fleisch vom Rotwild aus einer Metzgerei in München bezogen. Das Fleisch stammte von freilaufendem Rotwild, welches in Niederbayern von Jägern geschossen wurde. Die Proben wurden unter Kühlung mittels handelsüblicher Kühlakkus in Kühlboxen in den Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit, Tierärztliche Fakultät der LMU München, gebracht und mittels Kultur und PCR auf Freiheit von Bakterien des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes untersucht (vgl. Abschnitt 3.2.2.1 und 3.2.2.2). Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

Fleischproben aus der Region Oberallgäu (Bayern) zur Untersuchung auf das Vorkommen von Bakterien des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes

Insgesamt wurden 50 Wildbret-Proben vom Rotwild auf das Vorhandensein von Bakterien des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes untersucht. Die Proben wurden im Zeitraum von November 2014 bis Januar 2015 aus Metzgereien der Region Oberallgäu in Bayern bezogen. Die Region Oberallgäu wurde ausgewählt, da hier im Rahmen von Monitoring-Programmen die höchste Tuberkulose-Prävalenz bei Rotwild in Deutschland entlang der Alpenkette festgestellt wurde (vgl. Abschnitt 2.2.1). Das Rotwild wurde von Jägern in der Region Oberallgäu geschossen und direkt an die Metzgereien verkauft. Die Proben wurden unter Kühlung mittels handelsüblicher Kühlakkus in Kühlboxen in den Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit, Tierärztliche Fakultät der LMU München, gebracht und dort bis zur Untersuchung im Kühlschrank bei +4 °C gelagert. Die Zeit zwischen dem Erwerb und der Untersuchung der Proben betrug dabei maximal 48 h. Sämtliche Fleischproben stammten aus der Keule der Tiere.

3.1.3 Nährmedien

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Nährmedien mit Herstellerangaben

Inhaltsstoffe	Hersteller	Artikelnummer
Middlebrook-Medium 7H9:		
4,7 g Middlebrook-7H9-Bouillon	Becton Dickinson	271310
0,05 % Tween® 80		
0,2 % Glycerin		
ad 900 ml Aqua dest.		
10 min bei 121 °C autoklavieren		
100 ml BBL Middlebrook ADC Enrichment steril zugeben	Becton Dickinson	211887
Kirchner-Bouillon mit PANTA	Artelt-ENCLIT	0128
BBL™ Seven H11 Agar (Deep Fill)	Becton Dickinson	221870
Löwenstein-Jensen-Nährboden mit Glycerol, mit PACT	Artelt-ENCLIT	0114
Stonebrink-Nährboden mit PACT	Artelt-ENCLIT	0122

3.1.4 Chemikalien und Enzyme

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Chemikalien und Enzyme mit Herstellerangaben

Chemikalie/Enzym	Hersteller	Artikelnummer
Agarose (Molecular Biology Agarose)	Bio-Rad	161-3101
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck	1065801000
DNA-Ladepuffer (DNA Electrophoresis Sample Buffer 5x)	Bio-Rad	1610767EDU
DNA-Längenstandard (EZ load 100 bp, Molecular Ruler, 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Bio-Rad	1708352
Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)	Bio-Rad	1610433
Glycerin	Merck	8187091000
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck	1048731000
Lysozym, EGG White, ultra pure grade	Amresco	0663
<i>N</i> -Acetyl-L-Cystein, $\geq 99\%$ (TLC)	Sigma-Aldrich	A7250
Natriumchlorid (NaCl), $\geq 99,5\%$	Roth	3957.2
Natriumhydroxid (NaOH), $\geq 98\%$	Roth	P031.1
<i>N</i> -Lauroylsarcosin Natriumsalz, $\geq 94\%$	Sigma-Aldrich	L5125
Natriumdesoxycholat, $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich	SAFS30970
PMA (Propidium Monoazid), 1 x 1 mg	Biotium	40013
TBE-Puffer (10x Tris/Boric Acid/EDTA)	Bio-Rad	1610733

Tabelle 3 (Fortsetzung): Übersicht der verwendeten Chemikalien und Enzyme mit Herstellerangaben

Chemikalie/Enzym	Hersteller	Artikelnummer
tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Na ₃ -Citrat x 2H ₂ O)	Merck	1120051000
Triton® X 100 reinst	Applichem	APPC142314.1611
Tween® 80	Sigma-Aldrich	P1754
Wasser für die Molekularbiologie, Flaschen zu 50 ml	Eppendorf	0032 006.302

3.1.5 Lösungen und Puffer

N-Acetyl-L-Cystein-NaOH-Lösung (NALC):

50 ml Na₃-Citrat x 2 H₂O, 2,9 %ige Lösung, steril

50 ml NaOH, 4 %ige Lösung, steril

500 mg *N*-Acetyl-L-Cystein

Die Lösung kann bis zu 24 Stunden lang verwendet werden.

Natriumdesoxycholat-Stammlösung (5 %):

2,5 g Natriumdesoxycholat

ad 50 ml Aqua dest.

N-Lauroylsarcosin Natriumsalz-Stammlösung (2,5 %):

1,25 g *N*-Lauroylsarcosin Natriumsalz

ad 50 ml Aqua dest.

PBS-Puffer (1x, Phosphatgepufferte Salzlösung):

1 Tablette PBS (PBS-Puffer fest für die Biotechnologie, VWR, Art.-Nr. E404) pro 100 ml Aqua dest.

Phosphatpuffer (nach Sørensen; pH 6,8):

4,84 g KH₂PO₄

5,53 g Na₂HPO₄ x 2H₂O

ad 1000 ml Aqua dest.

physiologische Kochsalzlösung:

9 g NaCl

ad 1000 ml Aqua dest.

TBE-Pufferlösung für Agarosegele (0,5 %):

50 ml TBE-Puffer

ad 950 ml Aqua dest.

Triton® X 100-Stammlösung (1 %):

1 ml Triton® X 100

ad 100 ml Aqua dest.

3.1.6 Primer

Die in Tabelle 4 aufgelisteten PCR-Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Primerpaare mit Sequenzen, Fragmentgrößen und Annealing-Temperaturen nach DORN-IN et al. (2015)

Primer Forward/ Reverse	5'→3' Sequenz	Fragmentgröße [bp]	Annealing- Temperatur [°C]	Anwendung
335F Com2	CADACTCCTACGGGAGGC CCGTCAATTCCTTTGAGTTT	586	54	Universalprimer zur
769F 1492R	GYGBGGGKAKCAAACAGGAT TACGGYTACCTTGTTACGACTT	747	59	Sequenzierung von 16S rRNA- Genabschnitten
799F 1492R	AACMGGATTAGATACCKG TACGGYTACCTTGTTACGACTT	735	52	

3.1.7 Labor-Kits

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Labor-Kits mit Herstellerangaben

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
BactoReal® <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex, CY5	Ingenetix	ING-DVEB02713
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen	69506
HotStarTaq Master Mix Kit	Qiagen	203446
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen	28104

3.1.8 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
Einweg-Impfösen, steril	VWR	612-2496
Einweg-Küvetten für Spektralphotometer	VWR	634-0677
Filterpipettenspitzen, Quali, steril, 0,1 - 10 µl	Kisker	A300SX
Homogenisationsbeutel mit seitlichem Filter, 400 ml	VWR	129-0733
PCR-Tube-Streifen	Kisker Biotech	G003-LP-SF
Pipettenspitzen, epT.I.P.S.®-Reloads PCR clean, 0,1 - 20 µl	Eppendorf	0030073762
Pipettenspitzen, Quali, 0,1 - 20 µl	Kisker	EC.TIPS.B
Pipettenspitzen, epT.I.P.S.®-Reloads PCR clean, 2 - 200 µl	Eppendorf	0030073800
Pipettenspitzen, Value Line, 1 - 200 µl	Kisker	VL700G
Pipettenspitzen, epT.I.P.S.®-Reloads PCR clean, 50 - 1000 µl	Eppendorf	0030073843
Pipettenspitzen, Value Line, 100 - 1000 µl	Kisker	VL004SHO

Tabelle 6 (Fortsetzung): Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
Plastikschraubröhrchen, 50 ml	Greiner bio-one	227261
Reagiergefäße, 1,5 ml	Sarstedt	72706400
Reagiergefäße, 1,5 ml, braun	Sarstedt	72706001
sterile Einweg-Skalpelle	megro (Ratiomed)	147210

3.1.9 Geräte

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Geräte mit Herstellerangaben

Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank „IN75“	Memmert
CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad
DNA/RNA UV-Reinigungsbox, UVT-S-AR	Biosan
Eismaschine ZBE 70-35	Ziegra
Foto-/Videoleuchte Videolight 6, 93304	Kaiser
Gel-Laufkammer, Sub-Cell GT MINI	Bio-Rad
Glaspipetten, 10 ml, 20 ml	Brand
Halogenlampe, 650 Watt, 240 V, 64540	Osram
Homogenisiergerät BagMixer® 400 W	Interscience
iCycler-Thermal Cycler	Bio-Rad
Kleinschüttler „KM 2“	Edmund Bühler GmbH
Kühl-Gefrierkombination, CN3613, Comfort NoFrost	Liebherr
Kühlschrank, profi line	Liebherr
Laborthermometer, Precision, 0 - 100 °C	Amarell
Mikrowelle, Microstar MM 6460, Micromaxx	MTC Medion Technologie Center
Molecular Imager, Gel Doc, Typ 170-8060	Bio-Rad

Tabelle 7 (Fortsetzung): Übersicht der verwendeten Geräte mit Herstellerangaben

Bezeichnung	Hersteller
PCR-Werkbank CaptairBio, Biocap™ DNA 1274-05	Erlab
Photometer „Eppendorf® BioPhotometer“	Eppendorf
Pipetten 0,5 - 10 µl, 2 - 20 µl, 10 - 100 µl, 20 - 200 µl und 100 - 1000 µl, Research®	Eppendorf
Pipettierhilfe „pipetus-akku“	Hirschmann Laborgeräte
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad
Sicherheitswerkbank, CellGard NU-480-600-E	Nuaire
Thermomixer comfort, 1,5 ml	Eppendorf
Vortex Mixer „ZX3“	Velp Scientifica
Wasserbad „SW22“	Julabo
Zentrifuge „Centrifuge 5415D“	Eppendorf
Zentrifuge „Centrifuge 5804R“	Eppendorf
Zentrifuge „MiniSpin® plus“	Eppendorf

3.1.10 Software

- Bio-Rad CFX Manager 3.1
- Bio-Rad Quantity One, Version 4.5
- R für Windows 3.1.2
- RStudio Version 0.98.1103
- WinSTAT Version 2012.1.0.92

3.2 Methoden

3.2.1 Etablierung der Propidium Monoazid Real-Time PCR zur Lebend-Tot-Differenzierung von Bakterien des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes in Wildbret

3.2.1.1 Anzucht von *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin-Pasteur

Der Keim wurde in Middlebrook-Flüssignährmedium 7H9 bei 37 °C im Brutschrank aerob für ca. 10 Tage bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,1 angezüchtet.

3.2.1.2 OD-Messung

Die Messung der OD der Bakterienkulturen wurde mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm durchgeführt. Zur Bestimmung der OD wurde jeweils 1 ml der jeweiligen Bakterienkultur in eine Einmalküvette gegeben und gemessen. Als Leerprobe wurde 1 ml steriles Middlebrook-Flüssignährmedium 7H9 verwendet.

3.2.1.3 Keimzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Kolonie-bildenden Einheiten (KbE) pro ml der *Mycobacterium (M). bovis* Bacille Calmette-Guérin (BCG)-Pasteur Kulturen wurde von diesen mit sterilem PBS-Puffer eine Verdünnungsreihe hergestellt. Hierzu wurde 1 ml der Kultur zu 9 ml PBS-Puffer gegeben, gemischt und davon ausgehend weitere Verdünnungsstufen von 10^{-2} bis 10^{-6} hergestellt. Je 100 μ l der jeweiligen Verdünnungsstufen wurden im Doppelansatz mittels Oberflächen-Spatelverfahren in Anlehnung an GEDEK (1974) auf BBL™ Seven H11 Agar mit einem sterilen Drigalski-Spatel ausplattiert. Die Bakterien wurden aerob für sechs Wochen bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, bei wöchentlicher Auszählung der gewachsenen Kolonien. Im Anschluss an die Inkubation wurden pro Probe zwei Agarplatten aufeinander folgender Verdünnungsstufen ausgezählt und mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert. Der durchschnittliche Keimgehalt wurde aus dem Mittelwert beider Platten berechnet.

3.2.1.4 Abtötung von *M. bovis* BCG-Pasteur

M. bovis BCG-Pasteur wurde bei 90 °C für 30 min im Wasserbad abgetötet. Zur Bestätigung der erfolgreichen Abtötung wurden je 100 μ l der erhitzten Bakterien auf BBL™ Seven H11 Agar für acht Wochen bei 37 °C aerob im Brutschrank inkubiert.

3.2.1.5 Optimierung der Propidium Monoazid Behandlung zur Lebend-Tot-Differenzierung von *M. bovis* BCG-Pasteur

Zur Lebend-Tot-Differenzierung von *M. bovis* BCG-Pasteur wurde die Methode der Propidium Monoazid (PMA)-Behandlung in Kombination mit einer Real-Time PCR ausgewählt. Der Farbstoff PMA wird Bakterienproben vor der DNA-Extraktion zugegeben, diffundiert aufgrund des Verlustes der Membranintegrität in tote Zellen und bindet dort unter Lichteinwirkung an die DNA. Hierdurch wird eine Amplifizierung der DNA in der anschließenden Real-Time PCR verhindert. Somit wird im Idealfall nur die DNA lebender Bakterien nachgewiesen, da PMA in lebende Zellen aufgrund der Intaktheit der Zellmembran nicht diffundieren kann (vgl. Abschnitt 2.4.2.2 und 5.1).

Um eine möglichst optimale Lebend-Tot-Differenzierung von *M. bovis* BCG-Pasteur durch PMA zu erreichen, wurden verschiedene Bedingungen innerhalb der PMA-Behandlung verändert. Hierdurch sollte eine Nicht-Amplifizierung der DNA toter Bakterien bei gleichzeitiger vollständiger Amplifizierung der DNA lebender Bakterien in der Real-Time PCR erreicht werden. Dazu sollte der Farbstoff PMA möglichst in alle toten Bakterienzellen diffundieren, während er von lebenden Zellen aufgrund der intakten Zellwand ausgeschlossen bleiben sollte.

3.2.1.5.1 PMA-Behandlung

Von dem Farbstoff PMA wurde eine 20 mM Stammlösung in Aqua dest. hergestellt, die Lösung in lichtundurchlässige 1,5 ml Reagiergefäße aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. *M. bovis* BCG-Pasteur wurde bis zu einer Konzentration von ca. 10^6 KbE/ml in Middlebrook-Flüssignährmedium 7H9 angezüchtet und je 250 µl der Kultur im Wasserbad abgetötet. Ausgehend von der PMA-Stammlösung wurden definierte Mengen an PMA zu jeweils 250 µl der Bakteriensuspensionen in 1,5 ml lichtdurchlässigen Reagiergefäßen zugegeben. Anschließend wurden die Keime im Thermomixer bei 550 rpm inkubiert. Die Inkubation wurde aufgrund der Lichtempfindlichkeit von PMA im Dunkeln unter Zuhilfenahme von Aluminiumfolie durchgeführt. Der Thermomixer wurde hierfür mit der Aluminiumfolie eingehüllt. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Reagiergefäße mit den Keimen aus dem Thermomixer genommen und zur Bestrahlung horizontal auf Eis gelegt. Die Bestrahlung erfolgte mit einer 650 Watt Halogenlampe. Nach der Inkubation und Bestrahlung wurde die DNA extrahiert und eine Real-Time PCR durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.2.1.5.2 und 3.2.1.5.3).

Standardmäßig erfolgte die Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur (20 °C). Die PMA-Konzentration lag bei 100 µM und die Bestrahlung erfolgte für 2 min auf Eis, bei einem Abstand von 20 cm von der Lampe zu der Probe. Die Experimente wurden jeweils fünfmal unabhängig voneinander wiederholt. Hatte sich die Veränderung einer Variablen der PMA-Behandlung an abgetöteten Bakterien als Verbesserung herausgestellt, wurde diese an lebenden Bakterien überprüft. Sofern die Änderung auf den PCR-Nachweis der DNA lebender Bakterien keinen signifikanten Einfluss hatte, wurde diese auf die Folgeexperimente angewandt.

Zur Untersuchung der optimalen Bedingungen für die PMA-Behandlung von *M. bovis* BCG-Pasteur wurden die Variablen PMA-Konzentration, Inkubationszeit, Bestrahlungszeit und Inkubationstemperatur verändert und im Hinblick auf ihre Wirkung auf die PMA-Diffusion in die Zellen und somit auf das Real-Time PCR-Signal getestet (Tabelle 8).

Tabelle 8: Überblick der getesteten Variablen zur Optimierung der PMA Behandlung an *M. bovis* BCG-Pasteur

Getestete Variable	PMA-Konzentration [µM]	Inkubationszeit [min]	Bestrahlungszeit [min]	Inkubationstemperatur [°C]
PMA-Konzentration	10, 25, 50, 100, 200, 300	15	2	20
Inkubationszeit	100	15, 30, 60	2	20
Bestrahlungszeit	100	15	2, 5, 10	20
Inkubationstemperatur	100	15	2	20, 40, 50, 60

Zudem wurde der Einfluss einer Zugabe von verschiedenen Substanzen zu den Bakterien auf die PMA-Aufnahme in die Zellen getestet. Die Substanzen sollten dabei die bakterielle Membran destabilisieren und hierdurch eine erhöhte Aufnahme von PMA in tote Zellen fördern. Außerdem wurde die Wirkung einer zweimaligen PMA-Behandlung im Vergleich zu einer einfachen PMA-Behandlung getestet.

Zugabe von Substanzen zur Membran-Destabilisierung der Bakterien

Die Bakterien wurden vor der PMA-Zugabe mit Natriumdesoxychololat bzw. *N*-Lauroylsarcosin in den in Tabelle 9 angegebenen Konzentrationen für 30 min bei 37 °C inkubiert. Zudem wurde eine dreißigminütige Inkubation mit Lysozym und anschließender Zugabe von Triton® X 100 zusammen mit PMA zu den Proben durchgeführt (Tabelle 9).

Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Substanzen mit Angabe der jeweiligen Konzentrationen zur Überprüfung, ob die Zugabe der Substanzen zu einer Steigerung der Aufnahme von PMA in abgetötete *M. bovis* BCG-Pasteur Keime führt; die Bakteriensuspensionen wurden mit den aufgelisteten Substanzen vor der PMA-Zugabe jeweils für 30 min bei 37 °C inkubiert

Substanz	Konzentration
	0,01 %
Natriumdesoxychololat ¹	0,1 %
	1 %
	0,05 %
<i>N</i> -Lauroylsarcosin ¹	0,1 %
	0,5 %
Lysozym ¹	2 mg/ml
+	
Triton® X 100 ^{1,2}	0,1 %

¹vgl. Tabelle 3, Abschnitt 3.1.4

²Triton® X 100-Zugabe erst nach 30 minütiger Inkubation bei 37 °C, zusammen mit PMA-Zugabe

Aus Stammlösungen der jeweiligen Substanzen wurden Lösungen in den in Tabelle 9 angegebenen Konzentrationen mit Middlebrook-Flüssignährmedium 7H9 hergestellt. Jeweils 250 µl der Bakteriensuspensionen (ca. 10⁶ KbE/ml) wurden bei 9.500 x g für 5 min pelletiert und in je 250 µl der entsprechend konzentrierten Substanzen gelöst. Die Kontrollproben ohne Zusatz einer der Substanzen wurden in 250 µl Middlebrook-Flüssignährmedium 7H9 gelöst. Die PMA-Inkubation (100 µM) wurde bei 50 °C für 15 min durchgeführt, die

Bestrahlungszeit betrug 2 min. Diese Parameter zur Inkubation und Bestrahlung hatten sich in den vorherigen Experimenten (vgl. Tabelle 8) als optimal für die PMA-Aufnahme in tote Zellen erwiesen.

Zweimalige PMA-Behandlung

Um zu überprüfen, ob eine zweimalige PMA-Behandlung zu einer erhöhten Diffusion von PMA in abgetötete Keime führt, wurde die Zugabe von 2 x 50 µM und 2 x 100 µM PMA im Vergleich zu einer einmaligen Behandlung mit 100 µM PMA getestet. Bei der zweimaligen PMA-Zugabe wurden die 250 µl Bakteriensuspensionen (ca. 10⁶ KbE/ml) im Anschluss an die erste Inkubation (15 min, 50 °C) und Bestrahlung (2 min) bei 9.500 x g für 5 min pelletiert, in 250 µl Middlebrook-Flüssignährmedium 7H9 gelöst und die PMA-Behandlung mit Inkubation und Bestrahlung wiederholt.

3.2.1.5.2 DNA-Extraktion

Die DNA wurde mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit von Qiagen nach Anleitung des Herstellers extrahiert.

3.2.1.5.3 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR wurde mit dem BactoReal® *Mycobacterium tuberculosis* complex Kit der Firma Ingenetix durchgeführt. Dieses Kit weist laut Hersteller ausschließlich Bakterien des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes nach. Dabei wird ein 129 bp großer Bereich der 16S-23S ITS-Region (ITS = internal transcribed spacer) der mykobakteriellen DNA amplifiziert. Alle Proben wurden jeweils einmal mit und einmal nicht mit PMA behandelt. Um den Einfluss von PMA auf die Amplifizierung der DNA bestimmen zu können, wurden die Ct-Werte (cycle threshold) der Proben in der Real-Time PCR verglichen. Je höher der Ct-Wert der mit PMA behandelten Probe im Vergleich zu der nicht mit PMA behandelten Probe war (Ct-Wert-Differenz, Δ Ct), desto stärker wurde die DNA-Amplifizierung durch PMA gehemmt. Die Real-Time PCR erfolgte in einem Real-Time PCR Cyclor (CFX96 Touch).

3.2.1.6 Anwendung der optimierten PMA Real-Time PCR auf *M. bovis* BCG-Pasteur in Wildbret

Nachdem die PMA-Behandlung an bakteriellen Reinkulturen optimiert wurde, wurde die Funktionalität der Methode an artifiziell mit *M. bovis* BCG-Pasteur kontaminiertem Wildbret getestet.

3.2.1.6.1 Untersuchung des Wildbrets auf das Vorhandensein von Bakterien des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes

Das Wildbret wurde vor der Verwendung für die Experimente mittels Kultur und Real-Time PCR auf das Vorhandensein von Bakterien des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes (MTC) untersucht. Die Untersuchungen wurden analog zu den Abschnitten 3.2.2.1 und 3.2.2.2 durchgeführt.

3.2.1.6.2 Unterdrückung der DNA-Amplifizierung von abgetöteten *M. bovis* BCG-Pasteur Keimen in Wildbret durch die PMA-Behandlung in Abhängigkeit der KbE/ml

Es wurde untersucht, bis zu welcher Keimzahl eine Unterdrückung des Real-Time PCR-Signals abgetöteter *M. bovis* BCG-Pasteur Bakterien in Wildbret durch die PMA-Behandlung gelingt. Dazu wurden verschiedene Keimzahlen an *M. bovis* BCG-Pasteur in Fleischhomogenisat mit PMA behandelt, extrahiert und mittels Real-Time PCR auf die Amplifizierung von DNA untersucht.

Herstellung einer Verdünnungsreihe

Die Bakterien wurden bis zu einer Zellzahl von 10^2 KbE/ml verdünnt. Dazu wurde 1 ml aus der Bakteriensuspension (ca. 10^6 KbE/ml) entnommen und in 9 ml PBS-Puffer gegeben. Diese Suspension wurde gründlich gemischt und hieraus wiederum 1 ml in 9 ml PBS-Puffer gegeben. Dies wurde bis zu der entsprechenden Verdünnungsstufe fortgeführt.

PMA-Behandlung

Jeweils 250 µl aus den verschiedenen Verdünnungsstufen von *M. bovis* BCG-Pasteur wurden in 1,5 ml Reagiergefäße gegeben und abgetötet. Anschließend wurden die Bakterien bei 9500 x g für 5 min pelletiert. Es wurden 10 g des MTC freien Wildbrets in 90 ml physiologischer Kochsalzlösung für eine Minute im Homogenisator homogenisiert. Ein Teil des Fleischhomogenisats wurde abgenommen. Hiervon wurden jeweils 250 µl zu den abgetöteten Bakterienpellets gegeben. Jede Verdünnungsstufe wurde einmal mit und einmal nicht mit 100 µM PMA versetzt, die Proben wurden für 15 min bei 50 °C im

Thermomixer bei 550 rpm im Dunkeln inkubiert und anschließend für zwei Minuten bei 650 Watt mit einem Abstand von 20 cm von der Lampe zu der Probe bestrahlt. Anschließend wurde die DNA extrahiert und eine Real-Time PCR durchgeführt.

DNA-Extraktion

siehe Abschnitt 3.2.1.5.2

Real-Time PCR

siehe Abschnitt 3.2.1.5.3

3.2.1.6.3 Eignung der PMA-Real-Time PCR zur Differenzierung von unterschiedlichen Anteilen lebender und toter Mykobakterien in Wildbret

Es wurde überprüft, inwieweit durch die Methode der PMA Real-Time PCR eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Anteilen toter und lebender Mykobakterien in Fleisch möglich ist.

Herstellung von *M. bovis* BCG-Pasteur Suspensionen mit verschiedenen Lebend-Tot-Anteilen

Ein Teil einer *M. bovis* BCG-Pasteur Kultur (ca. 10^6 KbE/ml) wurde im Wasserbad abgetötet. Es wurden gemischte Suspensionen aus lebenden und abgetöteten *M. bovis* BCG-Pasteur Bakterien in Middlebrook 7H9-Flüssignährmedium in den prozentualen Anteilen 100 versus 0, 75 versus 25, 50 versus 50, 25 versus 75 und 0 versus 100 (tote Bakterien versus lebende Bakterien) hergestellt.

PMA-Behandlung

Jeweils 250 µl aus den verschiedenen Lebend-Tot-Suspensionen wurden in 1,5 ml lichtdurchlässige Reagiergefäße gegeben und bei 9500 x g für 5 min pelletiert. Von dem MTC freien Wildbret wurden 10 g in 90 ml physiologischer Kochsalzlösung für eine Minute im Homogenisator homogenisiert. Ein Teil des Fleischhomogenisats wurde abgenommen. Hiervon wurden jeweils 250 µl zu den Bakterienpellets aus den verschiedenen Lebend-Tot-Suspensionen gegeben. Jede Lebend-Tot-Suspension wurde einmal nicht mit PMA und einmal mit PMA behandelt. Die mit PMA behandelten Proben wurden dabei mit 100 µM PMA versetzt und für 15 min bei 50 °C im Thermomixer bei 550 rpm im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 2 min bei 650 Watt bestrahlt. Die DNA wurde von allen

Proben extrahiert und damit eine Real-Time PCR durchgeführt. Die Experimente wurden 5 x unabhängig voneinander wiederholt.

DNA-Extraktion

siehe Abschnitt 3.2.1.5.2

Real-Time PCR

siehe Abschnitt 3.2.1.5.3

3.2.1.7 Ermittlung der Nachweisgrenze von *M. bovis* BCG-Pasteur in artifiziell kontaminiertem Wildbret mittels Real-Time PCR

Um zu ermitteln, bis zu welcher Anzahl an KbE pro Gramm Fleisch ein Real-Time PCR-Nachweis von *M. bovis* BCG-Pasteur gelingt, wurde Wildbret vom Rotwild mit verschiedenen Mengen an *M. bovis* BCG-Pasteur artifiziell kontaminiert und mit einer Real-Time PCR untersucht. Der Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

*3.2.1.7.1 Herstellung der mit *M. bovis* BCG-Pasteur artifiziell kontaminierten Fleischproben*

Aus einer *M. bovis* BCG-Pasteur Kultur (ca. 10^6 KbE/ml) wurde eine Verdünnungsreihe mit steriler physiologischer Kochsalzlösung bis zu einer Bakterienzahl von 10^2 KbE/ml hergestellt. Hierfür wurden 2,5 ml aus der Bakteriensuspension in 22,5 ml physiologische Kochsalzlösung gegeben. Die Suspension wurde gut gemischt und hieraus wurden wiederum 2,5 ml in 22,5 ml physiologische Kochsalzlösung gegeben. Dies wurde fortgeführt, bis die entsprechende Verdünnungsstufe erreicht war. Zur Überprüfung der exakten Zellzahl wurde eine Keimzahlbestimmung mittels Kultur durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.2.1.3).

Von den Verdünnungsstufen mit 10^4 , 10^3 und 10^2 KbE/ml wurden jeweils 20 ml zu 20 g Wildbret in einen Homogenisationsbeutel gegeben und mit 160 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt. Die Proben wurden im Homogenisator für eine Minute homogenisiert.

3.2.1.7.2 Molekularbiologische Untersuchung

Aus jeder Probe wurden 250 µl Fleischhomogenisat entnommen und eine DNA-Extraktion sowie Real-Time PCR durchgeführt. Die DNA wurde mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit von Qiagen nach Anleitung des Herstellers extrahiert. Die Real-Time PCR wurde mit dem BactoReal® *Mycobacterium tuberculosis* complex Kit der Firma Ingenetix durchgeführt.

3.2.1.8 Statistik

Der Einfluss der PMA-Behandlung auf die Ct-Werte der Proben in der Real-Time PCR wurde durch einen t-Test für unabhängige Stichproben überprüft. Das Signifikanzniveau α wurde dabei auf 5 % festgelegt. Bei einem p-Wert (= Signifikanzwert) kleiner oder gleich dem Signifikanzniveau α galten die Unterschiede der Proben als statistisch signifikant. Der t-Test wurde mit dem Programm WinSTAT (Version 2012.1.0.92) durchgeführt.

Die Eignung der PMA Real-Time PCR zur Differenzierung von unterschiedlichen Anteilen lebender und toter Mykobakterien in Wildbret wurde durch eine binär-logistische Regressionsanalyse (Logit-Modell) ermittelt. Die dichotom abhängigen Variablen waren dabei 100 % tot versus nicht 100 % tot. Für die Auswertung wurde das Programm R für Windows 3.1.2 mit RStudio (Version 0.98.1103) verwendet. Die Analyse wurde in Zusammenarbeit mit dem „Statistischen Beratungslabor (STABLAB)“ des Instituts für Statistik der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

3.2.2 Untersuchung von Wildbret vom Rotwild aus der Region Oberallgäu (Bayern) auf das Vorhandensein von Bakterien des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes

Insgesamt 50 Wildbret-Proben aus der Region Oberallgäu (Bayern) (vgl. Abschnitt 3.1.2) wurden kulturell in Anlehnung an die amtliche Methodensammlung des Friedrich-Löffler-Instituts (FLI, 2014) und mittels Real-Time PCR auf das Vorhandensein von Bakterien des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes (MTC) untersucht.

3.2.2.1 Kulturelle Untersuchung

Von jeder der 50 Wildbret-Proben wurden 20 g in einen Homogenisationsbeutel gegeben. Nach Zugabe von 180 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung wurde das Fleisch für 1 min im Homogenisator homogenisiert. Um schnellwachsende Begleitmikrobiota im Probenmaterial zu entfernen, wurden 10 ml des Homogenisats zur Dekontamination in ein 50 ml Plastikschraubröhrchen gegeben und mit 10 ml *N*-Acetyl-L-Cystein-NaOH-Lösung (NALC) versetzt. Nach gründlichem Mischen wurde die Probe für 20 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler bei 250 U/min inkubiert. Anschließend wurde zur Neutralisierung der NALC-Lösung 20 ml Sörensen-Puffer dazugegeben, die Probe gemischt und für 20 min bei 3.300 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Sörensen-Puffer resuspendiert. Je 150 μ l von der Suspension wurden auf ein Löwenstein-Jensen-Festnährmedium, ein Stonebrink-Festnährmedium sowie in ein Kirchner-Flüssignährmedium

gegeben. Die Nährmedien wurden für acht Wochen in einem Brutschrank bei 37 °C aerob bebrütet und wöchentlich auf Koloniewachstum kontrolliert. Jede Wildbret-Probe wurde im Doppelansatz untersucht.

3.2.2.2 Real-Time PCR

Zur Untersuchung der Wildbret-Proben mit einer Real-Time PCR wurden je 250 µl Fleischhomogenisat vor der Dekontamination entnommen. Als Positivkontrolle wurden zusätzlich 250 µl Fleischhomogenisat mit 10 µl einer *M. bovis* BCG-Pasteur Kultur beimpft. Für die Negativkontrolle wurden 250 µl sterile Kochsalz-Lösung verwendet. Die DNA wurde mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit von Qiagen nach Anleitung des Herstellers extrahiert. Anschließend wurde mit der extrahierten DNA eine Real-Time PCR mit dem BactoReal® *Mycobacterium tuberculosis* complex Kit der Firma Ingenetix durchgeführt.

3.2.2.3 Sequenzierung

Proben, bei welchen ein Wachstum von Mykobakterien-ähnlichen Kolonien auf den Nährmedien beobachtet werden konnte, wurden per Sequenzierung weiter untersucht, um die genaue Bakterienart zu bestimmen. Dazu wurde die DNA aus den gewachsenen Kolonien mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit von Qiagen nach Anleitung des Herstellers extrahiert. Anschließend wurden 16S rRNA-Genabschnitte der extrahierten DNA in einer konventionellen PCR mit Hilfe von Universalprimern amplifiziert. Dazu wurden die Primerpaare 335F/Com2, 769F/1492R und 799F/1492R nach DORN-IN et al. (2015) verwendet (vgl. Abschnitt 3.1.6). Tabelle 10 zeigt den Reaktionsansatz, mit dem die PCR durchgeführt wurde.

Tabelle 10: Reaktionsansatz der PCR zur Amplifizierung von 16S rRNA Genabschnitten mithilfe der Primerpaare 335F/Com2, 769F/1492R und 799F/1492R nach DORN-IN et al. (2015)

	Konzentration Stammlösung	Endkonzentration im Ansatz	µl/Ansatz
DNase freies Wasser			22
Qiagen HotStarTaq	2 x	1 x	25
Master Mix			
Primer Forward	20 µM	0,2 µM	0,5
Primer Reverse	20 µM	0,2 µM	0,5
DNA-Template			2
Gesamtvolumen			50

Die PCR erfolgte in einem Thermocycler (iCycler, BioRad) nach dem Temperatur-Protokoll aus Tabelle 11.

Tabelle 11: Temperatur Protokoll der PCR zur Amplifizierung von 16S rRNA Genabschnitten mithilfe der Primerpaare 335F/Com2, 769F/1492R und 799F/1492R nach DORN-IN et al. (2015)

Zyklen	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min:sec]
1	Initiale Denaturierung	95	15:00
36	Denaturierung	95	00:45
	Annealing	Primer-spezifisch ¹	01:00
	Elongation	72	01:00
1	Finale Elongation	72	10:00

¹Primerpaar 335F/Com2: 54 °C, Primerpaar 769F/1492R: 59 °C, Primerpaar 799F/1492R: 52°C

Alle drei Ansätze wurden im Anschluss an die PCR über ein Agarosegel (1,0 %) auf die erfolgreiche Amplifikation des PCR-Produkts hin überprüft. Hierzu wurde 1 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer (0,5 %) in der Mikrowelle geschmolzen und in einen Gelträger gegossen. Mithilfe eines Kammes wurden Taschen in das Gel geprägt. Nach der Polymerisierung des

Gels wurde dieses in einer Gel-Laufkammer vollständig mit TBE-Puffer (0,5 %) bedeckt. Daraufhin wurden 4 µl des PCR-Produkts mit 1 µl DNA-Ladepuffer vermischt, in die Geltaschen pipettiert und bei 120 Volt für 20 min elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde daraufhin für 15 min in einer 1%igen Ethidium-Bromid-Lösung gefärbt. Nach der Entfärbung des Gels für 15 min in Aqua dest. wurden die Banden mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht. Dabei wurde überprüft, ob die korrekten Banden, entsprechend der Größe des jeweiligen Amplifikats, vorhanden waren. Anschließend wurden die restlichen PCR-Produkte mit dem QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen nach Herstellerangaben aufgereinigt und zur Sequenzierung an die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) geschickt. Jedes PCR-Produkt wurde vorwärts und rückwärts sequenziert. Die Sequenzen wurden mithilfe des BLAST-Programms (Basic Local Alignment Search Tool; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mit Sequenz-Datenbanken abgeglichen und die statistische Wahrscheinlichkeit für eine Speziesübereinstimmung ermittelt.

4 Ergebnisse

4.1 Keimzahl von *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin-Pasteur bei einer optischen Dichte von 0,1

Alle Versuche zur Etablierung der Propidium Monoazid (PMA) Real-Time PCR wurden mit *Mycobacterium (M.) bovis* Bacille Calmette-Guérin (BCG)-Pasteur Kulturen mit einer optischen Dichte (OD) von 0,1 durchgeführt. Tabelle 12 zeigt die Ergebnisse der durch Auszählung ermittelten Kolonie-bildenden Einheiten (KbE)/ml von *M. bovis* BCG-Pasteur bei einer OD von 0,1 auf BBL™ Seven H11 Agar nach 8 Wochen Kultivierung in fünf voneinander unabhängigen Versuchen. Eine *M. bovis* BCG-Pasteur Flüssigkultur enthält demnach bei einer OD von 0,1 durchschnittlich $1,51 \times 10^6$ KbE/ml.

Tabelle 12: Kolonie-bildende Einheiten (KbE) an *M. bovis* BCG-Pasteur pro ml bei einer OD von 0,1 in Middlebrook-Flüssigmedium 7H9, ermittelt durch Keimzahlbestimmung auf BBL™ Seven H11 Agar nach achtwöchiger Kultivierung

Versuch Nr.	KbE/ml
1	$1,17 \times 10^6$
2	$8,60 \times 10^5$
3	$2,00 \times 10^6$
4	$1,92 \times 10^6$
5	$1,58 \times 10^6$
Mittelwert	$1,51 \times 10^6$

4.2 Einfluss verschiedener Variablen der Propidium Monoazid (PMA)-Methode auf die Lebend-Tot-Differenzierung von *M. bovis* BCG-Pasteur

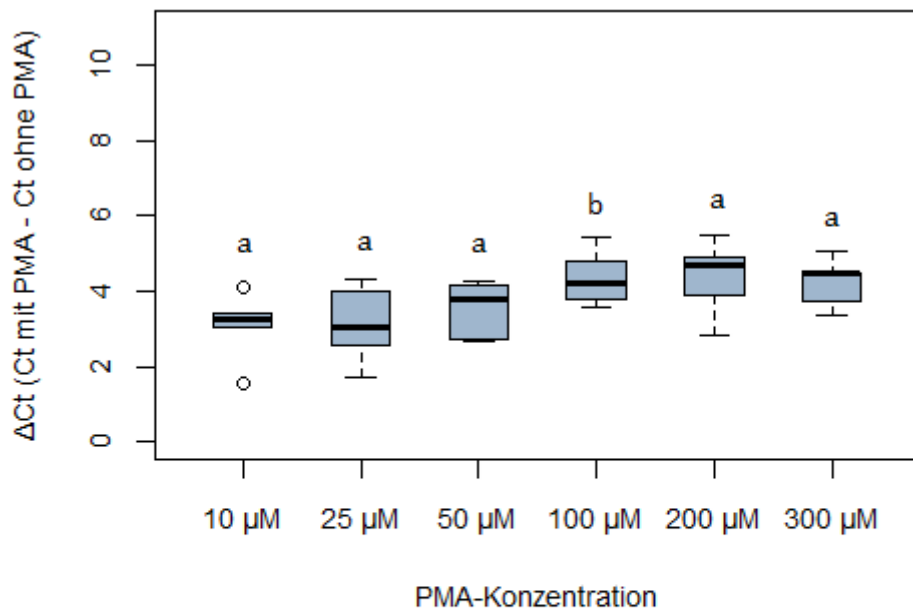
4.2.1 PMA-Konzentration

Die Inkubation der abgetöteten *M. bovis* BCG-Pasteur Keime mit PMA vor der DNA-Extraktion führte zu einer partiellen Hemmung der DNA-Amplifizierung in der Real-Time PCR. Dies zeigte sich in einer Erhöhung der Ct-Werte im Vergleich zu den Ct-Werten der nicht mit PMA behandelten abgetöteten Keime (Tabelle 26 im Anhang). Die stufenweise Erhöhung der PMA-Konzentration von 10 μM auf bis zu 300 μM führte zu einer leicht verstärkten Hemmung der DNA-Amplifizierung. Bis auf die Erhöhung der PMA-Konzentration von 10 μM auf 100 μM (t-Test, $p < 0,05$) waren die Unterschiede in den Ct-Wert-Differenzen (ΔCt) zwischen mit PMA und nicht mit PMA behandelten Proben allerdings nicht signifikant (Tabelle 13 und Abbildung 6).

Tabelle 13: Einfluss unterschiedlicher PMA-Konzentrationen auf die Ct-Wert-Differenzen (ΔCt) abgetöteter *M. bovis* BCG-Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden

Versuch	PMA-Konzentration [μM]					
	10	25	50	100	200	300
Nr.	[ΔCt]	[ΔCt]	[ΔCt]	[ΔCt]	[ΔCt]	[ΔCt]
1	4,1	4,35	4,25	5,44	5,47	5,05
2	3,42	4,03	4,14	4,78	4,71	4,51
3	3,25	2,56	2,74	3,57	3,91	3,73
4	3,06	3,05	3,77	4,24	4,9	4,51
5	1,56	1,73	2,67	3,78	2,86	3,36
Mittelwert	3,08	3,14	3,51	4,36	4,37	4,23
¹ p-Wert		0,9199	0,4418	0,0444	0,0693	0,0559
² p-Wert			0,5463	0,0720	0,1000	0,0912
³ p-Wert				0,1160	0,1690	0,1535
⁴ p-Wert					0,9891	0,7827
⁵ p-Wert						0,8064

¹⁻⁵ p-Werte ermittelt durch t-Test: ¹ jeweilige Konzentration vs. 10 μM , ² jeweilige Konzentration vs. 25 μM , ³ jeweilige Konzentration vs. 50 μM , ⁴ jeweilige Konzentration vs. 100 μM , ⁵ jeweilige Konzentration vs. 200 μM ; signifikante Unterschiede sind durch Fettdruck hervorgehoben



□ 50 % der Werte — Median ◊ Extremwerte

a, b: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen PMA-Konzentrationen (t-Test, $p < 0,05$)

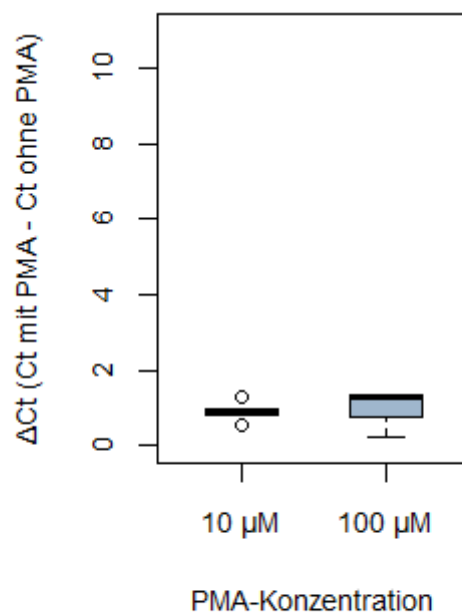
Abbildung 6: Einfluss unterschiedlicher PMA-Konzentrationen auf die Ct-Wert-Differenzen (ΔCt) abgetöteter *M. bovis* BCG-Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden

Da lediglich eine PMA-Konzentration von 100 μM einen signifikanten Einfluss auf die Hemmung des PCR-Signals bei abgetöteten Keimen im Vergleich zu 10 μM PMA hatte, wurde an lebenden Bakterien nur die PMA-Konzentration von 100 μM im Vergleich zu 10 μM getestet. Die Inkubation lebender Mykobakterien mit PMA führte dabei ebenfalls zu einer Erhöhung der Ct-Werte in der Real-Time PCR (Tabelle 27 im Anhang). Die Ct-Wert-Differenz zwischen den mit und nicht mit PMA behandelten Proben war hierbei jedoch deutlich geringer als bei abgetöteten Keimen. Die Erhöhung der PMA-Konzentration von 10 μM auf 100 μM führte bei vitalen *M. bovis* BCG-Pasteur Keimen zu keinem signifikanten Unterschied in der Hemmung der DNA-Amplifizierung (t-Test, $p > 0,05$; Tabelle 14 und Abbildung 7).

Tabelle 14: Einfluss unterschiedlicher PMA-Konzentrationen auf die Ct-Wert-Differenzen (ΔCt) vitaler *M. bovis* BCG-Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden

Versuch	PMA-Konzentration [μM]	
	10	100
Nr.	[ΔCt]	[ΔCt]
1	0,91	1,35
2	0,54	0,22
3	1,28	1,28
4	0,8	0,76
5	0,96	1,34
Mittelwert	0,898	0,99
¹ p-Wert	0,7245	

¹p-Wert ermittelt durch t-Test: 10 μM vs. 100 μM



□ 50 % der Werte — Median ◊ Extremwerte

Abbildung 7: Einfluss unterschiedlicher PMA-Konzentrationen auf die Ct-Wert-Differenzen (ΔCt) vitaler *M. bovis* BCG-Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden

4.2.2 Inkubationszeit

Die Verlängerung der PMA-Inkubationszeit von 15 min auf 30 min bzw. 60 min führte bei abgetöteten *M. bovis* BCG-Pasteur Kulturen zu keiner signifikanten Erhöhung der Ct-Werte in der Real-Time PCR und damit keiner weiteren Hemmung der DNA-Amplifikation (t-Test, $p > 0,05$) (Tabelle 15, Abbildung 8 und Tabelle 28 im Anhang). Der Einfluss auf lebende Keime wurde daher nicht getestet.

Tabelle 15: Einfluss unterschiedlicher PMA-Inkubationszeiten auf die Ct-Wert-Differenzen (Δ Ct) abgetöteter *M. bovis* BCG-Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden

Versuch	Inkubationszeit [min]		
	15	30	60
Nr.	[Δ Ct]	[Δ Ct]	[Δ Ct]
1	4,79	4,91	4,64
2	3,95	4,38	3,99
3	4,04	3,87	4,07
4	4,23	4,21	4,09
5	2,33	2,06	3,15
Mittelwert	3,87	3,89	3,99
¹ p-Wert		0,9782	0,8073
² p-Wert			0,8554

^{1,2}p-Werte ermittelt durch t-Test: ¹jeweilige Inkubationszeit vs. 15 min, ²jeweilige Inkubationszeit vs. 30 min

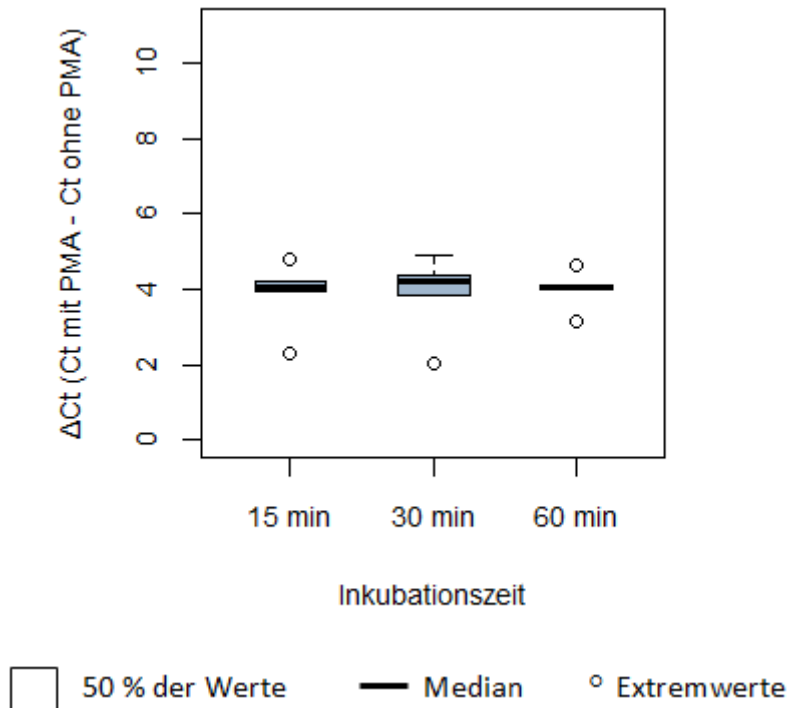


Abbildung 8: Einfluss verschiedener PMA-Inkubationszeiten auf die Ct-Wert-Differenzen (ΔCt) abgetöteter *M. bovis* BCG-Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden

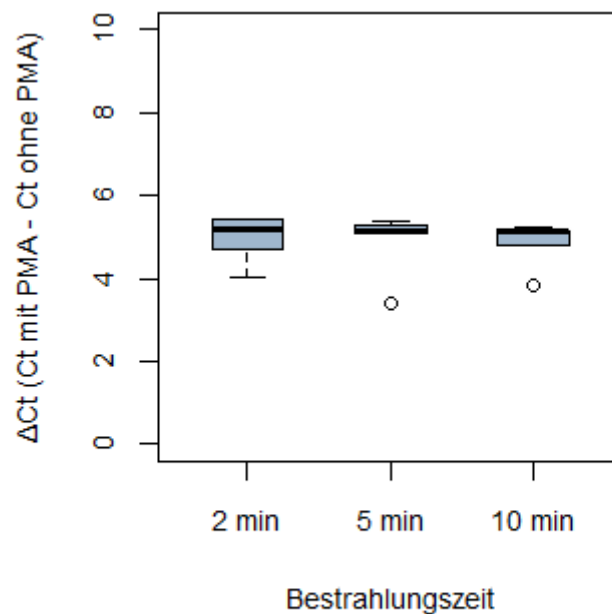
4.2.3 Bestrahlungszeit

Die Verlängerung der Bestrahlungszeit von 2 min auf 5 min bzw. 10 min bei abgetöteten *M. bovis* BCG-Pasteur Keimen führte zu keiner signifikant erhöhten Hemmung der DNA-Amplifizierung in der PCR (t-Test, $p > 0,05$). Die Ct-Wert-Unterschiede zwischen den mit PMA und nicht mit PMA behandelten Proben waren für alle getesteten Bestrahlungszeiten annähernd gleich (Tabelle 16, Abbildung 9 und Tabelle 29 im Anhang). Daher wurde der Einfluss der Bestrahlungszeit auf lebende Keime nicht getestet.

Tabelle 16: Einfluss unterschiedlicher Bestrahlungszeiten auf die Ct-Wert-Differenzen (ΔCt) abgetöteter *M. bovis* BCG-Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden

Versuch Nr.	Bestrahlungszeit [min]		
	2 [ΔCt]	5 [ΔCt]	10 [ΔCt]
1	4,7	5,09	4,78
2	5,21	5,12	5,14
3	5,44	5,29	5,22
4	4,03	3,38	3,82
5	5,44	5,4	5,16
Mittelwert	4,845	4,72	4,74
¹ p-Wert		0,8205	0,7197
² p-Wert			0,9458

^{1,2} p-Wert ermittelt durch t-Test: ¹jeweilige Bestrahlungszeit vs. 2 min
²jeweilige Bestrahlungszeit vs. 5 min



□ 50 % der Werte — Median ◊ Extremwerte

Abbildung 9: Einfluss verschiedener Bestrahlungszeiten auf die Ct-Wert-Differenzen (ΔCt) abgetöteter *M. bovis* BCG-Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden

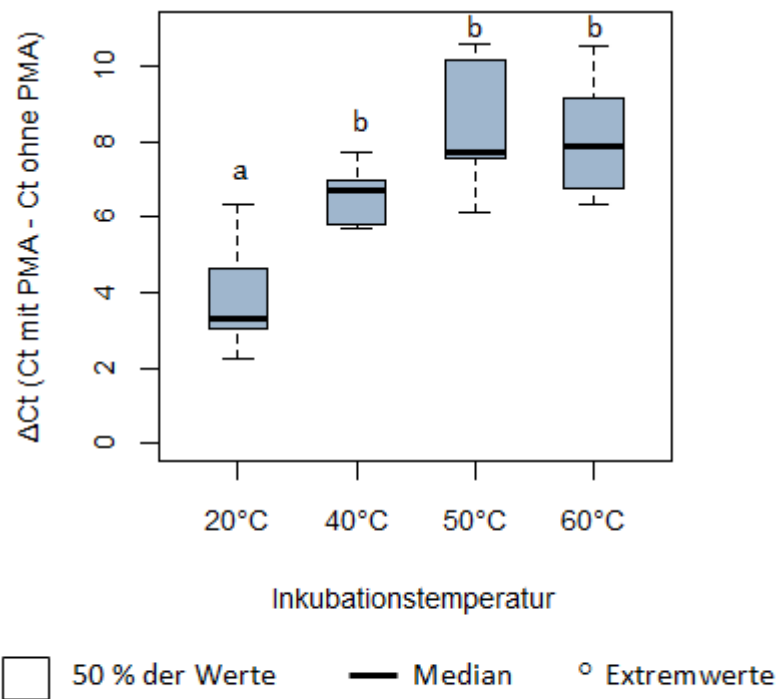
4.2.4 Inkubationstemperatur

Die Erhöhung der Inkubationstemperatur von Raumtemperatur (20 °C) auf 40 °C, 50 °C bzw. 60 °C führte bei abgetöteten Mykobakterien zu signifikant erhöhten Ct-Wert-Differenzen (Δ Ct) in der PCR (t-Test, $p < 0,05$). Die Ct-Wert-Unterschiede waren bei 50 °C und 60 °C nochmals erhöht im Vergleich zu 40 °C, allerdings nicht signifikant (t-Test, $p > 0,05$) (Tabelle 17, Abbildung 10 und Tabelle 30 im Anhang).

Tabelle 17: Einfluss unterschiedlicher PMA-Inkubationstemperaturen auf die Ct-Wert-Differenzen (Δ Ct) abgetöteter *M. bovis* BCG-Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden

Versuch	Inkubationstemperatur [°C]			
	20	40	50	60
Nr.	[Δ Ct]	[Δ Ct]	[Δ Ct]	[Δ Ct]
1	3,03	5,81	7,55	7,89
2	3,31	6,96	10,6	10,55
3	4,65	7,74	10,2	9,15
4	2,25	5,7	6,15	6,32
5	6,36	6,71	7,75	6,79
Mittelwert	3,92	6,58	8,45	8,14
¹ p-Wert		0,0115	0,0036	0,0041
² p-Wert			0,0786	0,1091
³ p-Wert				0,7938

¹⁻³ p-Werte ermittelt durch t-Test: ¹jeweilige Temperatur vs. Raumtemperatur, ²jeweilige Temperatur vs. 40 °C, ³jeweilige Temperatur vs. 50 °C; signifikante Unterschiede sind durch Fettdruck hervorgehoben



a, b: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Inkubationstemperaturen (t-Test, $p < 0,05$)

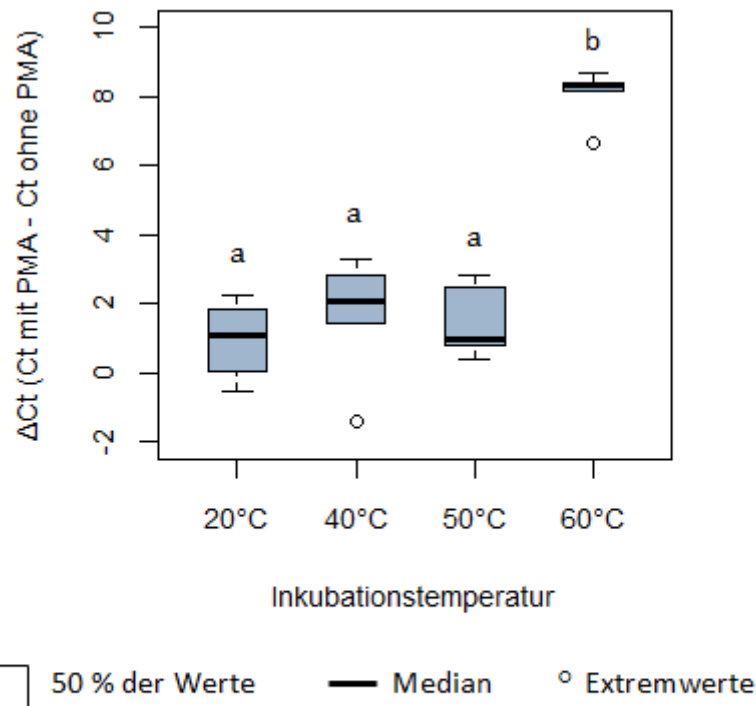
Abbildung 10: Einfluss verschiedener Inkubationstemperaturen auf die Ct-Wert-Differenzen (ΔCt) abgetöteter *M. bovis* BCG-Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden

Bei vitalen *M. bovis* BCG-Pasteur Keimen wurde bei einer Inkubationstemperatur von 60 °C ein signifikanter Anstieg der Ct-Wert-Differenz in der PCR im Vergleich zur Inkubation bei 20 °C, 40 °C und 50 °C beobachtet (t-Test, $p < 0,05$). Temperaturen von 40 °C und 50 °C führten im Vergleich zur Inkubation bei Raumtemperatur (20 °C) bei vitalen Bakterien zu keiner signifikant erhöhten Hemmung der DNA-Amplifizierung in der PCR (t-Test, $p > 0,05$) (Tabelle 18 und Abbildung 11 und Tabelle 31 im Anhang).

Tabelle 18: Einfluss unterschiedlicher PMA-Inkubationstemperaturen auf die Ct-Wert-Differenzen (Δ Ct) vitaler *M. bovis* BCG-Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden

Versuch	Inkubationstemperatur [°C]			
	20	40	50	60
Nr.	[Δ Ct]	[Δ Ct]	[Δ Ct]	[Δ Ct]
1	2,26	3,3	2,82	8,72
2	1,12	2,07	0,38	6,65
3	1,83	2,82	2,5	8,41
4	0,04	1,44	0,78	8,17
5	-0,55	-1,43	0,98	8,33
Mittelwert	0,94	1,64	1,492	8,056
¹ p-Wert		0,4974	0,4656	0,000004
² p-Wert			0,8818	0,0001
³ p-Wert				0,000005

¹⁻³ p-Werte ermittelt durch t-Test: ¹ jeweilige Temperatur vs. 20 °C, ² jeweilige Temperatur vs. 40 °C, ³ jeweilige Temperatur vs. 50 °C
signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind durch Fettdruck hervorgehoben



a, b: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Inkubationstemperaturen (t-Test, $p < 0,05$)

Abbildung 11: Einfluss verschiedener PMA-Inkubationstemperaturen auf die Ct-Wert-Differenzen (ΔCt) vitaler *M. bovis* BCG-Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden

4.2.5 Zugabe von Substanzen zur Destabilisierung der Zellmembran von *M. bovis* BCG-Pasteur

Die Inkubation der abgetöteten Mykobakterien mit den in Tabelle 9 (Abschnitt 3.2.1.5.1) aufgelisteten Substanzen vor der PMA-Zugabe führte zu keiner signifikanten Veränderung der Ct-Wert-Differenzen in der Real-Time PCR im Vergleich zu nicht mit den entsprechenden Substanzen inkubierten Proben. Die Verwendung von 0,5 % *N*-Lauroylsarcosin hatte zudem niedrigere Ct-Wert-Differenzen im Vergleich zu den restlichen Proben zur Folge, welche außer im Vergleich mit den Ct-Wert-Differenzen unbehandelter Proben und mit Lysozym/Triton® X 100 behandelten Proben signifikant unterschiedlich waren (t-Test, $p < 0,05$). Keine der verwendeten Substanzen führte somit in Kombination mit PMA zu einer erhöhten Hemmung der DNA-Amplifizierung toter Bakterien in der Real-Time PCR im Vergleich zu nicht mit einer der Substanzen behandelten Proben (Tabelle 19 und Abbildung 12 und Tabelle 32 im Anhang). Der Einfluss auf vitale Bakterien wurde daher nicht getestet.

Tabelle 19: Einfluss der Inkubation mit verschiedenen Substanzen vor der PMA-Behandlung auf die Ct-Wert-Differenzen (Δ Ct) abgetöteter *M. bovis* BCG-Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden

Versuch Nr.	Substanz									
	ohne Substanz	Natriumdesoxycholat [%]		N-Lauroylsarcosin [%]		Lysozym (2 mg/ml) + Triton® X 100 (0,1 %)				
	[Δ Ct]	0,01	0,1	1	0,05	0,1	0,5	[Δ Ct]	[Δ Ct]	[Δ Ct]
1	4,58	4,71	4,61	5,28	5,82	6,16	4,85	4,35		
2	6,54	7,24	6,93	5,76	6,74	5,07	3,94	7,05		
3	5,09	6,12	6,63	6,17	6,15	6,16	4,68	4,59		
4	8,32	6,33	6,25	4,89	6,8	6,22	4,42	6,6		
5	5,32	7,44	5,7	7,43	6,09	6,47	4,97	8,01		
Mittelwert	5,97	6,368	6,024	5,906	6,32	6,016	4,572	6,12		
¹ p-Wert		0,6435	0,9468	0,9382	0,6291	0,9501	0,0789	0,8819		
² p-Wert			0,6028	0,5001	0,9291	0,5353	0,0086	0,7809		
³ p-Wert				0,8488	0,5307	0,9870	0,0119	0,9098		
⁴ p-Wert					0,4120	0,8317	0,0228	0,8044		
⁵ p-Wert						0,3556	0,0002	0,7931		
⁶ p-Wert							0,0015	0,8935		
⁷ p-Wert								0,0684		

¹⁻⁷ p-Werte ermittelt durch t-Test: ¹ jeweilige Substanz vs. ohne Substanz, ² jeweilige Substanz vs. 0,01 % Natriumdesoxycholat, ³ jeweilige Substanz vs. 0,1 % Natriumdesoxycholat, ⁴ jeweilige Substanz vs. 1 % Natriumdesoxycholat, ⁵ jeweilige Substanz vs. 0,05 % N-Lauroylsarcosin, ⁶ jeweilige Substanz vs. 0,1 % N-Lauroylsarcosin, ⁷ jeweilige Substanz vs. 0,5 % N-Lauroylsarcosin; signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind durch Fettdruck hervorgehoben

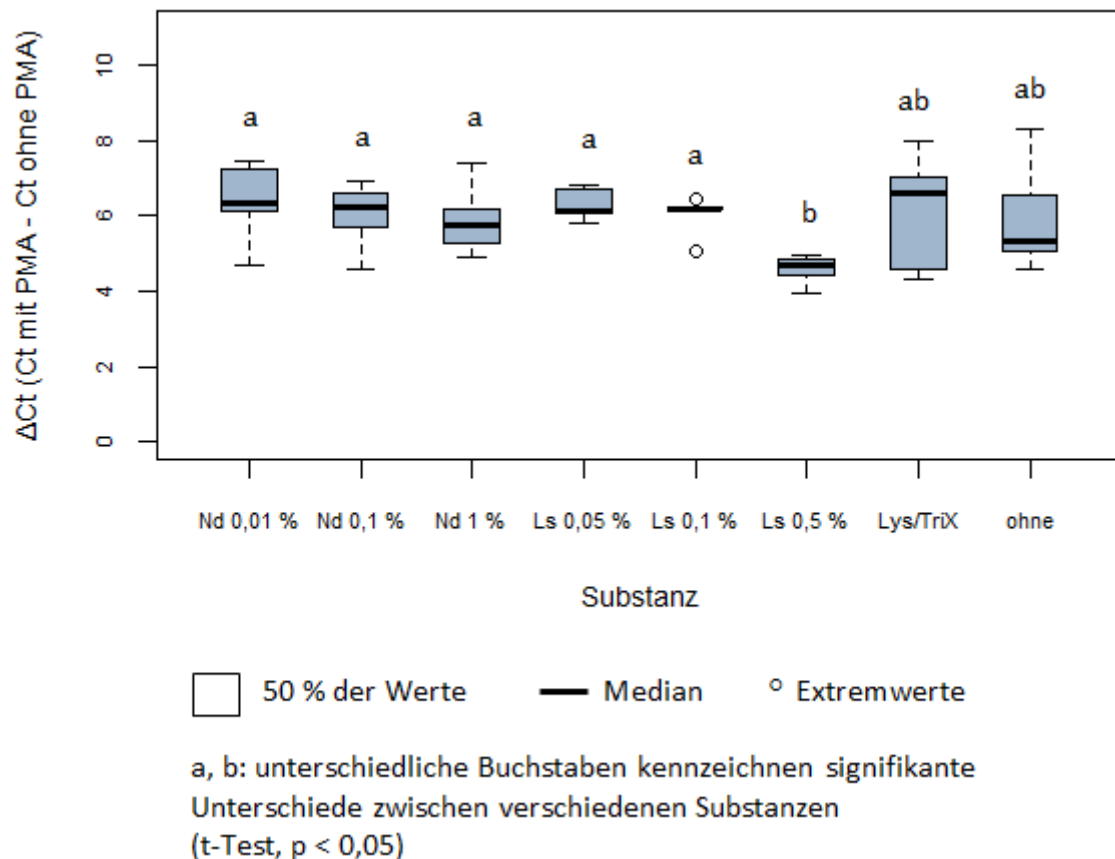


Abbildung 12: Einfluss der Inkubation mit verschiedenen Substanzen vor der PMA-Behandlung auf die Ct-Wert-Differenzen (ΔCt) von abgetöteten *M. bovis* BCG-Pasteur Keimen, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden; Nd: Natriumdesoxycholat, Ls: *N*-Lauroylsarcosin, Lys/TriX: Lysozym/ Triton® X 100, ohne: ohne Substanz-Zugabe

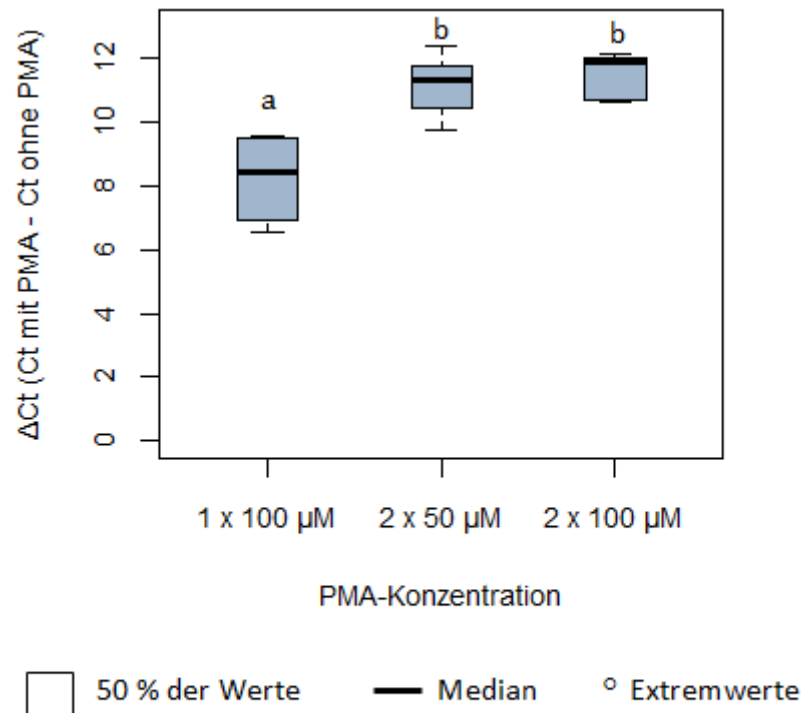
4.2.6 Zweimalige PMA-Behandlung

Eine zweimalige PMA-Behandlung führte im Vergleich zu einer einmaligen PMA-Behandlung bei abgetöteten *M. bovis* BCG-Pasteur Kulturen zu einem signifikanten Anstieg der Ct-Werte in der Real-Time PCR (t-Test, $p < 0,05$). Eine zweimalige Behandlung mit je 50 μM PMA erzeugte eine stärkere Hemmung der PCR-Amplifikation als eine einmalige Behandlung mit einer PMA-Konzentration von 100 μM . Die zweimalige Zugabe von je 100 μM PMA produzierte Ct-Wert-Unterschiede, die vergleichbar zu denen der zweimaligen Zugabe von 50 μM PMA waren (Tabelle 20 und Abbildung 13 und Tabelle 33 im Anhang).

Tabelle 20: Einfluss einer einmaligen bzw. doppelten PMA-Behandlung auf die Ct-Wert-Differenzen (Δ Ct) abgetöteter *M. bovis* BCG-Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden

Versuch Nr.	PMA-Gabe mit Konzentration [μ M]		
	1 x 100 [Δ Ct]	2 x 50 [Δ Ct]	2 x 100 [Δ Ct]
1	9,54	11,36	10,69
2	6,54	9,76	12
3	8,43	11,78	11,92
4	9,59	12,42	12,16
5	6,92	10,47	10,62
Mittelwert	8,204	11,158	11,478
p-Wert ¹		0,0059	0,0019
p-Wert ²			0,5965

^{1,2}p-Werte ermittelt durch t-Test; ¹jeweilige zweimalige PMA-Gabe vs. 1 x 100 μ M, ²2 x 100 μ M vs. 2 x 50 μ M; signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind durch Fettdruck hervorgehoben



a, b: unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen PMA-Konzentrationen (t-Test, $p < 0,05$)

Abbildung 13: Einfluss einer einmaligen bzw. doppelten PMA-Behandlung auf die Ct-Wert-Differenzen (ΔCt) abgetöteter *M. bovis* BCG-Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden

Auch bei vitalen *M. bovis* BCG-Pasteur Kulturen erhöhte eine zweimalige PMA-Behandlung die Ct-Wert-Differenzen in der PCR signifikant im Vergleich zu einer einmaligen PMA-Behandlung (t-Test, $p < 0,05$). Dabei wurde die DNA-Amplifikation durch die Zugabe von zweimal 100 μM PMA am stärksten gehemmt. Im Vergleich mit der zweimaligen Gabe von 50 μM PMA war der Unterschied aber nicht signifikant (t-Test, $p > 0,05$) (Tabelle 21, Abbildung 14 und Tabelle 34 im Anhang).

Tabelle 21: Einfluss einer einmaligen bzw. doppelten PMA-Behandlung auf die Ct-Wert-Differenzen (Δ Ct) vitaler *M. bovis* BCG-Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden

Versuch Nr.	PMA-Gabe mit Konzentration [μ M]		
	1 x 100 [Δ Ct]	2 x 50 [Δ Ct]	2 x 100 [Δ Ct]
1	1,29	1,74	4,26
2	0,78	6,33	9,42
3	2,5	6,53	7,44
4	1,76	3,45	4,91
5	0,69	2,36	5,1
Mittelwert	1,404	4,082	6,226
p-Wert ¹		0,0344	0,0015
p-Wert ²			0,1606

^{1,2}p-Werte ermittelt durch t-Test; ¹jeweilige zweimalige PMA-Gabe vs. 1 x 100 μ M, ²2 x 100 μ M vs. 2 x 50 μ M; signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind durch Fettdruck hervorgehoben

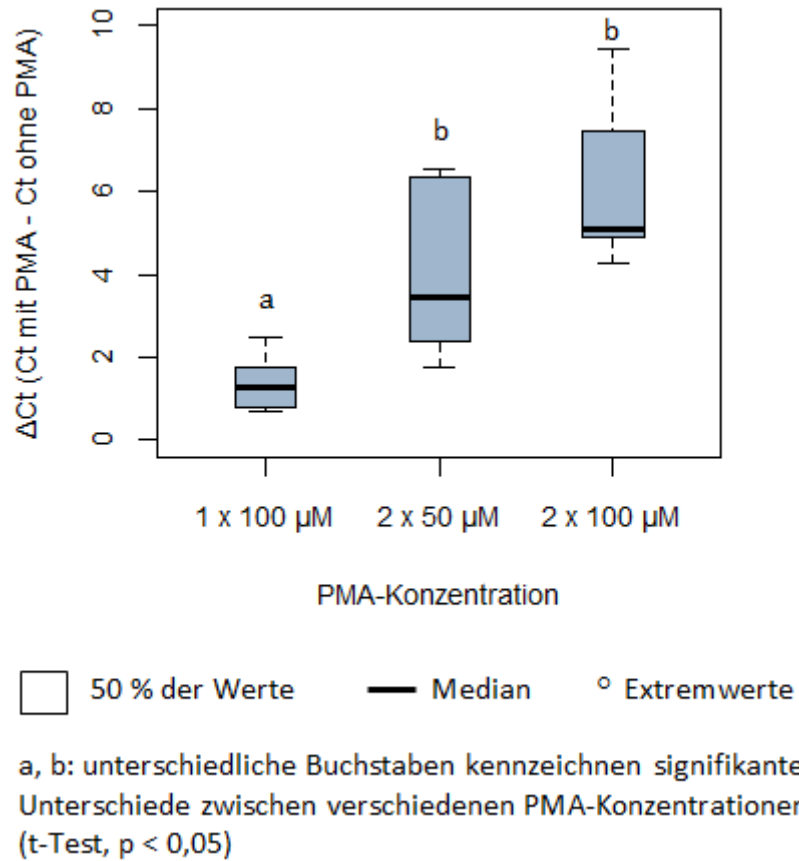


Abbildung 14: Einfluss einer einmaligen bzw. doppelten PMA-Behandlung auf die Ct-Wert-Differenzen (ΔCt) vitaler *M. bovis* BCG-Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden

4.3 Anwendung der optimierten PMA Real-Time PCR auf *M. bovis* BCG-Pasteur in Wildbret

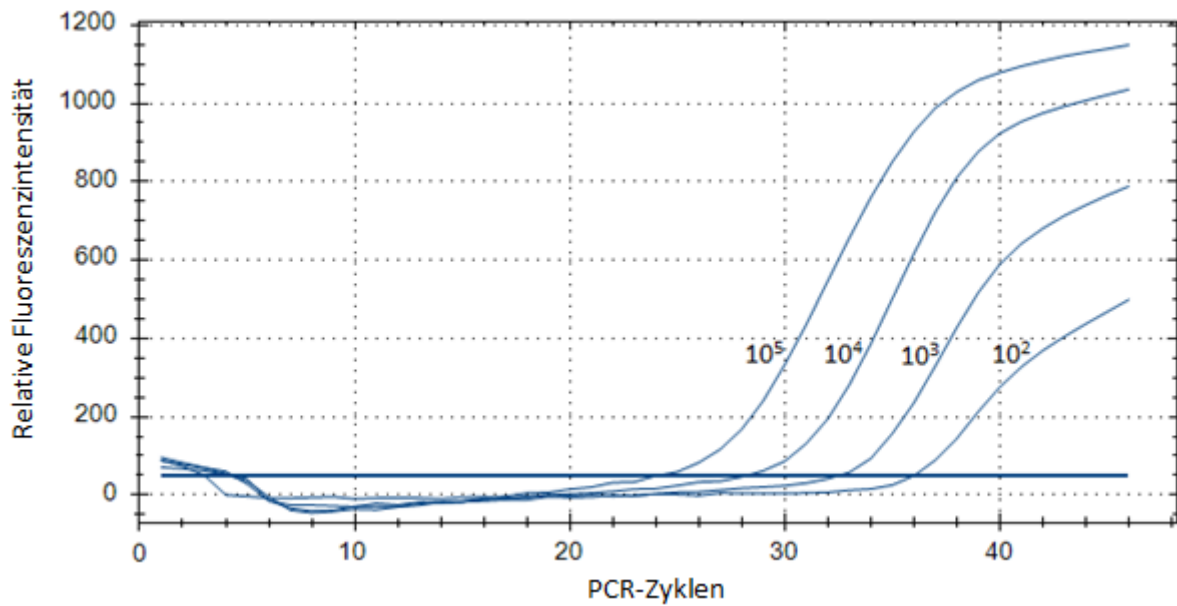
4.3.1 Unterdrückung der DNA-Amplifizierung von abgetöteten *M. bovis* BCG-Pasteur Keimen in Wildbret-Homogenisat durch die PMA-Behandlung in Abhängigkeit der Kolonie-bildenden Einheiten (KbE) pro ml

Die PMA-Behandlung von \log_{10} -Verdünnungsstufen abgetöteter *M. bovis* BCG-Pasteur Keime in Wildbret-Homogenisat führte je nach Zellzahl pro ml zu einer teilweisen bzw. vollständigen Unterdrückung der DNA-Amplifizierung. Bei Bakterienzahlen von 10^5 KbE/ml bis 10^3 KbE/ml hatte die PMA-Behandlung erhöhte Ct-Werte im Vergleich zu nicht mit PMA behandelten Proben zur Folge. Bei einer Keimzahl von 10^2 KbE/ml konnte das PCR-Signal durch PMA vollständig unterdrückt werden (Tabelle 22 und Abbildung 15 und 16). Die Ct-Wert-Differenz (ΔCt) zwischen mit PMA und nicht mit PMA behandelten Bakterien war etwas geringer, als die im Rahmen der Optimierung der PMA Real-Time PCR ermittelten Ct-Wert-Differenzen an Reinkulturen (vgl. Abschnitt 4.2)

Tabelle 22: Ct-Werte der Real-Time PCR von \log_{10} -Verdünnungsstufen von abgetöteten *M. bovis* BCG-Pasteur Keimen in Wildbret Homogenisat mit und ohne PMA-Behandlung

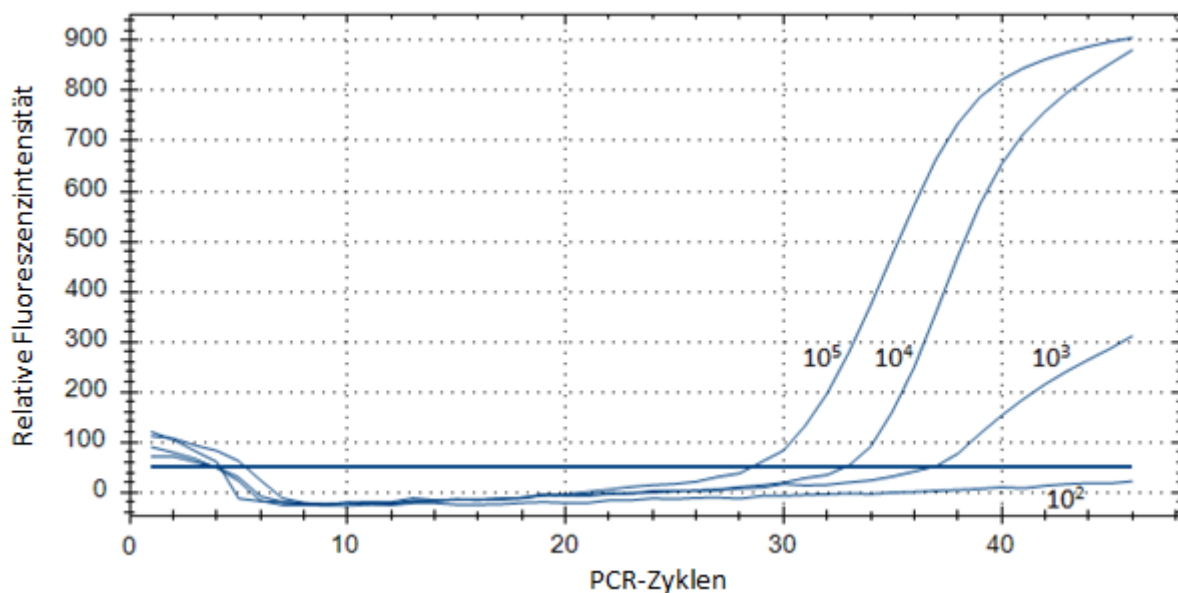
KbE/ml	ohne PMA [Ct]	mit PMA [Ct]	ΔCt
10^5	24,07	28,51	4,44
10^4	28,22	32,80	4,58
10^3	32,49	36,77	4,28
10^2	36,02	kein Signal	

KbE = Kolonie-bildende Einheiten, ΔCt = Ct mit PMA - Ct ohne PMA



$10^5 = 10^5$ KbE/ml, $10^4 = 10^4$ KbE/ml, $10^3 = 10^3$ KbE/ml, $10^2 = 10^2$ KbE/ml
(KbE = Kolonie-bildende Eineiten)

Abbildung 15: Real-Time PCR Ergebnis der \log_{10} -Verdünnungsstufen von abgetöteten *M. bovis* BCG-Pasteur Keimen in Wildbret Homogenisat ohne PMA-Behandlung



$10^5 = 10^5$ KbE/ml, $10^4 = 10^4$ KbE/ml, $10^3 = 10^3$ KbE/ml, $10^2 = 10^2$ KbE/ml
(KbE = Kolonie-bildende Einheiten)

Abbildung 16: Real-Time PCR Ergebnis der \log_{10} -Verdünnungsstufen von abgetöteten *M. bovis* BCG-Pasteur Keimen in Wildbret Homogenisat mit PMA-Behandlung

4.3.2 Eignung der PMA Real-Time PCR zur Differenzierung von unterschiedlichen Anteilen lebender und toter Mykobakterien in Wildbret

Die Zugabe von PMA zu Bakteriensuspensionen mit unterschiedlichen Anteilen lebender und toter Mykobakterien führte je nach prozentualem Anteil an toten Zellen zu unterschiedlichen Ct-Werten in der PCR. Je höher der Anteil toter Bakterien in einer Suspension war, desto größer waren durchschnittlich die Ct-Wert-Differenzen zwischen den mit PMA und nicht mit PMA behandelten Proben. Bei den fünf unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen war dies allerdings nicht durchgehend in jedem einzelnen Versuch zu beobachten. Im zweiten Versuch war der Ct-Wert-Unterschied der Suspension mit 0 % toten Bakterien mit einem Wert von 1,53 höher als bei der Suspension mit 25 % toten Bakterien mit einem Wert von 1,23. Ebenso war im zweiten Versuch die Ct-Wert-Differenz der Probe mit je 50 % vitalen und 50 % toten Bakterien mit 2,83 größer als bei der Probe mit 75% toten Mykobakterien mit einem Wert von 2,73. Im vierten Versuch war zudem die Ct-Wert-Differenz bei der Probe mit einem Anteil von 75 % toten Bakterien mit 5,26 höher als bei der Suspension aus 100 % abgetöteten Bakterien mit einem Wert von 5,0.

Die Ct-Wert-Differenzen der Suspensionen mit 100 % toten Bakterien, 50 % toten Bakterien und 0 % toten Bakterien unterschieden sich signifikant voneinander. Die Suspension mit 75 % toten Bakterien führte im Mittel zwar zu geringeren Ct-Wert-Differenzen im Vergleich zu der Suspension mit 100 % toten Bakterien, die Unterschiede waren aber nicht signifikant. Ebenso waren im Mittel die Unterschiede in den Ct-Wert-Differenzen zwischen den Suspensionen mit 75 % toten Bakterien und 50 % toten Bakterien nicht signifikant. Die Suspensionen mit 75 % toten Bakterien und 50 % toten Bakterien waren in ihren Ct-Wert-Differenzen aber wiederum signifikant unterschiedlich zu den Suspensionen mit 25 % toten Bakterien und 0 % toten Bakterien. Die Suspensionen mit 25 % toten Bakterien und 0 % toten Bakterien zeigten wiederum keine signifikant voneinander unterschiedlichen Ct-Wert-Differenzen (Tabelle 23 und Abbildung 17, Ct-Werte in Tabelle 35 und Tabelle 36 im Anhang).

Tabelle 23: Ct-Wert-Differenzen (ΔCt) zwischen mit PMA und nicht mit PMA behandelten Suspensionen mit unterschiedlichen Anteilen an abgetöteten und lebenden *M. bovis* BCG-Pasteur Keimen in Wildbret-Homogenisat

Versuch Nr.	Prozentualer Anteil tot versus lebend [%]				
	100 vs. 0 [ΔCt]	75 vs. 25 [ΔCt]	50 vs. 50 [ΔCt]	25 vs. 75 [ΔCt]	0 vs. 100 [ΔCt]
1	3,49	3,26	2,9	1,72	1,39
2	4,05	2,73	2,83	1,23	1,53
3	6,19	3,37	3,22	2,16	1,32
4	5,00	5,26	2,98	2,93	1,55
5	5,18	4,27	2,81	2,72	2,12
Mittelwert	4,78	3,78	2,95	2,15	1,58
p-Wert ¹		0,1592	0,0048	0,0016	0,0002
p-Wert ²			0,1035	0,0175	0,0015
p-Wert ³				0,0386	0,0003
p-Wert ⁴					0,1359

¹⁻⁴p-Werte ermittelt durch t-Test, ¹jeweiliges tot-lebend Verhältnis vs. 100 % tot, ²jeweiliges tot-lebend Verhältnis vs. 75 % tot, ³jeweiliges tot-lebend Verhältnis vs. 50 % tot, ⁴jeweiliges tot-lebend Verhältnis vs. 25 % tot; signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind durch Fettdruck hervorgehoben

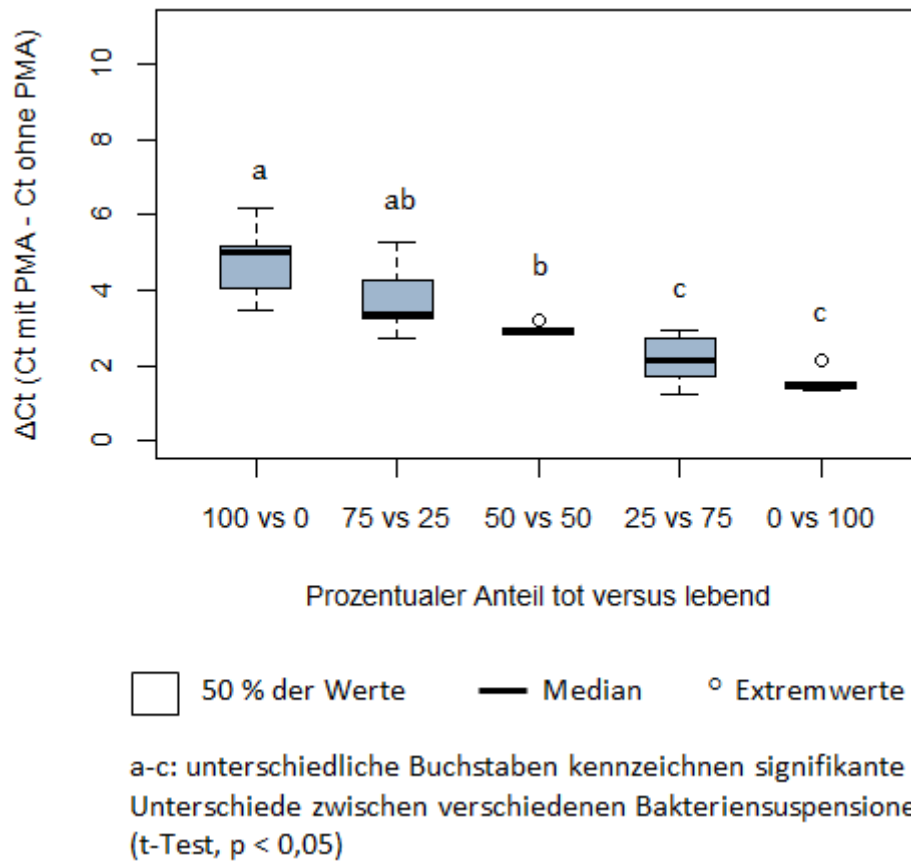


Abbildung 17: Einfluss der prozentualen Anteile an abgetöteten und vitalen *M. bovis* BCG-Pasteur Keimen in einer Suspension auf die Ct-Wert-Differenzen (Δ Ct) zwischen mit und nicht mit PMA behandelten Proben

Die Daten aus Tabelle 23 wurden in zwei Gruppen (100 % tote Bakterien versus nicht 100 % tote Bakterien) eingeteilt. Diese zwei Gruppen wurden in einer binär-logistischen Regressionsanalyse gegenübergestellt. Durch diese Analyse wurde ein Modell erstellt, aus welchem die Wahrscheinlichkeit abgeschätzt werden kann, ob eine untersuchte Probe ausschließlich tote Mykobakterien oder auch lebende Mykobakterien enthält. Aus dem Modell geht hervor, dass eine Probe, welche einmal mit und einmal nicht mit PMA behandelt wurde, bei einer daraus folgenden Ct-Wert-Differenz von 5,72 mit einer Wahrscheinlichkeit von 90 % ausschließlich tote Mykobakterien enthält (Abbildung 18).

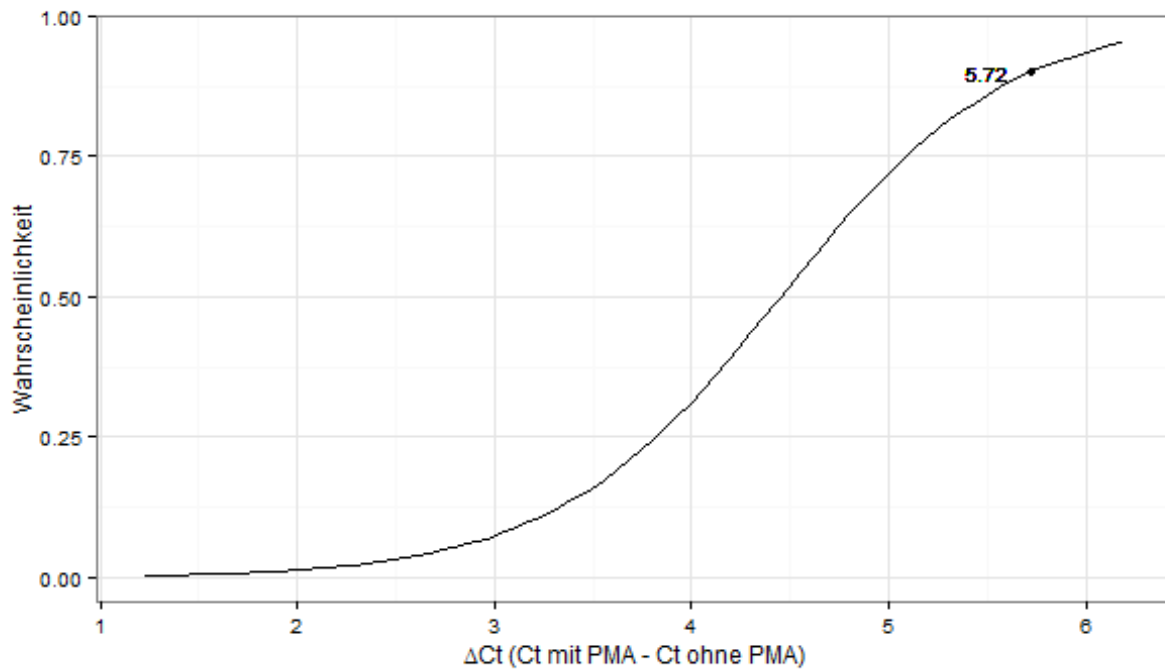


Abbildung 18: Binär-logistische Regressionsanalyse mit den beiden Gruppen 100 % tot versus nicht 100 % tot zur Abschätzung der Wahrscheinlichkeit, ob in einer untersuchten Wildbretprobe ausschließlich tote oder auch lebende Mykobakterien des MTC enthalten sind; beispielsweise besteht bei einer Ct-Wert-Differenz (ΔCt) von 5,72 eine neunzigprozentige Wahrscheinlichkeit, dass keine lebenden Mykobakterien des MTC in der Wildbretprobe vorhanden sind

4.4 Nachweisgrenze von *M. bovis* BCG-Pasteur in artifiziell kontaminiertem Wildbret mittels Real-Time PCR

Bei der Untersuchung der mit *M. bovis* BCG-Pasteur artifiziell kontaminierten Fleischproben mittels Real-Time PCR konnte DNA ab einer Bakterienzahl von 10^3 KbE pro Gramm Fleisch nachgewiesen werden. Dabei zeigten allerdings nicht alle mit 10^3 KbE pro Gramm Fleisch versetzten Proben ein Real-Time PCR-Signal. Hier wurde lediglich in zwei von drei Proben (66 %) ein positives Real-Time PCR Ergebnis beobachtet. Alle Fleischproben mit Bakterienzahlen von 10^4 KbE pro Gramm Fleisch zeigten ein positives Real-Time PCR-Ergebnis. Bei 10^2 KbE pro Gramm Fleisch konnte in keiner Probe ein Signal in der Real-Time PCR beobachtet werden. Die interne Amplifikationskontrolle lieferte in allen Proben ein positives Real-Time PCR-Signal (Tabelle 24).

Tabelle 24: Quantitative Nachweisbarkeit von *M. bovis* BCG-Pasteur in artifiziell kontaminierten Fleischproben mittels Real-Time PCR; Ergebnisse gemittelt aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen

Gesamtkeimzahl pro Gramm Fleisch	PCR positiv	Nachweisbarkeit [%]	Interne Amplifikationskontrolle
10^2 *	-	0	+
10^3 #	+	66,6	+
10^4 +	+	100	+

* 8×10^1 bis $1,25 \times 10^2$, # 8×10^2 bis $1,25 \times 10^3$, + 8×10^3 bis $1,25 \times 10^4$, ermittelt durch Keimzahlbestimmung (vgl. Tabelle 25); + = PCR-Signal vorhanden, - = kein PCR-Signal vorhanden

Die durchgeführte kulturelle Keimzahlbestimmung (vgl. Abschnitt 3.2.1.3) zur exakten Ermittlung der KbE/ml in den eingesetzten Verdünnungsstufen der drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuche ergab die in Tabelle 25 aufgelisteten Keimzahlen.

Tabelle 25: Ergebnisse der kulturellen Keimzahlbestimmung zur Ermittlung der Koloniebildenden Einheiten (KbE) pro ml in der zur Herstellung der Verdünnungsreihen eingesetzten Bakteriensuspension

Versuch Nr.	KbE/ml
1	8×10^3
2	$1,1 \times 10^4$
3	$1,25 \times 10^4$
Mittelwert	$1,05 \times 10^4$

Die tatsächlich eingesetzten Keimzahlen entsprachen den über die Messung der optischen Dichte eingestellten Werten. Die eingesetzte Bakteriensuspension mit theoretisch 10^4 KbE/ml beinhaltete in den drei durchgeführten Versuchen somit Keimzahlen zwischen 8×10^3 KbE/ml bis $1,25 \times 10^4$ KbE/ml. Davon ausgehend wurden \log_{10} -Verdünnungen hergestellt. Demnach enthielt die Verdünnung mit theoretisch 10^3 KbE/ml Keimzahlen zwischen 8×10^2 KbE/ml bis $1,25 \times 10^3$ KbE/ml und die Verdünnung mit theoretisch 10^2 KbE/ml enthielt 8×10^1 KbE/ml bis $1,25 \times 10^2$ KbE/ml.

4.5 Vorkommen von Bakterien des MTC in Wildbret von Rotwild aus der Region Oberallgäu (Bayern)

Die Untersuchung der 50 Wildbret-Proben (vgl. Abschnitt 3.1.2) ergab in allen Fällen ein negatives Real-Time PCR-Ergebnis bei der Testung auf Bakterien des MTC. Die interne Amplifikationskontrolle war bei allen Proben positiv. Die Positiv-Kontrollen führten bei sämtlichen Proben zu einem positiven PCR-Signal, während dies bei den Negativ-Kontrollen ausblieb. Zudem konnte in der kulturellen Untersuchung bei 49 der 50 Proben kein Wachstum von Mykobakterien-ähnlichen Keimen bei den drei verwendeten Nährmedien beobachtet werden. Bei einer der Proben war jedoch nach 8 Wochen Kultivierung auf allen Nährmedien Bakterienwachstum zu beobachten gewesen. Diese stellten sich auf den Festnährmedien als erhabene, beige Kolonien mit rauer Oberfläche und ungleichmäßigem Rand dar (Abbildung 19). In dem Flüssignährmedium hatten sich die Bakterien am Boden abgelagert und verteilten sich nach dem Aufschütteln in dem Medium als klumpige, beige Haufen (Abbildung 20).

Mit dem Isolat wurde unter Verwendung von Universalprimern eine PCR zur Amplifizierung von 16S rRNA-Gensequenzen durchgeführt. Alle hieraus ermittelten Nukleotidsequenzen (Tabelle 37 im Anhang) ergaben nach Abgleich mit dem BLAST-Programm eine Übereinstimmung von 99 % bzw. 100 % mit *Mycobacterium avium* (siehe Tabelle 38 im Anhang).

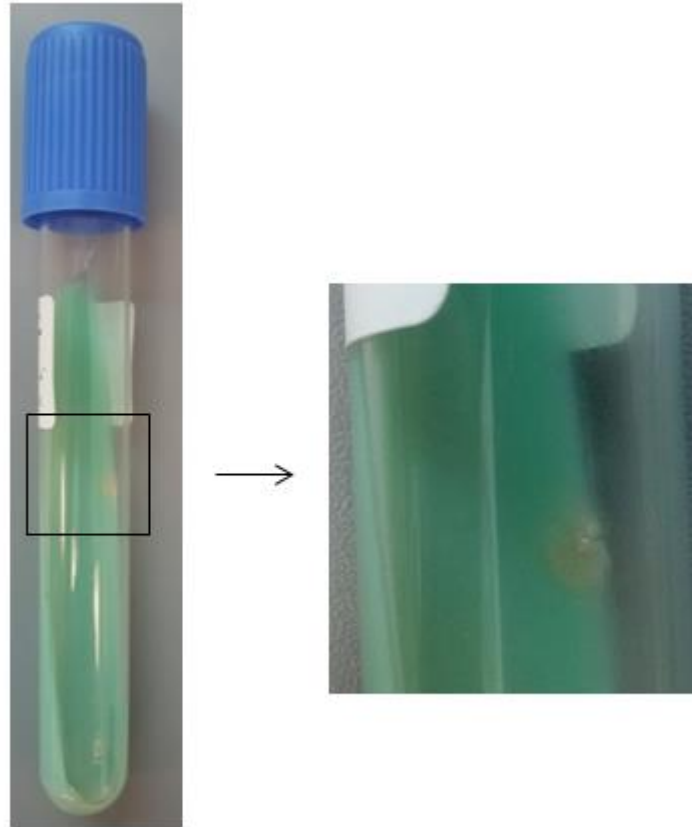


Abbildung 19: Links: Bakterienkolonie isoliert aus Wildbret auf Löwenstein Jensen-Festnährmedium nach achtwöchiger Inkubation bei 37 °C; rechts: vergrößerter Ausschnitt aus dem linkem Bild

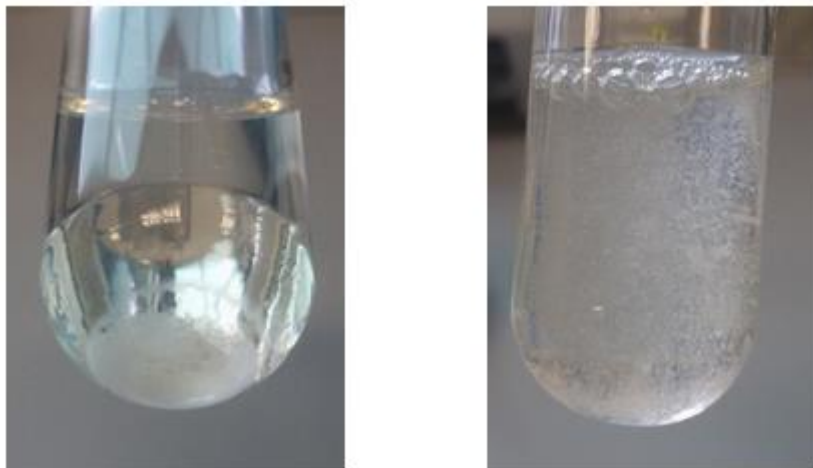


Abbildung 20: Bakterien isoliert aus Wildbret in Kirchner-Flüssignährmedium nach achtwöchiger Inkubation bei 37 °C; links: auf dem Boden abgelagerte Bakterien, rechts: aufgeschüttelte Probe

5 Diskussion

5.1 Etablierung der Propidium Monoazid (PMA) Real-Time PCR zur Lebend-Tot-Differenzierung von Bakterien des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes in Wildbret

Die als „Goldstandard“ geltende kulturelle Untersuchung ist infolge des langsamen Wachstums von Bakterien des *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplexes (MTC) von bis zu acht Wochen für frische Lebensmittel im Verdachtsfall kaum anwendbar (TYRRELL et al., 2012). Gut geeignet sind hierfür hingegen molekularbiologische Verfahren, wie z. B. die PCR, da diese eine schnelle Ergebnisauswertung ermöglichen. Die PCR gibt jedoch keinen Aufschluss darüber, ob es sich bei einem positiven Ergebnis um lebende oder tote Bakterien handelt (KIM et al., 2014). Lediglich lebende Mikroorganismen sind infektiös und stellen somit ein Gefährdungspotential in Bezug auf Lebensmittel dar (STINGL et al., 2015). Um ausschließlich lebende Bakterien des MTC in Wildbret schnell mittels PCR nachweisen zu können, ist es daher erforderlich, die PCR mit einer Methode zur Lebend-Tot-Differenzierung der Bakterien zu kombinieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde hierfür die Methode der Propidium Monoazid (PMA) Real-Time PCR ausgewählt. PMA wird einer Bakterienprobe vor der DNA-Extraktion zugegeben und diffundiert aufgrund der Membranschädigung in tote Zellen. Dort bindet PMA unter Lichteinwirkung an die DNA und verhindert dadurch die Amplifikation der DNA in der sich anschließenden PCR. Das PCR-Signal toter Bakterien wird somit unterdrückt (WAGNER et al., 2015). Studien haben gezeigt, dass PMA kaum in lebende Zellen diffundiert, die Diffusion in tote Zellen jedoch ebenfalls eingeschränkt ist und somit die Gefahr falsch positiver Ergebnisse besteht (FITTIPALDI et al., 2012). Das PCR-Signal toter Bakterien wird somit nicht vollständig unterdrückt, sondern nur verringert. In solchen Fällen sind die Ct-Werte in der Real-Time PCR von mit PMA behandelten toten Bakterien im Vergleich zu nicht mit PMA behandelten Zellen lediglich erhöht (RICCHI et al., 2014).

Als Alternative zur PMA Real-Time PCR bieten sich die Ethidium Monoazid (EMA) Real-Time PCR und die reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) an. Mit diesen beiden Methoden ist ebenfalls unter der Verwendung der PCR ein schneller Nachweis lebender Bakterien möglich. Die EMA Real-Time PCR und die RT-PCR weisen dabei allerdings die Tendenz auf, falsch negative Ergebnisse zu liefern (FITTIPALDI et al., 2012; YANEZ et al., 2011). Tierisches

Gewebe, in welchem Bakterien des MTC nachgewiesen wurden, muss nach Anhang I Abschnitt IV Kapitel IX der Verordnung (EG) 854/2004 für genussuntauglich erklärt werden (VERORDNUNG(EG)854/2004). Für Bakterien des MTC gilt somit eine Nulltoleranz im Hinblick auf das Vorkommen in Lebensmitteln, daher müssen falsch negative Ergebnisse in jedem Fall vermieden werden. Somit wurde die PMA Real-Time PCR in der vorliegenden Arbeit für den schnellen Nachweis lebender Mykobakterien in Wildbret als geeigneter angesehen als die EMA Real-Time PCR und die RT-PCR, aufgrund deren Tendenz, falsch negative Ergebnisse zu liefern (FITTIPALDI et al., 2012; YANEZ et al., 2011).

5.1.1 Optimierung der PMA Real-Time PCR an Reinkulturen von *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin-Pasteur

In einem ersten Schritt wurde in der vorliegenden Arbeit die PMA-Behandlung an Reinkulturen von *M. bovis* BCG-Pasteur optimiert. Hierbei wurde zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse immer mit gleichen Bakterienzahlen gearbeitet. Die optische Dichte (OD) wurde daher auf einen Wert von 0,1 eingestellt. Durch eine Keimzahlbestimmung wurde ermittelt, dass eine OD von 0,1 ca. 10^6 Kolonie-bildenden Einheiten (KbE) pro ml entspricht. Die PMA-Behandlung von toten Bakterien führte in allen durchgeführten Versuchen im Vergleich zu unbehandelten Bakterien zu einer Erhöhung der Ct-Werte in der PCR. Der Farbstoff scheint folglich in die abgetöteten Zellen aufgenommen worden zu sein und sich dort an die DNA gebunden zu haben, wodurch die DNA-Amplifizierung in der PCR gehemmt wurde. Eine vollständige Unterdrückung des PCR-Signals durch die PMA-Behandlung von toten Keimen blieb dabei allerdings aus, was sich mit den Ergebnissen anderer Studien gleicht (FITTIPALDI et al., 2012). Im optimalen Fall würde die PMA-Behandlung zu einer vollständigen Unterbindung des PCR-Signals bei toten Bakterien führen, während das Signal lebender Bakterien nicht beeinflusst wird (FITTIPALDI et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit war die Höhe der Ct-Wert-Verschiebung in der Real-Time PCR dabei abhängig von den Bedingungen, die im Rahmen der Optimierung der PMA-Behandlung von *Mycobacterium (M.) bovis* Bacille Calmette-Guérin (BCG)-Pasteur verändert wurden.

5.1.1.1 PMA-Konzentration

FITTIPALDI et al. (2012) empfehlen zur Verbesserung der PMA-Diffusion in tote Zellen, mit höheren PMA-Konzentrationen zu arbeiten. In der vorliegenden Arbeit führte eine Erhöhung der PMA-Konzentration von 10 μ M auf bis zu 300 μ M zu einer verstärkten Unterdrückung

des PCR-Signals toter Bakterien. Dies zeigte sich in einer Erhöhung der Ct-Werte von mit PMA behandelten abgetöteten Bakterien. Die Ct-Wert-Differenz zwischen mit PMA und nicht mit PMA behandelten toten Bakterien erhöhte sich somit in Folge höherer PMA-Konzentrationen. Mit einer Konzentration von 100 μM konnte dabei die größte Ct-Wert-Erhöhung erreicht werden, welche sich signifikant von einer PMA-Konzentration von 10 μM unterschied. Höhere Konzentrationen hatten keinen zusätzlichen Einfluss auf die Ct-Werte. Die unvollständige Unterdrückung des PCR-Signals scheint somit nicht an einer zu geringen Farbstoff-Konzentration zu liegen. Andernfalls hätten weitere Konzentrationserhöhungen noch höhere Ct-Werte in der PCR zur Folge haben müssen.

Bei lebenden *M. bovis* BCG-Pasteur Keimen führte der Einsatz von PMA im Vergleich zu unbehandelten vitalen Zellen in der vorliegenden Arbeit nur zu einer geringen Erhöhung der Ct-Werte. Eine PMA-Konzentration von 10 μM hatte dabei den gleichen Effekt auf das Real-Time PCR-Signal wie eine Konzentration von 100 μM . Eine leichte Erhöhung der Ct-Werte durch PMA bei lebenden Bakterien wurde z. B. auch bei *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (KRALIK et al., 2010) oder *Salmonella enterica* (LIANG et al., 2011) beobachtet. Dies lässt vermuten, dass PMA teilweise auch die Membranen lebender Zellen durchdringen kann. Eine andere Erklärung wäre, dass sich membrangeschädigte Bakterien in der Probe befunden haben, deren PCR-Signal folglich durch PMA unterdrückt wurde (YANEZ et al., 2011).

Aufgrund der Ergebnisse wurde eine Konzentration von 100 μM PMA für *M. bovis* BCG-Pasteur als optimal erachtet. Bei dieser Konzentration konnte die höchste PCR-Signalunterdrückung an toten Keimen erreicht werden, während das PCR-Signal lebender Keime im Vergleich zu einer geringeren PMA-Konzentration nicht signifikant beeinflusst wurde. DE ASSUNCAO et al. (2014) konnten bei *M. tuberculosis* ebenfalls mit einer Konzentration von 100 μM PMA die höchste PCR-Signalunterdrückung erreichen. Auch bei anderen Bakterienspezies liegen die verwendeten PMA-Konzentrationen häufig zwischen 50 μM und 100 μM (NKUIPOU-KENFACK et al., 2013).

5.1.1.2 Inkubationszeit

Die Verlängerung der PMA-Inkubationszeit von 15 Minuten auf 30 Minuten bzw. 60 Minuten hatte in der vorliegenden Arbeit keine signifikant verbesserte Aufnahme von PMA in abgetötete *M. bovis* BCG-Pasteur Bakterien zur Folge. Die Ct-Werte in der PCR erhöhten sich

bei den längeren Inkubationszeiten nicht im Vergleich zu einer 15-minütigen Inkubation. Der Einfluss einer verlängerten Inkubation auf lebende Zellen wurde daher nicht getestet, da die 15-minütige Inkubation aus den bisherigen Experimenten aufgrund dieser Ergebnisse beibehalten wurde.

In der Literatur wurde der Verlängerung der PMA-Inkubationszeit allerdings ein positiver Effekt auf die verbesserte Aufnahme von PMA in tote Zellen zugeschrieben. KRALIK et al. (2010) testeten PMA-Inkubationszeiten von 5, 20 und 50 Minuten an *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Dabei hatte die 20-minütige Inkubation keine signifikante Erhöhung der Ct-Werte in der PCR bei toten Zellen zur Folge. Die 50-minütige Inkubation führte hingegen zu einer erhöhten PCR-Signalunterdrückung. Allerdings führte eine 50-minütige Inkubation auch zu einer verstärkten Aufnahme von PMA in lebende Bakterien. NKUIPOU-KENFACK et al. (2013) konnten bei *Salmonella* Typhimurium und *Listeria monocytogenes* eine Verbesserung der PMA Aufnahme bei einer 30-minütigen Inkubation im Vergleich zu kürzeren Inkubationszeiten feststellen, wobei der Farbstoff dabei nicht vermehrt in lebende Zellen diffundiert. Allerdings wurde hier nur eine PMA-Konzentration von 10 μM verwendet. Die Autoren schlussfolgerten, dass aufgrund der niedrigen PMA-Konzentration ein positiver Effekt auf die PMA-Aufnahme durch längere Inkubationszeiten erzielt werden konnte und dies bei höheren Konzentrationen fraglich ist. Da in den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen mit *M. bovis* BCG-Pasteur eine PMA-Konzentration von 100 μM verwendet wurde, kann durch die hohe Konzentration vermutlich keine verbesserte Aufnahme von PMA in tote Zellen durch eine verlängerte Inkubationszeit erzielt werden.

5.1.1.3 Bestrahlungszeit

Eine Verlängerung der Bestrahlungszeit von 2 Minuten auf 5 Minuten bzw. 10 Minuten führte bei abgetöteten *M. bovis* BCG-Pasteur Keimen in der vorliegenden Arbeit zu keiner Veränderung der PCR-Signalunterdrückung. Daher wurde der Einfluss der Bestrahlungszeit auf lebende Bakterien nicht getestet und die Bestrahlungszeit von 2 Minuten aus den vorhergehenden Versuchen beibehalten. Die Bestrahlung der Proben wurde mit einer 650 Watt Halogenlampe durchgeführt. Dabei soll die Bestrahlung bewirken, dass sich das in die DNA eingelagerte PMA kovalent an die DNA bindet, so dass die DNA in der PCR nicht mehr amplifiziert werden kann (KRUGER et al., 2014). Bei zu kurzen Bestrahlungszeiten besteht die Möglichkeit, dass sich nicht das gesamte PMA durch die Bestrahlung kovalent an

die DNA bindet und die DNA somit vervielfältigt wird. Die Effizienz der PMA-Färbung korreliert direkt mit der Intensität der verwendeten Lichtquelle in Bezug auf die Anregungswellenlänge von PMA (YANEZ et al., 2011). Das Absorptionsmaximum von PMA liegt bei 464 nm (FITTIPALDI et al., 2012), was einen nur sehr kleinen Bereich im gesamten Emissionsspektrum von Halogenlampen darstellt (IGLESIAS et al., 2010). Die Verwendung einer anderen Lichtquelle mit einem engeren Lichtspektrum, wie z. B. eine 460 nm LED-Lampe, könnte eventuell zu einer Verbesserung der PMA-Bindung an die DNA führen (DESNEUX et al., 2015).

5.1.1.4 Inkubationstemperatur

Von einigen Autoren wird eine PMA-Inkubation bei erhöhten Temperaturen vorgeschlagen. NKUIPOU-KENFACK et al. (2013) propagieren, dass eine Inkubationstemperatur, welche um 10 °C höher als die optimale Wachstumstemperatur der Bakterien liegt, zu einer verbesserten PMA-Aufnahme führt. In der vorliegenden Arbeit hat bei *M. bovis* BCG-Pasteur die Erhöhung der PMA-Inkubationstemperatur von Raumtemperatur auf 40 °C, 50 °C bzw. 60 °C zu einer signifikanten Erhöhung der Ct-Werte bei abgetöteten Zellen in der PCR geführt. Hierbei lag die Ct-Wert-Differenz bei 40 °C signifikant höher als bei Raumtemperatur. Die Inkubationstemperaturen von 50 °C und 60 °C verbesserten die PCR-Signalunterdrückung nochmals im Vergleich zu 40 °C. Zwischen 50 °C und 60 °C konnte hingegen kein Unterschied bei toten Zellen festgestellt werden.

Die gesteigerte Hemmung des PCR-Signals bei höheren Inkubationstemperaturen könnte durch eine verbesserte Aufnahme von PMA in tote Zellen durch eine veränderte Membranbeschaffenheit zustande gekommen sein. Bei hohen Temperaturen sind Membranen flüssiger (CAO-HOANG et al., 2008), was zu einer vermehrten Durchlässigkeit des PMA geführt haben könnte. Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen auch die Annahme von NKUIPOU-KENFACK et al. (2013), dass eine um 10 °C höhere Temperatur als die optimale Wachstumstemperatur zu einer erhöhten PMA-Aufnahme führt. Die optimale Wachstumstemperatur von *M. bovis* BCG liegt bei 37 °C (MURRAY et al., 2012), die besten Ergebnisse wurden ab 50 °C erzielt.

Bei vitalen Zellen führten in der vorliegenden Arbeit die Inkubationstemperaturen von 40 °C und 50 °C im Vergleich mit Raumtemperatur zu keiner signifikanten Erhöhung der PCR-Zyklen. Hingegen hatte die PMA-Inkubation von lebenden Zellen bei 60 °C eine

signifikante Erhöhung der Ct-Werte in der PCR mit durchschnittlich 8 Zyklen zur Folge. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Bakterien bei 60 °C geschädigt bzw. abgetötet wurden und somit PMA in die Zellen gelangen konnte. HAMMER et al. (2015) konnten in Versuchen mit *M. caprae* in Milch eine leichte Inaktivierung der Mykobakterien bereits nach 35 Sekunden bei einer Temperatur von 60 °C feststellen, was sich in geringerem Wachstum auf Nährmedium zeigte. Eine PMA-Inkubationstemperatur von 60 °C scheint somit für Bakterien des MTC aufgrund der vermutlichen Schädigung der lebenden Zellen zu hoch zu sein. Aufgrund der Ergebnisse wurde in den folgenden Experimenten mit einer Inkubationstemperatur von 50 °C weitergearbeitet.

5.1.1.5 Substanzen zur Membran-Destabilisierung

Eine weitere Strategie zur Erhöhung der PMA-Aufnahme in tote Zellen kann die Verwendung von Membran-destabilisierenden Agenzien sein (FITTIPALDI et al., 2012). Im Hinblick auf die lipidreiche Zellwand der Mykobakterien wurde diese Strategie als erfolgsversprechend angesehen. Als Membran-destabilisierende Agenzien wurden die Tenside Natriumdesoxycholat und *N*-Lauroylsarcosin ausgewählt, sowie zusätzlich noch Lysozym in Kombination mit Triton® X 100 getestet.

Natriumdesoxycholat und *N*-Lauroylsarcosin hatten sich bereits bei anderen Bakterienarten als fördernd für die Aufnahme von PMA in tote Keime erwiesen und wurden daher in der vorliegenden Arbeit analog hierzu verwendet (WANG et al., 2014). Die Inkubation von *M. bovis* BCG mit diesen Stoffen führte in der vorliegenden Studie allerdings zu keiner erhöhten Aufnahme von PMA in tote Zellen. Die Ct-Wert-Differenzen waren mit denen unbehandelter Proben vergleichbar. Die Verwendung von 0,5 % *N*-Lauroylsarcosin führte sogar zu einer leichten Verringerung der Ct-Wert-Differenz. Einige Autoren haben im Gegensatz dazu bereits erfolgreich Detergenzien zur verbesserten Aufnahme von PMA oder EMA in tote Bakterien getestet. LEE et al. (2009b) überprüften verschiedene Konzentrationen von Natriumdesoxycholat im Hinblick auf die Aufnahme von EMA in *Vibrio vulnificus*. Dabei stellten sie fest, dass eine Konzentration von 0,01 % Natriumdesoxycholat zu einer verbesserten Aufnahme von EMA in tote Zellen führte, während lebende Zellen hiervon unbeeinflusst blieben.

Auch WANG et al. (2014) konnten mit der Verwendung von Membran-destabilisierenden Mitteln die Ergebnisse der viability-PCR (v-PCR) verbessern. Hier wurden zur erhöhten

Aufnahme von PMA in tote *Escherichia coli* 12 Detergenzien getestet. Dabei wurde mit *N*-Lauroylsarcosin die beste PCR-Signalunterdrückung durch PMA bei abgetöteten *Escherichia coli* erreicht. Auch Natriumdesoxycholat führte zu einer verbesserten Aufnahme von PMA in tote Zellen. NKUIPOU-KENFACK et al. (2013) überprüften den Einfluss von Natriumdesoxycholat auf die PMA-Aufnahme in *Salmonella* Typhimurium und *Listeria monocytogenes*. Dabei zeigte sich, dass Natriumdesoxycholat bis zu einer Konzentration von 0,1 % die PMA-Aufnahme in tote *Salmonella* Typhimurium erhöht, ohne dies bei lebenden Zellen zu bewirken. Für *Listeria monocytogenes* zeigte sich hingegen, dass nicht nur die Aufnahme von PMA in tote Zellen, sondern auch in vitale Zellen durch Verwendung des Detergenz erhöht ist.

Die Autoren schlussfolgerten, dass Natriumdesoxycholat in Kombination mit einer v-PCR nur für Gram-negative Bakterien geeignet sei, da dieses auf Gram-positive Bakterien einen abtötenden Effekt besitzt. Für *M. tuberculosis* konnte bereits gezeigt werden, dass Gallensalze wie Desoxycholat das Wachstum hemmen (EPSTEIN et al., 2012). Trotzdem konnte in der vorliegenden Studie mit Natriumdesoxycholat keine verbesserte Aufnahme von PMA in *M. bovis* BCG-Pasteur erreicht werden. Möglicherweise muss die Inkubation mit den Detergenzien länger als eine halbe Stunde erfolgen, um einen positiven Effekt auf die PMA-Aufnahme erzielen zu können. Über eine Erhöhung der Konzentration der verwendeten Detergenzien eine verbesserte Aufnahme zu erzielen, bleibt allerdings fraglich. Ein Überschuss an Detergenzien wie *N*-Lauroylsarcosin und Natriumdesoxycholat kann zu einer Inhibition der PCR führen (BAR et al., 2012).

Die Verwendung von 0,5 % *N*-Lauroylsarcosin führte in der vorliegenden Arbeit zudem im Gegensatz zu geringeren Konzentrationen zu niedrigeren Ct-Werten in der PCR. WANG et al. (2014) konnten eine verminderte Aufnahme von PMA in vitale *Escherichia coli* unter der Verwendung von *N*-Lauroylsarcosin beobachten. Die Autoren begründeten dies mit einer elektrostatischen Interaktion des negativ geladenen *N*-Lauroylsarcosins mit dem positiv geladenen PMA, wodurch eine Aufnahme in lebende Zellen verhindert wurde. Möglicherweise führte dies in der vorliegenden Studie bei der hohen Konzentration von 0,5 % *N*-Lauroylsarcosin auch bei toten *M. bovis* BCG-Pasteur Bakterien zu einer verminderten Aufnahme von PMA in die Zellen.

CIMINO et al. (2006) konnten zeigen, dass die Verwendung von Lysozym und Triton® X 100 die Permeabilität der Zellwand von *M. tuberculosis* für Proteine erhöht. Daher wurde *M. bovis* BCG-Pasteur in der vorliegenden Arbeit analog dazu mit Lysozym und Triton® X 100 behandelt, um zu testen, ob die Permeabilität von PMA in die Zellen hiermit gesteigert werden kann. Obwohl über die Kombination der beiden Stoffe eine erhöhte Permeabilität für Proteine erreichbar ist, scheint dies für die Aufnahme von PMA nicht der Fall zu sein. Möglich wäre aber, dass auch hier eine verlängerte Inkubation mit den Stoffen durchgeführt werden muss. Auch über eine höhere Konzentration der beiden Stoffe müsste nachgedacht werden, allerdings nur in einem solchen Maß, dass intakte Zellen nicht geschädigt werden.

5.1.1.6 Zweimalige PMA-Behandlung

Eine von mehreren Autoren erfolgreich angewandte Strategie zur Verbesserung der PMA-Aufnahme in tote Zellen ist eine wiederholte PMA-Behandlung (FITTIPALDI et al., 2012). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die einmalige PMA-Behandlung mit 100 µM PMA mit einer zweimaligen PMA-Behandlung mit jeweils 50 µM bzw. 100 µM PMA verglichen. Dabei führte eine zweimalige PMA-Behandlung zu einer signifikant stärkeren Hemmung des Real-Time PCR-Signals toter *M. bovis* BCG-Pasteur Bakterien. Die Hemmung konnte durch die zweite PMA-Behandlung um durchschnittlich 3 Ct-Werte gesteigert werden. Der Einsatz von zweimal 50 µM führte zu vergleichbaren Ct-Werten wie die Verwendung von zweimal 100 µM PMA. Die doppelte PMA-Behandlung hat somit scheinbar eine verbesserte PMA-Aufnahme in tote Zellen bewirkt.

Allerdings scheint die doppelte PMA-Behandlung bei vitalen *M. bovis* BCG-Pasteur Bakterien ebenfalls zu einer verstärkten PMA-Aufnahme geführt zu haben, da hier die Ct-Werte im Vergleich zur einfachen PMA-Behandlung ebenfalls signifikant erhöht waren. Die PCR-Hemmung der vitalen Bakterien war bei der doppelten PMA-Behandlung mit 100 µM nochmals stärker als bei Verwendung von zweimal 50 µM. Möglicherweise wurden die Zellen durch die Wärmeentwicklung bei der Bestrahlung ganz leicht geschädigt, so dass bei einer zweiten PMA-Gabe der Farbstoff vermehrt in die Zellen gelangen konnte. Dafür, dass die Schädigung nur sehr leicht war, spricht auch, dass beim Einsatz von zweimal 50 µM das Real-Time PCR-Signal der vitalen Zellen weniger unterdrückt wurde als bei zweimal 100 µM PMA. Die bakterielle Zellmembran muss erst einen gewissen Grad der Schädigung aufweisen, damit PMA in die Zelle aufgenommen wird (LEE et al., 2009a).

Es könnte also sein, dass die Schädigung sehr gering war, so dass der Farbstoff erst bei höheren Konzentrationen vermehrt in die vitalen Zellen gelangen konnte. Bei *M. avium* subsp. *paratuberculosis* stellte sich eine zweifache PMA-Färbung mit 25 µM PMA als wirkungsvoller heraus als eine einmalige PMA-Gabe von 50 µM (KRALIK et al., 2010). Dabei lag eine durchschnittliche Ct-Wert-Erhöhung von 1,5 bei abgetöteten Bakterien vor. Die Bestrahlung wurde hier ebenfalls mit einer 650 Watt Halogenlampe mit den gleichen Abständen zur Probe und den gleichen Bestrahlungszeiten durchgeführt. Auf lebende Keime hatte die doppelte PMA-Färbung mit 25 µM keinen Einfluss. Eventuell ist dies mit der niedrigeren PMA-Konzentration zu begründen.

Nach den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit ist eine doppelte PMA-Behandlung grundsätzlich für die verbesserte PMA-Aufnahme in tote Mykobakterien zu empfehlen. Allerdings müsste die erhöhte PMA-Diffusion in lebende Bakterien dabei verhindert werden. Die Verwendung einer niedrigeren PMA-Konzentration als 50 µM könnte bei einer doppelten PMA-Behandlung eventuell die vermehrte PMA-Diffusion in lebende Bakterien verhindern. Auch der Gebrauch einer anderen Lichtquelle, bei welcher keine Wärmeentwicklung bei der Bestrahlung entsteht, könnte möglicherweise die Aufnahme von PMA in lebende Zellen bei der doppelten PMA-Behandlung verhindern.

5.1.1.7 Optimierung der PMA Real-Time PCR

Von allen in der vorliegenden Arbeit getesteten Bedingungen der PMA-Behandlung führten demnach die Erhöhung der PMA-Konzentration auf 100 µM sowie die Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 50 °C zu einer signifikant verstärkten Hemmung des PCR-Signals toter *M. bovis* BCG-Pasteur Bakterien, ohne dass vitale Zellen dadurch signifikant beeinflusst wurden. Es konnte allerdings keine vollständige Unterdrückung des PCR-Signals toter *M. bovis* BCG-Pasteur Bakterien erreicht werden.

Andere Autoren konnten ebenfalls an verschiedenen Bakterienspezies beobachten, dass eine PMA-Behandlung nicht zu einer vollständigen Unterdrückung des PCR-Signals toter Bakterien führt. Für *Staphylococcus aureus* konnte lediglich eine Ct-Wert-Erhöhung von 10 erreicht werden (SCHMIDLIN et al., 2010). Die Verwendung von PMA bei *Listeria monocytogenes* führte nur zu einer Ct-Wert-Erhöhung von 8 (PAN et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Optimierung der PMA-Behandlung eine Ct-Wert-Differenz von durchschnittlich sechs bis acht PCR-Zyklen bei toten

M. bovis BCG-Pasteur Keimen aus Reinkultur erreicht werden. Dies entspricht einer eher geringen PCR-Signalreduktion durch PMA. Üblicherweise liegt die PCR-Signalreduktion bei toten Bakterien aus Reinkulturen bei ca. 4 log₁₀-Stufen (NKUIPOU-KENFACK et al., 2013).

Auch NOCKER et al. (2006) konnten bereits feststellen, dass bei Mykobakterien generell eine im Vergleich zu anderen Bakterienarten geringere Signalreduktion durch PMA in der PCR erreicht wird. Dies konnte durch andere Autoren für *M. tuberculosis* und *M. avium* subsp. *paratuberculosis* bestätigt werden (DALTON et al., 2013; KIM et al., 2014; KRALIK et al., 2010; PHOLWAT et al., 2011; RICCHI et al., 2014). Der Grund hierfür könnte der spezielle Aufbau der mykobakteriellen Zellwand und die damit einhergehende Widerstandsfähigkeit sein, wodurch die Diffusion von PMA selbst in membrangeschädigte Zellen erschwert ist (RICCHI et al., 2014). Theoretisch könnte in der vorliegenden Arbeit auch die Abtötung der Bakterien bei 90 °C für 30 Minuten nicht ausreichend gewesen sein. Somit hätten sich noch lebende Bakterien in der Probe befunden, was eine nicht vollständige Unterdrückung des PCR-Signals erklären könnte. Dies kann allerdings mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, da die Bakterien nach der Erhitzung routinemäßig auf Nährmedium inkubiert wurden, um ein eventuelles Wachstum und damit Überleben ausschließen zu können.

Auffällig war weiterhin, dass mit den optimierten Bedingungen eine Schwankung der Ct-Wert-Differenzen auftrat. Die Ct-Wert-Unterschiede lagen variabel bei 6 PCR-Zyklen und bei 8 PCR-Zyklen, obwohl die PMA-Behandlung unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurde. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Mykobakterien dazu neigen, miteinander zu verklumpen, wodurch der Farbstoff nicht immer alle Zellen erreichen konnte. Auch KRALIK et al. (2010) stellten wechselhafte Ct-Wert-Differenzen bei *M. avium* subsp. *paratuberculosis* fest und führten dies auf das Klumpungsverhalten der Mykobakterien zurück.

5.1.2 Anwendbarkeit der optimierten PMA Real-Time PCR an *M. bovis* BCG-Pasteur in Wildbret

Nach der Optimierung an Reinkulturen wurde die PMA-Färbung an artifiziell mit *M. bovis* BCG-Pasteur kontaminiertem Wildbret getestet. Dabei waren die Ct-Wert-Differenzen bei den abgetöteten *M. bovis* BCG-Pasteur Keimen in Wildbret um durchschnittlich ca. 2 Zyklen geringer als in Reinkulturen. Im Gegensatz zu den Reinkulturen,

bei welchen die Ct-Wert-Differenzen unter den optimierten Bedingungen (100 µM PMA, Inkubation bei 50 °C) zwischen 6 bis 8 PCR-Zyklen betragen, lagen die Ct-Wert-Differenzen bei abgetöteten *M. bovis* BCG-Pasteur Keimen in Wildbret zwischen 4 bis 6 PCR-Zyklen. Dies ist vermutlich auf die Probenmatrix „Wildbret“ zurückzuführen. Der Einsatz von PMA an Umweltproben kann zu einer geringeren Signalreduktion in der PCR führen (NKUIPOU-KENFACK et al., 2013). Ein hoher Anteil an Schwebstoffen und Mikroorganismen im Probenmedium kann durch die Bindung des Farbstoffes zu einer verringerten Aufnahme von PMA in die gesuchten Bakterien führen (VARMA et al., 2009). Auch kann eine unzureichende Lichttransparenz des Probenmediums und eine dadurch nicht ausreichende Photoaktivierung von PMA der Grund hierfür sein (WAGNER et al., 2008).

Die Untersuchung verschiedener Bakterienzahlen in Wildbret-Homogenisat zeigte, dass lediglich bei einer Zellzahl von 10^2 KbE/ml eine vollständige Unterdrückung des PCR-Signals durch die Verwendung von PMA möglich war. Höhere Zellzahlen führten zu einer Erhöhung der Ct-Werte, aber zu keiner vollständigen Signalunterdrückung. Trotzdem ist durch die Verwendung der PMA Real-Time PCR eine Aussage darüber möglich, ob lebende Bakterien des MTC in Wildbret vorhanden sind. PMA wurde Suspensionen mit verschiedenen Anteilen an lebenden und toten *M. bovis* BCG-Pasteur Bakterien in Wildbret-Homogenisat zugegeben. Die Ct-Wert-Differenzen nahmen dabei mit der Verringerung des Anteils toter Bakterien ab, so dass mit PMA eine Differenzierung verschiedener Anteile an lebenden und toten *M. bovis* BCG-Pasteur Keimen durchgeführt werden konnte. Durch eine Regressionsanalyse konnte anschließend ermittelt werden, dass bei einer Ct-Wert-Differenz von 5,72 mit einer Wahrscheinlichkeit von 90 % keine lebenden Keime des MTC in einer Wildbretprobe vorhanden sind. Im Zusammenhang mit Wildbret kann somit geschlossen werden, dass eine Ct-Wert-Differenz $< 5,72$ mit deutlich höherer Wahrscheinlichkeit mit lebenden Bakterien des MTC verbunden sein dürfte, wodurch ein Hinweis zur Lebensmittelsicherheit getroffen werden kann.

Innerhalb der einzelnen Versuche nahmen die Ct-Wert-Unterschiede allerdings nicht in allen Fällen mit dem Anteil toter Bakterien ab. In Versuch 4 (Tabelle 18, Abschnitt 4.3.2) lag z. B. die Ct-Wert-Differenz bei einem Anteil von 75 % toten Bakterien mit 5,26 höher als bei 100 % toten Bakterien mit einem Ct-Wert-Unterschied von 5,0. Dies könnte wiederum mit dem Klumpungsverhalten der Mykobakterien zusammenhängen, so dass das PMA nicht alle

toten Bakterien erreichen konnte. Ebenso könnten aber auch Schwebstoffe oder die DNA anderer Mikroorganismen als Mykobakterien das PMA in der einen Probe mehr gebunden haben als in der anderen Probe. Hierdurch wäre ebenso zu erklären, dass nicht das gesamte PMA die toten Mykobakterien erreichen konnte und somit eine geringere Ct-Wert-Differenz bei 100 % toten Bakterien vorlag.

Um eindeutige Aussagen über das Vorkommen von lebenden Bakterien des MTC in Wildbret machen zu können, müsste die Ct-Wert-Differenz bei Proben mit 100 % toten Bakterien konstant über einem Wert von 5,72 liegen. Hierfür müsste die PMA-Behandlung noch weiter optimiert werden. Neben den bereits weiter oben genannten Ansätzen (vgl. Abschnitt 5.1.1) könnten längere PCR-Amplifikate verwendet werden (ELIZAQUIVEL et al., 2014). Dies hatte bei einigen Autoren einen positiven Effekt auf die viability-PCR (v-PCR). MARTIN et al. (2013) testeten drei verschiedene Amplikon-Längen von 95, 285 und 417 bp an Salmonellen in Kochschinken. Die Hemmung der PCR war dabei abhängig von der Länge des Amplifikats. Nur mit dem langen Amplifikat wurde eine vollständige Unterdrückung des PCR-Signals erreicht. Auch SOEJIMA et al. (2008) konnten mit einem längeren PCR-Produkt ein besseres Ergebnis in einer v-PCR an *Listeria monocytogenes* feststellen. Bei einem PCR-Produkt mit einer Länge von 894 bp konnte in einer konventionellen PCR im Gegensatz zu einem PCR-Produkt von 113 bp eine komplette Unterdrückung der Amplifikation bei toten Zellen erreicht werden. Der Farbstoff bindet mit einer gewissen stöchiometrischen Häufigkeit an die DNA und unterbindet dadurch die Amplifikation in der PCR. Je länger das Amplifikat ist, desto wahrscheinlicher ist es, dass der Farbstoff innerhalb dieser Sequenz gebunden hat, wodurch der Effekt von längeren Amplifikaten auf die bessere Unterdrückung des v-PCR-Signals zu erklären wäre (CONTRERAS et al., 2011). Allerdings sind PCR-Produkte, welche länger als ca. 250 bp sind, kaum kompatibel mit einer Real-Time PCR (SOEJIMA et al., 2008).

Ferner muss bedacht werden, dass, obwohl die Intaktheit der Zellmembran ein allgemein anerkanntes Vitalitätskriterium von Bakterien ist (GREGORI et al., 2001), durch die Verwendung von PMA genau genommen nur die Membranintegrität, aber nicht „lebend“ oder „tot“, festgestellt werden kann (HAMMES et al., 2011). Tötungseffekte, über welche die Membran nicht geschädigt wird, werden mit PMA nicht erfasst. Hierzu gehört z. B. die

Abtötung von Bakterien via UV-Licht (FITTIPALDI et al., 2011). Hierbei tritt vorrangig eine Schädigung der DNA und nicht der Zellmembran ein (SINHA et al., 2002).

5.1.3 Nachweisgrenze von Bakterien des MTC in Wildbret mittels Real-Time PCR

Bei der Bestimmung der Nachweisgrenze von Bakterien des MTC in Fleisch konnte *M. bovis* BCG-Pasteur in artifiziell kontaminiertem Wildbret in der vorliegenden Arbeit in zwei Drittel der Fälle ab einer Bakterienzahl von 10^3 KbE pro Gramm Fleisch mit der PCR detektiert werden. Ein hundertprozentiger Nachweis gelang ab 10^4 KbE pro Gramm. Diese Nachweisgrenze entspricht dem allgemeinen Detektionslevel von Bakterien in Lebensmitteln (ELIZAQUIVEL et al., 2014). Ein Nicht-Funktionieren der PCR bei den negativen PCR-Ergebnissen konnte aufgrund des PCR-Signals der internen Amplifikationskontrolle in allen Proben ausgeschlossen werden.

Das Wildbret wurde vor der Extraktion homogenisiert, um einen größeren Anteil an Gewebe untersuchen zu können. Die Alternative, direkt aus einem Gewebestück die DNA zu extrahieren, wurde als nicht zielführend erachtet. Mykobakterien kommen ungleichmäßig in Geweben vor, so dass die Trefferwahrscheinlichkeit bei kleinen Gewebestücken sinkt (STEWART et al., 2013). VAN DER MERWE et al. (2010) konnten unter Verwendung der Homogenisierung *M. bovis* aus Muskelgewebe von an Tuberkulose erkrankten afrikanischen Büffeln und Antilopen erfolgreich isolieren. Die Tiere wiesen hier allerdings makroskopisch sichtbare Läsionen in verschiedenen Organen auf. Gerade im Hinblick auf Tuberkulose-positive Tiere mit nicht sichtbaren Läsionen ist jedoch bekannt, dass sich der Nachweis der Erreger aus Gewebeproben häufig schwierig darstellt, da die Bakterien hier in relativ geringen Mengen vorliegen (STEWART et al., 2013).

Die ermittelte Nachweisgrenze von 10^3 KbE pro Gramm Fleisch könnte sich somit als zu niedrig erweisen, so dass die Sensitivität der Methode verbessert werden müsste. Hier könnte ein Anreicherungsschritt vor der Untersuchung der Proben hilfreich sein, bei welchem sich die lebenden Bakterien auf Zahlen oberhalb der Nachweisgrenze vermehren können. Dies wurde im Zusammenhang mit einer v-PCR bei Lebensmitteln bereits erfolgreich mit Salmonellen praktiziert (LIANG et al., 2011). Aufgrund des langsamen Wachstums der Mykobakterien würde dies die Dauer bis zur Ergebnisauswertung allerdings deutlich verlängern. Ein schnelleres Verfahren zur Verbesserung des Nachweises könnte die biomagnetische Separation darstellen. Dabei binden sogenannte Magnetbeads an die

Zielbakterien; über ein Magnetfeld können die Bakterien daraufhin aus den Proben gezielt abgeschieden werden (BOSCHKE et al., 2005). STEWART et al. (2013) konnten bereits zeigen, dass die Sensitivität des Nachweises von *M. bovis* aus Lymphknoten mit dieser Methode gesteigert werden kann. Dabei führte die klassische kulturelle Untersuchung bei nur 2,7 % der Kulturen aus Lymphknoten Tuberkulose-positiver Tiere mit nicht sichtbaren Läsionen zu einem positiven Ergebnis. Durch den Einsatz der biomagnetischen Separation konnte die Nachweisrate auf 70,3 % gesteigert werden. Mithilfe der biomagnetischen Separation könnte zudem gleichzeitig das Problem umgangen werden, dass die Probenmatrix „Wildbret“ einen negativen Effekt auf die Aufnahme von PMA in die Mykobakterien hat. Die Bakterien wären von der Probenmatrix getrennt und könnten in ein Medium überführt werden, welches das PMA nicht beeinflusst. Somit sollten annähernd die gleichen Ct-Wert-Unterschiede wie bei Reinkulturen zu erzielen sein, wodurch die Ct-Wert-Unterschiede konstant über 5,72 liegen könnten.

5.2 Vorkommen von Bakterien des MTC in Wildbret von Rotwild aus der Region Oberallgäu (Bayern)

In den 50 untersuchten Wildbretproben von Rotwild aus der bayerischen Region Oberallgäu konnten keine Bakterien des MTC mittels Kultur und Real-Time PCR nachgewiesen werden. Da sämtliche Positiv-Kontrollen sowie die internen Amplifikationskontrollen aller Proben ein Real-Time PCR-Signal generierten, konnte ein negatives PCR-Ergebnis aufgrund einer fehlerhaften DNA-Extraktion oder einer Hemmung der PCR ausgeschlossen werden. Bei der kulturellen Untersuchung konnte in einer Wildbret-Probe Wachstum von Bakterien beobachtet werden, deren Morphologie Übereinstimmungen mit der von Bakterien des MTC zeigte. Erhabene Bakterien-Kolonien mit rauer Oberfläche und ungleichmäßigem Rand auf Festnährmedium sowie ungleichmäßig verteilte, verklumpte Haufen in Flüssignährmedium sind kennzeichnend für die Morphologie u. a. von Bakterien des MTC (JULIAN et al., 2010; LEMASSU et al., 1992).

Die DNA des Bakterienisolats wurde extrahiert und eine PCR mit Universalprimern zur Amplifizierung von 16S rRNA-Gensequenzen nach DORN-IN et al. (2015) durchgeführt. Einige Abschnitte der Gensequenz der 16S rRNA sind hochkonserviert, wodurch Universalprimer an diesen Abschnitten unabhängig von der Bakterienspezies binden können. Dazwischen liegen variable Sequenzbereiche, welche zur Identifizierung der Bakterienart herangezogen werden können (SCHMALENBERGER et al., 2001). Die mit den Universalprimern in der vorliegenden

Arbeit hergestellten Amplifikate wurden sequenziert, dabei konnte nach Abgleich mit Sequenz-Datenbanken die Anwesenheit von *M. avium* bestätigt werden. Der Erreger wurde nicht weiter bis auf die Subspezies-Ebene differenziert.

Die Region Oberallgäu wurde ausgesucht, da hier aus den zuletzt veröffentlichten Daten aus der Jagdsaison 2012/2013 die höchste Tuberkulose-Prävalenz beim Rotwild in Bayern mit 5,3 % hervorging (BÜTTNER et al., 2013). Die Anzahl von 50 Proben in der vorliegenden Arbeit kann allerdings nicht als repräsentative Stichprobe gesehen, sondern muss als Voruntersuchung betrachtet werden. In Anlehnung an den „Leitfaden zur Bestimmung von Stichprobenumfängen“ des Friedrich-Loeffler-Instituts wären 50 Proben bei einer Tuberkulose-Prävalenz von 5,3 % repräsentativ gewesen, wenn insgesamt lediglich 70 Tiere erlegt und in den Verkehr gelangt wären (FLI, 2015). Die erforderliche Stichprobenanzahl vergrößert sich mit der Zahl der erlegten Tiere und dem Sinken der Tuberkulose-Prävalenz unter den Tieren (FLI, 2015).

Aus dem negativen Ergebnis der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Wildbret-Proben kann somit nicht geschlussfolgert werden, dass sich kein Fleisch von Tuberkulose-positiven Tieren im Verkehr zum menschlichen Verzehr befindet. Zudem muss beachtet werden, dass wie bereits beschrieben, der Nachweis von Bakterien des MTC aus Gewebeprobe von Tieren mit nicht sichtbaren Läsionen häufig nicht gelingt (vgl. Abschnitt 5.1.3). Tiere mit offensichtlichen tuberkulösen Läsionen können bei der Wildbretuntersuchung als nicht zum Verzehr geeignet erkannt werden. Es muss aber davon ausgegangen werden, dass Fleisch von Tieren mit nicht sichtbaren Läsionen in den Handel kommt (LUGTON et al., 1998). Ein Schuss z. B. in das Abdomen der Tiere könnte dazu beitragen, dass Bakterien in den Blutkreislauf gelangen und im Muskelgewebe verteilt werden, obwohl dieses vorher steril gewesen ist. Zudem könnten die Bakterien durch Kreuzkontaminationen auf das Fleisch gelangen. Durch Nichteinhaltung von Hygieneregeln könnten die Mykobakterien z. B. über Messer bei einem unbemerkten Anschneiden von erregerhaltigem Gewebe auf dem Fleisch verteilt werden (ATANASSOVA et al., 2008).

5.3 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Verwendung von PMA das Real-Time PCR-Signal toter *M. bovis* BCG-Pasteur Keime verringert werden. Mithilfe der optimierten PMA Real-Time PCR konnte somit erfolgreich eine Differenzierung von lebenden und toten

M. bovis BCG-Pasteur Bakterien in Wildbret durchgeführt werden. Anhand einer logistischen Regressionsanalyse konnte damit ein Modell erstellt werden, mit dessen Hilfe über die Verwendung der PMA Real-Time PCR die Wahrscheinlichkeit ermittelt werden kann, ob Wildbret mit vitalen Bakterien des MTC kontaminiert ist. Weitere Studien sind nötig, um die Aussage zur Wahrscheinlichkeit über das Vorkommen von lebenden Mykobakterien in Wildbret noch zu erhöhen und um die Sensitivität der Methode zu steigern.

In 50 Wildbret-Proben von Rotwild aus der bayerischen Region Oberallgäu konnten keine Bakterien des MTC nachgewiesen werden. In einem Fall wurde jedoch *M. avium* aus einer Wildbret-Probe isoliert. Zur genauen Abschätzung über das Vorkommen von Bakterien des MTC in Wildbret sollten weitere Untersuchungen an einer größeren Anzahl an Wildbret-Proben folgen.

6 Zusammenfassung

Die Rindertuberkulose ist eine anzeigepflichtige Tierseuche und wird durch die bakteriellen Erreger *Mycobacterium (M.) bovis* und *M. caprae* hervorgerufen. Beide Erreger gehören zum *Mycobacterium-tuberculosis*-Komplex (MTC) und können aufgrund ihres zoonotischen Potentials auch den Menschen sowie andere Tierarten wie z. B. Rotwild infizieren. Eine Übertragung der Erreger auf den Menschen kann durch den direkten Kontakt mit infizierten Tieren oder durch Lebensmittel infizierter Tiere erfolgen.

Innerhalb der letzten Jahre wurde *M. caprae* bei Rotwild in der Alpenregion nachgewiesen. Bei Tuberkulose-infiziertem Rotwild fehlen häufig die makroskopisch sichtbaren, typischen pathologisch-anatomischen Veränderungen. Die Tierkörper werden somit im Rahmen der Wildbretuntersuchung als gesundheitlich unbedenklich für den Menschen eingestuft. Daher besteht die Gefahr, dass Fleisch von Tuberkulose-infiziertem Rotwild für den menschlichen Verzehr in den Verkehr gelangt. Da nur lebende Bakterien infektiös sind, ist zur Risikobewertung von Lebensmitteln lediglich der Nachweis vitaler Bakterien relevant. Dadurch, dass Bakterien des MTC mit bis zu acht Wochen ein besonders langsames Wachstum auf Nährmedien zeigen, ist die kulturelle Untersuchung für frische Lebensmittel im Verdachtsfall jedoch nicht anwendbar. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, ein schnelles und sensitives Verfahren zur Lebend-Tot-Differenzierung von Bakterien des MTC in Wildbret zu etablieren.

Hierfür wurde der Farbstoff Propidium Monoazid (PMA) in Kombination mit einer Real-Time PCR verwendet. PMA diffundiert aufgrund der Membranschädigung in tote Zellen und bindet dort unter Lichteinwirkung irreversibel an die DNA. Dadurch kann die DNA der toten Bakterien im Optimalfall in einer anschließenden PCR nicht mehr vervielfältigt werden. In lebende Bakterien kann PMA kaum diffundieren, da diese eine intakte Zellmembran aufweisen. Somit kann deren DNA trotz PMA-Behandlung in einer PCR nachgewiesen werden.

Die PMA Real-Time PCR wurde zunächst an Reinkulturen des zum MTC gehörenden Impfstamms *M. bovis* Bacille Calmette-Guérin (BCG) optimiert. Als variable Parameter wurden Veränderungen in der PMA-Konzentration, der Inkubationszeit, der Bestrahlungszeit und der Inkubationstemperatur vorgenommen. Zudem wurde die Wirkung verschiedener Substanzen, hauptsächlich Tenside, sowie die Wirkung einer zweimaligen PMA-Behandlung

der Bakterien auf die PMA-Diffusion in die Bakterien und damit auf das Real-Time PCR-Signal getestet. Über Veränderungen der PMA-Konzentration und der Inkubationstemperatur konnte dabei ein positiver Effekt auf die PMA-Aufnahme in tote Bakterien erzielt werden. Anschließend wurde die Methode an artifiziell mit *M. bovis* BCG kontaminiertem Wildbret getestet. Das Real-Time PCR-Signal toter *M. bovis* BCG-Keime in Wildbret konnte durch die Verwendung von PMA bis zu einer Bakterienzahl von 10^2 Kolonie-bildenden Einheiten (KbE)/ml vollständig unterdrückt werden. Höhere Bakterienzahlen führten zu einer partiellen Unterdrückung des Real-Time PCR-Signals. Mithilfe einer logistischen Regressionsanalyse konnte durch die partielle Unterdrückung des Real-Time PCR-Signals ein Modell erstellt werden, mit dessen Hilfe die Wahrscheinlichkeit bestimmt werden kann, ob sich lebende Bakterien des MTC in Wildbret befinden. Die PMA Real-Time PCR ist somit grundsätzlich zum Nachweis lebender Bakterien des MTC in Wildbret geeignet. Um die Aussage zur Wahrscheinlichkeit noch zu erhöhen, sollten weitere Studien zur Optimierung der PMA-Aufnahme in tote Mykobakterien folgen.

Zudem erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Untersuchung von 50 Wildbretproben aus der bayerischen Region Oberallgäu mittels Kultur und Real-Time PCR auf das Vorkommen von Bakterien des MTC. Dabei konnten keine Bakterien des MTC nachgewiesen werden. Aus einer Wildbretprobe wurde allerdings *M. avium* kulturell isoliert, was durch eine Sequenzierung von 16S rRNA-Gensequenzen des Isolats bestätigt wurde. Um das vom Wildbret ausgehende Gefährdungspotential aus Regionen mit hohen Tuberkulose-Prävalenzen beim Rotwild vollumfänglich einschätzen zu können, wären Untersuchungen an größeren Probenmengen erforderlich.

7 Summary

Bovine tuberculosis is a notifiable animal disease and is caused by the bacterial pathogens *Mycobacterium (M.) bovis* and *M. caprae*. Both pathogens belong to the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) and can also infect humans and other animal species like red deer due to their zoonotic potential. A transmission of the pathogens to humans can occur through direct contact with infected animals or through food from infected animals.

In recent years *M. caprae* has been detected in red deer in the Alpine region. Red deer infected with tuberculosis often lack the macroscopically visible, typical tuberculosis-like lesions. The carcasses are thus classified as nonhazardous for human health. Therefore, there is a risk that meat from red deer infected with tuberculosis passes for human consumption. Since only living bacteria cause infections, only the detection of vital bacteria is relevant for the risk assessment of food. Due to the slow growth rate of bacteria of the MTC in culture of up to eight weeks, the cultural examination of fresh food is not applicable to suspicious cases. Therefore, an attempt was made in this thesis to establish a rapid and sensitive method for discriminating live and dead bacteria of the MTC in venison.

For this purpose the dye propidium monoazide (PMA) was used in combination with a real-time PCR. PMA penetrates dead cells with compromised membranes and is irreversibly cross-linked to the DNA by exposure to bright light. This leads to a non-amplification of the DNA from dead bacteria in a subsequent PCR. PMA barely penetrates vital bacterial cells with intact cell membranes. Thus, the DNA of vital bacteria can be detected in a PCR despite PMA treatment.

Initially, the PMA real-time PCR was optimized. For this purpose *M. bovis* Bacille Calmette Guerin (BCG), a vaccine strain belonging to the MTC, was chosen. The optimized variables included the PMA concentration, incubation time, light exposure time and incubation temperature. In addition, membrane-destabilizing agents and double PMA-treatment were tested and evaluated to determine their effect on the penetration of PMA into the bacteria, and hence on the real-time PCR signal. Application of higher dye concentrations and sample exposure at higher temperatures had a positive effect on the penetration of PMA into dead bacterial cells. Subsequently, the optimized PMA real-time PCR was applied to artificially with *M. bovis* BCG contaminated venison. The real-time PCR signal from dead *M. bovis* BCG bacteria in venison was completely suppressed by the use of PMA up to a bacterial

concentration of 10^2 colony forming units (CFU)/ml. Higher bacterial concentrations led to a reduction of the real-time PCR signal, but not to a complete suppression. Due to the reduction of the real-time PCR signal, a model could be created by using logistic regression analysis, by which the probability can be determined whether live bacteria of the MTC are present in venison. Thus, the PMA real-time PCR is basically applicable to detect live bacteria of the MTC in venison. Additional studies are required to optimize the penetration of PMA into dead cells to achieve a higher probability regarding the statement whether live mycobacteria are present in venison.

In addition, 50 venison samples from the Bavarian region Oberallgäu were examined by culture and real-time PCR for bacteria of the MTC. No bacteria of the MTC could be detected. *M. avium* was isolated by culture from one meat sample, which was confirmed by the sequencing of the 16S rRNA gene sequence of the isolate. In order to assess the full hazard potential of venison from regions with high prevalence of tuberculosis infection in red deer, studies with larger sample sizes would be required.

8 Literaturverzeichnis

ACMSF. (2002). Report on *Mycobacterium bovis*. A review of the possible health risks to consumers of meat from cattle with evidence of *Mycobacterium bovis* infection. http://acmsf.food.gov.uk/sites/default/files/mnt/drupal_data/sources/files/multimedia/pdfs/committee/acm981b_att.pdf, Zugriffsdatum 26.10.2015.

ADEKAMBI, T., DRANCOURT, M. (2004). Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, *hsp65*, *sodA*, *recA* and *rpoB* gene sequencing. International journal of systematic and evolutionary microbiology 54(Pt 6), 2095-2105.

ALEXANDER, K. A., LAVER, P. N., MICHEL, A. L., WILLIAMS, M., VAN HELDEN, P. D., WARREN, R. M., GEY VAN PITTIUS, N. C. (2010). Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. Emerging infectious diseases 16(8), 1296-1299.

ANONYMOUS. (2015a). Biotium, <https://biotium.com/product/pmatm-dye-propidium-monoazide/>. Zugriffsdatum 28.10.2015.

ANONYMOUS. (2015b). Sigma-Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/e2028?lang=de®ion=DE>. Zugriffsdatum 28.10.2015.

ANTHONY, R. M., COBELENS, F. G., GEBHARD, A., KLATSER, P. R., LUMB, R., RUSCH-GERDES, S., VAN SOOLINGEN, D. (2009). Liquid culture for *Mycobacterium tuberculosis*: proceed, but with caution. The international journal of tuberculosis and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease 13(9), 1051-1053.

ARA, M., SERAL, C., BASELGA, C., NAVARRO, M., DEL PILAR GRASA, M., CARAPETO, F. J. (2000). Primary tuberculous chancre caused by *Mycobacterium bovis* after goring with a bull's horn. Journal of the American Academy of Dermatology 43(3), 535-537.

ARANAZ, A., COUSINS, D., MATEOS, A., DOMINGUEZ, L. (2003). Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology 53(Pt 6), 1785-1789.

ASANTE-POKU, A., YEBOAH-MANU, D., OTCHERE, I. D., ABOAGYE, S. Y., STUCKI, D., HATTENDORF, J., BORRELL, S., FELDMANN, J., DANSO, E., GAGNEUX, S. (2015). *Mycobacterium africanum* is associated with patient ethnicity in Ghana. PLoS neglected tropical diseases 9(1), e3370.

ATANASSOVA, V., APELT, J., REICH, F., KLEIN, G. (2008). Microbiological quality of freshly shot game in Germany. *Meat science* 78(4), 414-419.

AYELE, W. Y., NEILL, S. D., ZINSSTAG, J., WEISS, M. G., PAVLIK, I. (2004). Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. *The international journal of tuberculosis and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* 8(8), 924-937.

BANIHASHEMI, A., VAN DYKE, M. I., HUCK, P. M. (2012). Long-amplicon propidium monoazide-PCR enumeration assay to detect viable *Campylobacter* and *Salmonella*. *Journal of applied microbiology* 113(4), 863-873.

BAR, T., KUBISTA, M., TICHOPAD, A. (2012). Validation of kinetics similarity in qPCR. *Nucleic acids research* 40(4), 1395-1406.

BESNARD, V., FEDERIGHI, M., CAPPELIER, J. M. (2000). Development of a direct viable count procedure for the investigation of VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Letters in applied microbiology* 31(1), 77-81.

BEZOS, J., ALVAREZ, J., MORENO, I., DE JUAN, L., ROMERO, B., RODRIGUEZ, S., DOMINGUEZ, M., TORANO, A., MATEOS, A., DOMINGUEZ, L., ARANAZ, A. (2012). Study of peripheral blood cell populations involved in the immune response of goats naturally infected with *Mycobacterium caprae*. *Research in veterinary science* 93(1), 163-167.

BLOUIN, Y., CAZAJOUS, G., DEHAN, C., SOLER, C., VONG, R., HASSAN, M. O., HAUCK, Y., BOULAIS, C., ANDRIAMANANTENA, D., MARTINAUD, C., MARTIN, E., POURCEL, C., VERGNAUD, G. (2014). Progenitor "*Mycobacterium canettii*" clone responsible for lymph node tuberculosis epidemic, Djibouti. *Emerging infectious diseases* 20(1), 21-28.

BONIOTTI, M. B., GAFFURI, A., GELMETTI, D., TAGLIABUE, S., CHIARI, M., MANGELI, A., SPISANI, M., NASSUATO, C., GIBELLI, L., SACCHI, C., ZANONI, M., PACCIARINI, M. L. (2014). Detection and molecular characterization of *Mycobacterium microti* isolates in wild boar from northern Italy. *Journal of clinical microbiology* 52(8), 2834-2843.

BOSCHKE, E., STEINGROEWER, J., BLEY, T. (2005). Einsatz der biomagnetischen Separation zur mikrobiologischen Qualitätskontrolle von Lebensmitteln. *Chemie Ingenieur Technik* 77(7), 912-919.

BROSCH, R., GORDON, S. V., MARMIESSE, M., BRODIN, P., BUCHRIESER, C., EIGLMEIER, K., GARNIER, T., GUTIERREZ, C., HEWINSON, G., KREMER, K., PARSONS, L. M., PYM, A. S., SAMPER, S., VAN SOOLINGEN, D., COLE, S. T. (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(6), 3684-3689.

BÜTTNER, M., JUST, F., NEUENDORI, E., HÖRMANSDORIER, S., ZIMMERMANN, P. (2013). Tuberkulose bei Rind und Rotwild in Bayern. Rundschau für Fleischhygiene und Lebensmittelüberwachung 65(9), 341-345.

CAO-HOANG, L., MARECHAL, P. A., LE-THANH, M., GERVAIS, P., WACHE, Y. (2008). Fluorescent probes to evaluate the physiological state and activity of microbial biocatalysts: a guide for prokaryotic and eukaryotic investigation. Biotechnology journal 3(7), 890-903.

CARDOSO-TOSET, F., LUQUE, I., AMARILLA, S. P., GOMEZ-GASCON, L., FERNANDEZ, L., HUERTA, B., CARRASCO, L., RUIZ, P., GOMEZ-LAGUNA, J. (2015). Evaluation of rapid methods for diagnosis of tuberculosis in slaughtered free-range pigs. Veterinary journal (London, England: 1997) 204(2), 232-234.

CHEN, P., SHI, M., FENG, G. D., LIU, J. Y., WANG, B. J., SHI, X. D., MA, L., LIU, X. D., YANG, Y. N., DAI, W., LIU, T. T., HE, Y., LI, J. G., HAO, X. K., ZHAO, G. (2012). A highly efficient Ziehl-Neelsen stain: identifying de novo intracellular *Mycobacterium tuberculosis* and improving detection of extracellular *M. tuberculosis* in cerebrospinal fluid. Journal of clinical microbiology 50(4), 1166-1170.

CHO, S. Y., KIM, M. J., SUH, J. T., LEE, H. J. (2011). Comparison of diagnostic performance of three real-time PCR kits for detecting *Mycobacterium* species. Yonsei medical journal 52(2), 301-306.

CIMINO, M., ALAMO, L., SALAZAR, L. (2006). Permeabilization of the mycobacterial envelope for protein cytolocalization studies by immunofluorescence microscopy. BMC microbiology 6, 35.

COMPTON, J. (1991). Nucleic acid sequence-based amplification. Nature 350(6313), 91-92.

CONTRERAS, P. J., URRUTIA, H., SOSSA, K., NOCKER, A. (2011). Effect of PCR amplicon length on suppressing signals from membrane-compromised cells by propidium monoazide treatment. Journal of microbiological methods 87(1), 89-95.

CORNER, L. A., O'MEARA, D., COSTELLO, E., LESELLIER, S., GORMLEY, E. (2012). The distribution of *Mycobacterium bovis* infection in naturally infected badgers. Veterinary journal (London, England : 1997) 194(2), 166-172.

COSTA, P., COUTO, I., VIVEIROS, M., INACIO, J. (2015). Nested and multiplex real-time PCR using dual-labeled probes: detecting and discriminating *Mycobacterium tuberculosis* complex members in cultures and animal tissues. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) 1247, 133-143.

COURCOUL, A., MOYEN, J. L., BRUGERE, L., FAYE, S., HENAULT, S., GARES, H., BOSCHIROLI, M. L. (2014). Estimation of sensitivity and specificity of bacteriology, histopathology and PCR for the confirmatory diagnosis of bovine tuberculosis using latent class analysis. *PloS one* 9(3), e90334.

DALTON, J. P., HILL, C. (2013). Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in synthetic human gastric juice and acidified porcine bile. *Applied and environmental microbiology* 79(4), 1418-1420.

DE ASSUNCAO, T. M., BATISTA, E. L., JR., DEVES, C., VILLELA, A. D., PAGNUSSATTI, V. E., DE OLIVEIRA DIAS, A. C., KRITSKI, A., RODRIGUES-JUNIOR, V., BASSO, L. A., SANTOS, D. S. (2014). Real time PCR quantification of viable *Mycobacterium tuberculosis* from sputum samples treated with propidium monoazide. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 94(4), 421-427.

DELAHAY, R. J., SMITH, G. C., BARLOW, A. M., WALKER, N., HARRIS, A., CLIFTON-HADLEY, R. S., CHEESEMAN, C. L. (2007). Bovine tuberculosis infection in wild mammals in the South-West region of England: a survey of prevalence and a semi-quantitative assessment of the relative risks to cattle. *Veterinary journal (London, England : 1997)* 173(2), 287-301.

DESNEUX, J., CHEMALY, M., POURCHER, A. M. (2015). Experimental design for the optimization of propidium monoazide treatment to quantify viable and non-viable bacteria in piggy effluents. *BMC microbiology* 15, 164.

DO ROSARIO, T. R., DIB, C. C., ROXO, E., PINHEIRO, S. R., VASCONCELLOS, S. A., BENITES, N. R. (2014). Thin layer microcolony culture associated with PCR for early identification of *Mycobacterium bovis*. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]* 45(1), 225-230.

DOMOGALLA, J., PRODINGER, W. M., BLUM, H., KREBS, S., GELLERT, S., MÜLLER, M., NEUENDORF, E., SEDLMAIER, F., BÜTTNER, M. (2013). Region of difference 4 in alpine *Mycobacterium caprae* isolates indicates three variants. *Journal of clinical microbiology* 51(5), 1381-1388.

DORN-IN, S., BASSITTA, R., SCHWAIGER, K., BAUER, J., HOLZEL, C. S. (2015). Specific amplification of bacterial DNA by optimized so-called universal bacterial primers in samples rich of plant DNA. *Journal of microbiological methods* 113, 50-56.

DUARTE, E. L., DOMINGOS, M., AMADO, A., BOTELHO, A. (2008). Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* animal isolates. *Veterinary microbiology* 130(3-4), 415-421.

EFSA. (2003). Tuberculosis in Bovine Animals: Risks for human health and control strategies. *The EFSA Journal* 13, 1-52.

ELIZAKUIVEL, P., AZNAR, R., SANCHEZ, G. (2014). Recent developments in the use of viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field. *Journal of applied microbiology* 116(1), 1-13.

ENTSCHEIDUNG. (1999/467/EG). Entscheidung der Kommission vom 15. Juli 1999 über die amtliche Anerkennung der Tuberkulosefreiheit von Rinderbeständen in bestimmten Mitgliedstaaten und Regionen der Mitgliedstaaten und zur Aufhebung der Entscheidung 97/76/EG. 16.07.1999.

EPSTEIN, D., MISTRY, K., WHITELAW, A., WATERMEYER, G., PETTENGELL, K. E. (2012). The effect of physiological concentrations of bile acids on in vitro growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde* 102(6), 522-524.

FAKRUDDIN, M., MANNAN, K. S., ANDREWS, S. (2013). Viable but nonculturable bacteria: food safety and public health perspective. *ISRN microbiology* 2013, 703813.

FINE, A. E., BOLIN, C. A., GARDINER, J. C., KANEENE, J. B. (2011). A Study of the Persistence of *Mycobacterium bovis* in the Environment under Natural Weather Conditions in Michigan, USA. *Veterinary medicine international* 2011, 765430.

FINK, M., SCHLEICHER, C., GONANO, M., PRODINGER, W. M., PACCIARINI, M., GLAWISCHNIG, W., RYSER-DEGIORGIS, M. P., WALZER, C., STALDER, G. L., LOMBARDO, D., SCHOBESBERGER, H., WINTER, P., BUTTNER, M. (2015). Red deer as maintenance host for bovine tuberculosis, Alpine region. *Emerging infectious diseases* 21(3), 464-467.

FITTIPALDI, M., CODONY, F., ADRADOS, B., CAMPER, A. K., MORATO, J. (2011). Viable real-time PCR in environmental samples: can all data be interpreted directly? *Microbial ecology* 61(1), 7-12.

FITTIPALDI, M., NOCKER, A., CODONY, F. (2012). Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *Journal of microbiological methods* 91(2), 276-289.

FLEKNA, G., STEFANIC, P., WAGNER, M., SMULDERS, F. J., MOZINA, S. S., HEIN, I. (2007). Insufficient differentiation of live and dead *Campylobacter jejuni* and *Listeria monocytogenes* cells by ethidium monoazide (EMA) compromises EMA/real-time PCR. *Research in microbiology* 158(5), 405-412.

FLI. (2013). Friedrich-Loeffler-Institut. Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit. Informationen des FLI. Rindertuberkulose. http://www.fli.de/fileadmin/FLI/Publikationen/FLI-Informationen/FLI-Information_Tuberkulose_20130902.pdf, Zugriffsdatum 18.11.2015.

FLI. (2014). Amtliche Methodensammlung. Stand: 30. November 2014. <http://www.fli.de/de/publikationen/amtlichemethodensammlung/>, Zugriffsdatum 26.10.2015.

FLI. (2015). Leitfaden zur Bestimmung von Stichprobenumfängen, 2. überarbeitete Auflage, August 2015, http://www.fli.de/fileadmin/FLI/IfE/Leitfaden_Bestimmung_von_Stichprobenu_mfaengen.pdf, Zugriffsdatum 10.12.2015.

FLORES, E., RODRIGUEZ, J. C., GARCIA-PACHON, E., SOTO, J. L., RUIZ, M., ESCRIBANO, I., ROYO, G. (2009). Real-time PCR with internal amplification control for detecting tuberculosis: method design and validation. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 117(8), 592-597.

FRANCO, M. M., PAES, A. C., RIBEIRO, M. G., DE FIGUEIREDO PANTOJA, J. C., SANTOS, A. C., MIYATA, M., LEITE, C. Q., MOTTA, R. G., LISTONI, F. J. (2013). Occurrence of mycobacteria in bovine milk samples from both individual and collective bulk tanks at farms and informal markets in the southeast region of Sao Paulo, Brazil. *BMC veterinary research* 9, 85.

FRITSCH, A., ENGEL, R., BUHL, D., ZELLWEG, J. P. (2004). *Mycobacterium bovis* tuberculosis: from animal to man and back. *The international journal of tuberculosis and lung disease: the official journal of the international union against tuberculosis and lung disease* 8(7), 903-904.

GEDEK, B. (1974). Möglichkeiten und Grenzen der mikrobiologischen Futtermittelkontrolle. *DTW Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 81, 37-40 und 65-69

GINGERAS, T. R., HIGUCHI, R., KRICKA, L. J., LO, Y. M., WITTE, C. T. (2005). Fifty years of molecular (DNA/RNA) diagnostics. *Clinical chemistry* 51(3), 661-671.

GORMLEY, E., DOYLE, M. B., FITZSIMONS, T., MCGILL, K., COLLINS, J. D. (2006). Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam) assay. *Veterinary microbiology* 112(2-4), 171-179.

GREGORI, G., CITTERIO, S., GHIANI, A., LABRA, M., SGORBATI, S., BROWN, S., DENIS, M. (2001). Resolution of viable and membrane-compromised bacteria in freshwater and marine waters based on analytical flow cytometry and nucleic acid double staining. *Applied and environmental microbiology* 67(10), 4662-4670.

GRESSNER, A. M., ARNDT, T. (2012). *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik: Band 1: Klinische Chemie (Vol. 1): Springer-Verlag.*

HAMMER, P., RICHTER, E., RUSCH-GERDES, S., WALTE, H. G., MATZEN, S., KIESNER, C. (2015). Inactivation of *Mycobacterium bovis* ssp. *caprae* in high-temperature, short-term pasteurized pilot-plant milk. *Journal of dairy science* 98(3), 1634-1639.

HAMMES, F., BERNEY, M., EGLI, T. (2011). Cultivation-independent assessment of bacterial viability. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 124, 123-150.

HUARD, R. C., FABRE, M., DE HAAS, P., LAZZARINI, L. C., VAN SOOLINGEN, D., COUSINS, D., HO, J. L. (2006). Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of bacteriology* 188(12), 4271-4287.

HUR, M., MOON, H. W., YUN, Y. M., KANG, T. Y., KIM, H. S., KIM, H. S., LEE, K. M., KANG, S. H., LEE, E. H. (2011). Detection of tuberculosis using artus *M. tuberculosis* PCR Kit and COBAS AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* Test. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the international union against tuberculosis and lung disease* 15(6), 795-798.

IGLESIAS, F. G., FARRERAS, J. M., SOLAR, D. S. (2010). Apparatus for blocking nucleic acids by means of photoactivating intercalating agents: Google Patents EP2493620 A1. <http://www.google.com/patents/EP2493620A1?hl=de&cl=en>, Zugriffdatum 10.12.2015.

JAGIELSKI, T., VAN INGEN, J., RASTOGI, N., DZIADEK, J., MAZUR, P. K., BIELECKI, J. (2014). Current methods in the molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. *BioMed research international* 2014, 645802.

JOSEFSEN, M. H., LOFSTROM, C., HANSEN, T. B., CHRISTENSEN, L. S., OLSEN, J. E., HOORFAR, J. (2010). Rapid quantification of viable *Campylobacter* bacteria on chicken carcasses, using real-time PCR and propidium monoazide treatment, as a tool for quantitative risk assessment. *Applied and environmental microbiology* 76(15), 5097-5104.

JULIAN, E., ROLDAN, M., SANCHEZ-CHARDI, A., ASTOLA, O., AGUSTI, G., LUQUIN, M. (2010). Microscopic cords, a virulence-related characteristic of *Mycobacterium tuberculosis*, are also present in nonpathogenic mycobacteria. *Journal of bacteriology* 192(7), 1751-1760.

KANA, B. D., GORDHAN, B. G., DOWNING, K. J., SUNG, N., VOSTROKTUNOVA, G., MACHOWSKI, E. E., TSENOVA, L., YOUNG, M., KAPRELYANTS, A., KAPLAN, G., MIZRAHI, V. (2008). The resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis* are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth in vitro. *Molecular microbiology* 67(3), 672-684.

KANEENE, J. B., THOEN, C. O. (2004). Tuberculosis. *Journal of the american veterinary medical association* 224(5), 685-691.

KEER, J. T., BIRCH, L. (2003). Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *Journal of microbiological methods* 53(2), 175-183.

KIERS, A., KLARENBECK, A., MENDELTS, B., VAN SOOLINGEN, D., KOETER, G. (2008). Transmission of *Mycobacterium pinnipedii* to humans in a zoo with marine mammals. *The international journal of tuberculosis and lung disease: the official journal of the international union against tuberculosis and lung disease* 12(12), 1469-1473.

KIM, Y. J., LEE, S. M., PARK, B. K., KIM, S. S., YI, J., KIM, H. H., LEE, E. Y., CHANG, C. L. (2014). Evaluation of propidium monoazide real-time PCR for early detection of viable *Mycobacterium tuberculosis* in clinical respiratory specimens. *Annals of laboratory medicine* 34(3), 203-209.

KOGURE, K., SIMIDU, U., TAGA, N. (1979). A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Canadian journal of microbiology* 25(3), 415-420.

KRALIK, P., NOCKER, A., PAVLIK, I. (2010). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability determination using F57 quantitative PCR in combination with propidium monoazide treatment. *International journal of food microbiology* 141 Suppl 1, S80-86.

KRUGER, N. J., BUHLER, C., IWOBI, A. N., HUBER, I., ELLERBROEK, L., APPEL, B., STINGL, K. (2014). "Limits of control"-crucial parameters for a reliable quantification of viable *Campylobacter* by real-time PCR. *PloS one* 9(2), e88108.

KUBICA, T., RUSCH-GERDES, S., NIEMANN, S. (2003). *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* caused one-third of human *M. bovis*-associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. *Journal of clinical microbiology* 41(7), 3070-3077.

LEE, J. L., LEVIN, R. E. (2009a). A comparative study of the ability of EMA and PMA to distinguish viable from heat killed mixed bacterial flora from fish fillets. *Journal of microbiological methods* 76(1), 93-96.

LEE, J. L., LEVIN, R. E. (2009b). Discrimination of viable and dead *Vibrio vulnificus* after refrigerated and frozen storage using EMA, sodium deoxycholate and real-time PCR. *Journal of microbiological methods* 79(2), 184-188.

LEMASSEU, A., LEVY-FREBAULT, V. V., LANEELLE, M. A., DAFPE, M. (1992). Lack of correlation between colony morphology and lipooligosaccharide content in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of general microbiology* 138(7), 1535-1541.

LFGB. (2015). Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch, in der Fassung der Bekanntmachung vom 3. Juni 2013 (BGBl. I S. 1426), zuletzt geändert durch Artikel 8 Absatz 3 des Gesetzes vom 3. Dezember 2015 (BGBl. I S. 2178).

LGL. (2013). FAQs zu Tuberkulose. http://www.lgl.bayern.de/gesundheit/infektionsschutz/infektionskrankheiten_a_z/tuberkulose/faq_tuberkulose_mensch.htm. Dokument aktualisiert am: 22.04.2014.

LI, L., MAHAN, C. S., PALACI, M., HORTER, L., LOEFFELHOLZ, L., JOHNSON, J. L., DIETZE, R., DEBANNE, S. M., JOLOBA, M. L., OKWERA, A., BOOM, W. H., EISENACH, K. D. (2010). Sputum *Mycobacterium tuberculosis* mRNA as a marker of bacteriologic clearance in response to antituberculosis therapy. *Journal of clinical microbiology* 48(1), 46-51.

LIANG, N., DONG, J., LUO, L., LI, Y. (2011). Detection of viable *Salmonella* in lettuce by propidium monoazide real-time PCR. *Journal of food science* 76(4), M234-237.

LOEFFLER, S. H., DE LISLE, G. W., NEILL, M. A., COLLINS, D. M., PRICE-CARTER, M., PATERSON, B., CREWS, K. B. (2014). The seal tuberculosis agent, *Mycobacterium pinnipedii*, infects domestic cattle in New Zealand: epidemiologic factors and DNA strain typing. *Journal of wildlife diseases* 50(2), 180-187.

LOPEZ-OLVERA, J. R., FERNANDEZ-DE-MERA, I. G., SERRANO, E., VIDAL, D., VICENTE, J., FIERRO, Y., GORTAZAR, C. (2013). Sex-related differences in body condition and serum biochemical parameters in red deer (*Cervus elaphus*) naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Veterinary journal (London, England : 1997)* 198(3), 702-706.

LOVDAL, T., HOVDA, M. B., BJORKBLUM, B., MOLLER, S. G. (2011). Propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR underestimates heat-killed *Listeria innocua*. *Journal of microbiological methods* 85(2), 164-169.

LUGTON, I. W., WILSON, P. R., MORRIS, R. S., NUGENT, G. (1998). Epidemiology and pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection of red deer (*Cervus elaphus*) in New Zealand. *New Zealand veterinary journal* 46(4), 147-156.

MARTIN-HERNANDO, M. P., TORRES, M. J., AZNAR, J., NEGRO, J. J., GANDIA, A., GORTAZAR, C. (2010). Distribution of lesions in red and fallow deer naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Journal of comparative pathology* 142(1), 43-50.

MARTIN, B., RAURICH, S., GARRIGA, M., AYMERICH, T. (2013). Effect of amplicon length in propidium monoazide quantitative PCR for the enumeration of viable cells of *Salmonella* in cooked ham. *Food Analytical Methods* 6(2), 683-690.

MATOS, A. C., FIGUEIRA, L., MARTINS, M. H., PINTO, M. L., MATOS, M., COELHO, A. C. (2014). New insights into *Mycobacterium bovis* prevalence in wild mammals in Portugal. *Transboundary and emerging diseases*, doi: 10.1111/tbed.12306.

MCDONNELL, G., RUSSELL, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical microbiology reviews* 12(1), 147-179.

MCFETERS, G. A., PYLE, B. H., LISLE, J. T., BROADAWAY, S. C. (1999). Rapid direct methods for enumeration of specific, active bacteria in water and biofilms. *Symposium series (Society for Applied Microbiology)* 85(28), 193s-200s.

MDIVANI, N., LI, H., AKHALAIA, M., GEGIA, M., GOGINASHVILI, L., KERNODLE, D. S., KHECHINASHVILI, G., TANG, Y. W. (2009). Monitoring therapeutic efficacy by real-time detection of *Mycobacterium tuberculosis* mRNA in sputum. *Clinical chemistry* 55(9), 1694-1700.

MEISSNER, G. (1974). Bovine tuberculosis in man before and after the eradication of tuberculosis in cattle (author's transl). *Praxis der Pneumologie* 28(3), 123-128.

MENG, X. C., PANG, R., WANG, C., WANG, L. Q. (2010). Rapid and direct quantitative detection of viable bifidobacteria in probiotic yogurt by combination of ethidium monoazide and real-time PCR using a molecular beacon approach. *The Journal of dairy research* 77(4), 498-504.

MENG, X. J., LINDSAY, D. S., SRIRANGANATHAN, N. (2009). Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 364(1530), 2697-2707.

MINAMI, J., SOEJIMA, T., YAESHIMA, T., IWATSUKI, K. (2012). Direct real-time PCR with ethidium monoazide: a method for the rapid detection of viable *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula. *Journal of food protection* 75(9), 1572-1579.

MORRISON, J., PAI, M., HOPEWELL, P. C. (2008). Tuberculosis and latent tuberculosis infection in close contacts of people with pulmonary tuberculosis in low-income and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet. Infectious diseases* 8(6), 359-368.

MULLER, B., DURR, S., ALONSO, S., HATTENDORF, J., LAISSE, C. J., PARSONS, S. D., VAN HELDEN, P. D., ZINSSTAG, J. (2013). Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. *Emerging infectious diseases* 19(6), 899-908.

MURICY, E. C., LEMES, R. A., BOMBARDA, S., FERRAZOLI, L., CHIMARA, E. (2014). Differentiation between *Nocardia* spp. and *Mycobacterium* spp.: Critical aspects for bacteriological diagnosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 56(5), 397-401.

MURRAY, P. R., ROSENTHAL, K. S., PFALLER, M. A. (2012). *Medical Microbiology*, with STUDENT CONSULT Online Access, 7: *Medical Microbiology*: Elsevier Health Sciences.

NASR ESFAHANI, B., REZAEI YAZDI, H., MOGHIM, S., GHASEMIAN SAFAEI, H., ZARKESH ESFAHANI, H. (2012). Rapid and accurate identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex and common non-tuberculous mycobacteria by multiplex real-time PCR targeting different housekeeping genes. *Current microbiology* 65(5), 493-499.

NAVARRO, E., SERRANO-HERAS, G., CASTANO, M. J., SOLERA, J. (2015). Real-time PCR detection chemistry. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 439, 231-250.

NKUIPOU-KENFACK, E., ENGEL, H., FAKIH, S., NOCKER, A. (2013). Improving efficiency of viability-PCR for selective detection of live cells. *Journal of microbiological methods* 93(1), 20-24.

NOCKER, A., CHEUNG, C. Y., CAMPER, A. K. (2006). Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of microbiological methods* 67(2), 310-320.

NOGVA, H. K., DROMTORP, S. M., NISSEN, H., RUDI, K. (2003). Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *BioTechniques* 34(4), 804-808, 810, 812-803.

NUGENT, G., WHITFORD, E. J., YOCKNEY, I., PERRY, M., TOMPKINS, D. M., HOLTSLAG, N., CROSS, M. L. (2013). Percutaneous interdigital injection of *Mycobacterium bovis* as a model for tuberculous lesion development in wild brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*). *Journal of comparative pathology* 148(1), 33-42.

O'BRIEN, D. J., SCHMITT, S. M., RUDOLPH, B. A., NUGENT, G. (2011). Recent advances in the management of bovine tuberculosis in free-ranging wildlife. *Veterinary microbiology* 151(1-2), 23-33.

OLIVER, J. D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS microbiology reviews* 34(4), 415-425.

PACHOLEWICZ, E., SWART, A., LIPMAN, L. J., WAGENAAR, J. A., HAVELAAR, A. H., DUIM, B. (2013). Propidium monoazide does not fully inhibit the detection of dead *Campylobacter* on broiler chicken carcasses by qPCR. *Journal of microbiological methods* 95(1), 32-38.

PALMER, M. V., WATERS, W. R., WHIPPLE, D. L. (2002). Lesion development in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Veterinary pathology* 39(3), 334-340.

PALMER, M. V., WHIPPLE, D. L., WATERS, W. R. (2001). Experimental deer-to-deer transmission of *Mycobacterium bovis*. *American journal of veterinary research* 62(5), 692-696.

PALOMINO, J. C. (2005). Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field. *The European respiratory journal* 26(2), 339-350.

PAN, Y., BREIDT, F., JR. (2007). Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. *Applied and environmental microbiology* 73(24), 8028-8031.

PANTEIX, G., GUTIERREZ, M. C., BOSCHIROLI, M. L., ROUVIERE, M., PLAIDY, A., PRESSAC, D., PORCHERET, H., CHYDERIOTIS, G., PONSADA, M., VAN OORTEGEM, K., SALLOUM, S., CABUZEL, S., BANULS, A. L., VAN DE PERRE, P., GODREUIL, S. (2010). Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium microti*: a study of six recent cases in France. *Journal of medical microbiology* 59(Pt 8), 984-989.

PARRA, A., GARCIA, N., GARCIA, A., LACOMBE, A., MORENO, F., FREIRE, F., MORAN, J., HERMOSO DE MENDOZA, J. (2008). Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. *Veterinary microbiology* 127(3-4), 315-324.

PARRISH, N. M., DICK, J. D., BISHAI, W. R. (1998). Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in microbiology* 6(3), 107-112.

PATE, M., SVARA, T., GOMBAC, M., PALLER, T., ZOLNIR-DOVC, M., EMERSIC, I., PRODINGER, W. M., BARTOS, M., ZDOVC, I., KRT, B., PAVLIK, I., CVETNIC, Z., POGACNIK, M., OCEPEK, M. (2006). Outbreak of tuberculosis caused by *Mycobacterium caprae* in a zoological garden. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health* 53(8), 387-392.

PHOLWAT, S., HEYSELL, S., STROUP, S., FOONGLADDA, S., HOUP, E. (2011). Rapid first- and second-line drug susceptibility assay for *Mycobacterium tuberculosis* isolates by use of quantitative PCR. *Journal of clinical microbiology* 49(1), 69-75.

PINTO, D., SANTOS, M. A., CHAMBEL, L. (2015). Thirty years of viable but nonculturable state research: unsolved molecular mechanisms. *Critical reviews in microbiology* 41(1), 61-76.

RICCHI, M., DE CICCO, C., KRALIK, P., BABAK, V., BONIOTTI, M. B., SAVI, R., CERUTTI, G., CAMMI, G., GARBARINO, C., ARRIGONI, N. (2014). Evaluation of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk using peptide-mediated separation and Propidium Monoazide qPCR. *FEMS microbiology letters* 356(1), 127-133.

RICHTLINIE. (64/432/EWG). Richtlinie des Rates vom 26. Juni 1964 zur Regelung viehseuchenrechtlicher Fragen beim innergemeinschaftlichen Handelsverkehr mit Rindern und Schweinen (64/432/EWG). In der konsolidierten Fassung vom 27. Mai 2015.

RICHTLINIE. (2000/54/EG). Richtlinie 2000/54/EG des europäischen Parlaments und des Rates vom 18. September 2000 über den Schutz der Arbeitnehmer gegen Gefährdung durch biologische Arbeitsstoffe bei der Arbeit (Siebte Einzelrichtlinie im Sinne von Artikel 16 Absatz 1 der Richtlinie 89/391/EWG) (ABl. EU Nr. L 262 S. 21).

RINDTBV. (2013). Verordnung zum Schutz gegen die Tuberkulose des Rindes (Tuberkulose-Verordnung), Erstaussfertigung 1972, in der Fassung vom 12. Juli 2013.

RINGUET, H., AKOUA-KOFFI, C., HONORE, S., VARNEROT, A., VINCENT, V., BERCHE, P., GAILLARD, J. L., PIERRE-AUDIGIER, C. (1999). *hsp65* sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *Journal of clinical microbiology* 37(3), 852-857.

ROBERT-KOCH-INSTITUT. (2014). Epidemiologisches Bulletin Nr. 34, August 2014. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2014/Ausgaben/34_14.pdf?__blob=publicationFile, Zugriffsdatum 26.10.2015.

ROBERT-KOCH-INSTITUT. (2015). Epidemiologisches Bulletin Nr. 11/12, März 2015. http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2015/Ausgaben/11_12_15.pdf;jsessionid=3AE12FE0BA39919DE506A3A05621DC98.2_cid372?__blob=publicationFile, Zugriffsdatum 01.12.2015.

RODRIGUEZ, E., SANCHEZ, L. P., PEREZ, S., HERRERA, L., JIMENEZ, M. S., SAMPER, S., IGLESIAS, M. J. (2009). Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* in Spain, 2004-2007. *The international journal of tuberculosis and lung disease: the official journal of the international union against tuberculosis and lung disease* 13(12), 1536-1541.

RODRIGUEZ, G. G., PHIPPS, D., ISHIGURO, K., RIDGWAY, H. F. (1992). Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Applied and environmental microbiology* 58(6), 1801-1808.

RODRIGUEZ, J. G., MEJIA, G. A., DEL PORTILLO, P., PATARROYO, M. E., MURILLO, L. A. (1995). Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. *Microbiology (Reading, England)* 141 (Pt 9), 2131-2138.

RODRIGUEZ, S., BEZOS, J., ROMERO, B., DE JUAN, L., ALVAREZ, J., CASTELLANOS, E., MOYA, N., LOZANO, F., JAVED, M. T., SAEZ-LLORENTE, J. L., LIEBANA, E., MATEOS, A., DOMINGUEZ, L., ARANAZ, A. (2011). *Mycobacterium caprae* infection in livestock and wildlife, Spain. *Emerging infectious diseases* 17(3), 532-535.

ROWE, M. T., DONAGHY, J. (2008). *Mycobacterium bovis*: the importance of milk and dairy products as a cause of human tuberculosis in the UK. A review of taxonomy and culture methods, with particular reference to artisanal cheeses. *International journal of dairy technology* 61(4), 317-326.

SCHMALENBERGER, A., SCHWIEGER, F., TEBBE, C. C. (2001). Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. *Applied and environmental microbiology* 67(8), 3557-3563.

SCHMIDLIN, M., ALT, M., BRODMANN, P., BAGUTTI, C. (2010). Insufficient distinction between DNA from viable and nonviable *Staphylococcus aureus* cells in wipe-samples by use of propidium monoazide-PCR. *Applied biosafety* 15(4), 180.

SCHOEPF, K., PRODINGER, W. M., GLAWISCHNIG, W., HOFER, E., REVILLA-FERNANDEZ, S., HOFRICHTER, J., FRITZ, J., KOFER, J., SCHMOLL, F. (2012). A Two-Years' Survey on the Prevalence of Tuberculosis Caused by *Mycobacterium caprae* in Red Deer (*Cervus elaphus*) in the Tyrol, Austria. *ISRN veterinary science* 2012, 245138.

SHERIDAN, G. E., MASTERS, C. I., SHALLCROSS, J. A., MACKEY, B. M. (1998). Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Applied and environmental microbiology* 64(4), 1313-1318.

SHINNICK, T. M., GOOD, R. C. (1994). Mycobacterial taxonomy. *European journal of clinical microbiology and infectious diseases: official publication of the european society of clinical microbiology* 13(11), 884-901.

SHOUB, H. L. (1923). A Comparison of the Ziehl-Neelsen and Schulte-Tigges Methods of Staining Tubercle Bacilli. *Journal of bacteriology* 8(2), 121-126.

SILHAVY, T. J., KAHNE, D., WALKER, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2(5), a000414.

SINGH, S., KUMAR, M., SINGH, P. (2015). Evolution of *M. bovis* BCG Vaccine: Is Niacin Production Still a Valid Biomarker? Tuberculosis research and treatment 2015, 957519.

SINGHAL, R., MYNEEDU, V. P. (2015). Microscopy as a diagnostic tool in pulmonary tuberculosis. International journal of mycobacteriology 4(1), 1-6.

SINHA, R. P., HADER, D. P. (2002). Life under solar UV radiation in aquatic organisms. Advances in space research: the official journal of the committee on space research (COSPAR) 30(6), 1547-1556.

SMITH, I. (2003). *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. Clinical microbiology reviews 16(3), 463-496.

SOEJIMA, T., IIDA, K., QIN, T., TANAI, H., SEKI, M., YOSHIDA, S. (2008). Method to detect only live bacteria during PCR amplification. Journal of clinical microbiology 46(7), 2305-2313.

SOEJIMA, T., MINAMI, J. I., XIAO, J. Z., ABE, F. (2015). Innovative use of platinum compounds to selectively detect live microorganisms by polymerase chain reaction. Biotechnology and bioengineering 113(2), 301-310.

SRIVASTAVA, K., CHAUHAN, D. S., GUPTA, P., SINGH, H. B., SHARMA, V. D., YADAV, V. S., SREEKUMARAN, THAKRAL, S. S., DHARAMDHEERAN, J. S., NIGAM, P., PRASAD, H. K., KATOCH, V. M. (2008). Isolation of *Mycobacterium bovis* and *M. tuberculosis* from cattle of some farms in north India-possible relevance in human health. The Indian journal of medical research 128(1), 26-31.

STEWART, L. D., MCNAIR, J., MCCALLAN, L., GORDON, A., GRANT, I. R. (2013). Improved detection of *Mycobacterium bovis* infection in bovine lymph node tissue using immunomagnetic separation (IMS)-based methods. PloS one 8(3), e58374.

STINGL, K., BUHLER, C., KRUGER, N. J. (2015). *Campylobacter* detection along the food chain-towards improved quantitative risk analysis by live/dead discriminatory culture-independent methods. Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift 128(3-4), 122-129.

SWAMINATHAN, B., FENG, P. (1994). Rapid detection of food-borne pathogenic bacteria. Annual review of microbiology 48, 401-426.

TALIP, B. A., SLEATOR, R. D., LOWERY, C. J., DOOLEY, J. S., SNELLING, W. J. (2013). An update on global tuberculosis (TB). Infectious diseases 6, 39-50.

TAYLOR, G. M., WORTH, D. R., PALMER, S., JAHANS, K., HEWINSON, R. G. (2007). Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. BMC veterinary research 3, 12.

THACKER, T. C., HARRIS, B., PALMER, M. V., WATERS, W. R. (2011). Improved specificity for detection of *Mycobacterium bovis* in fresh tissues using IS6110 real-time PCR. BMC veterinary research 7, 50.

THAKUR, A., SHARMA, M., KATOCH, V. C., DHAR, P., KATOCH, R. C. (2012). Detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* from Cattle: possible public health relevance. Indian journal of microbiology 52(2), 289-291.

THOEN, C., LOBUE, P., DE KANTOR, I. (2006). The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. Veterinary microbiology 112(2-4), 339-345.

TIERSEUCHANZV. (2014). Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen, §1, Erstauflage 1991, in der Fassung der Bekanntmachung vom 19. Juli 2011, letzte Änderung 29. Dezember 2014.

TOMLINSON, A. J., CHAMBERS, M. A., MCDONALD, R. A., DELAHAY, R. J. (2015). Association of quantitative interferon-gamma responses with the progression of naturally acquired *Mycobacterium bovis* infection in wild European badgers (*Meles meles*). Immunology 144(2), 263-270.

TORRES-GONZALEZ, P., SOBERANIS-RAMOS, O., MARTINEZ-GAMBOA, A., CHAVEZ-MAZARI, B., BARRIOS-HERRERA, M. T., TORRES-ROJAS, M., CRUZ-HERVERT, L. P., GARCIA-GARCIA, L., SINGH, M., GONZALEZ-AGUIRRE, A., PONCE DE LEON-GARDUNO, A., SIFUENTES-OSORNIO, J., BOBADILLA-DEL-VALLE, M. (2013). Prevalence of latent and active tuberculosis among dairy farm workers exposed to cattle infected by *Mycobacterium bovis*. PLoS neglected tropical diseases 7(4), e2177.

TRIFIRO, S., BOURGAULT, A. M., LEBEL, F., RENE, P. (1990). Ghost mycobacteria on Gram stain. Journal of clinical microbiology 28(1), 146-147.

TYRRELL, F. C., BUDNICK, G. E., ELLIOTT, T., GILLIM-ROSS, L., HILDRED, M. V., MAHLMEISTER, P., PARRISH, N., PENTELLA, M., VANNESTE, J., WANG, Y. F., STARKS, A. M. (2012). Probability of negative *Mycobacterium tuberculosis* complex cultures based on time to detection of positive cultures: a multicenter evaluation of commercial-broth-based culture systems. Journal of clinical microbiology 50(10), 3275-3282.

VAN DER MERWE, M., MICHEL, A. L. (2010). An investigation of the effects of secondary processing on *Mycobacterium* spp. in naturally infected game meat and organs. Journal of the south african veterinary association 81(3), 166-169.

VAN INGEN, J., RAHIM, Z., MULDER, A., BOEREE, M. J., SIMEONE, R., BROSCH, R., VAN SOOLINGEN, D. (2012). Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerging infectious diseases* 18(4), 653-655.

VARMA, M., FIELD, R., STINSON, M., RUKOVETS, B., WYMER, L., HAUGLAND, R. (2009). Quantitative real-time PCR analysis of total and propidium monoazide-resistant fecal indicator bacteria in wastewater. *Water research* 43(19), 4790-4801.

VERORDNUNG(EG)854/2004. Verordnung (EG) Nr. 854/2004 des europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit besonderen Verfahrensvorschriften für die amtliche Überwachung von zum menschlichen Verzehr bestimmten Erzeugnissen tierischen Ursprungs. ABl. EG Nr. L 226 vom 25. Juni 2004. Zuletzt geändert durch Art. 2 ÄndVO (EU) 633/2014 vom 13. 6. 2014 (ABl. Nr. L 175 S. 6)

WAGNER, A. O., MALIN, C., KNAPP, B. A., ILLMER, P. (2008). Removal of free extracellular DNA from environmental samples by ethidium monoazide and propidium monoazide. *Applied and environmental microbiology* 74(8), 2537-2539.

WAGNER, A. O., PRAEG, N., REITSCHULER, C., ILLMER, P. (2015). Effect of DNA extraction procedure, repeated extraction and ethidium monoazide (EMA)/propidium monoazide (PMA) treatment on overall DNA yield and impact on microbial fingerprints for bacteria, fungi and archaea in a reference soil. *Applied soil ecology: a section of agriculture, ecosystems and environment* 93, 56-64.

WANG, GILL, C. O., YANG, X. (2014). Use of sodium lauroyl sarcosinate (sarkosyl) in viable real-time PCR for enumeration of *Escherichia coli*. *Journal of microbiological methods* 98, 89-93.

WANG, L., LI, Y., MUSTAPHA, A. (2009). Detection of viable *Escherichia coli* O157:H7 by ethidium monoazide real-time PCR. *Journal of applied microbiology* 107(5), 1719-1728.

WANG, L., MUSTAPHA, A. (2010). EMA-real-time PCR as a reliable method for detection of viable *Salmonella* in chicken and eggs. *Journal of food science* 75(3), M134-139.

WATANABE PINHATA, J. M., CERGOLE-NOVELLA, M. C., MOREIRA DOS SANTOS CARMO, A., RUIVO FERRO, E. S. R., FERRAZOLI, L., TAVARES SACCHI, C., SIQUEIRA DE OLIVEIRA, R. (2015). Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex by real-time PCR in sputum samples and its use in the routine diagnosis in a reference laboratory. *Journal of medical microbiology* 64(9), 1040-1045.

WHO. (2004). BCG vaccine. WHO position paper. Relevé épidémiologique hebdomadaire/Section d'hygiène du Secrétariat de la Société des Nations= Weekly epidemiological record/Health Section of the Secretariat of the League of Nations 79(4), 27.

WHO. (2014). Global Tuberculosis Report 2014, World Health Organization, http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809_eng.pdf, Zugriffsdatum 06.12.2015.

WILSON, G., BROUGHAN, J., CHAMBERS, M., CLIFTON-HADLEY, R., CRAWSHAW, T., DE LA FUENTE, J., DELAHAY, R., GAVIER-WIDEN, D., GORTAZAR, C., HEWINSON, G. (2009). Scientific review on tuberculosis in wildlife in the EU. http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/12e.pdf, Zugriffsdatum 10.11.2015.

XIAO, X. L., TIAN, C., YU, Y. G., WU, H. (2013). Detection of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 using propidium monoazide treatments and qPCR. Canadian journal of microbiology 59(3), 157-163.

YANEZ, M. A., NOCKER, A., SORIA-SORIA, E., MURTULA, R., MARTINEZ, L., CATALAN, V. (2011). Quantification of viable *Legionella pneumophila* cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR. Journal of microbiological methods 85(2), 124-130.

ZANELLA, G., DURAND, B., HARS, J., MOUTOU, F., GARIN-BASTUJI, B., DUVAUCHELLE, A., FERME, M., KAROUI, C., BOSCHIROLI, M. L. (2008a). *Mycobacterium bovis* in wildlife in France. Journal of wildlife diseases 44(1), 99-108.

ZANELLA, G., DUVAUCHELLE, A., HARS, J., MOUTOU, F., BOSCHIROLI, M. L., DURAND, B. (2008b). Patterns of lesions of bovine tuberculosis in wild red deer and wild boar. The veterinary record 163(2), 43-47.

ZHANG, FANG, H. H. (2006). Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. Applied microbiology and biotechnology 70(3), 281-289.

ZHANG, Z., LIU, H., LOU, Y., XIAO, L., LIAO, C., MALAKAR, P. K., PAN, Y., ZHAO, Y. (2015a). Quantifying viable *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes* simultaneously in raw shrimp. Applied microbiology and biotechnology 99(15), 6451-6462.

ZHANG, Z., LIU, W., XU, H., AGUILAR, Z. P., SHAH, N. P., WEI, H. (2015b). Propidium monoazide combined with real-time PCR for selective detection of viable *Staphylococcus aureus* in milk powder and meat products. Journal of dairy science 98(3), 1625-1633.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der mykobakteriellen Zellwand (KIESER et al., 2014)	4
Abbildung 2:	Beispiel der relativen Fluoreszenz-Intensität von fünf Verdünnungen einer Bakterienkultur (a bis e) im Verlauf der Amplifikationszyklen während der Real-Time PCR; je mehr Bakterien pro ml vorhanden sind, desto geringer ist der Ct (Cycle threshold)-Wert (ZHANG et al., 2006).....	15
Abbildung 3:	Schematische Darstellung von Methoden zur Lebend-Tot-Differenzierung von Bakterien (KEER et al., 2003).....	17
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der Verlinkung der DNA membrangeschädigter Zellen mit PMA (nach DACKÉ et al., 2013).....	20
Abbildung 5:	Links: Strukturformel von Ethidium Monoazid (EMA), das Molekül verfügt über eine einfache positive Ladung (nach ANONYMOUS, 2015b); rechts: Strukturformel von Propidium Monoazid (PMA), das Molekül ist zweifach positiv geladen (nach ANONYMOUS, 2015a)	21
Abbildung 6:	Einfluss unterschiedlicher PMA-Konzentrationen auf die Ct-Wert-Differenzen (Δ Ct) abgetöteter <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden.....	45
Abbildung 7:	Einfluss unterschiedlicher PMA-Konzentrationen auf die Ct-Wert-Differenzen (Δ Ct) vitaler <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden	46
Abbildung 8:	Einfluss verschiedener PMA-Inkubationszeiten auf die Ct-Wert-Differenzen (Δ Ct) abgetöteter <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden.....	48
Abbildung 9:	Einfluss verschiedener Bestrahlungszeiten auf die Ct-Wert-Differenzen (Δ Ct) abgetöteter <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden	49
Abbildung 10:	Einfluss verschiedener Inkubationstemperaturen auf die Ct-Wert-Differenzen (Δ Ct) abgetöteter <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden	51

- Abbildung 11:** Einfluss verschiedener PMA-Inkubationstemperaturen auf die Ct-Wert-Differenzen (ΔCt) vitaler *M. bovis* BCG-Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden..... 53
- Abbildung 12:** Einfluss der Inkubation mit verschiedenen Substanzen vor der PMA-Behandlung auf die Ct-Wert-Differenzen (ΔCt) von abgetöteten *M. bovis* BCG-Pasteur Keimen, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden; Nd: Natriumdesoxycholat, Ls: *N*-Lauroylsarcosin, Lys/TriX: Lysozym/ Triton® X 100, ohne: ohne Substanz-Zugabe 55
- Abbildung 13:** Einfluss einer einmaligen bzw. doppelten PMA-Behandlung auf die Ct-Wert-Differenzen (ΔCt) abgetöteter *M. bovis* BCG-Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden 57
- Abbildung 14:** Einfluss einer einmaligen bzw. doppelten PMA-Behandlung auf die Ct-Wert-Differenzen (ΔCt) vitaler *M. bovis* BCG-Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden 59
- Abbildung 15:** Real-Time PCR Ergebnis der \log_{10} -Verdünnungsstufen von abgetöteten *M. bovis* BCG-Pasteur Keimen in Wildbret Homogenisat ohne PMA-Behandlung 61
- Abbildung 16:** Real-Time PCR Ergebnis der \log_{10} -Verdünnungsstufen von abgetöteten *M. bovis* BCG-Pasteur Keimen in Wildbret Homogenisat mit PMA-Behandlung 61
- Abbildung 17:** Einfluss der prozentualen Anteile an abgetöteten und vitalen *M. bovis* BCG-Pasteur Keimen in einer Suspension auf die Ct-Wert-Differenzen (ΔCt) zwischen mit und nicht mit PMA behandelten Proben..... 64
- Abbildung 18:** Binär-logistische Regressionsanalyse mit den beiden Gruppen 100 % tot versus nicht 100 % tot zur Abschätzung der Wahrscheinlichkeit, ob in einer untersuchten Wildbretprobe ausschließlich tote oder auch lebende Mykobakterien des MTC enthalten sind; bei einer Ct-Wert-Differenz (ΔCt) von 5,72 besteht eine neunzigprozentige Wahrscheinlichkeit, dass keine lebenden Mykobakterien des MTC in der Wildbretprobe vorhanden sind 65
- Abbildung 19:** Links: Bakterienkolonie isoliert aus Wildbret auf Löwenstein Jensen-Festnährmedium nach achtwöchiger Inkubation bei 37 °C; rechts: vergrößerter Ausschnitt aus dem linkem Bild 68

Abbildung 20: Bakterien isoliert aus Wildbret in Kirchner-Flüssignährmedium nach achtwöchiger Inkubation bei 37 °C; links: auf dem Boden abgelagerte Bakterien, rechts: aufgeschüttelte Probe 68

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Monitoring-Ergebnisse über das Vorkommen von Tuberkulose beim Rotwild in verschiedenen bayerischen Regionen (BÜTTNER et al., 2013)	11
Tabelle 2:	Übersicht der verwendeten Nährmedien mit Herstellerangaben	24
Tabelle 3:	Übersicht der verwendeten Chemikalien und Enzyme mit Herstellerangaben...	25
Tabelle 4:	Übersicht der verwendeten Primerpaare mit Sequenzen, Fragmentgrößen und Annealing-Temperaturen nach DORN-IN et al. (2015).....	27
Tabelle 5:	Übersicht der verwendeten Labor-Kits mit Herstellerangaben	28
Tabelle 6:	Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben ..	28
Tabelle 7:	Übersicht der verwendeten Geräte mit Herstellerangaben	29
Tabelle 8:	Überblick der getesteten Variablen zur Optimierung der PMA Behandlung an <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur	33
Tabelle 9:	Übersicht der verwendeten Substanzen mit Angabe der jeweiligen Konzentrationen zur Überprüfung, ob die Zugabe der Substanzen zu einer Steigerung der Aufnahme von PMA in abgetötete <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur Keime führt; die Bakteriensuspensionen wurden mit den aufgelisteten Substanzen vor der PMA-Zugabe jeweils für 30 min bei 37 °C inkubiert	34
Tabelle 10:	Reaktionsansatz der PCR zur Amplifizierung von 16S rRNA Genabschnitten mithilfe der Primerpaare 335F/Com2, 769F/1492R und 799F/1492R nach DORN-IN et al. (2015)	41
Tabelle 11:	Temperatur Protokoll der PCR zur Amplifizierung von 16S rRNA Genabschnitten mithilfe der Primerpaare 335F/Com2, 769F/1492R und 799F/1492R nach DORN-IN et al. (2015).....	41
Tabelle 12:	Kolonie-bildende Einheiten (KbE) an <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur pro ml bei einer OD von 0,1 in Middlebrook-Flüssigmedium 7H9, ermittelt durch Keimzahlbestimmung auf BBL™ Seven H11 Agar nach achtwöchiger Kultivierung.....	43
Tabelle 13:	Einfluss unterschiedlicher PMA-Konzentrationen auf die Ct-Wert-Differenzen (Δ Ct) abgetöteter <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden	44

Tabelle 14:	Einfluss unterschiedlicher PMA-Konzentrationen auf die Ct-Wert-Differenzen (Δ Ct) vitaler <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden	46
Tabelle 15:	Einfluss unterschiedlicher PMA-Inkubationszeiten auf die Ct-Wert-Differenzen (Δ Ct) abgetöteter <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden	47
Tabelle 16:	Einfluss unterschiedlicher Bestrahlungszeiten auf die Ct-Wert-Differenzen (Δ Ct) abgetöteter <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden	49
Tabelle 17:	Einfluss unterschiedlicher PMA-Inkubationstemperaturen auf die Ct-Wert-Differenzen (Δ Ct) abgetöteter <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden	50
Tabelle 18:	Einfluss unterschiedlicher PMA-Inkubationstemperaturen auf die Ct-Wert-Differenzen (Δ Ct) vitaler <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden	52
Tabelle 19:	Einfluss der Inkubation mit verschiedenen Substanzen vor der PMA-Behandlung auf die Ct-Wert-Differenzen (Δ Ct) abgetöteter <i>M. bovis</i> BCG Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden.....	54
Tabelle 20:	Einfluss einer einmaligen bzw. doppelten PMA-Behandlung auf die Ct-Wert-Differenzen (Δ Ct) abgetöteter <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden	56
Tabelle 21:	Einfluss einer einmaligen bzw. doppelten PMA-Behandlung auf die Ct-Wert-Differenzen (Δ Ct) vitaler <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur Keime, welche mit und nicht mit PMA behandelt wurden	58
Tabelle 22:	Ct-Werte der Real-Time PCR von log ₁₀ -Verdünnungsstufen von abgetöteten <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur Keimen in Wildbret Homogenisat mit und ohne PMA-Behandlung.....	60
Tabelle 23:	Ct-Wert-Differenzen (Δ Ct) zwischen mit PMA und nicht mit PMA behandelten Suspensionen mit unterschiedlichen Anteilen an abgetöteten und lebenden <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur Keimen in Wildbret-Homogenisat	63

Tabelle 24:	Quantitative Nachweisbarkeit von <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur in artifiziell kontaminierten Fleischproben mittels Real-Time PCR; Ergebnisse gemittelt aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen	66
Tabelle 25:	Ergebnisse der kulturellen Keimzahlbestimmung zur Ermittlung der Koloniebildenden Einheiten (KbE) pro ml in der zur Herstellung der Verdünnungsreihen eingesetzten Bakteriensuspension.....	66
Tabelle 26:	Real Time PCR Ergebnisse (Ct-Werte) von mit PMA Konzentrationen zwischen 10 µM und 300 µM behandelten abgetöteten <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur Keimen	114
Tabelle 27:	Real Time PCR Ergebnisse (Ct-Werte) von mit PMA Konzentrationen von 10 µM und 100 µM behandelten vitalen <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur Keimen	114
Tabelle 28:	Real Time PCR Ergebnisse (Ct-Werte) von mit PMA behandelten abgetöteten <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur Keimen bei verschiedenen Inkubationszeiten.....	115
Tabelle 29:	Real Time PCR Ergebnisse (Ct-Werte) von mit PMA behandelten abgetöteten <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur Keimen bei verschiedenen Bestrahlungszeiten.....	115
Tabelle 30:	Real Time PCR Ergebnisse (Ct-Werte) von mit PMA behandelten abgetöteten <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur Keimen bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen	116
Tabelle 31:	Real Time PCR Ergebnisse (Ct-Werte) von mit PMA behandelten vitalen <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur Keimen bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen	116
Tabelle 32:	Real Time PCR Ergebnisse (Ct-Werte) von mit PMA behandelten abgetöteten <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur Keimen, die vor der PMA-Behandlung mit verschiedenen Substanzen für 30 min bei 37 °C inkubiert wurden	117
Tabelle 33:	Real Time PCR Ergebnisse (Ct-Werte) von mit PMA behandelten abgetöteten <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur Keimen bei einmaliger und doppelter PMA-Behandlung.	117
Tabelle 34:	Real Time PCR Ergebnisse (Ct-Werte) von mit PMA behandelten vitalen <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur Keimen bei einmaliger und doppelter PMA-Behandlung.	118

Tabelle 35:	Real Time PCR Ergebnisse (Ct-Werte) von mit PMA behandelten <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur Suspensionen mit unterschiedlichen Anteilen an toten und lebenden Bakterien.....	118
Tabelle 36:	Real Time PCR Ergebnisse (Ct-Werte) von nicht mit PMA behandelten <i>M. bovis</i> BCG-Pasteur Suspensionen mit unterschiedlichen Anteilen an toten und lebenden Bakterien	119
Tabelle 37:	Sequenzierungsergebnisse nach Eurofins MWG Operon.....	120
Tabelle 38:	Ergebnisse des Abgleichs der Nukleotidsequenzen aus Tabelle 37 mit dem BLAST-Programm (vgl. Abschnitt 3.2.2.3).....	122

11 Anhang

Tabelle 26: Real Time PCR Ergebnisse (Ct-Werte) von mit PMA Konzentrationen zwischen 10 μ M und 300 μ M behandelten abgetöteten *M. bovis* BCG-Pasteur Keimen

Versuch Nr.	PMA-Konzentration [μ M]						
	ohne PMA [Ct]	10 [Ct]	25 [Ct]	50 [Ct]	100 [Ct]	200 [Ct]	300 [Ct]
1	23,13	27,23	27,48	27,38	28,57	28,60	28,18
2	22,20	25,62	26,23	26,34	26,98	26,91	26,71
3	22,30	25,55	24,86	25,04	25,87	26,21	26,03
4	24,28	27,34	27,33	28,05	28,52	29,18	28,79
5	23,41	24,97	25,14	26,08	27,19	26,27	26,77

Tabelle 27: Real Time PCR Ergebnisse (Ct-Werte) von mit PMA Konzentrationen von 10 μ M und 100 μ M behandelten vitalen *M. bovis* BCG-Pasteur Keimen

Versuch Nr.	PMA-Konzentration [μ M]		
	ohne PMA [Ct]	10 [Ct]	100 [Ct]
1	23,67	24,58	25,02
2	24,30	24,84	24,52
3	24,14	25,42	25,42
4	23,26	24,06	24,02
5	22,77	23,73	24,11

Tabelle 28: Real Time PCR Ergebnisse (Ct-Werte) von mit PMA behandelten abgetöteten *M. bovis* BCG-Pasteur Keimen bei verschiedenen Inkubationszeiten

Versuch Nr.	ohne PMA [Ct]	Inkubationszeit [min]		
		15 [Ct]	30 [Ct]	60 [Ct]
1	24,84	29,63	29,75	29,48
2	21,70	25,65	26,08	25,69
3	23,28	27,32	27,15	27,35
4	24,64	28,87	28,85	28,73
5	23,41	25,74	25,47	26,56

Tabelle 29: Real Time PCR Ergebnisse (Ct-Werte) von mit PMA behandelten abgetöteten *M. bovis* BCG-Pasteur Keimen bei verschiedenen Bestrahlungszeiten

Versuch Nr.	ohne PMA [Ct]	Bestrahlungszeit [min]		
		2 [Ct]	5 [Ct]	10 [Ct]
1	22,35	27,05	27,44	27,13
2	24,34	29,55	29,46	29,48
3	24,51	29,95	29,80	29,73
4	23,24	27,27	26,62	27,06
5	23,08	28,52	28,48	28,24

Tabelle 30: Real Time PCR Ergebnisse (Ct-Werte) von mit PMA behandelten abgetöteten *M. bovis* BCG-Pasteur Keimen bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen

Versuch Nr.	Inkubationstemperatur [°C]				
	ohne PMA [Ct]	20 [Ct]	40 [Ct]	50 [Ct]	60 [Ct]
1	23,23	26,26	29,04	30,78	31,12
2	21,80	25,11	28,76	32,40	32,35
3	21,02	25,67	28,76	31,22	30,17
4	24,38	26,63	30,08	30,53	30,70
5	23,41	29,77	30,12	31,16	30,20

Tabelle 31: Real Time PCR Ergebnisse (Ct-Werte) von mit PMA behandelten vitalen *M. bovis* BCG-Pasteur Keimen bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen

Versuch Nr.	Inkubationstemperatur [°C]				
	ohne PMA [Ct]	20 [Ct]	40 [Ct]	50 [Ct]	60 [Ct]
1	22,57	24,83	25,87	25,39	31,29
2	21,14	22,26	23,21	21,52	27,79
3	21,85	23,68	24,67	24,35	30,26
4	23,74	23,78	25,18	24,52	31,91
5	23,61	23,06	22,18	24,59	31,94

Tabelle 32: Real Time PCR Ergebnisse (Ct-Werte) von mit PMA behandelten abgetöteten *M. bovis* BCG-Pasteur Keimen, die vor der PMA-Behandlung mit verschiedenen Substanzen für 30 min bei 37 °C inkubiert wurden

Versuch Nr.	Substanz								
	ohne PMA	mit PMA/ohne Substanz	Natriumdesoxycholat [%]			N-Lauroylsarcosin [%]			Lysozym (2 mg/ml) + Triton® X 100 ¹ (0,1 %)
			0,01	0,1	1	0,05	0,1	0,5	
	[Ct]	[Ct]	[Ct]	[Ct]	[Ct]	[Ct]	[Ct]	[Ct]	[Ct]
1	24,96	29,54	29,67	29,57	30,24	30,78	31,12	29,81	29,31
2	23,79	30,33	31,03	30,72	29,55	30,53	28,86	27,73	30,84
3	23,72	28,81	29,84	30,35	29,89	29,87	29,88	28,40	28,31
4	22,93	31,25	29,26	29,18	27,82	29,73	29,15	27,35	29,53
5	22,84	28,16	30,28	28,54	30,72	28,93	29,31	27,81	30,85

¹ Triton® X 100-Zugabe erst nach der 30-minütigen Inkubation, zusammen mit PMA

Tabelle 33: Real Time PCR Ergebnisse (Ct-Werte) von mit PMA behandelten abgetöteten *M. bovis* BCG-Pasteur Keimen bei einmaliger und doppelter PMA-Behandlung

Versuch Nr.	PMA-Gabe mit Konzentration			
	ohne PMA	[µM]		
		1 x 100	2 x 50	2 x 100
	[Ct]	[Ct]	[Ct]	[Ct]
1	21,00	30,54	32,36	31,69
2	23,79	30,33	33,55	35,79
3	22,26	30,69	34,04	34,18
4	22,33	31,92	34,75	34,49
5	23,93	30,85	34,40	34,55

Tabelle 34: Real Time PCR Ergebnisse (Ct-Werte) von mit PMA behandelten vitalen *M. bovis* BCG-Pasteur Keimen bei einmaliger und doppelter PMA-Behandlung

Versuch Nr.	PMA-Gabe mit Konzentration			
	ohne PMA	[μ M]		
		1 x 100	2 x 50	2 x 100
[Ct]	[Ct]	[Ct]	[Ct]	
1	20,66	21,95	22,40	24,92
2	20,74	21,52	27,07	30,16
3	21,85	24,35	28,38	29,29
4	23,34	25,10	26,79	28,25
5	23,98	24,67	26,34	29,08

Tabelle 35: Real Time PCR Ergebnisse (Ct-Werte) von mit PMA behandelten *M. bovis* BCG-Pasteur Suspensionen mit unterschiedlichen Anteilen an toten und lebenden Bakterien

Versuch Nr.	Prozentualer Anteil tot versus lebend [%]				
	mit PMA				
	100 vs. 0	75 vs. 25	50 vs. 50	25 vs. 75	0 vs. 100
[Ct]	[Ct]	[Ct]	[Ct]	[Ct]	
1	27,67	27,20	26,49	25,81	25,42
2	27,76	26,88	25,60	25,00	24,28
3	29,69	26,94	26,36	24,97	24,23
4	27,98	27,02	25,42	25,32	23,35
5	30,50	28,32	27,08	26,31	25,88

Tabelle 36: Real Time PCR Ergebnisse (Ct-Werte) von nicht mit PMA behandelten *M. bovis* BCG-Pasteur Suspensionen mit unterschiedlichen Anteilen an toten und lebenden Bakterien

Prozentualer Anteil tot versus lebend [%]					
Versuch	ohne PMA				
Nr.	100 vs. 0	75 vs. 25	50 vs. 50	25 vs. 75	0 vs. 100
	[Ct]	[Ct]	[Ct]	[Ct]	[Ct]
1	24,18	23,94	23,59	24,09	24,03
2	23,71	24,15	22,77	23,77	22,75
3	23,50	23,57	23,14	22,81	22,91
4	22,98	21,76	22,44	22,39	21,80
5	25,32	24,05	24,27	23,59	23,76

Tabelle 37: Sequenzierungsergebnisse nach Eurofins MWG Operon

Probe/ PCR- Produkte vom Primerpaar	Sequenz (5'-3')
335F-Com2-FW (Primer 335F)	ATGGGCGCAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGCCTTCG GGTTGTAAACCTCTTTCACCATCGACGAAGGTCCGGGTTTTCTCGGATTGA CGGTAGGTGGAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT AATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCG TAGGTGGTTTGTGCGGTTGTTCGTGAAATCTCACGGCTTAACTGTGAGCGT GCGGGCGATACGGGCAGACTAGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCT GGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAG GCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGC GAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGGTGGGTACTAG GTGTGGGTTTCCTTCTTGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACC CCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGGGG
335F-Com2-RV (Primer Com2)	ACCAGGCGGGTACTTAATGCGTTAGCTACGGCACGGATCCCAAGGAAGG AAACCCACACCTAGTACCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTA ATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACTGCCAGAG ACCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTCCACCGCTAC ACCAGGAATTCCAGTCTCCCCTGCAGTACTCTAGTCTGCCCGTATCGCCCGC ACGTCCACAGTTAAGCCGTGAGATTTACGAACAACGCGACAAACCACCTA CGAGCTCTTACGCCAGTAATCCGGACAACGCTCGCACCTACGTATTAC CGCGGCTGCTGGCACGTAGTTGGCCGGTGCTTCTTCTCCACCTACCGTCAA TCCGAGAAAACCCGGACCTTCGTCGATGGTGAAGAGGTTTACAACCCGA AGGCCGTCATCCCCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTG CAATATCCCCACTGCTGCCTCCTAATA
769F-1492R-FW (Primer 769F)	GCGCCGTAACGGTGGGTAAGTACCGCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTA CGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTA AAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGA TTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTACATGCACAGGAC GCGTCTAGAGATAGGCGTTCCTTGTGGCCTGTGTGCAGGTGGTGCATGG CTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC AACCTTGTCTCATGTTGCCAGCGGGTAATGCCGGGGACTCGTGAGAGAC TGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCC CCTTATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGC GATGCCGTAAGGTTAAGCGAATCCTTTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTG GGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATC AGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAC GTCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCAGTGGCCTAACCTTTTGGGAG GGAGCTGTCGAAGGTGGGATCGGCGATTGGGACGAAGTCGAAAGGGGA

Tabelle 37 (Fortsetzung): Sequenzierungsergebnisse nach Eurofins MWG Operon

Probe/ PCR- Produkte vom Primerpaar	Sequenz (5'-3')
769F-1492R-RV (Primer 1492R)	<p>TCGCAGCTCCCTCCCAAAGGGTTAGGCCACTGGCTTCGGGTGTTACCGACTT TCATGACGTGACGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCAGC GTTGCTGATCTGCGACTACTAGCGACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGA CCCCAATCCGAAGTGAAGCCGGCTTTAAAAGGATTCGCTTAACCTTACGGCAT CGCAGCCCTTTGTACCGGCCATTGTAGCATGTGTGAAGCCCTGGACATAAGG GGCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTC TCTCACGAGTCCCCGGCATTACCCGCTGGCAACATGAGACAAGGGTTGCGCTC GTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCA CCACCTGCACACAGGCCACAAGGGAACGCCTATCTCTAGACGCGTCCTGTGCA TGTCAAACCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCACATGCTCC GCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTA CTCCCAGGCGGGTACTTAATGCGTTAGCTACGGCACGGATCCCAAGGAAG GAAACCCACACCTAGTACCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAA TCCTGTGTCCC</p>
799F-1492R-FW (Primer 799F)	<p>TCTTCCTTGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCCTGGGGAG TACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCG GCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTG ACATGCACAGGACGCGTCTAGAGATAGGCGTTCCCTTGTGGCCTGTGTGCAG GTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG CAACGAGCGCAACCCTTGTCTCATGTTGCCAGCGGGTAATGCCGGGGACTCG TGAGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCA TCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATGGCCGGTACAAAGG GCTGCGATGCCGTAAGGTTAAGCGAATCCTTTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGA TTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGAT CAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCCCGTCACG TCATGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCAGTGGCCTAACCCCTTTGGGAGGGA GCTGTGCAAGGTGGGATCGCGATTGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAACCCG TAATAAG</p>
799F-1492R-RV (Primer 1492R)	<p>TGTCACAAGGGTATAGGCCACTGGCTTCGGGTGTTACCGACTTTCATGACGTG ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCAGCGTTGCTGATC TGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCG AACTGAGACCGGCTTTAAAAGGATTCGCTTAACCTTACGGCATCGCAGCCCTT TGTACCGGCCATTGTAGCATGTGTGAAGCCCTGGACATAAGGGGCATGATGA CTTGACGTATCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCTCTCACGAGTC CCCGGCATTACCCGCTGGCAACATGAGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGAC TTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGCACA CAGGCCACAAGGGAACGCCTATCTCTAGACGCGTCCTGTGCATGTCAAACCCA GGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCACATGCTCCGCCGCTTGTGC GGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCAGGCG GGTACTTAATGCGTTAGCTACGGCACGGATCCCAAGGAAGGAAACCCACAC CTAGTACCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCAAA</p>

FW = forward (engl., vorwärts), RV = reverse (engl., rückwärts)

Tabelle 38: Ergebnisse des Abgleichs der Nukleotidsequenzen aus Tabelle 37 mit dem BLAST-Programm (vgl. Abschnitt 3.2.2.3)

Probe / PCR Produkte vom Primerpaar	Fragmentgröße (bp)	Anzahl der Seq. mit Max Score ¹	query coverage ² (%)	% Identität	Anzahl der Sequenzalignments ³	Sequenzalignments ³
335F-Com2-FW (Primer 335F)	538	54	99	99 (537/538)	15	<i>Mycobacterium avium</i> (subsp. <i>avium</i> / <i>paratuberculosis</i>) <i>Mycobacterium intracellulare</i> <i>Mycobacterium</i> spp.
335F-Com2-RV (Primer Com2)	539	57	98	100 (534/534)	17 31	<i>Mycobacterium avium</i> (subsp. <i>avium</i> / <i>paratuberculosis</i>) <i>Mycobacterium intracellulare</i> <i>Mycobacterium</i> spp.
769F-1492R-FW (Primer 769F)	702	16	98	99 (694/695)	16 2	<i>Mycobacterium avium</i> (subsp. <i>avium</i> / <i>paratuberculosis</i>) <i>Mycobacterium mantanii</i> (693/695)
769F-1492R-RV (Primer 1492R)	695	18	99	99 (691/692)	18	<i>Mycobacterium avium</i> (subsp. <i>avium</i> / <i>paratuberculosis</i>)
799F-1492R-FW (Primer 799F)	684	12	99	99 (677/679)	12	<i>Mycobacterium avium</i> (subsp. <i>avium</i> / <i>paratuberculosis</i>)
799F-1492R-RV (Primer 1492R)	674	23	98	99 (666/667)	20 2 1	<i>Mycobacterium avium</i> (subsp. <i>avium</i> / <i>paratuberculosis</i>) <i>Mycobacterium mantanii</i> <i>Mycobacterium intracellulare</i>

¹Seq. = Sequenzen, Max Score = höchster Alignment-Score zwischen Eingabesequenz und gefundener Datenbanksequenz; ²prozentualer Anteil der Eingabesequenzlänge, der in gefundener Datenbanksequenz enthalten ist; ³Alignment = Übereinstimmung; FW = forward (engl., vorwärts), RV = reverse (engl., rückwärts)

12 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. habil. M. Gareis dafür, dass er mir die Anfertigung dieser Arbeit an seinem Lehrstuhl ermöglicht hat. Ich bedanke mich sehr für die Überlassung des Themas, die Durchsicht der Arbeit und das entgegengebrachte Vertrauen.

Bei Frau PD Dr. Karin Schwaiger möchte ich mich ganz herzlich für die Betreuung und für die wertvollen Hinweise und Ratschläge bei der Durchsicht und Korrektur der Arbeit bedanken.

Beim Bayerischen Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz bedanke ich mich sehr für die finanzielle Förderung des Projektes.

Dem Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, und hier insbesondere Herrn Dr. U. Busch und Frau Dr. U. Messelhäuser, danke ich für die freundliche Zusammenarbeit im Rahmen des Projektes.

Herrn Dr. Samart Dorn-In gilt mein großer Dank für die Hilfestellung bei der Durchführung und Auswertung der Sequenzierung. Zudem bedanke ich mich sehr für die Durchsicht der Arbeit.

Bei den Mitarbeitern des Statistischen Beratungslabors (STABLAB) des Instituts für Statistik der LMU München, insbesondere Frau Julia Herbinger, möchte ich mich für die Unterstützung bei der Erarbeitung der Statistik bedanken.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Lebensmittelsicherheit der Tierärztlichen Fakultät der LMU München, die durch ihre Hilfsbereitschaft zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuletzt danke ich von ganzem Herzen meiner Familie für die uneingeschränkte liebevolle Unterstützung während des Studiums und der Doktorarbeit.