

Molekularbiologischer Nachweis von *Mycobacterium avium*
subsp. *paratuberculosis* mit Fokus auf Milchproben

von Ricarda Mayer

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
(Dr. rer. biol. vet.)
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München

Molekularbiologischer Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp.
paratuberculosis mit Fokus auf Milchproben

von Ricarda Mayer
aus Ebersberg

München 2018

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

Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Christina Hölzel

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Christina Hölzel

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Kristina Schauer

Tag der Promotion: 27. Juli 2018

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	Einleitung	1
II.	Literaturübersicht	3
1.	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> (MAP)	3
1.1	Charakteristika	3
1.2	Tenazität und Wirtsspektrum	3
2.	Paratuberkulose beim Rind	4
2.1	Infektionswege und Pathogenese	4
2.2	Interaktion von MAP mit dem Immunsystem – Immunevasion	6
2.3	Diagnostik der Paratuberkulose	7
2.4	Prävalenz und wirtschaftliche Relevanz	8
2.5	Präventions- und Kontrollmaßnahmen.....	10
3.	MAP im Lebensmittel Milch	11
4.	MAP in Zusammenhang mit Morbus Crohn	13
5.	Nachweisverfahren von MAP	15
5.1	MAP-Kultur in/auf verschiedenen Medien	15
5.2	Kultureller Nachweis von MAP aus der Matrix Milch	16
5.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	17
5.3.1	Formen der PCR-Methode	18
5.3.2	PCR-basierter MAP-Nachweis aus Milchproben.....	20
5.3.3	Möglichkeiten zur Lebend-Tot-Bestimmung in der PCR	22
III.	Material und Methoden	25
1.	Materialien und Geräte	25
1.1	MAP-Stämme	25
1.2	Mykobakterien-Stämme	25
1.3	Kontroll-Stämme.....	26
1.4	Nährmedien.....	26
1.5	Chemikalien und Reagenzien.....	27
1.6	Puffer und Lösungen	28
1.7	Enzyme	29
1.8	Kits.....	29
1.9	Verbrauchsmaterialien	29
1.10	Primer.....	30

1.11	Geräte.....	31
1.12	Software.....	32
2.	Methoden.....	33
2.1	Vorbereitende Arbeiten.....	33
2.1.1	Erstellen der Kontrollkeim-Stammsammlung.....	33
2.1.2	Anzucht und Langzeitkultivierung von MAP.....	33
2.1.3	Identifikation der Kolonien.....	35
2.1.4	Einfluss von Tween 80 auf die MAP-Kultivierung.....	37
2.1.5	Kultureller Nachweis von MAP aus Milchproben zur Etablierung eines Gold-Standards.....	42
2.2	Entwicklung des molekularbiologischen Nachweises von MAP.....	42
2.2.1	Auswahl neuer MAP-spezifischer Targets.....	42
2.2.2	Spezifitätstest der neu generierten Primerpaare.....	45
2.2.3	Einstellen der PCR-Parameter zum MAP-Nachweis via Sybr-Green qPCR mit Fokus auf Milchproben	46
2.2.4	Probenaufbereitung für qPCR mit Fokus auf Milchproben.....	50
2.2.5	Erarbeitung eines Protokolls zum qPCR-basierten Nachweis von MAP mittels Sybr-Green in Milch und Ermittlung der Nachweisgrenze.....	57
2.2.6	Orientierender MAP-Nachweis in Konsummilch aus dem Handel.....	58
2.2.7	Quantitative Lebend-Tot-Unterscheidung von MAP über DNA-interferierende Reagenzien und anschließender qPCR.....	59
IV.	Ergebnisse.....	64
1.	Vorbereitende Arbeiten.....	64
1.1	Stammsammlung Mykobakterien-Stämme und Kontrollkeime.....	64
1.2	MAP-Anzucht.....	64
1.3	Koloniemorphologie.....	66
1.4	Aggregatbildung unter verschiedenen Anzuchtbedingungen.....	68
1.5	Zellquantifizierung von MAP-Kulturen.....	70
1.6	Bestimmung der Nachweisgrenze beim kulturellen Nachweis von MAP in pasteurisierter Frischmilch und Vorzugsmilch.....	72
2.	Molekularbiologischer Nachweis von MAP.....	74
2.1	Etablierung neuer MAP-spezifischer Primer.....	74
2.1.1	Generierung neuer MAP-spezifischer Primer auf Basis der Proteomanalyse.....	74
2.1.2	Thermocyclerprogramme der neuen Primerpaare mit optimalen Annealing-Temperaturen zum qualitativen MAP-Nachweis.....	76
2.1.3	Spezifität der neu generierten Primerpaare.....	77
2.2	Einstellen der PCR-Parameter zum quantitativen MAP-Nachweis via Sybr-Green qPCR anhand der Primerpaare F57, 8771/B und 2420/A.....	80
2.3	Optimierung und Validierung der DNA-Extraktion aus MAP in Reinkultur.....	83

2.4	Validierung der MAP-DNA-Extraktion aus dotierten Milchproben	88
2.5	Validierung des erarbeiteten Protokolls zum MAP-Nachweis aus Milchproben mittels Sybr-Green qPCR und Ermittlung der Nachweisgrenze.....	90
2.6	Konsummilch aus dem Handel	95
2.7	Lebend-Tot-Unterscheidung mit EMA, PMA und PMAxx und anschließender F57-qPCR	95
2.7.1	Abtötungsstrategie für geeignete Tot-Kontrolle.....	95
2.7.2	Vergleich der Reagenzien EMA, PMA und PMAxx	96
2.7.3	Optimierung der PMA-F57-qPCR	98
2.7.4	Validierung der Lebend-Tot-Unterscheidung von MAP in Reinkultur durch PMA-F57-qPCR.....	99
V.	Diskussion.....	101
1.	Vorarbeiten	101
1.1	Kontrollkeimstammsammlung und MAP-Anzucht.....	101
1.2	Koloniemorphologie, Flüssiganzucht und Zellzahlbestimmung für Dotierungsversuche.....	103
1.3	Kultureller Nachweis von MAP aus Milchproben	106
2.	Molekularbiologischer Nachweis von MAP in Milchproben	109
2.1	Optimierung der Parameter zur optimalen Amplifikation der Targetsequenzen im Sybr-Green qPCR-Assay.....	110
2.2	Probenaufbereitung	111
2.3	Etablierter Sybr-Green qPCR-Assay zur Detektion von MAP aus Milchproben.....	117
3.	Feldproben.....	120
4.	Lebend-Tot-Unterscheidung von MAP im qPCR-System	121
VI.	Schlussfolgerungen	125
VII.	Ausblick.....	127
VIII.	Zusammenfassung.....	128
IX.	Summary.....	130
X.	Literaturverzeichnis	132
XI.	Anhang	146
XII.	Abbildungsverzeichnis.....	155
XIII.	Tabellenverzeichnis.....	158

XIV. Danksagung	160
------------------------------	------------

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BCG	Bacillus Calmette Guerin
BLAST	Basic local alignment search tool
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CP	Crossing Point
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSM/DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMA	Ethidium Monoazid
et al.	et alii
fg	Femtogramm
FW	forward
<i>G</i>	Erdbeschleunigung
HEYM-Agar	Herrold's Egg Yolk Agar mit Mykobaktin
HPC	Hexadecylpyridiniumchlorid
KbE	Koloniebildende Einheit
L	Liter
log ₁₀	Dekadischer Logarithmus
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> subspecies <i>paratuberculosis</i>
mg	Milligramm

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mM	millimolar
MW	Mittelwert
NALC-NaOH	N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide
Ng	Nanogramm
Nm	Nanometer
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
Pg	Pikogramm
PMA	Propidium Monoazid
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleic acid
Rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcriptase-polymerase chain reaction
RV	reverse
SD	Standard deviation
Sek	Sekunden
Std	Stunden
subsp.	subspecies
TE-Puffer	TRIS-EDTA-Puffer
Tm	Schmelztemperatur
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
VBNC	Viable but nonculturable
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel

I. EINLEITUNG

„*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, Crohn's disease and the Doomsday Scenario” (Hermon-Taylor, 2009): Mit dramatischen Titeln wie diesem sind wissenschaftliche Publikationen bereits überschrieben. Doch wie realistisch ist es, den Erreger in Verbindung mit solchen Szenarien zu bringen?

Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis* (MAP) verursacht die in Deutschland meldepflichtige Johnesche Krankheit bei Wiederkäuern. Sie zeichnet sich durch mehrjährige Inkubationszeit aus, in deren Verlauf der Erreger jedoch über den Kot ausgeschieden werden kann. Die chronische Enteritis zeigt sich im fortgeschrittenen Stadium in klinischen Symptomen wie wässriger Durchfall, starke Abmagerung und Dehydrierung (Manning und Collins, 2001).

Symptomatik und Gewebeveränderungen bei der Johneschen Krankheit ähneln stark dem Erscheinungsbild von Morbus Crohn beim Menschen. Die bis dato nicht gänzlich geklärte Ursache dieser chronischen Magen-Darmentzündung und die Parallelen zur Johneschen Krankheit veranlassten Wissenschaftler dazu, Studien zu MAP als potenziellem Zoonose-Erreger durchzuführen (Greenstein, 2003, Hermon-Taylor, 2009) – bis heute ist jedoch die Diskussion über MAP als Gefahr für den Menschen kontrovers.

MAP kann über infizierte Tiere in die Rohmilch gelangen, der Eintrag kann dabei schon bei subklinisch erkrankten Tieren über fäkale Kontamination erfolgen (Pierce, 2010). Gerade in Anbetracht der diskutierten Fähigkeit von MAP, Pasteurierungsprozesse zu überleben, könnten tierische Lebensmittel ein gewisses Risiko als Quelle lebender Erreger tragen (Ellingson et al., 2005). Aufgrund des nicht ausgeschlossenen Gesundheitsrisikos des MAP-Erregers für den Menschen stehen mögliche MAP-Expositionsquellen wie Milch und Milchprodukte somit im Fokus der Forschung zum vorbeugenden Verbraucherschutz.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es – im Rahmen eines Verbundprojektes zum Thema „Nachweis und Kontrolle von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* zur Sicherung der Produktqualität in milchverarbeitenden Betrieben“ – kulturelle und molekularbiologische Vorarbeiten für einen komplexen MAP-Nachweis mit Fokus auf Milchproben zu leisten. Ein Hauptaugenmerk lag auf Optimierungs- und Validierungsarbeiten in Bezug auf Probenvorbereitung und effiziente Amplifikation im Sybr-Green-Real-Time-Assay zur Detektion von MAP in Milchproben. Dabei sollten die Verluste in einzelnen Schritten der Probenvorbereitung durch Berechnungen abgeschätzt werden, um Schwierigkeiten, die bei

der Verbesserung der Nachweisgrenze überwunden werden müssen, detailliert aufzuzeigen und um daraus resultierend zukünftig erfolgversprechende Lösungsansätze einleiten zu können. Darüber hinaus wurden im Rahmen dieser Arbeit neue MAP-spezifische Targets identifiziert. Außerdem sollte die Anwendbarkeit von DNA-interkalierenden Stoffen zur Lebend-Tot-Unterscheidung von MAP im PCR-System überprüft werden.

Diese Arbeit wurde durch das IGF-Forschungsvorhaben AiF 18388 N der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP)

1.1 Charakteristika

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) gehört zur Familie der *Mycobacteriaceae*. Die Gattung *Mycobacterium* setzt sich aus über 100 Arten zusammen, die sowohl wichtige Human- als auch Tierpathogene – mit MAP als Erreger der Paratuberkulose – inkludieren. Auf Basis von DNA-DNA-Hybridisierungen wird MAP zu der *Mycobacterium-avium*-Gruppe gezählt (Harris und Barletta, 2001). Gemeinsamkeiten der Mykobakterien sind der hohe GC-Gehalt der DNA sowie eine stark lipidhaltige (Cook et al., 2009) und säurestabile Zellwand, aufgrund derer sie in der Ziehl-Neelsen-Färbung auch nach Säurezugabe rot angefärbt bleiben (Bishop und Neumann, 1970). MAP-Zellen stellen sich unter dem Mikroskop als immobile Stäbchen mit einer Größe von 0,5–1,5 µm dar, die sich in wässrigen Lösungen aufgrund ihrer Hydrophobizität zu Klumpen aus mehreren hundert Bakterien formieren (Primm et al., 2004, Grant, 2005). MAP gehört dabei zu den äußerst langsam wachsenden Mykobakterien mit Generationszeiten von ca. 24 Stunden unter optimalen Wachstumsbedingungen (Lambrecht et al., 1988). Als einzige Subspezies benötigt MAP zum Wachstum das Siderophor Mykobaktin (Lambrecht und Collins, 1993). Der Eisen-Chelator wird von anderen Mykobakterien-Arten selbst sekretiert, um mit Eisen in der Umwelt Komplexe zu bilden, sodass dieses komplexierte Eisen anschließend von der Bakterienzelle aufgenommen werden kann und dem bakteriellen Stoffwechsel zur Verfügung steht (De Voss et al., 1999). Die Unfähigkeit zu dieser Mykobaktin-Produktion lässt MAP natürlicherweise – als obligat parasitäres Pathogen – nur in Wirts-Zellen (typischerweise in Makrophagen) replizieren (Coussens, 2001).

1.2 Tenazität und Wirtsspektrum

Die bekannt hohe Widerstandsfähigkeit wird der MAP-Zelle durch ihre äußere Hülle verliehen: Die dicke, wachsartige Zellwand, bestehend aus Peptidoglycan, Arabinogalaktan, Mykolsäuren, Lipoarabinomannan, Proteinen und einer Vielzahl an Lipiden, verleiht dem Bakterium hohe Robustheit z. B. gegen Hitze, Frost, Säuren, Laugen und Desinfektionsmittel (Richards und Thoen, 1977, Rowe et al., 2000, Sung und Collins, 2003, Beran et al., 2006). (Intrinsische) Resistenz gegen Chemikalien und antimikrobielle Wirkstoffe erlangt das Bakterium durch die geringe Permeabilität der Zellwand. Diese wird hauptsächlich von einer

Vielzahl an Lipiden, die eine hohe Hydrophobizität zur Folge haben, verursacht (Beran et al., 2006). Im Gegenzug ist diese komplexe Zellwand, die gegen Stressoren einen erheblichen Überlebensvorteil bietet, auch für das langsame Wachstum durch die beschränkte Nährstoffaufnahme verantwortlich (Rowe und Grant, 2006). In der Literatur wird das hohe Maß an Widerstandsfähigkeit von MAP, der bis zu 250 Tage in Wasser, Faeces und Rindergülle persistieren kann, beschrieben (Harris und Barletta, 2001). Diese hohe Überlebensdauer in der Umwelt wurde in einer Studie von Whittington et al. (2004) ebenfalls beobachtet; dabei wurde zudem auf einen möglichen Übergang des Bakteriums in die Dormanz verwiesen: Im MAP-Genom konnten das *dps*-like genetische Element sowie *relA* nachgewiesen werden, die in anderen Mykobakterien in die sogenannte Dormanz-Antwort involviert sind (Whittington et al., 2004). Auch sporenähnliche Zustände von MAP wurden bereits beschrieben, die ähnlich zur Dormanz in einer chronischen Persistenz resultieren, ausgelöst durch Umwelt-Stressoren oder Nährstoffmangel (Lamont et al., 2012). Die hohe Überlebensdauer von MAP in der Umwelt ist ein Grund für dessen weite Verbreitung. Über Kontamination von Boden, Wasser oder Futter gelangt der Erreger in seinen Wirt, um sich dort zu vermehren (Sweeney, 1996). Dabei gelten als primär für MAP empfängliche Tierarten domestizierte und wildlebende Wiederkäuer wie Rind, Schaf und Ziege; zudem wurde aber auch von infizierten Primaten, Kaninchen, Wiesel, Füchsen und Hermelinen berichtet (Manning und Collins, 2001).

2. Paratuberkulose beim Rind

2.1 Infektionswege und Pathogenese

MAP ist der Erreger der in Deutschland meldepflichtigen Johneschen Krankheit (auch Paratuberkulose) bei Wiederkäuern (Tiergesundheitsjahresbericht 2016 FLI https://www.openagrar.de/servlets/MCRFileNodeServlet/openagrar_derivate_00008949/TGJB_2016_2017-12-19.pdf, letzter Zugriff 03/2018). Symptomatisch für diese intestinale mykobakterielle Infektion sind in der fortgeschrittenen Krankheitsphase wässriger Durchfall, starke Abmagerung und Dehydrierung. Eine Behandlung der Paratuberkulose ist nicht möglich (Manning und Collins, 2001).

Die Übertragung von MAP kann direkt – intrauterin, fäkal-oral oder über kontaminiertes Kolostrum –, aber auch indirekt über kontaminiertes Wasser und Futter erfolgen. Dabei infizieren sich jüngere Tiere überwiegend an kontaminierten Zitzen oder Kolostrum, ältere Tiere über kontaminiertes Futter, Wasser oder Weiden (Büttner et al., 2006). Generell sind

Kälber anfälliger für eine Infektion, mit steigendem Alter weisen die Tiere zunehmende Resistenz auf (Hagan, 1938, Larsen et al., 1975, Sweeney, 1996). Die Empfänglichkeit ist assoziiert mit der hohen Anzahl an transienten ilealen Peyerschen Platten in Jungtieren. Diese wiederum beinhalten viele M-Zellen, das Eintrittsportal von MAP. Ist ein Tier infiziert, kann die Inkubationszeit mehrere Jahre betragen. Nur etwa 10 % dieser chronisch infizierten Tiere entwickeln später die progressive Krankheitsform mit den charakteristischen Symptomen (Koets et al., 2015). Während dieser klinischen Phase können mehr als 10^8 Erreger pro Gramm Kot ausgeschieden werden (Cocito et al., 1994). Für die Verbreitung des Erregers spielen jedoch insbesondere die subklinisch erkrankten Tiere eine bedeutsame Rolle. Schon während dieser subklinischen Phase werden die Erreger über den Kot ausgeschieden, was zur Kontamination der Umwelt und somit zur möglichen Infektion weiterer Tiere führt (Atreya et al., 2014). Bei der Tier-zu-Tier-Übertragung ist die Transmission von infizierten erwachsenen Tieren zu Kälbern am bedeutendsten, eine Kalb-zu-Kalb-Übertragung ist jedoch auch möglich (Marcé et al., 2011). In einer Übersichtsarbeit aus dem Jahr 1996 wird die Eisberg-These vorgestellt, die die Verbreitung von MAP in infizierten Herden beschreibt: So sollen pro fortgeschrittenem Fall der Paratuberkulose mit hoher Wahrscheinlichkeit bis zu 25 weitere Tiere in der Herde infiziert sein; das klinisch erkrankte Tier sei nur die „Spitze des Eisberges“ (Whitlock und Buergelt, 1996).

Tabelle 1: Der Eisberg-Effekt

Stadium 4	fortgeschrittene klinische Phase		1 Tier
Stadium 3	klinische Phase		1–2 Tiere
Stadium 2	subklinische Phase	adulte Carrier-Tiere	4–8 Tiere
Stadium 1	stille Infektion	Kälber, junge und adulte Tiere	10–14 Tiere
Total			15–25 Tiere

(modifiziert nach Whitlock und Buergelt, 1996)

Die in Tabelle 1 aufgeführten Stadien werden von Whitlock und Buergelt (1996) wie im folgenden Absatz dargestellt beschrieben: In Stadium 1 weisen die infizierten Tiere keinerlei klinische Anzeichen einer Infektion auf und sind rein äußerlich von nicht-infizierten Artgenossen nicht zu unterscheiden. Die einzige Möglichkeit, die Infektion in dieser frühen Phase zu erkennen, ist der Nachweis des Erregers im Gewebe über histologische

Untersuchungen. Diese Tiere könnten MAP bereits unter dem Level der Nachweisgrenze in die Umwelt ausscheiden. Tiere mit subklinischer Infektion (Stadium 2) zeigen keine beobachtbaren Anzeichen der Paratuberkulose. Nur wenige infizierte Individuen produzieren in dieser Phase detektierbare Antikörper, nur ein kleiner Prozentsatz (ca. 15 %) der betroffenen Tiere kann über Kot-Kultur identifiziert werden. Die Mehrheit bleibt unentdeckt und kann geringe Mengen des Erregers in die Umwelt ausscheiden. Erste klinische Anzeichen wie Gewichtsverlust und optional gesteigerter Appetit sind nach 2 bis 10 Jahren Inkubationszeit zu beobachten (Stadium 3). In den nächsten Wochen zeigt sich vermehrt wässriger Stuhl. Die betroffenen Tiere verbleiben für mehr als 3 bis 4 Monate in diesem Stadium. Biochemische Veränderungen im Blut sind charakteristisch in dieser Phase, jedoch nicht ausreichend spezifisch für eine sichere Diagnose der Paratuberkulose. Viele mit MAP infizierte Tiere können über Fäkal-Kultur oder detektierbare Antikörper mit kommerziellen ELISA-Tests identifiziert werden. In Phase 4 werden die betroffenen Tiere zunehmend lethargisch, schwach und sind stark abgemagert. Kachexie und wässriger Durchfall charakterisieren die terminale Phase der Paratuberkulose (Whitlock und Buergelt, 1996).

2.2 Interaktion von MAP mit dem Immunsystem – Immunevasion

Befindet sich das Bakterium nach oraler Aufnahme im Intestinal-Trakt, dringt es über ileale M-Zellen in die Mucosa ein und wird von subepithelialen Makrophagen aufgenommen (Momotani et al., 1988). Im Gegensatz zu nicht-pathogenen Bakterien gelingt es MAP als intrazellulärem Pathogen, die Wirtszell-Funktionen zu manipulieren (Zurbrick und Czuprynski, 1987). Dadurch erreicht das Bakterium den Status der Immunevasion, es ist so in der Lage, sich innerhalb der Makrophagen zu vermehren (Kuehnel et al., 2001). Die Mechanismen, die die parasitäre Vermehrung von MAP in Makrophagen erlauben, sind bis dato nicht zur Gänze geklärt, jedoch konnten in einigen Veröffentlichungen Aufklärungsansätze zur Interaktion von pathogenen intrazellulären Mykobakterien wie MAP mit Makrophagen geliefert werden: *Mycobacterium avium* subsp. *avium* beispielsweise verändert das Aktinfilament-Netzwerk der Makrophagen, wodurch die Endosomenbewegung gestört und die Fusion des Phagosoms mit dem Endosom verzögert werden könnte (Guérin und de Chastellier, 2000). Kuehnel et al. (2001) stellten im Hinblick auf die Fusionseigenschaften fest, dass Phagosomen mit lebenden MAP zwar mit frühen Endosomen, jedoch in nur geringem Maße bzw. nicht mit späten Endosomen oder Lysosomen fusionieren. Im Gegensatz dazu verhielten sich Phagosomen mit toten MAP genauso wie Phagosomen mit lebenden nicht-pathogenen Mykobakterien. Außerdem zeigten Zellen, die mit MAP infiziert

wurden, mit pH 6–6,5 nur eine milde Ansäuerung, während Makrophagen mit abgetöteten MAP eine deutliche Ansäuerung (pH 5) aufwiesen (Kuehnel et al., 2001). In einer Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2015 wurden folgende Prozesse zusammengefasst, die von MAP im infizierten bovinen Makrophagen verändert werden (Koets et al., 2015): So unterstützt der MAP-Erreger das Überleben der Wirtszelle, indem er die Apoptose der Makrophagen verhindert. Des Weiteren interagiert der Erreger mit der phagolysosomalen Funktion des Makrophagen und wirkt seiner eigenen Abtötung entgegen. Die Manipulation der Cytokin- und Chemokinexpression induziert zusätzlich ein immunsuppressives Zellmilieu (Koets et al., 2015).

2.3 Diagnostik der Paratuberkulose

Die Diagnose der Paratuberkulose wird über den direkten Erregernachweis oder indirekt, gestützt auf spezifische Immunreaktionen nach MAP-Exposition, gestellt (Büttner et al., 2006). Abbildung 1 fasst die Diagnostik schematisch zusammen.

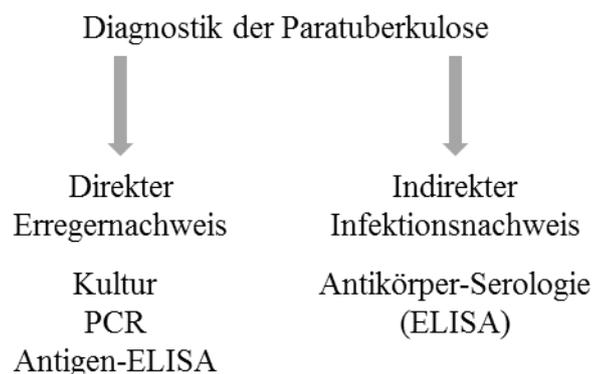


Abbildung 1: Möglichkeiten der Diagnostik

Als bislang sensitivste Methode gilt der direkte Erregernachweis über Fäkalkultur, der jedoch mit hohem zeitlichem Aufwand verbunden ist. Nach 12 Kulturwochen erscheinen ca. 97 % der in Kultur vermehrungsfähigen MAP-Zellen als sichtbare Kolonien (Whitlock et al., 1989), zur sicher negativen Diagnose ist daher ein noch längerer Zeitraum anzusetzen. Eine zeitsparende Alternative stellt der molekularbiologische Nachweis via Endpoint- oder Real-Time-PCR dar. Bislang werden einerseits PCR-Protokolle veröffentlicht, die zur Fäkalkultur vergleichbare Sensitivitäten versprechen – so konnten Bögli und Kollegen eine 100 %ige Sensitivität bei einem Spiking-Level von 500 KbE/g Fäzes zeigen (Bögli-Stuber et al., 2005), De Kruijff et al. (2017) berichten von einem Detektionslimit von 100 KbE/g Fäzes; auf der anderen Seite wurde jedoch via PCR auch geringere Sensitivität im Vergleich zum Gold-Standard publiziert und der molekularbiologische Nachweis als keine adäquate Alternative

zur langwierigen Kultur deklariert (Keller et al., 2014). In Realproben wie gepoolten Fäkal- und Umweltproben, bzw. Sockentupfer- und Gülleproben wird dem PCR-Nachweis eine zur Kultur äquivalente Sensitivität attestiert (Aly et al., 2010, Hahn et al., 2017).

Der indirekte Erregernachweis basiert auf der Immunreaktion des Wirtstieres. Es sind bereits kommerziell erhältliche ELISA-Kits auf dem Markt zur Detektion von MAP-Antikörpern in Serum- bzw. Milchproben. In Deutschland zugelassen sind derzeit IDEXX Paratuberculosis Verification, IDEXX Paratuberculosis Screening von IDEXX Europe B. V., PARAS bzw. PARAB von ID Vet, LSIVet VETPTRS von Life Technologies, PARACHECK 2 von Thermo Fisher Scientific sowie cattletype MAP Ab von Qiagen (amtliche Methodensammlung FLI, Stand 03/2018). Die Ergebnisse einer Validierungsstudie von vier ELISA-Kits zeigte, dass eine diagnostische Spezifität von bis zu 98,6 %, Sensitivitäten allerdings nur im Bereich von 23,3 % und 32,2 % erreicht werden konnten, jeweils in Relation zur Kot-Kultur (Donat et al., 2012). Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass ELISA-Verfahren auch zum direkten Erregernachweis eingesetzt werden können, jedoch in der Sensitivität dem kulturellen Nachweis und der PCR generell unterlegen sind (Sachse et al., 2003, Eriksson und Aspan, 2007). Auch wenn wiederholte Beprobung und Untersuchung die Sicherheit der Diagnose erhöhen kann (Whitlock et al., 2000), ermöglicht aktuell weder der direkte Erregernachweis, noch der Antikörpernachweis eine hinreichende diagnostische Sicherheit.

2.4 Prävalenz und wirtschaftliche Relevanz

Der deutsche Veterinär H. A. Johne und sein Kollege L. Frothingham berichteten 1894 erstmals über die heute als Johnesche Krankheit bezeichnete Gastroenteritis in Deutschland (Johne und Frothingham, 1895 zitiert nach Behr und Collins, 2010). Heute wird die Erkrankung als weltweites Problem angesehen, mit erheblichen ökonomischen Folgen für Milcherzeuger und Milchindustrie (Benedictus et al., 1987). Eine Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2011 fasst Daten zur Prävalenz in einzelnen Ländern zusammen, wobei im Allgemeinen das Vorkommen einer MAP-Infektion in Milchviehbeständen höher eingestuft wird als in Fleischviehbeständen: In Milchviehbeständen der USA beträgt die Prävalenz einer MAP-Infektion beispielsweise zwischen 1 % und 20 % (Lombard, 2011). In Belgien wird die Prävalenz auf 1,2 % (Boelaert et al., 2000), in Dänemark auf 8,8 % (Jakobsen et al., 2000) geschätzt. Diese Daten beziehen sich jeweils auf die Anzahl infizierter Einzeltiere innerhalb einer Population. Der Anteil infizierter Herden an einer Population ist um ein Vielfaches höher: So wird die Herdenprävalenz in den USA auf 68 % eingestuft (Lombard, 2011).

Nielson und Toft fassen in ihrer Übersichtsarbeit Studien zu Einzeltier- und Herdenprävalenzen in Europa zusammen: Darunter wird die Einzeltierprävalenz in Bayern beispielsweise mit bis zu 24 % angegeben, die Herdenprävalenz in Sachsen mit 42 % (Nielsen und Toft, 2009). Die in gezielten Studien erhobene Herdenprävalenz liegt dabei erheblich über den Daten, die aus den Tierseuchenmeldungen hervorgehen: Das Friedrich-Löffler-Institut veröffentlichte in seinem Jahresbericht zur Tiergesundheit Daten zur Situation in ganz Deutschland. So wurden im Jahr 2016 insgesamt 511 Fälle der Paratuberkulose gemeldet, darunter 474 Rinder (Tiergesundheitsjahresbericht 2016 FLI https://www.openagrar.de/servlets/MCRFileNodeServlet/openagrar_derivate_00008949/TGJB_2016_2017-12-19.pdf, letzter Zugriff 03/2018). Dies erklärt sich nicht zuletzt dadurch, dass gezielte Studien auch Herden mit ausschließlich subklinisch erkrankten Tieren erkennen, während in klinisch unauffälligen Herden bislang nur in einzelnen Bundesländern (im Rahmen von Sanierungsprogrammen, vgl. Kapitel 2.5) Routineuntersuchungen auf Paratuberkulose stattfinden. Abbildung 2 zeigt die regionale Verteilung der 2016 beim FLI erfassten Meldungen.

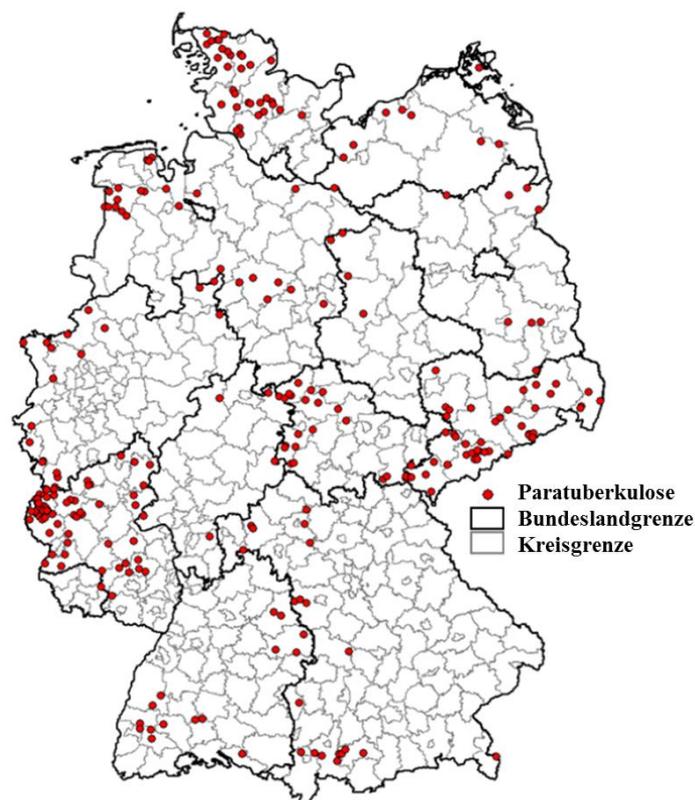


Abbildung 2: Verteilung der gemeldeten Paratuberkulose-Fälle in Deutschland 2016

(modifiziert nach Tiergesundheitsjahresbericht 2016 FLI

https://www.openagrar.de/servlets/MCRFileNodeServlet/openagrar_derivate_00008949/TGJB_2016_2017-12-19.pdf, letzter Zugriff 03/2018)

Für die Milcherzeuger entstehen durch MAP-Infektionen hohe finanzielle Einbußen. Als Ursache dieses ökonomischen Defizits werden die mit der Paratuberkulose einhergehende Reduktion der Milchleistung, Reduktion des Schlachtgewichts, Verluste aufgrund vorzeitiger Schlachtung infizierter Rinder sowie Ersatz-Kosten genannt (Benedictus et al., 1987, Ott et al., 1999). In der Literatur finden sich zahlreiche Studien zur Kalkulation des Verlustbetrags pro Kuh in Milchviehbetrieben: In einer Studie aus dem Jahr 1999 wird das durchschnittliche durch Paratuberkulose verursachte Defizit in infizierten Herden auf 22-27 USD/Kuh geschätzt (Ott et al., 1999). Ähnliche Defizit-Kalkulationen in infizierten Rinderherden liefern Stott und Kollegen mit knapp über 30 USD/Kuh (Stott et al., 2005) oder Chi und Kollegen mit bis zu 50 USD/Kuh (Chi et al., 2002). Die durch Paratuberkulose verursachten jährlichen Kosten für die gesamte US Milchindustrie belaufen sich auf 200-250 Millionen USD (Ott et al., 1999).

2.5 Präventions- und Kontrollmaßnahmen

Um die Paratuberkulose und die damit einhergehenden Kosten zu kontrollieren, wurden in Europa weitestgehend freiwillige Kontrollprogramme ins Leben gerufen. Die meisten dieser Kontrollprogramme basieren auf Test- und Auslese-Strategien, kombiniert mit hygienischen Schutzmaßnahmen (Garry, 2011). Solche Programme sind bis dato sehr zeitintensiv und mit hohen Kosten und kontinuierlichem Arbeitsaufwand verbunden, dem nur eine begrenzte Erfolgsrate gegenübersteht. Die freiwillige Teilnahme an solchen Kontrollprogrammen ist daher stark limitiert (Khol und Baumgartner, 2012). In Deutschland herrscht eine Meldepflicht von Paratuberkulose-Fällen, in den meisten Bundesländern erfolgen keine verpflichtenden Konsequenzen für die jeweiligen Tiere oder Herden. In Niedersachsen trat im November 2017 die erste verpflichtende Verordnung in Kraft, die sogenannte Niedersächsische Paratuberkulose-Verordnung. Darin stellt die Untersuchungspflicht von allen über zwei Jahre alten Zuchtrindern im Abstand von höchstens 12 Monaten einen wesentlichen Bestandteil dar (niedersächsische Paratuberkulose-Verordnung <http://www.nds-voris.de/jportal/?quelle=jlink&query=ParaTbSchV+ND&psml=bsvorisprod.psml&max=true>, letzter Zugriff 03/2018). In anderen Regionen Deutschlands können sich Landwirte freiwillig nach den Guidelines zur Kontrolle der Johnsen Krankheit richten, die Vorschläge zu Hygienemaßnahmen, zur Reduktion klinischer Fälle und Vorbeugung der weiteren Verbreitung der Paratuberkulose beinhalten (Khol und Baumgartner, 2012). Seit dem 1. Januar 2015 haben hessische Landwirte zusätzlich die Möglichkeit, am hessischen MAP-Untersuchungsprogramm teilzunehmen. Die Betriebe werden mehrfach beprobt, bei MAP-positivem Befund erhalten die Landwirte Hilfestellung zur Senkung der MAP-Prävalenz (Gemeinsame Arbeitstagung der

Nationalen Referenzlabore 2017). Deutschland befindet sich demnach aktuell im Umschwung beim Kampf gegen die Paratuberkulose. Aufgrund der oftmals immer noch inkonsequenten Kontrolle wurde neben den beschriebenen Kontrollsystemen auch eine Impfung gegen Paratuberkulose in Erwägung gezogen. Ein Übersichtsartikel aus dem Jahr 2010 von Bastida und Juste fasst insgesamt 118 Experimente aus 63 Veröffentlichungen aus 14 Ländern zur Vakzination gegen Paratuberkulose wie folgt zusammen: Die Ergebnisse der Studien zeigen einen deutlich positiven Effekt von Schutzimpfungen. Die Reduktion von MAP-positiven Ergebnissen durch Impfungen variieren zwischen 11 % und 50 %. Diese Strategie hat laut dieser Meta-Analyse demnach gute Chancen, einen signifikanten Beitrag zur Bekämpfung der Paratuberkulose zu leisten. Eine komplette Verhinderung einer MAP-Infektion konnte bisher jedoch über Vakzination nicht erreicht werden (Bastida und Juste, 2011).

3. MAP im Lebensmittel Milch

Hinsichtlich des diskutierten Gesundheitsrisikos, das MAP für den Menschen darstellen könnte (Hermon-Taylor, 2009), werden zunehmend Studien zu möglichen MAP-Expositionsquellen veröffentlicht. Für Milch und Milchprodukte wird hierbei ein gewisses Gefahrenpotenzial diskutiert, insbesondere unter Berücksichtigung des allgemein hohen Verbrauches. In Deutschland wurden 2017 laut Milchindustrieverband rund 50 Liter Milch pro Kopf konsumiert, Käse in einer Menge von ungefähr 25 Kilogramm pro Einwohner (Informationsbroschüre des Milchindustrieverbands 2017 https://milchindustrie.de/wp-content/uploads/2017/10/Fakten_Milch_September_2017_A4.pdf, letzter Zugriff 03/2018). Der MAP-Eintrag in die Rohmilch kann dabei auf zwei Arten erfolgen: Direkt über die Milchdrüse oder indirekt über fäkale Kontamination (Pierce, 2010). Letztgenanntes stellt den bedeutsameren Weg dar, da auch subklinisch erkrankte Tiere den Erreger in höheren Mengen bereits über den Kot ausscheiden (Büttner et al., 2006). Dass ein gewisses Gefahrenpotenzial von Rohmilch ausgeht, konnten Studien belegen, die lebende MAP-Erreger in Milch klinisch auffälliger, aber auch subklinischer Tiere nachgewiesen haben (Streeter et al., 1995, Giese und Ahrens, 2000). An den Verbraucher abgegeben wird derzeit in Deutschland Milch unterschiedlichster Vorbehandlung, reglementiert in der Durchführungsverordnung zum EU-Hygienepaket, Artikel 2 Tierische Lebensmittelhygieneverordnung, kurz Tier-LMHV. Zum einen wird nicht weiter behandelte Rohmilch („Milch ab Hof“) im Milcherzeugungsbetrieb angeboten, die jedoch mit dem Verweis auf Abkochen versehen werden muss – diese Milch kann im eigenen Betrieb auch über sogenannte „Milchtankstellen“ abgegeben werden. Im Gegenzug dazu ist Vorzugsmilch – abgepackte nicht wärmebehandelte Rohmilch – zum

Rohverzehr im Einzelhandel frei erhältlich (Tier-LMHV, § 17). Vorzugsmilcherzeugende Betriebe unterstehen strengen hygienischen Vorschriften, eine Untersuchung auf den MAP-Erreger ist jedoch nicht vorgesehen. In Tabelle 2 sind die Anforderungen an Vorzugsmilch vom Rind, die in monatlichen Stichproben erfüllt werden müssen, aufgeführt (Tier-LMHV Anlage 9 zu § 17 Abs. 2 Satz 1 Nr. 1 und 2, § 18 Abs. 1 und 2 und § 21 Abs. 3 Nr. 4).

Tabelle 2: Anforderungen an Vorzugsmilch vom Rind

	m ¹	M ²	n ³	c ⁴
Keimzahl/ml bei + 30 °C	20.000	50.000	5	2
Enterobacteriaceae/ml bei + 30 °C	10	100	5	2
Koagulase-positive Staphylokokken/ml	10	100	5	2
Anzahl somatischer Zellen/ml	200.000	300.000	5	2
Salmonellen in 25 ml	0	0	5	0
Pathogene Mikroorganismen oder deren Toxine dürfen in der Milch nicht in Mengen vorhanden sein, die die Gesundheit des Verbrauchers beeinträchtigen können				
Bei der sensorischen Kontrolle der Milch dürfen keine Abweichungen erkennbar sein				
Der Phosphatsetest muss positiv reagieren				

(1: m = Schwellenwert; das Ergebnis gilt als ausreichend, wenn die einzelnen Proben diesen Wert nicht überschreiten. 2: M = Höchstwert; das Ergebnis gilt als nicht ausreichend, wenn die Werte einer oder mehrerer Proben diesen Wert überschreiten. 3: n = Anzahl der zu untersuchenden Proben. 4: c = maximale Anzahl der Proben, deren Werte zwischen „m“ und „M“ liegen dürfen; das Ergebnis gilt als akzeptabel, wenn die Werte der übrigen Proben höchstens den Wert „m“ erreichen (modifiziert nach Tier-LMHV Anlage 9 zu § 17 Abs. 2 Satz 1 Nr. 1 und 2, § 18 Abs. 1 und 2 und § 21 Abs. 3 Nr. 4))

Abgesehen von den zwei bereits genannten Ausnahmefällen darf als verzehrfertig nur solche Milch in Verkehr gebracht werden, die zur Reduktion der Keimzahlen ultrahochoerhitzt oder pasteurisiert wurde. Während die Ultrahochoerhitzung bei mindestens + 135 °C durchgeführt wird, wird bei der Pasteurisierung die Milch bei Kurzzeiterhitzung lediglich für 15 Sekunden auf mindestens + 72 °C, bei Dauererhitzung für 30 Minuten auf + 63 °C erhitzt (Tier-LMHV, Anlage 5 zu § 7 Satz 1). In den letzten Jahren wird im Handel vermehrt sogenannte ESL (*extended shelf life*)-Milch angeboten. Die Erhitzungsstrategie ist nicht gesetzlich geregelt; sie stellt eine Zwischenform der Pasteurisierung und Ultrahochoerhitzung dar. Die stärkere Wärme-Behandlung im Vergleich zur konventionellen Pasteurisierung führt zur längeren Haltbarkeit, die geringere Hitzebehandlung im Vergleich zur ultrahochoerhitzten Milch soll Nährstoffe und Geschmack besser erhalten (Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft http://www.dlg.org/fileadmin/downloads/fachinfos/sensorik/Downloads/Lebensmitteltechnologie/001_004_AB_Sensorik_2014_4_final.pdf, letzter Zugriff 03/2018). Es liegen einige Studien zur Thermostabilität von MAP und dessen Nachweis in pasteurisierter Milch vor: Ellingson et al. untersuchten in ihrer Studie 702 Packungen in den USA kommerziell

erhältlicher pasteurisierter Milch auf MAP. Über Kultivierungsverfahren konnten in 2,8 % der untersuchten Proben lebende MAP detektiert werden (Ellingson et al., 2005). Auf ein ähnliches Ergebnis kamen Ayele et al. (2005): Zwischen November 2002 und April 2003 wurden 244 in der Tschechischen Republik kommerziell erhältliche pasteurisierte Milchproben untersucht. Davon wurden 1,6 % über Kulturtechnik und anschließende Charakterisierung der Kolonien als MAP-positiv bewertet (Ayele et al., 2005). In Indien wurden in einem Probenlot von 26 pasteurisierten Milchproben 67 % als MAP-positiv bewertet. Dieses Ergebnis wurde über MAP-Kultur mit anschließender IS900- und IS1311-PCR erlangt (Shankar et al., 2010). Auch aus den weiterverarbeiteten Milchprodukten wie beispielsweise Käse konnten MAP kultiviert werden, solche Produkte stellen daher ebenfalls eine mögliche MAP-Expositionsquelle für den Menschen dar (Ikonomopoulos et al., 2005).

4. MAP in Zusammenhang mit Morbus Crohn

MAP verursacht eine chronische Erkrankung des Darms bei vielerlei Tierarten, auch aus klinisch auffälligen nicht-humanen Primaten konnte MAP bereits isoliert werden (Singh et al., 2011). Die histopathologischen Veränderungen, die mit der Johnsenen Krankheit bei Tieren einhergehen, weisen einige Ähnlichkeiten zur Histologie Morbus Crohn erkrankter Menschen auf (Pierce, 2010). Bei dieser Erkrankung handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung, mit deren Entstehung mehrere Faktoren in Verbindung gebracht werden: Neben genetischen Dispositionen (Shanahan, 2002) können auch bakterielle Infektionen nicht ausgeschlossen werden (Greenstein, 2003). MAP als multi-Host-Pathogen und Auslöser einer chronischen Enteritis steht dabei im Fokus der Forschung (Hermon-Taylor, 2009). Amerikanische Forscher konnten in einer Blindstudie dreier unabhängiger Labore beispielsweise MAP im Blut von Morbus Crohn-Patienten nachweisen: Insgesamt wurden in 11 von 20 Blutproben lebende MAP nachgewiesen, wobei davon allerdings kein einziges Ergebnis von allen drei beteiligten Laboren gemeinsam bestätigt wurde, was die zu überwindenden Schwierigkeiten des MAP-Nachweises in solchen Studien zeigt (Naser et al., 2010). Naser und Kollegen konnten schon Jahre zuvor in Morbus-Crohn-Fällen MAP aus Gewebeproben und sogar der Muttermilch kultivieren (Naser et al., 2000, Schwartz et al., 2000). Ein Übersichtsartikel von Sartor aus dem Jahr 2005 stellt einige Studienergebnisse zusammen, die für bzw. gegen einen ursächlichen Zusammenhang von MAP und Morbus Crohn sprechen, dargestellt in Tabelle 3 (Sartor, 2005):

Tabelle 3: Argumente für und gegen einen kausalen Zusammenhang von MAP und Morbus Crohn

Pro	Contra
Klinische Ähnlichkeiten zwischen Paratuberkulose und Morbus Crohn (Diarrhoe, intermittierende Diarrhoe, Gewichtsverlust)	Klinische Unterschiede zwischen Paratuberkulose und Morbus Crohn (Obstipation, Vomitus lediglich bei Morbus Crohn Patienten)
Präsenz von MAP in der Nahrungskette	Fehlen von epidemiologischen Hinweisen auf eine übertragbare Infektion
Progression einer zervikalen Lymphadenopathie zu distaler Ileitis in einem Patienten mit MAP-Infektion	Keine Hinweise auf eine Übertragung von MAP von infizierten Tieren auf den Menschen
Erhöhter Nachweis von MAP in Morbus Crohn-Patienten	Keine Ähnlichkeit der Genotypen von MAP isoliert aus Morbus Crohn-Patienten und MAP aus Paratuberkulose erkrankten Tieren
Nachweis von MAP in Muttermilch von Morbus Crohn-Patientinnen	Hohe Nachweisvariabilität von MAP in Morbus Crohn-Patienten (0–100 %)
Erhöhte serologische Antworten auf MAP in Morbus Crohn-Patienten	Keine Hinweise auf eine mykobakterielle Zellwand über histochemische Färbungen
Positive MAP-Kultur aus Blut von Morbus Crohn-Patienten	Keine Verschärfung der Morbus Crohn-Symptomatik bei Gabe immunsuppressiver Medikamente oder HIV
	Keine dokumentierte zellvermittelte Immunantwort auf MAP in Morbus Crohn-Patienten
	Keine therapeutische Wirkung von traditionellen anti-mykobakteriellen Antibiotika

(modifiziert nach Sartor, 2005)

In einer Meta-Analyse aus dem Jahr 2007 wurden 28 Studien analysiert, um den Zusammenhang von MAP und Morbus Crohn zu beleuchten (Feller et al., 2007). Jedoch konnte MAP als Ursache weder bestätigt noch mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Ferner könnte MAP neben der Rolle des ursächlichen Erregers auch im Kontext einer Sekundärinfektion stehen oder eine nicht-pathogene Besiedlung darstellen. Eine (bisher noch nicht) bestätigte ursächliche Assoziation von MAP hätte den Autoren zufolge große

Auswirkung auf die Weiterverarbeitung von Milch und Milchprodukten (Feller et al., 2007). In jüngeren Studien wird MAP auch mit anderen Erkrankungen des Menschen wie Diabetes Typ 1 (Dow, 2006, Sechi et al., 2008), Multipler Sklerose (Cossu et al., 2011) und Hashimoto Thyreoiditis (D'amore et al., 2010, Sisto et al., 2010) in Verbindung gebracht.

5. Nachweisverfahren von MAP

Der direkte Nachweis des MAP-Erregers kann über dessen kulturelle Anzucht oder molekularbiologisch via PCR erfolgen. Im Folgenden sollen diese beiden Formen als Hintergrundinformation zur vorliegenden Dissertation genauer erläutert werden.

5.1 MAP-Kultur in/auf verschiedenen Medien

Für die Anzucht von MAP steht der als Schrägagar erhältliche Herrold's Egg Yolk Agar mit Mykobaktin-, Amphotericin-, Vancomycin-, und Nalidixinsäure-Zusatz (im Folgenden HEYM-Agar genannt) zur Verfügung. Der Agar enthält Caseinpepton, was dem Bakterium die zum Wachstum erforderliche(n) Stickstoffquelle, Aminosäuren und Peptide liefert. Rindextrakt stellt Vitamine, Kohlenhydrate und stickstoffhaltige Verbindungen zur Verfügung. Das enthaltene Eigelb und Glycerol bieten die für den Metabolismus erforderlichen Fettsäuren und Proteine (Herrold, 1931). Ohne den Mykobaktinzusatz könnte MAP, im Gegensatz zu anderen Mykobakterien, nicht replizieren; diese Mykobaktin-Abhängigkeit kann auch genutzt werden, um über den Vergleich des Wachstums auf mykobaktin-haltigen und -freien Medien MAP von anderen Mykobakterien zu differenzieren. Das in HEYM-Agar zugesetzte Mykobaktin J führt außerdem zu schneller sichtbarem Koloniewachstum von MAP als andere Mykobaktine (Whipple et al., 1991). Aufgrund der langen Anzuchtdauer sind im Medium Selektivstoffe enthalten, um Kontaminanten zu unterdrücken. So inhibiert das zugesetzte Malachitgrün Bakterien der Gram-positiven als auch Gram-negativen Begleitflora (Rappaport und Konforti, 1959, Alderman, 1985), Amphotericin B beugt Kontamination durch Pilze vor (Brajtburg et al., 1990), Nalidixinsäure inhibiert Gram-negative (Peters et al., 1979), Vancomycin andere Gram-positive Bakterien (Hubbard und Walsh, 2003).

Die MAP-Kultur kann des Weiteren auf dem Festmedium Middlebrook 7H10-Agar sowie im Flüssigmedium Middlebrook 7H9 erfolgen. Auch hier muss zur MAP-Anzucht jeweils Mykobaktin J zugesetzt werden (Whipple et al., 1991). Als Selektivstoff ist dem Festmedium lediglich Malachitgrün zugesetzt, das teilweise Begleitflora hemmen kann (Rappaport und Konforti, 1959).

Die Zugabe von Tween 80 ist bei beiden Medien möglich und soll das Wachstum von MAP fördern (Chiodini et al., 1984). Bei Anzucht auf dem hoch selektiven HEYM-Agar ist die Gefahr einer Kontamination zwar stark reduziert, jedoch konnte gezeigt werden, dass die Anzucht im Flüssigmedium höhere Sensitivitäten erreicht (Ellingson et al., 2005).

5.2 Kultureller Nachweis von MAP aus der Matrix Milch

Bei der kulturellen Anzucht von MAP in Gegenwart von Begleitkeimen ist ein Dekontaminationsschritt vonnöten, um aufgrund der langen Inkubationszeit einer Überwucherung entgegen zu wirken. In Milchproben sind unter anderem folgende Bakterien vorzufinden: *Bacillus cereus* (Ahmed et al., 1983), *Staphylococcus aureus* (Morandi et al., 2007), Enterokokken (Arizcun et al., 1997), Laktobazillen (Franciosi et al., 2009), *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* (Zadoks et al., 2005, Tenhagen et al., 2006), *Streptococcus thermophilus* (Mora et al., 2002), *Serratia* subsp. (Immanuel et al., 2008), *Escherichia coli* (Heuvelink et al., 1998), *Acinetobacter* subsp. und Pseudomonaden (Lafarge et al., 2004). Diese und andere Bakterien sorgen insbesondere bei der kulturellen Anzucht von MAP dafür, dass eine vorgeschaltete Dekontamination unumgänglich ist. Auch Umweltmykobakterien könnten beim MAP-Nachweis als Störfaktoren auftreten. Eine Studie aus den USA identifizierte folgende Umweltmykobakterien in Rinderbeständen: *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, Mykobakterien des *terrae*- bzw. *avium*-Komplex und *M. asiaticum* (Roussel et al., 2007). Dies zeigt, dass ein vorgeschalteter Dekontaminationsschritt unumgänglich ist, um eine Überwucherung mit schnell wachsender Begleitflora zu unterbinden; aber auch nach der kulturellen Anzucht muss eine molekularbiologische Verifikation der Kolonien durchgeführt werden, um MAP eindeutig zu identifizieren (Nationales Referenzlabor für Paratuberkulose <https://www.fli.de/de/institute/institut-fuer-molekulare-pathogenese-imp/referenzlabore/nrl-fuer-paratuberkulose/>, letzter Zugriff 03/2018). In der Literatur sind verschiedene Protokolle zur Dekontamination von Milchproben zu finden, die – zusammen mit dem verwendeten Anzuchtmedium – Auswirkungen auf die Nachweisgrenze haben; dabei ist beim kulturellen Nachweis von MAP aus Milchproben kein Protokoll als universeller Gold-Standard definiert (Grant und Rowe, 2001). Einzelne Forschergruppen zentrifugieren vor der Dekontamination unterschiedlich große Milchvolumina ab – mit unterschiedlicher *g*-Zahl und Zentrifugationsdauer. So variieren nach dieser Studie von Grant und Rowe (2001), die bisherige Studien zusammenfasst und zugleich eine Umfrage in zahlreichen Laboren einschließt, die verwendeten Volumina zwischen 1 ml und 100 ml, die Zentrifugation wird bei 2500 x *g* für

15 min bis hin zu 15000 x g für 1 Stunde durchgeführt. Die Dekontamination erfolgte meist durch HPC, doch wurden auch 4 %iges Natriumhydroxid oder NALC-NaOH zur Dekontamination verwendet. Als Kulturmedien fanden neben HEYM-Agar auch modifiziertes Middlebrook 7H10-Medium, BACTEC oder Dubos-Medium mit Mykobaktin Verwendung (Grant und Rowe, 2001). In einer Validierung von Dundee und Kollegen wurden verschiedene Dekontaminationsmethoden in Hinblick auf ihrer Sensitivität getestet. Dabei fanden sie heraus, dass für Milchproben durch eine Dekontamination mit 0,75 %igen HPC für 5 Stunden und anschließender Kultur auf HEYM-Medium die höchste Sensitivität mit 30 Kbe/40 ml erreicht werden konnte (Dundee et al., 2001).

5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Kary B. Mullis erhielt 1993 den Nobelpreis für die Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (Rabinow, 2011). Heute wird die enzymatische Vervielfältigung von definierten DNA-Sequenzen für eine Vielzahl an Fragestellungen routinemäßig eingesetzt. Geringste Ausgangs-DNA-Mengen reichen bereits aus, um nach erfolgter Amplifikation weitere Analysen zuzulassen (Gill und Ghaemi, 2008). Das Prinzip des PCR-Prozesses wird in Abbildung 3 dargestellt.

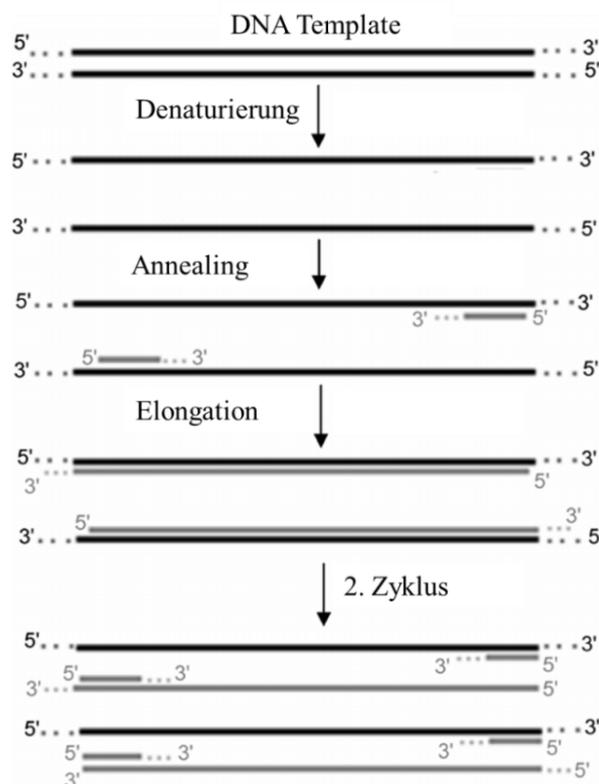


Abbildung 3: PCR-Prinzip

(modifiziert nach Gill und Ghaemi, 2008)

Die Amplifikation erfolgt dabei in der Regel in ca. 30 bis 40 Zyklen, die aus drei temperaturabhängigen Einzelschritten bestehen. Während der DNA-Doppelstrang im Denaturierungsschritt bei Temperaturen von ca. 95 °C in seine Einzelstränge getrennt wird, erfolgt anschließend bei geringerer, primerspezifischer Temperatur das Primerannealing an die definierte, zu amplifizierende Sequenz. Anschließend synthetisiert bei ca. 72 °C die Taq-Polymerase den neuen Strang vom 5'-Ende hin zum 3'-Ende, sodass theoretisch nach dem ersten Zyklus zwei neue Doppelstränge als Template im zweiten Zyklus zur Verfügung stehen (Linz und Degenhardt, 1990). Zur Gewährleistung einer hohen Reaktionseffizienz sollten Optimierungsschritte wie Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur, Primerkonzentration und allgemeine Mastermixzusammenstellung – bestehend aus Reaktionspuffer, Magnesiumchlorid, dNTPs, Primer und Polymerase – eingeleitet werden (Linz und Degenhardt, 1990, Rochelle et al., 1997, Innis und Gelfand, 1999). Ist die PCR-Amplifikation optimal eingestellt, so können beispielsweise Proben ohne Voranreicherung auf Erreger, die in nur geringen Mengen enthalten sind, überprüft werden (Tasara und Stephan, 2005). Die Nachweisgrenze ist jedoch auch bei der PCR-Methode limitiert und insbesondere in komplexen Matrices von der Probenaufbereitung abhängig (Grant und Rowe, 2001). Da der Nachweis nicht über eine Vermehrung des Erregers wie bei Anreicherungs- und Kulturverfahren, sondern lediglich über das Vorhandensein der Zielsequenz erfolgt, ist eine Lebend-Tot-Unterscheidung mit der herkömmlichen PCR-Methodik nicht möglich.

5.3.1 Formen der PCR-Methode

Bei der konventionellen oder qualitativen PCR, auch Endpunkt-PCR genannt, werden nach Amplifikation die generierten PCR-Produkte auf ein Agarosegel geladen. Da die DNA eine negative Gesamtladung aufgrund des Phosphatrestes am 5'-Ende trägt, wandert sie im Spannungsfeld, größenpezifisch weit, in Richtung Pluspol (Westermeier, 2016). In Abgleich mit einem definierten Größenstandard können die PCR-Produkte zugeordnet und eine qualitative Aussage über das Vorhanden- oder Nicht-Vorhandensein des Zieltargets in der Ausgangsprobe getätigt werden; basierend auf der Bandenintensität werden teils auch semiquantitative Aussagen getroffen (O'Mahony und Hill, 2004, Gao et al., 2007).

Die Gradienten-PCR ist ein Spezialfall der konventionellen PCR. Benötigt wird ein Thermocycler, dessen Thermoblock einen Temperaturgradienten erzeugen kann. Dadurch können in Parallelansätzen in einem Lauf mehrere Annealing-Temperaturen eingestellt werden. Nach erfolgter Amplifikation wird auf dem Agarosegel anhand der Bandenintensitäten semiquantitativ überprüft, welche Annealing-Temperatur die höchste Reaktionseffizienz erbrachte (Linz und Degenhardt, 1990).

Die Real-Time oder quantitative PCR wird in speziellen Geräten durchgeführt, um in Echtzeit die Amplifikation des Targets verfolgen zu können. Das Prinzip basiert dabei auf der Emission von Fluoreszenzfarbstoffen, die mit steigendem Target-Gehalt positiv korreliert ist und in Echtzeit nach jedem Amplifikationszyklus gemessen wird. Während bei der relativen Quantifizierung die Menge des Targets im Verhältnis zu einem Referenztarget ausgegeben wird, was beispielsweise für Transkriptionsanalysen mittels qRT-PCR Verwendung findet (Livak und Schmittgen, 2001), erlaubt die absolute Quantifizierung die Aussage über einen absoluten Wert, z. B. in Kopien pro Mikroliter und wird beispielsweise für den quantitativen Nachweis von Erregern in Lebensmitteln angewandt (Tasara und Stephan, 2005). Bei der absoluten Quantifizierung wird dafür eine Verdünnungsreihe eines definierten Standards benötigt (vgl. Abbildung 4). Der jeweilig gemessene Crossing Point (CP)-Wert gibt dabei denjenigen Zyklus an, bei dem die Fluoreszenz über die Hintergrundfluoreszenz hinaus ansteigt (vgl. Abbildung 4 A). Bei optimaler Amplifikation beträgt die CP-Wert-Differenz bei dekadischer Verdünnung jeweils den Wert 3,3. Die entsprechende Software trägt automatisch die vorgegebenen Standardkonzentrationen und die gemessenen CP-Werte gegeneinander auf und generiert eine Standardkurve, wie in Abbildung 4 B dargestellt. Anhand dieser Standardkurve wird die Konzentration der unbekannt Probe automatisch berechnet (Van der Velden et al., 2003).

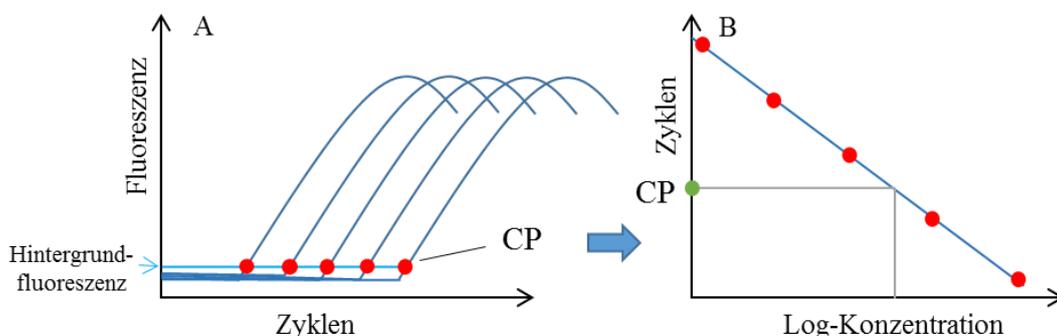


Abbildung 4: Generierung einer Standardkurve

(A: CP-Werte der einzelnen Verdünnungsstufen bekannter Konzentration zur Generierung der Standardkurve, B: Generierung der Standardkurve, CP: Crossing Point: Zyklus bzw. interpolierter Bruchteil eines Zyklus, bei dem die Fluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz übersteigt)

Im Einsatz ist dabei der Fluoreszenzfarbstoff Sybr-Green, der eine hohe Bindungsaffinität zu doppelsträngiger DNA aufweist (O'Mahony und Hill, 2002). Des Weiteren werden fluoreszenzmarkierte Hybridisierungs- und Hydrolysisierungs sonden verwendet (Fang et al., 2002, De Kruijf et al., 2017). Während Sybr-Green unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet und dabei Licht emittiert, binden Sonden sequenzkomplementär an die Targetsequenz und generieren deshalb spezifischere Signale (Van der Velden et al., 2003).

5.3.2 PCR-basierter MAP-Nachweis aus Milchproben

In den letzten Jahren wurden einige Studien zur Entwicklung des PCR-Nachweises von MAP durchgeführt, um eine schnellere Identifikation des Erregers in Milchproben durchzuführen als es bis dato über Kultur möglich ist (Grant und Rowe, 2001).

Für die Probenvorbereitung vor der PCR ist ähnlich zur vorgeschalteten Dekontamination beim kulturellen Nachweis kein Gold-Standard definiert, weshalb zahlreiche unterschiedliche Probenvorbereitungsprotokolle zum MAP-Nachweis in Milch zu finden sind.

Zur Separation bzw. Aufkonzentrierung von MAP aus Milch wird als erster Schritt überwiegend ein bestimmtes Milchvolumen abzentrifugiert. Die Volumina variieren meist zwischen 10 ml und 50 ml (Millar et al., 1996, Giese und Ahrens, 2000, Tasara und Stephan, 2005, Gao et al., 2007). Vor der Zentrifugation kann ein Inkubationsschritt mit TritonX-100 erfolgen (Tasara und Stephan, 2005, Molitor, 2014). Die Zentrifugation erfolgt entweder bei gemäßigter g -Zahl mit bis zu $5000 \times g$ für 15 bis 30 min (Tasara und Stephan, 2005, Gao et al., 2007) oder bei Highspeed mit bis zu $41000 \times g$ mit Zentrifugationszeiten zwischen 5 und 60 min (Giese und Ahrens, 2000, Grant und Rowe, 2001). Neben der Zentrifugation können auch immunomagnetische Separationstechniken zur MAP-Ernte aus der Matrix Milch verwendet werden, wofür polyklonale Kaninchen-Antikörper gegen gammabestrahlte MAP-Stämme generiert und an magnetische Beads gekoppelt wurden (Grant et al., 1998). Neben polyklonalen Antikörpern wurden auch einzelne spezifisch MAP-bindende Peptide via Phagen-Display identifiziert und an paramagnetische Beads zur Separation gebunden (Stratmann et al., 2002). Auch eine Kombination von vorgeschalteter Zentrifugation mit immunomagnetischer Separation ist dokumentiert (Grant et al., 2000). Nach der Zentrifugation wird entweder nur das Pellet (Tasara und Stephan, 2005) oder auch die Rahmschicht extrahiert (Millar et al., 1996), letzteres liegt in der Annahme begründet, dass sich MAP aufgrund seiner Zellwandstruktur in der fetthaltigen Fraktion sammeln könnte (Gao et al., 2007). In einer Studie von Gao und Kollegen wurden verschiedene Protokolle validiert. Die Autoren fanden heraus, dass durch Erhitzung der Milch vor der Zentrifugation und anschließende HPC-Behandlung des Pellets und der Rahmschicht vor erneuter Zentrifugation die Nachweisgrenze positiv beeinflusst werden konnte. Als Erklärung diskutierten sie, dass die 30-minütige HPC-Inkubation in der darauffolgenden Zentrifugation die MAP-Partizipation ins Pellet verbessert (Gao et al., 2007). Manche Gruppen führen Waschschrte des erhaltenen Pellets vor der Extraktion ein, um PCR-Inhibitoren zu eliminieren (Pillai und Jayarao, 2002), nach Gao und Kollegen hat dies jedoch bei Milchproben keinen positiven Einfluss auf die Nachweisgrenze (Gao et al., 2005).

Der Zellaufschluss zur DNA-Extraktion geschieht neben einfachem Aufkochen (Millar et al., 1996) durch enzymatische und/oder mechanische Zellaufschlussverfahren (Grant et al., 2000, Gao et al., 2005, Tasara und Stephan, 2005, Gao et al., 2007).

Als Template werden nicht weiter gereinigte Proben direkt nach dem Zellaufschluss verwendet (Millar et al., 1996), außerdem kommen säulenbasierte Verfahren oder Präzipitationsmethoden zur Reinigung der DNA zum Einsatz (Grant und Rowe, 2001, Gao et al., 2005, Tasara und Stephan, 2005, Molitor, 2014). In einer Studie von Tasara und Stephan konnten mit einem Präzipitationsprotokoll vergleichend mit einem säulenbasierten Verfahren in Kombination mit mechanischem und enzymatischem Zellaufschluss ähnliche CP-Werte für mit 100 MAP-Zellen/ml dotierte Milch erzielt werden (Tasara und Stephan, 2005).

Die PCR an sich kann konventionell oder im Real-Time-System durchgeführt werden, wobei letzteres durch schneller erhaltene Resultate ohne weiteren gelbasierten Nachweisschritt besticht. Neben Sybr-Green kommen gerade bei komplexeren Matrizes wie Milchproben Hybridisierungs- oder Hydrolysesonden zum Einsatz (Fang et al., 2002, Tasara und Stephan, 2005, De Kruijf et al., 2017). Als Target dient oftmals das *IS900* Insertionselement, da es in mehreren Kopien im MAP-Genom vorliegt und dadurch die Sensitivität des Nachweises positiv beeinflusst (Grant et al., 2000, Corti und Stephan, 2002, Pillai und Jayarao, 2002). Da in den letzten Jahren jedoch auch *IS900*-ähnliche Sequenzen in anderen Mykobakterien vorgefunden wurden (Grant, 2005), werden fortlaufend Studien zu neuen Targets zum MAP-Nachweis wie *f57*, *hspX*, *Lokus 255*, *ISMAV2*, *IS_MAP02* oder *IS_MAP04* publiziert (Ellingson et al., 2005, Tasara und Stephan, 2005, Möbius et al., 2008, De Kruijf et al., 2017). Das in 4 Kopien vorliegende Target *IS_MAP04* wurde von De Kruijf et al. vergleichend zu *IS900* und *IS_MAP02* untersucht und als Alternative mit vergleichbaren Nachweisgrenzen zum Target *IS900* deklariert (De Kruijf et al., 2017). In einer Studie von Möbius und Kollegen wurden verschiedene Targets bezüglich ihrer Spezifitäten untersucht. Dabei wurden Kreuzreagenten im ISMAV2-Testsystem identifiziert, für *Lokus 255* und *f57* dagegen wurde eine Empfehlung ausgesprochen (Möbius et al., 2008). Der Vorteil des *f57*-Nachweises liegt in seiner bis dato strikten Einzigartigkeit im MAP-Genom; zudem bietet dieses Target die Möglichkeit einer umrechnungsreifen Quantifizierung vorliegender MAP-Genome, aufgrund seiner single-copy-Eigenschaft (Tasara und Stephan, 2005).

5.3.3 Möglichkeiten zur Lebend-Tot-Bestimmung in der PCR

Die Amplifikation von Nukleinsäuren ist aufgrund der Anwendungsvielfalt, geringen Zeitintensität und Automatisierungsfähigkeit eine Schlüsseltechnologie in der Mikrobiologie. Wird lediglich DNA vervielfältigt, so kann jedoch aufgrund ihrer hohen Stabilität keine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen erfolgen, was in vielen Anwendungen, insbesondere in der Lebensmittelmikrobiologie, allerdings erwünscht wäre (Nocker und Camper, 2009). Eine Möglichkeit, dieses Problem zu lösen, ist die Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) mit RNA als nachzuweisendem Target (Birmingham et al., 2008). Als sehr instabiles Molekül degradiert RNA relativ schnell nach dem Zelltod und kann dadurch nur in lebenden Zellen nachgewiesen werden. Dabei ist gerade die Instabilität, auf deren Basis der Assay aufgebaut ist, Grund dafür, dass die Probenaufbereitung mit äußerster Sorgfalt durchgeführt werden muss. Liegt eine Kontamination mit RNAsen vor, so führt dies zur Degradation vorhandener RNA-Moleküle und letztendlich zu falsch negativen Resultaten (Kralik et al., 2010). Auf der anderen Seite konnte bereits gezeigt werden, dass bestimmte RNA-Moleküle in Abhängigkeit von Abtötungsstrategie, Umweltbedingungen oder Eigenschaft des RNA-Moleküls auch nach dem Zelltod persistieren können und ein Risiko eines falsch positiven Ergebnisses gegeben ist (Birch et al., 2001). Trotz der zu überwindenden Fehlerquellen konnte für MAP ein Real-Time-Assay zur RNA-basierten Lebend-Tot-Bestimmung publiziert werden, basierend auf dem MAP-spezifischen Target Mptb52.16, das sowohl in Dubos-Medium als auch dotierter Rohmilch exprimiert wurde und detektiert werden konnte (Dzieciol et al., 2010).

Als Alternative zur RNA-basierten Lebend-Tot-Unterscheidung können der zu testenden Probe DNA-modifizierende Farbstoffe zugeführt werden. Diese DNA-interkalierenden Stoffe treten selektiv nur in Zellen mit gestörter Membranintegrität ein, nicht jedoch in Zellen mit intakter Zellmembran. In der Zelle werden die Reagenzien unter Lichtexposition aktiviert, binden irreversibel an die DNA, wodurch in der nachfolgenden PCR die Amplifikation des modifizierten DNA-Moleküls gehemmt wird (Nogva et al., 2003, Nocker et al., 2006). Das Prinzip ist in Abbildung 5 dargestellt.

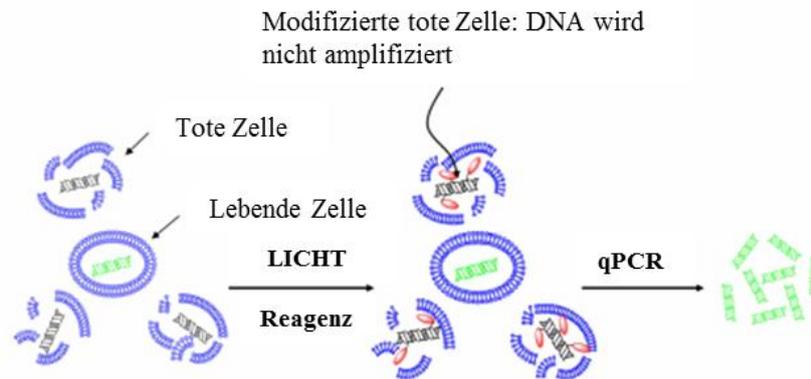


Abbildung 5: Prinzip DNA-modifizierender Reagenzien zur PCR-basierten Lebend-Tot-Unterscheidung

(modifiziert nach <https://biotium.com/product/pmatm-dye-propidium-monoazide/>, letzter Zugriff 03/2018)

Vergleicht man nun die erhaltenen qPCR-Daten der behandelten und nicht behandelten Probe, so lassen sich Aussagen über das vorliegende Lebend-Tot-Verhältnis des Ziel-Mikroorganismus in der unbekannt Probe treffen (Kralik et al., 2010). Zu den Anwendungsgebieten zählen beispielsweise schnellere kulturunabhängige Überwachung von Abtötungsstrategien und des Einflusses von Desinfektionsmitteln (Nocker et al., 2007, Rieder et al., 2008), die Überprüfung der Überlebensfähigkeit von Fäkalbakterien im Abwasser (Varma et al., 2009) oder der Nachweis lebender Erreger wie MAP in Lebensmitteln (Ricchi et al., 2014).

Als erstes beschrieben wurde der Fluoreszenzfarbstoff Ethidium Monoazid (EMA), der eine starke Hemmung der Amplifikation modifizierter DNA erbrachte und als erfolgversprechend zur Lebend-Tot-Differenzierung angesehen wurde (Nogva et al., 2003). In den folgenden Jahren wurden einige Studien zur Anwendbarkeit des Farbstoffes an unterschiedlichen Bakterienarten wie *Campylobacter*, *Listerien*, *Escherichia coli* oder *Salmonellen* durchgeführt: Während eine starke Amplifikationshemmung der DNA toter Zellen durch EMA gezeigt werden konnte, wiesen verschiedene Forschergruppen jedoch auch auf das Problem des EMA-Einflusses auf lebende Zellen hin (Rudi et al., 2005, Nocker und Camper, 2006, Flekna et al., 2007, Pan und Breidt, 2007, Lee und Levin, 2009). In einer vergleichenden Studie von EMA und dem weiterentwickelten Reagenz Propidium Monoazid (PMA) wurde letztgenanntes als selektiver für tote Zellen deklariert, vermutlich aufgrund der höheren Ladung des Moleküls (Nocker et al., 2006). Seither wurden einige PMA-Real-Time-Assays für ein breites Spektrum an Bakterienspezies wie *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* oder *Enterobacter sakazakii* veröffentlicht (Cawthorn

und Witthuhn, 2008, Kobayashi et al., 2009, Nkuipou-Kenfack et al., 2013). Die Anwendung von PMA zur Differenzierung lebender und toter MAP-Zellen wurde von Kralik und Kollegen getestet, die einen Assay-Vergleich hierzu publizierten (Kralik et al., 2010). Zur verbesserten Hemmung ausschließlich toter Zellen innerhalb eines solchen Assays auf PMA-Basis können unterschiedliche Optimierungsschritte eingeleitet werden. Dazu gehören beispielsweise erhöhte Farbstoffkonzentrationen, verlängerte PMA-Inkubationszeit oder Doppelbehandlung der Probe mit Farbstoff, um die Hemmung toter Zellen durch verbesserte Penetration zu erhöhen (Kralik et al., 2010). Eine weitere Optimierungsmöglichkeit stellen membrandestabilisierende Surfactants dar, die als Ziel eine verbesserte Aufnahme von PMA in bereits vorgeschädigte Zellen haben, jedoch keinen Einfluss auf intakte Zellen haben sollten. Nkuipou-Kenfack et al. testeten den Einfluss von Deoxycholat auf die Aufnahme von PMA in *Listeria monocytogenes* und Salmonellen, wobei ein unerwartet starker Einfluss des Reagenzes auf die PMA-Aufnahme in lebende Listerien vorgefunden wurde (Nkuipou-Kenfack et al., 2013). Optimierungsschritte sollten deshalb immer von beiden Seiten beleuchtet werden: starke Amplifikationshemmung toter Zellen, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, aber auch möglichst geringer Einfluss auf lebende Zellen, um falsch negativen Aussagen entgegen zu wirken.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Materialien und Geräte

1.1 MAP-Stämme

Name	Stamm	Kultivierung
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	DSM 44133	Wachstum auf HEYM, 37 °C
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	DSM 44135	Wachstum auf HEYM, 37 °C
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	MS-4 Feldisolat	Wachstum auf HEYM, 37 °C

1.2 Mykobakterien-Stämme

Name	Stamm	Kultivierung
BCG	LMS*	Wachstum auf Löwenstein-Jensen, 37 °C
<i>M. asiaticum</i>	DSM 44297	Wachstum auf Löwenstein-Jensen, 37 °C
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	DSM 44156	Wachstum auf Löwenstein-Jensen, 37 °C
<i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>	DSM 44175	Wachstum auf Löwenstein-Jensen, 37 °C
<i>M. celatum</i>	DSM 44243	Wachstum auf Löwenstein-Jensen, 37 °C
<i>M. intracellulare</i>	DSM 43223	Wachstum auf Löwenstein-Jensen, 37 °C
<i>M. scrofulaceum</i>	DSM 43992	Wachstum auf Löwenstein-Jensen, 37 °C
<i>M. smegmatis</i>	DSM 43756	Wachstum auf Löwenstein-Jensen, 37 °C
<i>M. terrae</i>	DSM 43227	Wachstum auf Löwenstein-Jensen, 37 °C

* Der Bakterienstamm *Mycobacterium (M.) bovis* Bacille Calmette-Guérin (BCG)-Pasteur stammte ursprünglich vom Nationalen Referenzzentrum für Mykobakterien, Forschungszentrum Borstel und wurde vom Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit (LMS) der LMU zur Verfügung gestellt.

1.3 Kontroll-Stämme

Name	Stamm	Kultivierung
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	DSM 2403	Wachstum auf Blutagar, 37 °C
<i>Bacillus cereus</i>	DSM 4312	Wachstum auf Blutagar, 37 °C
<i>Enterococcus durans</i>	ATCC 13755	Wachstum auf Blutagar, 37 °C
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM 2570	Wachstum auf Blutagar, 37 °C
<i>Enterococcus faecium</i>	DSM 2918	Wachstum auf Blutagar, 37 °C
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	Wachstum auf Blutagar, 37 °C
<i>Lactobacillus lactis</i>	DSM 20481	Wachstum auf Blutagar, 37 °C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	Wachstum auf Blutagar, 37 °C
<i>Serratia rubidaea</i>	MHI 702 aus Stutenmilch isoliert	Wachstum auf Blutagar, 37 °C
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6528P	Wachstum auf Blutagar, 37 °C
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	DSM 20662	Wachstum auf Blutagar, 37 °C
<i>Streptococcus thermophilus</i>	MHI 518	Wachstum auf Blutagar, 37 °C
<i>Streptococcus uberis</i>	MHI 516	Wachstum auf Blutagar, 37 °C

1.4 Nährmedien

Feste Nährmedien

Herrold's Egg Yolk Agar mit Mykobaktin (HEYM-Agar)	BD, 222232
Löwenstein-Jensen Agar	Thermo Scientific, TV 5112C
M7H10-Agar / OADC Enrichment	BD, 262710 / BD, 211886
Schafsblutagarplatten	Oxoid, PB5039A

Flüssiges Anreicherungsmedium

M7H9 / ADC Enrichment	BD, 271330 / BD, 211887
-----------------------	-------------------------

Herstellung

M7H10-Platten mit OADC und Mykobaktin (2 mg/l)	19 g M7H10-Pulver in Glaskolben einwiegen, mit 900 ml Aqua dest., das 5 ml Glycerin enthält, lösen und unter Rühren zum Kochen bringen: Autoklavieren bei 121 °C, 10 min und Abkühlen auf ca. 55 °C. 100 ml OADC-Enrichment unter sterilen Bedingungen dazugeben. Ein Fläschchen Mykobaktin J mit 2 ml 95 %igem Ethanol lösen und unter sterilen Bedingungen zugeben. Restlichen Fläschcheninhalt nochmals mit 2 ml 95 %igem Ethanol lösen und zugeben. Den Agar zu je 25 ml in Petrischalen gießen und über Nacht aushärten lassen.
M7H9 mit ADC und Mykobaktin (2 mg/l)	4,7 g M7H9-Pulver einwiegen, mit 900 ml Aqua dest., das 2 ml Glycerin enthält, lösen: Autoklavieren bei 121 °C, 15 min und Abkühlen auf ca. 45 °C. 100 ml ADC-Enrichment unter sterilen Bedingungen dazugeben. Ein Fläschchen Mykobaktin J mit 2 ml 95 %igem Ethanol lösen und unter sterilen Bedingungen zugeben. Restlichen Fläschcheninhalt nochmals mit 2 ml 95 %igem Ethanol lösen und zugeben.

1.5 Chemikalien und Reagenzien

Agarose	PeqGold, 35-1020
Amphotericin B	Roth, 0246.2
Beads (Zirkonia/Silica 0,1 mm)	Biospec Products, 11079191z
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Sigma, H9151
Chelex 100	Sigma, C7901
Chloroform-Isoamyl Alkohol	Roth, X984.1
Ethanol	VWR, 20821.330
Ethidiumbromid	Serva, 09108
Ethidiummonoazidbromid (EMA)	Biotium, 40015
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, E1644
Glycerin	Merck, 1.04094.1000
Hexadecylpyridiniumchlorid (HPC)	Sigma, C0732
Isopropanol	VWR, 1.09634.2511
Methylenblau	Sigma, M9140
Mykobaktin J (2 mg)	IDvet, MYCO

Nalidixinsäure	Roth, CN32.1
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma, L4390
PCR-100 bp Größenstandard	Thermo Scientific, SM0324
PCR-dNTP-Mix (10 mM)	Thermo Scientific, R0191
PCR-MgCl ₂ (25 mM)	Thermo Scientific, AB0359
Phenolchloroform-Isoamyl-Alkohol	Roth, A156.1
PMA _{xx} TM	Biotium, 40069
Propidiummonoazid (PMA)	Biotium, 40013
qPCR Mastermix	KAPA Biosystems, 07-KK4611
Salzsäure 5 M	Merck, 1.09911.0001
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Roth, 5429.1
Triton X-100	Sigma, X100
Tween 80	Merck, 8.22187.0500
Vancomycin	Roth, 0242.1
Ziehl-Neelsen-Lösung	Applichem A0886,0500

1.6 Puffer und Lösungen

Ladepuffer (6 x)	Thermo Scientific, R0611
PCR-Reaktionspuffer (10 x)	Thermo Scientific, AB0289
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom GmbH, L1825

Herstellung Lysepuffer und TE-Puffer

Lysepuffer	20 mM TRIS-Cl, pH 8,0 2 mM sodium EDTA 1,2 % Triton® X-100 Direkt vor Verwendung Zugabe von Lysozym (20 mg/ml)
TRIS-EDTA (TE)-Puffer	100 mM TRIS 1 mM EDTA

1.7 Enzyme

Lysozym	Roth, 8259.1
Proteinase K	Roth, 7528.1
Taq-Polymerase (5 U/ μ l)	Thermo Scientific, AB0301/B

1.8 Kits

DNeasy Blood and Tissue Kit	Qiagen, 69504
High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche, 11796828001

1.9 Verbrauchsmaterialien

Blue Caps (15 ml)	Greiner bio-one, 188271
Filterpipettenspitzen (10 μ l, 200 μ l, 1000 μ l)	Peqlab, 81-1011 / 81-1030 / 81-1050
Küvetten	Brand, 759210
Lightcycler 480 Multiwell Plate 96 mit Folie	Roche, 04729692001 / 04729757001
Parafilm	VWR, 52858
Pipettenspitzen (10 μ l, 200 μ l, 1000 μ l)	Brand, 732024 / 732028 / 732032
Reaktionsgefäße (1,5 ml / 2,0 ml)	Eppendorf, 0030120086 / 0030120094
Reaktionsgefäße (0,2 ml)	peqLab, 82-0337-A
Ribolyzer Tubes	Roth, XC84.1
Spritzen (10 ml)	B Braun, 4606108V
Spritzenvorsatzfilter (0,45 μ m / 0,2 μ m)	Berrytec, 1302504 / Sartorius, 16532

1.10 Primer

Name	Sequenz	Amplikonlänge	Spezifität	Quelle
F57	FW: 5'TGGGACGATCCG AATATGT RV: 5'AGTGGGAGGCGT ACCA	255 bp	MAP	Tasara und Stephan, 2005
ISMAP04	ISMAP04_F3: 5'GTTCAGCAAGCA CCGCAA ISMAP04_R2: 5'AGCCAGGTGGTG AACTCTTC	378 bp	MAP	De Kruijf et al., 2017
IS900 MP3/4	MP3: 5'CTGGCTACCAAA CTCCCGA MP4: 5'GAACTCAGCGCC CAGGAT	317 bp	MAP	Erume et al., 2001
MYKO	FW: 5'GGTGGTTTGTCG CGTTGTTC RV: 5'ATGCACCACCTG CACACAGG	470 bp	Mykobakterien	Mendum et al., 2000
4470/A	FW: 5'TGAAGAGCACTT TCCCGACC RV: 5'GCCCAGGAATTG GGCTAGTT	524 bp	MAP	diese Arbeit
4470/B	FW: 5'TAAGCTGCGGTG GGAGTTTC RV: 5'ATGGAGTTTCGG TGGTCTGG	192 bp	MAP	diese Arbeit

Primer

Name	Sequenz	Amplikonlänge	Spezifität	Quelle
8771/A	FW: 5'CATCGAATGACA GCGCAAGG RV: 5'CTAAAGCATGAA CGAGCGGC	352 bp	MAP	diese Arbeit
8771/B	FW: 5'GGGTTGGTCTTC GGGAATG RV: 5'CGGATCGGCAAG CCATAAGT	137 bp	MAP	diese Arbeit
2420/A	FW: 5'CTACGAGCGGTC GAG AAT CC RV: 5'CTGATCCTAGCA GGCTGACG	307 bp	MAP	diese Arbeit
2420/B	FW: 5'GCGCCAACCTAT CTCAACC RV: 5'GGATCCCCAGAA GCCGAT CTA	161 bp	MAP	diese Arbeit

1.11 Geräte

Brutschrank	Memmert
Elektrophoresekammer	Peqlab
Fire Wire Kamera	Leica
Fluoreszenzmikroskop	Keyence
Intellimixer	Neo Lab
Lichtmikroskop	Leitz
Lichtstrahler Halogen Spot HL500	Elro

Lightcycler LC 480	Roche Diagnostics GmbH
Magnetrührer	Ikamag reo
Photometer	Eppendorf BioPhotomer
Pipetten (0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl)	Eppendorf
Ribolyzer	Hybaid
Spannungsgerät für Elektrophorese	Pharmacia Biotech
Stereo-Mikroskop	Leica
Thermocycler	Biometra
Tischzentrifuge	Heraeus
UV-Transilluminator	Biostep GmbH
Vortex-2 Genie	Scientific Industries
Waage	Sartorius
Wasserbad	GFL
Zählkammer, Sondertiefe 0,01 mm	VWR
Zentrifuge	Herareus

1.12 Software

Argus X1, Bio-Imaging-Control-Software	Biostep GmbH Jahnsdorf
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Inc.
Light Cycler 480 Software	Roche Diagnostics GmbH
NCBI/BLAST	National Center for Biotechnology Information
TotalLab TL-100	Nonlinear dynamics

2. Methoden

2.1 Vorbereitende Arbeiten

2.1.1 Erstellen der Kontrollkeim-Stammsammlung

Die in dieser Arbeit verwendeten Mykobakterien-Referenzstämme wurden von der DSMZ als Lyophilisate bezogen. BCG wurde freundlicherweise vom Lehrstuhl für Lebensmittelsicherheit der LMU (ursprünglich bezogen vom nationalen Referenzzentrum für Mykobakterien, Forschungszentrum Borstel) zur Verfügung gestellt. Die Lyophilisate wurden unter sterilen Bedingungen in 1 ml steriler Ringerlösung gelöst und im Zweifach-Ansatz jeweils 500 µl auf Löwenstein-Jensen Schrägagar pipettiert. Die Röhren wurden in Schrägposition mit leicht geöffnetem Deckel bei 37 °C inkubiert, nach einer Woche in aufrechter Position mit geschlossenem Deckel. Die bewachsenen Röhren wurden in 4 Wochen-Abständen auf frische Löwenstein-Jensen-Röhren überimpft. Die nicht dem Genus *Mycobacterium* angehörigen Kontrollkeime konnten von der lehrstuhlinterne cryokonservierten Stammsammlung bezogen und durch Ausstreichen der gefrorenen Bakterien-Glycerin-Suspension und anschließender Bebrütung bei 37 °C auf Blutagar kultiviert werden.

2.1.2 Anzucht und Langzeitkultivierung von MAP

Für die Stammsammlung wurden verschiedene MAP-Feldstämme als Magermilch-Lyophilisate von der Universität Gießen zur Verfügung gestellt. Zwei DSM-Stämme wurden als Lyophilisat von der DSMZ bezogen. Eine Informationsübersicht der erhaltenen Stämme sind Tabelle 4 und Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 4: Magermilch-Lyophilisate verschiedener MAP-Isolate

MAP 442	Isoliert aus Rinderkot, Rinderbestand Rheinland-Pfalz
MAP 4102-116	Isoliert aus Rinderkot, Rinderbestand Thüringen
MAP 4102-33	Isoliert aus Rinderkot, Rinderbestand Thüringen
MAP 4102-31	Isoliert aus Rinderkot, Rinderbestand Thüringen
MAP 4102-95	Isoliert aus Rinderkot, Rinderbestand Thüringen
MAP K3-Eimer	Isoliert aus Milch einer an Paratuberkulose erkrankten Kuh, Gießen
MAP MS-8	Isoliert aus Rinderkot, Deutschland
MAP MS-10	Isoliert aus Rinderkot, Ägypten
MAP MS-4	Isoliert aus Ileum, Deutschland
MAP MS-6	Isoliert aus Rinderkot, Deutschland

Tabelle 5: Lyophilisate verschiedener DSMZ-Stämme

MAP DSM 44133	Typstamm, isoliert aus Rinderkot
MAP DSM 44135	Typstamm, isoliert aus Rinderkot

Zur Anzucht und Kultivierung wurden die Lyophilisate in 1 ml steriler Ringerlösung gelöst und jeweils 500 µl auf HEYM-Schrägagar pipettiert. Die HEYM-Röhrchen wurden eine Woche lang mit leicht geöffnetem Deckel und in Schrägposition bei 37 °C inkubiert, anschließend in aufrechter Position und geschlossenem Deckel. Die Anzucht wurde wöchentlich auf Koloniewachstum hin untersucht. Weitere 500 µl dienten als Inokulum für die Flüssigkultur in M7H9 + Mykobaktin (2 mg/l), die jedoch nach einer Woche aufgrund von starker Kontamination verworfen wurde.

Da ein Großteil der Isolate auch nach 6 Monaten Inkubation auf HEYM-Festagar kein sichtbares Wachstum zeigten, wurden die HEYM-Röhrchen mit 1 ml PBS abgeschwemmt, 500 µl als Inokulum für die Flüssigkultur verwendet und 500 µl direkt weiter untersucht (siehe 2.1.3). Das Ziel bestand darin, die bis dato auf HEYM-Festagar nicht kultivierbaren MAP-Isolate in Flüssigkultur zum Wachstum zu aktivieren. Durch die vorherige Inkubation des resuspendierten Lyophilisates auf HEYM-Agar konnten eventuelle Kontaminanten im Lyophilisat selektiv abgetötet werden und die Anzucht in wenig selektivem Flüssigmedium M7H9 + Mykobaktin (2 mg/l) erfolgen.

Zur Kultivierung von MAP in Flüssigmedium wurde Bakterienmaterial zu 20 ml M7H9 + Mykobaktin (2 mg/l) gegeben und als Schüttelkultur im Erlenmeyerkolben bei 100 rpm und 37 °C bis zur gewünschten Bakteriendichte inkubiert.

Die Anzucht der MAP-Feldstämme wurde in einem zweiten biologischen Replikat wiederholt, hierbei wurde neben HEYM-Medium wiederum M7H9 + Mykobaktin (2 mg/l) beimpft, diesmal jedoch antibiotischer Selektivzusatz zugefügt (Amphotericin B: 50 mg/l, Nalidixinsäure 100 mg/l, Vancomycin 100 mg/l).

Für die Langzeitkultur wurde in monatlichen Abständen unter sterilen Bedingungen Koloniematerial mit einer langen, sterilen Impföse aus einem bewachsenen HEYM-Röhrchen entnommen, auf neuen HEYM-Röhrchen wellenförmig ausgestrichen und bei 37 °C mindestens 3 Wochen bebrütet.

2.1.3 Identifikation der Kolonien

Die MAP-Feldstämme aus den Magermilch-Lyophilisaten sowie die MAP-Stämme der DSMZ wurden in weiteren Schritten auf ihre Identität hin überprüft. Makroskopisch nicht erkennbar bewachsene HEYM-Röhrchen wurden nach 6 Monaten mit PBS abgeschwemmt und die Suspension ebenfalls untersucht. Kolonien, die schon während der ersten 1 bis 2 Wochen der Kultur auf HEYM-Agar sichtbar wurden, wurden zusätzlich auf M7H10 ohne Mykobaktin-Zusatz inkubiert.

2.1.3.1 Ziehl-Neelsen-Färbung

Bewachsene HEYM-Röhrchen, trübe Flüssigkulturen und die abgeschwemmten Proben nicht bewachsener HEYM-Röhrchen wurden der Ziehl-Neelsen-Färbung unterzogen. Dazu wurden 10 µl sterile Ringerlösung auf einen Objektträger pipettiert, Koloniematerial des zu untersuchenden HEYM-Röhrchens darin suspendiert und luftgetrocknet. Von den Bakteriensuspensionen der Flüssigkultur und der abgeschwemmten HEYM-Röhrchen wurden ebenfalls 10 µl entnommen und auf dem Objektträger luftgetrocknet. Nach erfolgter Hitzefixierung wurden die fixierten Bakterien mit Ziehl-Neelsen-Färbelösung überzogen und der Objektträger solange erhitzt, bis Dampfschwaden sichtbar wurden. Anschließend wurde der Objektträger gründlich mit Aqua dest. gewaschen und nicht säurefeste Bakterien für 5 min mit saurem Alkohol entfärbt. Es folgte ein weiterer Waschschriff mit Aqua dest., gefolgt von 1 min Gegenfärbung mit Methylenblau (0,3 % in Aqua dest.). Nach erneutem Waschen mit Aqua dest. konnte das Präparat im Lichtmikroskop auf das Vorhandensein säurefester Stäbchen untersucht werden.

2.1.3.2 Qualitative PCR

Anhand der Ziehl-Neelsen-Färbung lassen sich zwar säurefeste von nicht-säurefesten Bakterien unterscheiden, eine eindeutige Identifizierung von MAP ist jedoch nicht möglich. Aus diesem Grund wurden die MAP-Kulturen zusätzlich molekularbiologisch untersucht. Dafür wurde von dem zu überprüfenden HEYM-Agar mittels steriler Impföse Koloniematerial entnommen, direkt in 180 µl Lysepuffer überführt und resuspendiert. Zur DNA-Extraktion aus Flüssigkultur bzw. aus den abgeschwemmten HEYM-Röhrchen wurde 1 ml der jeweiligen Bakteriensuspension bei 16000 x g für 10 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 180 µl Lysepuffer resuspendiert und die DNA mittels Chelex-basierter Methodik (siehe 2.2.4.1) extrahiert. Für die anschließende qualitative PCR zur Identifikation der Isolate kamen drei verschiedene Primerpaare zum Einsatz. Durch Verwendung des Primerpaares MYKO FW und MYKO RV konnten die Isolate dem Genus

Mycobacterium zugeordnet werden, die IS900-PCR und F57-PCR wurden zum MAP-spezifischen Nachweis verwendet. Die folgenden Tabelle 6 und Tabelle 7 zeigen Pipettierschema und Thermocyclerprogramme auf. Die Zyklenzahl bei der Amplifikation betrug jeweils 40.

Tabelle 6: PCR-Pipettierschema zum Nachweis des Genus *Mycobacterium* und zur Identifikation von MAP

Reagenz	Volumen (µl)
H ₂ O	34,8
10 x PCR-Puffer	5,0
MgCl ₂ (25 mM)	5,0
dNTP-Mix (10 mM)	1,0
Primer FW (10 µM)	1,0
Primer RV (10 µM)	1,0
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,2
Template	2,0

Tabelle 7: Thermocycler-Programme zum Nachweis des Genus *Mycobacterium* (links) und zur Identifikation von MAP via IS900-PCR (links) und F57-PCR (rechts)

Genus-spezifische PCR und IS900-PCR			F57-PCR		
Schritt	Temperatur (°C)	Zeit	Schritt	Temperatur (°C)	Zeit
Initiale Denaturierung	94	3 min	Initiale Denaturierung	94	3 min
Denaturierung	94	30 sek	Denaturierung	94	30 sek
Annealing	59	20 sek	Annealing	58	20 sek
Elongation	72	45 sek	Elongation	72	45 sek
Finale Elongation	72	5 min	Finale Elongation	72	5 min
Kühlung	4	∞	Kühlung	4	∞

Die amplifizierte Sequenzen wurden mit 6 x Ladepuffer versehen, 15 µl davon wurden auf ein 1,5 %iges Agarosegel geladen. Ein 100 bp plus Größenstandard diente zum Größenabgleich positiver Ergebnisse. Der Lauf erfolgte bei 200 V für 25 min. Zum Anfärben der Banden wurde das Agarosegel für 25 min in eine mit Ethidiumbromid gefüllte und im Anschluss für 10 min in eine mit Wasser befüllte Wanne gegeben. Die Visualisierung der Banden erfolgte mit einem UV-Geldokumentationssystem (Biostep).

2.1.4 Einfluss von Tween 80 auf die MAP-Kultivierung

2.1.4.1 Koloniemorphologie (Festmedium)

Zur Untersuchung der Koloniemorphologie von MAP DSM 44133 auf verschiedenen Nährmedien wurde von bewachsenen HEYM-Röhrchen Kulturmaterial mit 1 ml PBS abgeschwemmt, eine dekadische Verdünnungsreihe in PBS erstellt und einzelne Verdünnungsstufen auf HEYM-Agar pipettiert, die Röhrchen für eine Woche in Schrägposition bei leicht geöffnetem Deckel inkubiert, zugeschraubt und in aufrechter Position weiter inkubiert. Des Weiteren wurden zum Vergleich der Koloniemorphologie einzelne Verdünnungsstufen auf M7H10 + Mykobaktin (2 mg/l) und auf M7H10 + Mykobaktin (2 mg/l) + Tween 80 (0,05 %) ausplattiert. Die Platten wurden aufgrund der langen Inkubationszeit mit Parafilm gegen Austrocknung verschlossen und mindestens 4 Wochen bei 37 °C bebrütet. Anschließend erfolgte die Aufnahme der Kolonien unter dem Stereomikroskop.

2.1.4.2 Aggregatbildung als mögliche Fehlerquelle von Zellzahlquantifizierungen

In diesem Versuch sollte die Aggregatbildung bei der MAP-Anzucht in Flüssigmedium untersucht werden. Dafür wurden 20 ml M7H9-Medium + Mykobaktin (2 mg/l) mit unterschiedlichen Tween 80-Konzentrationen (0,05 %, 0,1 %, 0,2 % und 0,3 %) versetzt und mit MAP DSM 44133 (Endkonzentration: 10^5 Zellen/ml) inokuliert. Die Kulturen wurden bei 37 °C als Schüttelkulturen bei 100 rpm für 2,5 Wochen inkubiert und der Grad der Trübung photographisch festgehalten. Für die genauere Untersuchung der Flüssigkulturen wurden jeweils Ziehl-Neelsen-Präparate angefertigt und mikroskopisch beurteilt.

Die Möglichkeit einer korrekten Zellzahlbestimmung der Kulturen wurde durch eine vergleichende Zellquantifizierung analysiert. In der Literatur wird oftmals die Suspension mittels Spritze durch feine Nadeln gepresst, um durch die Scherkräfte vorhandene Aggregate aufzubrechen (Odumeru et al., 2001, Herman et al., 2005). Aus diesem Grund wurden die Kulturen aufgeteilt in zwei Ansätze. Ansatz 1 wurde direkt analysiert, Ansatz 2 dreimal durch eine 0,45 mm Spritzennadel auf- und abgezogen und erst anschließend weiter untersucht. Zur Quantifizierung mittels qPCR wurden Kulturen mit denselben Anzuchtbedingungen komplett abzentrifugiert und die Zellzahl mittels qPCR ermittelt. Vergleichend wurde ein bewachsenes HEYM-Röhrchen abgeschwemmt und die entstandene Suspension in zwei 2 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt (zur Herstellung einer Suspension von HEYM-Agar siehe Abbildung 6).

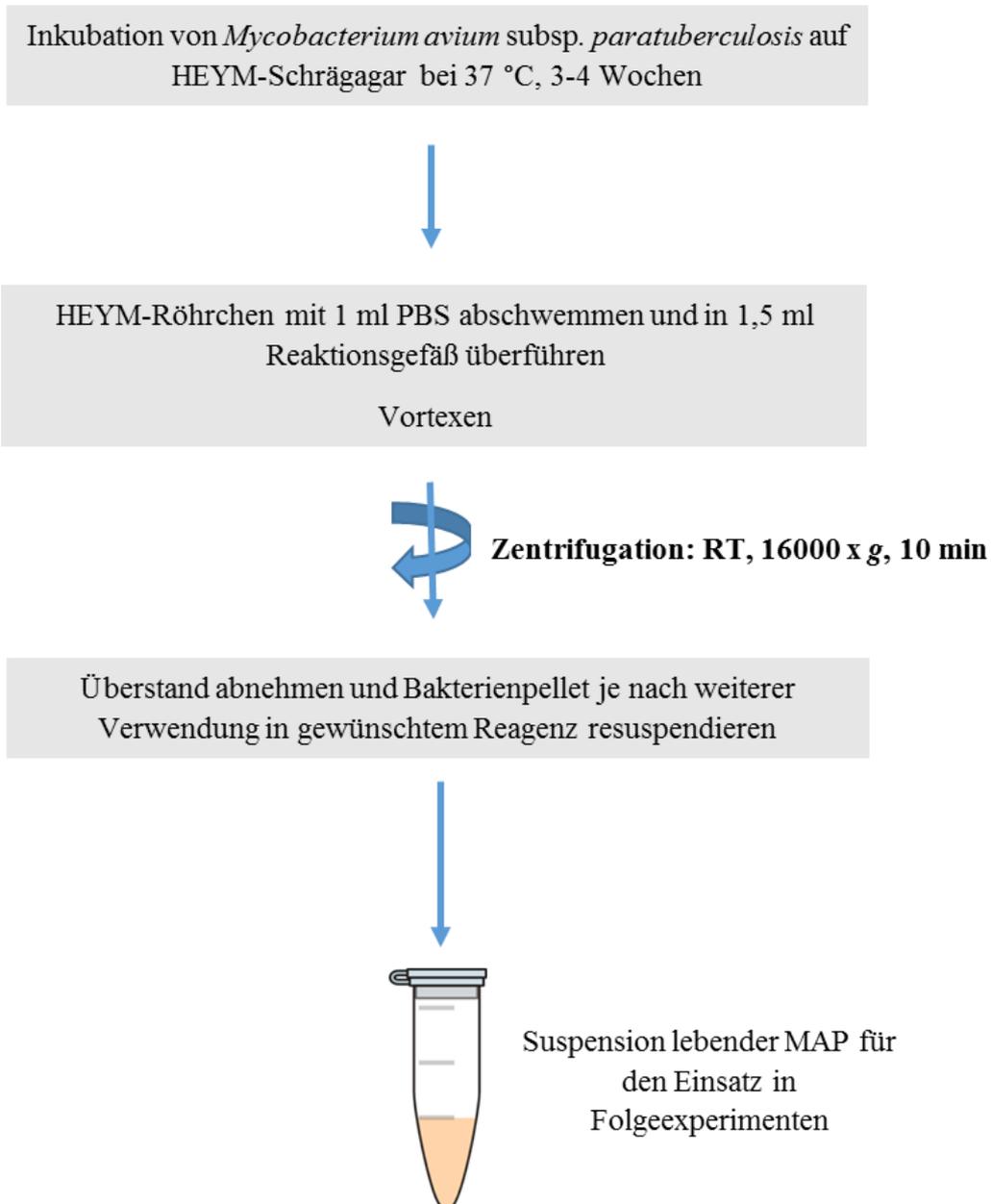


Abbildung 6: Herstellung einer MAP-Suspension von HEYM-Agar

Der erste Ansatz der HEYM-Suspension wurde (ohne Spritzenbehandlung) den drei Quantifizierungsmethoden unterzogen, Ansatz 2 komplett abzentrifugiert und mittels qPCR quantifiziert. In Abbildung 7 wird der komplette Versuchsaufbau detailliert dargestellt.

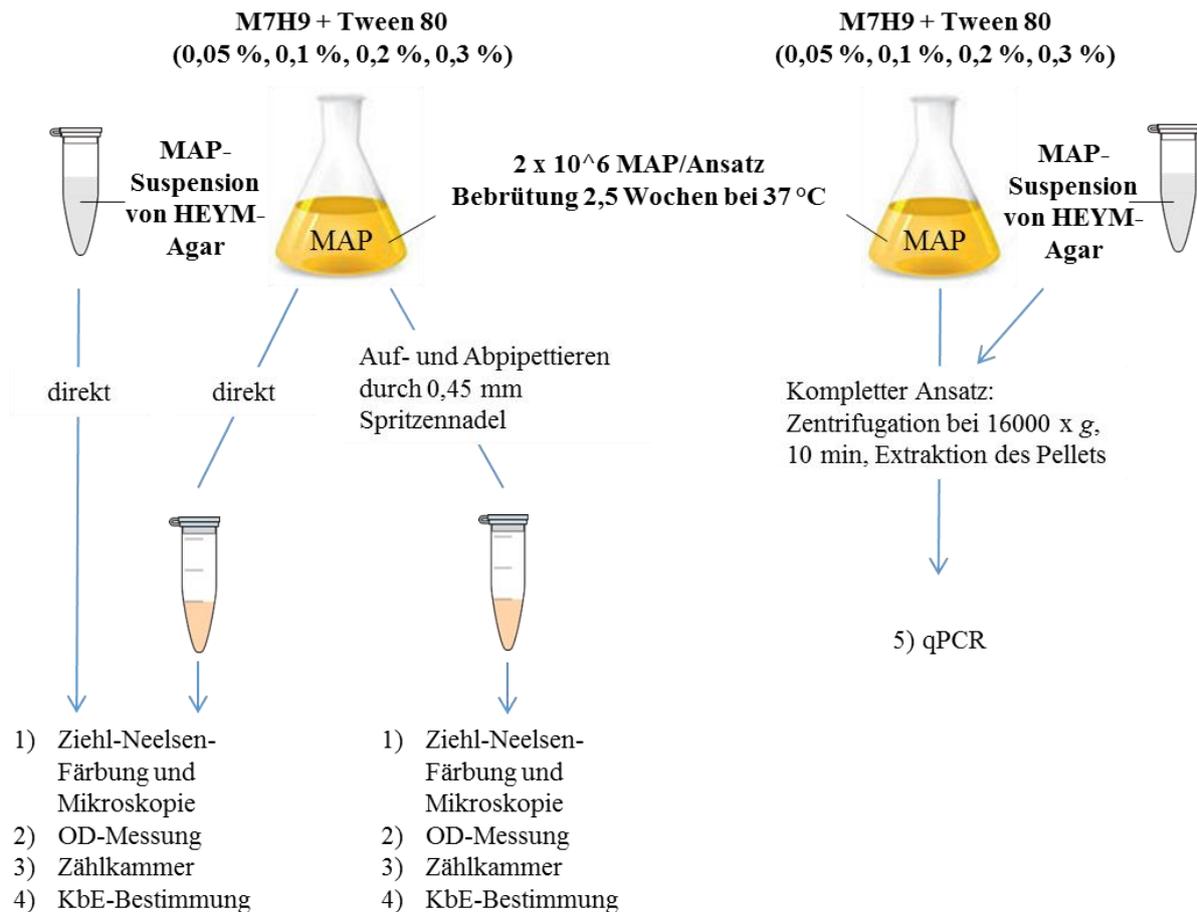


Abbildung 7: Untersuchungsschema unterschiedlicher MAP-Kulturen

1) Ziehl-Neelsen-Färbung: Um neben der makroskopischen Untersuchung auch einen mikroskopischen Eindruck der MAP-Suspensionen zu erhalten, wurden von jeder Flüssigkultur und der MAP-Suspension von HEYM-Agar Ziehl-Neelsen-Präparate (siehe 2.1.3.1) hergestellt und auf das Vorhandensein von Zellaggregaten hin untersucht.

2) OD-Messung: Die OD-Messung ermöglicht es, anhand der Dichte einer Bakteriensuspension mithilfe eines Standards deren Zellzahl zu ermitteln. Um die Tauglichkeit dieser Methode für MAP-Suspensionen zu testen, wurden 1:2 Verdünnungen (angelegt in M7H9-Medium mit jeweiliger Tween 80-Konzentration) der MAP-Flüssigkulturen im Photometer bei OD 600 vermessen. Ebenso wurde mit 1:2 Verdünnungen (angelegt in PBS) der MAP-Suspensionen von HEYM-Agar verfahren, die zuvor, um im linearen Messbereich zu liegen, auf OD = 1 (durch eine 1:2,3 Verdünnung) eingestellt werden mussten. Die Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt, der jeweilige Medienleerwert von den gemessenen Werten abgezogen; die Tauglichkeit wurde anhand der Korrelation von aufgrund des Verdünnungsfaktors theoretisch berechneten Werts und jeweils gemessenem OD-Wert überprüft.

3) Zählkammer: Die Quantifizierung lebender und toter MAP-Zellen erfolgte in der Zählkammer (Neubauer Improved; Sonder-Kammertiefe 0,01 mm). Die Außenstege der Kammer wurden mit Aqua dest. befeuchtet und das Deckglas mit sanftem Druck auf die Zählkammer aufgelegt. Das Deckglas wurde solange auf- und abgeschoben, bis sich Interferenzlinien bildeten (vgl. Abbildung 8). Anschließend wurde mit einer 10 µl-Pipette aus den Flüssigkulturen und deren jeweiligen 1:2 Verdünnungen diejenige Menge in den Spalt zwischen Deckglas und Kammerboden pipettiert, die durch Kapillarkräfte in die Kammer gesogen wurde. Die Auszählung erfolgte unter dem Lichtmikroskop bei 50-facher Vergrößerung. Die Auszählung der Originalkulturen und der 1:2 Verdünnungsstufe erfolgte jeweils in Duplikaten. Aufgrund der hohen Zellzahl der abgeschwemmten Suspension von HEYM-Agar wurde neben der Auszählung der Originalsuspension und der auf OD = 1 eingestellten Suspension zusätzlich eine weitere 1:10 Verdünnung hergestellt und ausgezählt.

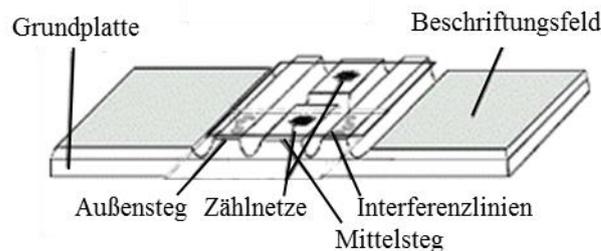


Abbildung 8: Zählkammer

(modifiziert nach <http://www.lo-laboroptik.de/deutsch/info/info.html>, letzter Zugriff 03/2018)

Das Zählgitter der Neubauer Improved Kammer besteht aus 9 Großquadraten mit einer Fläche von je 1 mm². Das Großquadrat in der Mitte ist zusätzlich unterteilt in 25 Gruppenquadrate. Diese Gruppenquadrate bestehen wiederum aus 16 Kleinstquadraten von je 0,0025 mm² Fläche. Die Zellzahl pro µl Zellsuspension ergab sich demnach aus folgender Formel:

Formel 1: Zellzahlberechnung Zählkammer

$$\text{Zellen pro } \mu\text{l} = \frac{\text{Anzahl der gezählten Zellen}}{\text{Fläche der ausgezählten Quadrate (mm}^2\text{)} * \text{Kammertiefe (mm)} * \text{Verdünnung}}$$

Die Plausibilitätsprüfung erfolgte anhand der Abweichungen innerhalb der Zweifachansätze und der Korrelation des aufgrund des Verdünnungsfaktors theoretisch berechneten Werts mit dem jeweilig tatsächlich ausgezählten Wert.

4) Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KbE): Zur Bestimmung lebender MAP-Zellen wurden aus den Flüssigkulturen und der abgeschwemmten MAP-Suspension im Zweifachansatz dekadische Verdünnungsreihen in PBS angelegt und die einzelnen

Verdünnungsstufen auf M7H10-Platten + Mykobaktin (2 mg/l) ausplattiert. Zum Schutz vor Austrocknung aufgrund der langen Inkubationszeit wurden die Platten mit Parafilm versiegelt und mindestens 4 Wochen bei 37 °C inkubiert. Es wurden jeweils alle Verdünnungsstufen berücksichtigt, die zwischen 10 und 300 KbE enthielten. Nach erster Plausibilitätsprüfung (Überprüfung der um Verdünnungsfaktor korrigierten Werte zwischen Verdünnungsstufen) wurden ggf. zusätzlich auch solche Verdünnungsstufen herangezogen, die in unter 10 Kolonien je Platte resultierten. Die Berechnung des gewichteten Mittelwertes (KbE/ml) erfolgte nach folgender Formel:

Formel 2: Gewichteter Mittelwert der KbE

$$c = \frac{\Sigma c}{n1 * 1 + n2 * 0,1 + n3 * 0,01} * d$$

- c gewogener arithmetischer Mittelwert der Koloniezahlen
- Σc Summe der Kolonien aller Platten, die zur Berechnung herangezogen wurden
- n1 Anzahl der Platten der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe
- n2 Anzahl der Platten der nächsthöheren auswertbaren Verdünnungsstufe
- n3 Anzahl der Platten der nächsthöheren auswertbaren Verdünnungsstufe
- d Verdünnungsfaktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe

Die Plausibilitätsprüfung der letztlich ermittelten Werte erfolgte anhand folgender Parameter: Reproduzierbarkeit innerhalb der Zweifachansätze und Plausibilität zwischen den einzelnen Verdünnungsstufen.

qPCR: MAP neigt zur Aggregatbildung bei Anzucht in Flüssigmedium, wodurch eine inhomogene Suspension entsteht. Bei Zellzahlbestimmungen, die auf ein Aliquotieren der Probe und anschließendem Hochrechnen der Zellzahl beruhen (vgl. KbE, Zählkammer, OD-Messung), sind bei Flüssigkulturen inkorrekte Werte zu erwarten. Um diesen Fehler abzuschätzen, wurden Flüssigkulturen, die dieselben Kulturbedingungen und dasselbe Inokulum aufwiesen wie die Kulturen, die über KbE, Zählkammer und OD-Messung beurteilt wurden, komplett bei 16000 x g für 10 min abzentrifugiert, die DNA des entstandenen Pellets mit dem Blood and Tissue Kit nach Protokoll 3 (siehe 2.2.4.1) extrahiert und mittels qPCR anhand des single-copy-Targets *f57* quantifiziert, so dass letztlich nur das Eluat, nicht aber die zu extrahierende Suspension aliquotiert werden musste. Ein Genomäquivalent-Standard (siehe 2.2.3.2) diente als Grundlage zur Berechnung der Zellzahl. Da in die PCR nur 1/50 des Gesamteluats eingebracht wurde, wurde die über den Standard berechnete Zellzahl mit 50 multipliziert, um die Zellzahl in der Gesamtkultur (Zellzahl/ 20ml) zu errechnen. Der Versuch wurde in Duplikaten durchgeführt.

Zum Abgleich aller Methoden untereinander wurden alle Quantifizierungsergebnisse in Zellzahl(äquivalent)/ml umgerechnet.

2.1.5 Kultureller Nachweis von MAP aus Milchproben zur Etablierung eines Gold-Standards

Zum kulturellen Nachweis von MAP in Frischmilch und Vorzugsmilch wurde ein Protokoll nach Dundee et al. (2001) verwendet. Dazu wurde eine homogene MAP-Suspension hergestellt, die Zellzahl mittels Zählkammer bestimmt, eine dekadische Verdünnungsreihe in PBS mit 10^6 MAP/ml bis 10^0 MAP/ml hergestellt, parallel das Spiking-Level durch Ausplattieren der letzten vier Verdünnungsstufen auf M7H10-Platten kulturell überprüft und 49 ml Frischmilch und Vorzugsmilch mit jeweils 1 ml der einzelnen Verdünnungsstufen artifiziell kontaminiert. Als Leerwert dienten 49 ml Milch, versetzt mit 1 ml PBS. Die dotierten und undotierten Milchproben wurden bei $2500 \times g$ für 15 min abzentrifugiert, das Pellet mit 10 ml HPC (0,75 %) resuspendiert, für 5 Std bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei $2500 \times g$ und 15 min abzentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 300 μ l PBS resuspendiert und auf HEYM-Röhrchen pipettiert, die zunächst für eine Woche in Schrägposition mit leicht geöffnetem Deckel inkubiert wurden und im Anschluss in aufrechter Position mit geschlossenem Deckel. Zu beachten galt, dass die stehende Flüssigkeit, die sich durch Kondensation in frischen HEYM-Röhrchen sammelt, vor Auftrag der Probe entfernt wurde, da andernfalls bei Zugabe der Probe Flockenbildung entstand, was die Auswertung erschwerte. Nach 12 Wochen Bebrütungsdauer wurden die Kolonien der niedrig dotierten Röhrchen (10^3 bis 10^0) gezählt, zur Identifikation der Kolonien wurde mittels steriler Öse Koloniematerial der Röhrchen entnommen, die Proben mittels Chelex-Extraktion (siehe 2.2.4.1) extrahiert und die MAP-spezifische qualitative F57-PCR durchgeführt (siehe Tabelle 6 und Tabelle 7 für Mastermix und PCR-Bedingungen).

2.2 Entwicklung des molekularbiologischen Nachweises von MAP

2.2.1 Auswahl neuer MAP-spezifischer Targets

Neben den in der Literatur bereits publizierten und häufig zum MAP-Nachweis verwendeten genetischen Elementen *f57* und *IS900* sollten in dieser Arbeit neue MAP-spezifische Targets gefunden und entsprechende Primerpaare getestet werden. Zur Findung neuer MAP-spezifischer Protein-Zielstrukturen, die perspektivisch neben dem PCR-Nachweis der codierenden DNA-Sequenzen auch einen Antikörper-vermittelten Nachweis von MAP in Milchproben ermöglichen sollen, wurde MAP in Milch und zum Abgleich in

M7H9 + Mykobaktin (2 mg/l) inkubiert, aus der Matrix Milch bzw. dem Medium zurückgewonnen und das MAP-Proteom beim Kooperationspartner einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen (Probenvorbereitung siehe Abbildung 9 und Abbildung 10). Dabei sollte festgestellt werden, welche Proteine/Peptide von MAP in der Matrix Milch exprimiert werden und dadurch zukünftig auch als Target eines antikörpervermittelten Nachweises Verwendung finden können.

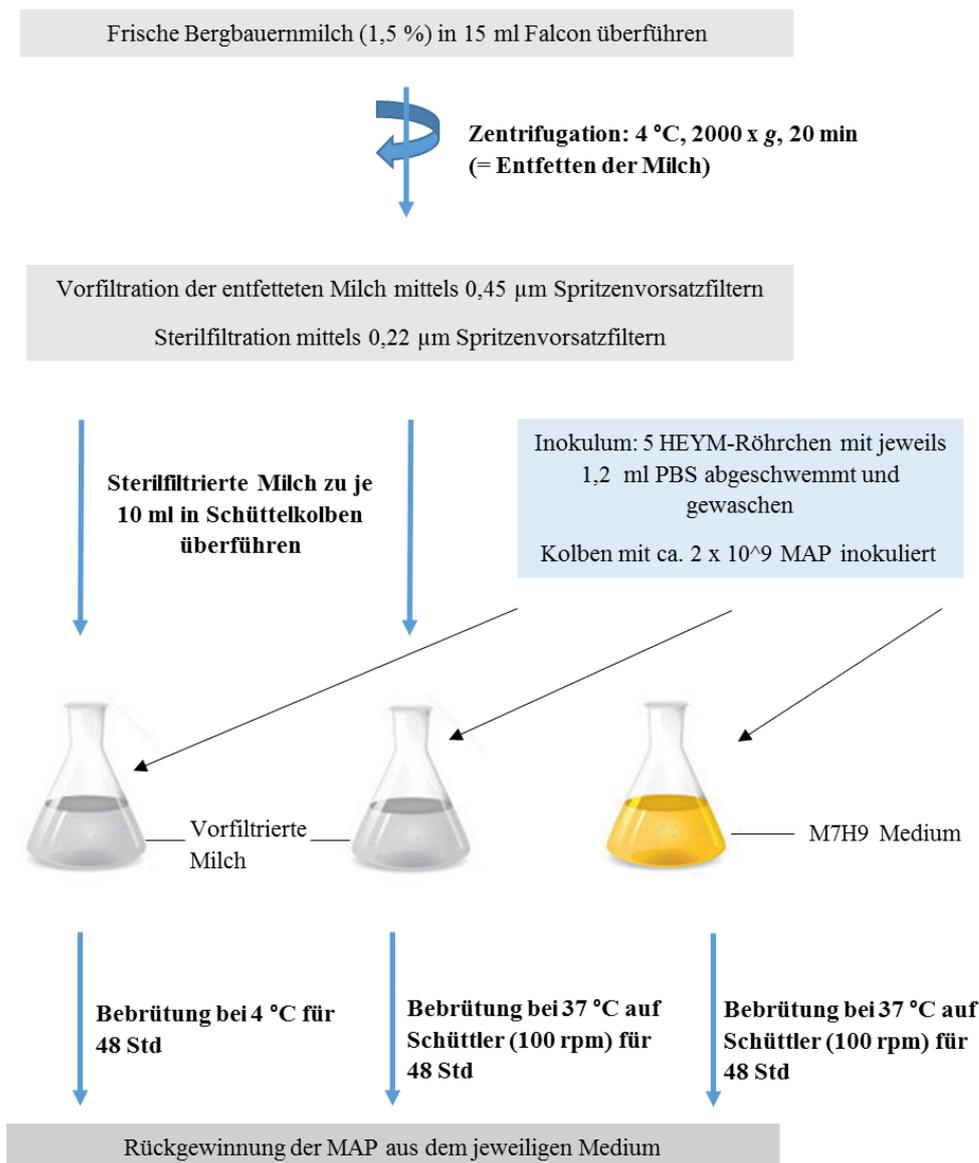


Abbildung 9: Versuchsablauf zur Vorbereitung der Proteomanalyse Schritt 1

Nach der Inkubation in Milch bzw. M7H9 wurden die MAP-Suspensionen jeweils mit einer sterilen Spritze aufgezogen und durch 0,45 µm Spritzenvorsatzfiltern filtriert. Das Filtrat wurde verworfen. Der Filter wurde durch zweimaliges Rückspülen und Filtrieren mit 2 ml PBS gewaschen und das 3. Rückfiltrat (2 ml PBS) in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, die

Bakterien bei 16000 x g für 10 min abzentrifugiert und durch Zugabe von 500 µl PBS dreimal gewaschen, wie Abbildung 10 zeigt.

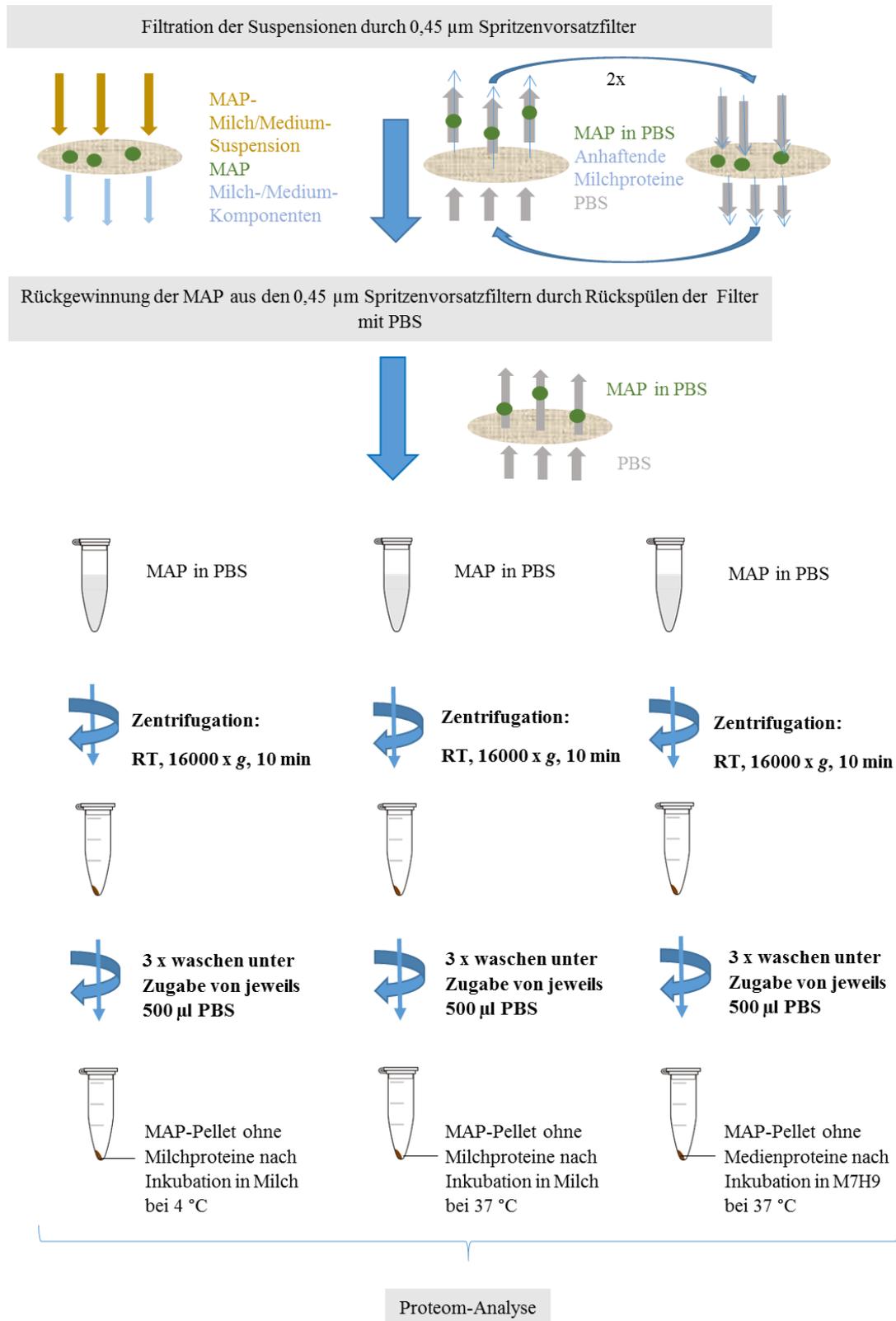


Abbildung 10: Versuchsablauf zur Vorbereitung der Proteomanalyse Schritt 2

Das gewonnene MAP-Pellet wurde an Kollegen des Lehrstuhls für Tierphysiologie an der LMU übergeben, dort über FASP-Verdau aufbereitet und am Helmholtz Zentrum München (Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt; *Research Unit Protein Science*) massenspektrometrisch analysiert. Die gewonnenen Peptide wurden anschließend mit dem Online-Tool NCBI-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, letzter Zugriff 03/2018) auf ihre MAP-Spezifität getestet (blastp, tblastn). Im Anschluss wurden mittels PrimerBLAST Primerpaare für den molekularbiologischen Nachweis der codierenden DNA-Sequenzen generiert.

2.2.2 Spezifitätstest der neu generierten Primerpaare

Aus den unter 2.2.1 erhaltenen Daten wurden zu drei verschiedenen hoch abundanten, über BLAST als MAP-spezifisch deklarierten Peptiden sechs Primerpaare (4470/A FW/RV, 4470/B FW/RV, 8771/A FW/RV, 8771/B FW/RV, 2420/A FW/RV und 2420/B FW/RV) zu den jeweilig codierenden Sequenzen generiert und diese zusätzlich experimentell auf MAP-Spezifität und Konserviertheit untersucht. Dafür wurden 3 unterschiedliche MAP-Stämme, 8 weitere Mykobakterienstämme, darunter 2 Vertreter der *M. avium*-Gruppe, BCG, sowie 13 weitere Spezies, die häufig in Tankmilch und pasteurisierter Milch vorkommen, verwendet (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Testkeime

MAP-Stämme	MAP DSM 44133 MAP DSM 44135 MAP MS-4 Feldisolat
Mykobakterien-Stämme und BCG	BCG <i>M. asiaticum</i> <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> <i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i> <i>M. celatum</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. terrae</i>
In Tankmilch und pasteurisierter Milch zu erwartende Spezies (Kontrollkeime)	<i>Acinetobacter lwoffii</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Enterococcus durans</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Lactobacillus lactis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia rubidaea</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Streptococcus uberis</i>

Die DNA des jeweiligen Stammes wurde nach der Chelex-basierten Methode (siehe 2.2.4.1) aufbereitet und als Template in der jeweiligen qualitativen PCR eingesetzt. Zur Überprüfung unspezifischer Bindungen der Primerpaare in der Matrix Milch wurden Milchextrakte hergestellt und 2 µl als Template in der jeweiligen PCR eingesetzt. Dazu wurden 10 ml pasteurisierte Frischmilch bzw. Vorzugsmilch über Zentrifugation pelletiert (2500 x g, 15 min) und das Pellet anschließend mit dem Blood and Tissue Kit nach Protokoll 3 (siehe 2.2.4.1) extrahiert. Als Positivkontrolle diente jeweils ein MAP-DNA-Extrakt aus Reinkultur, des Weiteren wurden ein Extraktionsleerwert sowie eine Negativkontrolle (Zugabe von 2 µl H₂O anstatt Template zum PCR-Ansatz) mitgeführt. Mastermix und Thermocyclerprogramm finden sich in Tabelle 9. Die Auswertung erfolgte nach Auftrennung der Amplifikate im 1,5 %igen Agarosegel bei 200 V für 25 min.

Tabelle 9: Mastermix (links) und Thermocycler-Programm (rechts) vor Optimierung: neue MAP-spezifische Primerpaare 4470/A, 4470/B, 8771/A, 8771/B, 2420/A und 2420/B

Reagenz	Volumen (µl)	Schritt	Temperatur (°C)	Zeit
H ₂ O	34,8	Initiale Denaturierung	94	3 min
10 x PCR-Puffer	5,0	Denaturierung	94	30 sek
MgCl ₂ (25 mM)	5,0	Annealing	55	20 sek
dNTP-Mix (10 mM)	1,0	Elongation	72	45 sek
Primer FW (10 µM)	1,0	Finale Elongation	72	5 min
Primer RV (10 µM)	1,0	Kühlung	4	∞
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,2			
Template	2,0			

2.2.3 Einstellen der PCR-Parameter zum MAP-Nachweis via Sybr-Green qPCR mit Fokus auf Milchproben

Zur Etablierung eines sensitiven molekularbiologischen Nachweises von MAP via Sybr-Green qPCR sollten zunächst einzelne PCR-Parameter für eine effiziente Amplifikation optimiert werden.

2.2.3.1 Gradienten-PCR zur Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur

Die Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur der in dieser Arbeit verwendeten MAP-spezifischen Primerpaare erfolgte über eine Gradienten-PCR im Thermocycler, in der innerhalb eines Thermo-Block-Cyclers 12 verschiedene Temperaturen nebeneinander eingestellt wurden. Für das F57-Primerpaar (T_m Primerpaar F57: 54,3 °C bzw. 52,4 °C)

wurde die Temperaturspanne von 50 °C bis 61 °C gewählt, für die neu generierten Primerpaare (T_m zwischen 59 °C und 61 °C) von 55 °C bis 66 °C. Als Template wurde aus MAP mittels Blood and Tissue Kit nach dem Protokoll für Gram-positive Bakterien extrahierte DNA verwendet. Diese wurde mit dem Photometer vermessen und mit Elutionspuffer auf eine Konzentration von 10 ng/µl eingestellt. Tabelle 10 zeigt Mastermix und Thermocycler-Programm für die Gradienten-PCR auf.

Tabelle 10: Mastermix und Gradienten-PCR-Programm

Reagenz	Volumen (µl)	Schritt	Temperatur (°C)	Zeit
H ₂ O	34,8	Initiale Denaturierung	94	3 min
10 x PCR-Puffer	5,0	Denaturierung	94	30 sek
MgCl ₂ (25 mM)	5,0	Annealing	50 bzw. 55	20 sek
dNTP-Mix (10 mM)	1,0		-61 bzw. 66	
Primer FW (10 µM)	1,0	Elongation	72	45 sek
Primer RV (10 µM)	1,0	Finale Elongation	72	5 min
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,2	Kühlung	4	∞
Template	2,0			

Zur Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur wurden die Amplifikate mit Ladepuffer versetzt, exakt 15 µl davon auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen, bei 200 V für 25 min aufgetrennt und anschließend mit Ethidiumbromid unter UV-Licht visualisiert. Die Bandenintensitäten auf dem Agarosegel wurden über die Software TotalLab berechnet. Als optimale Annealing-Temperatur galt diejenige, bei der die Amplifikation die höchste Effizienz aufwies, resultierend in der Bande mit höchster Bandenintensität.

2.2.3.2 Generierung eines Genomäquivalent-Standards für die qPCR

Extrahierte MAP-DNA (Blood and Tissue Kit nach Angaben der Hersteller für Gram-positive Bakterien) aus Reinkultur wurde im Photometer vermessen und die Konzentration an doppelsträngiger DNA im Extrakt bestimmt. Die Anzahl der Genome im Extrakt wurde nach folgender Formel berechnet:

Formel 3: Anzahl MAP-Genome einer extrahierten MAP-Reinkultur

$$\frac{\text{Genome}}{\mu\text{l}} = \frac{(6,022 \cdot 10^{23} \frac{\text{Teilchen}}{\text{mol}}) \cdot (\text{gemessene DNA Konzentration in } \frac{\text{g}}{\mu\text{l}})}{(3,16 \cdot 10^9 \frac{\text{g}}{\text{mol}})}$$

Mit: MAP-Genom: ca. 4,8 Megabasenpaare => 9,6 Megabasen // mittlere Nukleotidmasse: 330 g/mol => mittlere molare Masse eines MAP-Genoms: $9,6 \times 10^6$ Nukleotide \times 330 g/mol = $3,16 \times 10^9$ g/mol, Avogadro-Konstante: $6,022 \times 10^{23}$ Teilchen/mol

Das Eluat wurde mit sterilem Aqua dest. auf eine Konzentration von 5 ng/ μ l eingestellt, was rund 1×10^6 Genomen/ μ l entspricht. Die dekadische Verdünnungsreihe in Aqua dest. diente als Standard zur Beurteilung von qPCR-Programmen und DNA-Extraktionsprotokollen während der Optimierungsphase. Dabei wurden jeweils 2 μ l/PCR-Ansatz der jeweiligen Verdünnungsstufe eingesetzt, von 2×10^6 Genomen (= 10 ng) bis 2×10^0 Genomen (= 10 fg) pro PCR-Ansatz. Bei Verwendung des single-copy-Targets *f57* und einer Amplifikationseffizienz von annähernd 100 % konnte somit in unbekanntem Proben bei Verwendung von 2 μ l Template/PCR-Ansatz die Anzahl nachgewiesener *f57* Elemente mit der nachgewiesenen Genomanzahl und somit mit der erfolgreich extrahierten Zellzahl pro 2 μ l gleichgesetzt werden. Um die extrahierte Zellzahl der Gesamtprobe zu errechnen, wurde die über den Genomäquivalent-Standard berechnete Zellzahl/2 μ l mit dem Faktor $\frac{\text{Volumen des DNA-Extrakts in } \mu\text{l}}{2}$ multipliziert.

2.2.3.3 Optimierung der Primerkonzentration

Die Mastermix-Zusammensetzung wurde in Hinblick auf die Primerkonzentration optimiert. Drei verschiedene Mastermix-Mischungen mit Primerkonzentrationen von 100 nM, 200 nM und 300 nM wurden eingesetzt (Tabelle 11); über eine Standardkurve wurden Effizienz und Nachweisgrenze ermittelt. Als Template dienten die Verdünnungsstufen des Genomäquivalent-Standards (siehe 2.2.3.2). Die einzelnen Optimierungsschritte sollen folgend für das Target *f57* näher erläutert werden, zusätzlich wurden nach derselben Vorgehensweise die zwei neuen Primerpaare 8771/B und 2420/A für die qPCR mittels Sybr-Green etabliert und optimiert. Die jeweilige optimierte Annealing-Temperatur wurde entsprechend der Ergebnisse der Gradienten-PCR (aus 2.2.3.1) im Amplifikationsprogramm der quantitativen PCR am LC480 Lightcycler eingestellt.

Tabelle 11: Mastermix für unterschiedliche Primerkonzentrationen zur Optimierung der Amplifikationsbedingungen

Reagenz	Volumen (μ l)	Volumen (μ l)	Volumen (μ l)
H ₂ O	6,8	7,2	7,6
Primer FW (10 μ M)	0,6 (300 nM)	0,4 (200 nM)	0,2 (100 nM)
Primer RV (10 μ M)	0,6 (300 nM)	0,4 (200 nM)	0,2 (100 nM)
KAPA Mastermix (2 x)	10 (1 x)	10 (1 x)	10 (1 x)
Template	2,0	2,0	2,0

Die PCR-Bedingungen für das Target *f57* lauteten wie folgt: Initiale Denaturierung: 95 °C, 5 min, gefolgt von 40 Zyklen: Denaturierung bei 95 °C für 10 sek, Annealing bei 58 °C für 15 sek und Elongation bei 72 °C für 11 sek mit Fluoreszenzmessung nach dem Elongationsschritt. Daran schloss sich eine Schmelzkurvenanalyse an.

2.2.3.4 Veränderung des PCR-Programmes aufgrund von Primer-Dimeren

Um zu verhindern, dass ein Fluoreszenzsignal, das durch die Bildung von Primer-Dimeren entsteht, die CP-Werte nach vorne bzw. links (vgl. Abbildung 4) verschiebt, wurde ein vierter PCR-Schritt eingeführt, wie in Tabelle 12 gezeigt. Durch diese Modifikation wird die Messung des Fluoreszenzsignals nicht bei Elongationstemperatur durchgeführt, sondern abgekoppelt von der Elongation nach den jeweiligen Amplifikationsschritt geschaltet. Dadurch findet die Fluoreszenzmessung erst nach Aufschmelzen der Primer-Dimere statt. Die Temperatur zur Fluoreszenzmessung wurde hierfür mit 82 °C zwischen der Schmelztemperatur (T_m) der Primer-Dimere und der T_m des Zielamplifikats gewählt. Zur Überprüfung eines etwaigen negativen Einflusses auf die Messwerte wurde im Zweifachansatz eine dekadische Verdünnungsreihe in Aqua dest. erstellt und über die Standardkurve die Nachweisgrenze und Effizienz analysiert. Diese Ergebnisse wurden mit den Ergebnissen verglichen, die aus der Amplifikation ohne den vierten PCR-Schritt resultierten. Der Mastermix entsprach dem von Tabelle 11 mit der optimalen Primerkonzentration von 300 nM für das Target *f57* und dem Amplifikationsprotokoll aus Tabelle 12. Entsprechend wurden Programme mit viertem Schritt für die Primerpaare 8771/B und 2420/A etabliert.

Tabelle 12: Lightcycler-Amplifikationsprogramm mit viertem PCR-Schritt: F57-qPCR

Program Name	amplification						
Cycles	40	Analysis Mode	Quantification				
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:10	4.40		0	0	0
58	None	00:00:15	2.20		0	0	0
72	None	00:00:11	4.40		0	0	0
82	Single	00:00:05	4.40		0	0	0

2.2.4 Probenaufbereitung für qPCR mit Fokus auf Milchproben

Neben den PCR-Parametern sollte für einen sensitiven Nachweis von MAP die Probenaufbereitung zum Zweck des anschließenden PCR-Nachweises etabliert und optimiert werden. Dazu sollte in einem ersten Schritt die DNA-Extraktion aus MAP-Reinkultur und in einem zweiten Schritt die Zellernte von MAP aus Milch optimiert und validiert werden.

2.2.4.1 DNA-Extraktion aus MAP-Reinkultur

Die DNA-Extraktion aus MAP stellt sich aufgrund seiner robusten Zellwand als nicht trivial dar. Aus diesem Grund wurden verschiedene Methoden zur DNA-Extraktion aus einer MAP-Reinkultur getestet und optimiert. Neben kommerziell erhältlichen DNA-Isolierungs-Kits von Qiagen (DNeasy Blood and Tissue Kit) und Roche (High Pure PCR Template Preparation Kit) wurden zusätzlich ein Protokoll der nicht kit-basierten DNA-Extraktion mittels Chelex 100 und eine Phenol-Chloroform basierte DNA-Extraktion für MAP erarbeitet und getestet. Für die Extraktion wurden bewachsene HEYM-Röhrchen mit 1 ml PBS abgeschwemmt und die MAP-PBS-Suspension 3 min auf höchster Stufe mittels Vortex-Gerät vermischt um die Homogenität der Suspension zu gewährleisten. Die Suspension wurde in der Zählkammer ausgezählt und mit PBS auf eine Zellzahl von 1×10^8 Zellen/ml verdünnt. Für die jeweiligen DNA-Extraktionen wurden 100 μ l (entspricht ca. 1×10^7 Zellen) verwendet. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurde jedes Protokoll im Dreifachansatz durchgeführt. Die Validierung erfolgte anhand der beiden MAP-Stämme MAP DSM 44133 und MAP MS-4 Feldisolat. Die qPCR wurde jeweils in technischen Duplikaten durchgeführt und ein Genomäquivalent-Standard (siehe 2.2.3.2) zur Auswertung herangezogen. Es wurde das Primerpaar F57 verwendet mit dem in dieser Arbeit optimierten Mastermix und PCR-Amplifikationsprogramm (siehe Ergebnisteil: Tabelle 33 und Tabelle 34).

DNeasy Blood and Tissue Kit

Protokoll 1 entsprach den Angaben des Herstellers, welche im DNeasy Blood & Tissue Handbook für Gram-positive Bakterien aufgeführt sind (<https://www.qiagen.com/au/resources/resourcedetail?id=6b09dfb8-6319-464d-996c-79e8c7045a50&lang=en>, letzter Zugriff 03/2018). Dazu wurde das abzentrifugierte Bakterienpellet (16000 x g, 10 min) in 180 μ l Lysepuffer resuspendiert und 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Es folgte die Zugabe von 25 μ l Proteinase K und 200 μ l Puffer AL mit anschließender 30-minütiger Inkubation bei 56 °C im Wasserbad. Nach der Zellyse wurden 200 μ l 100 %iger Ethanol zugegeben und mittels Vortex-Gerät vermischt. Die DNA-haltige Lösung wurde auf die Säulchen gegeben, gewaschen und mit 100 μ l Elutionspuffer eluiert (siehe Abbildung 11).

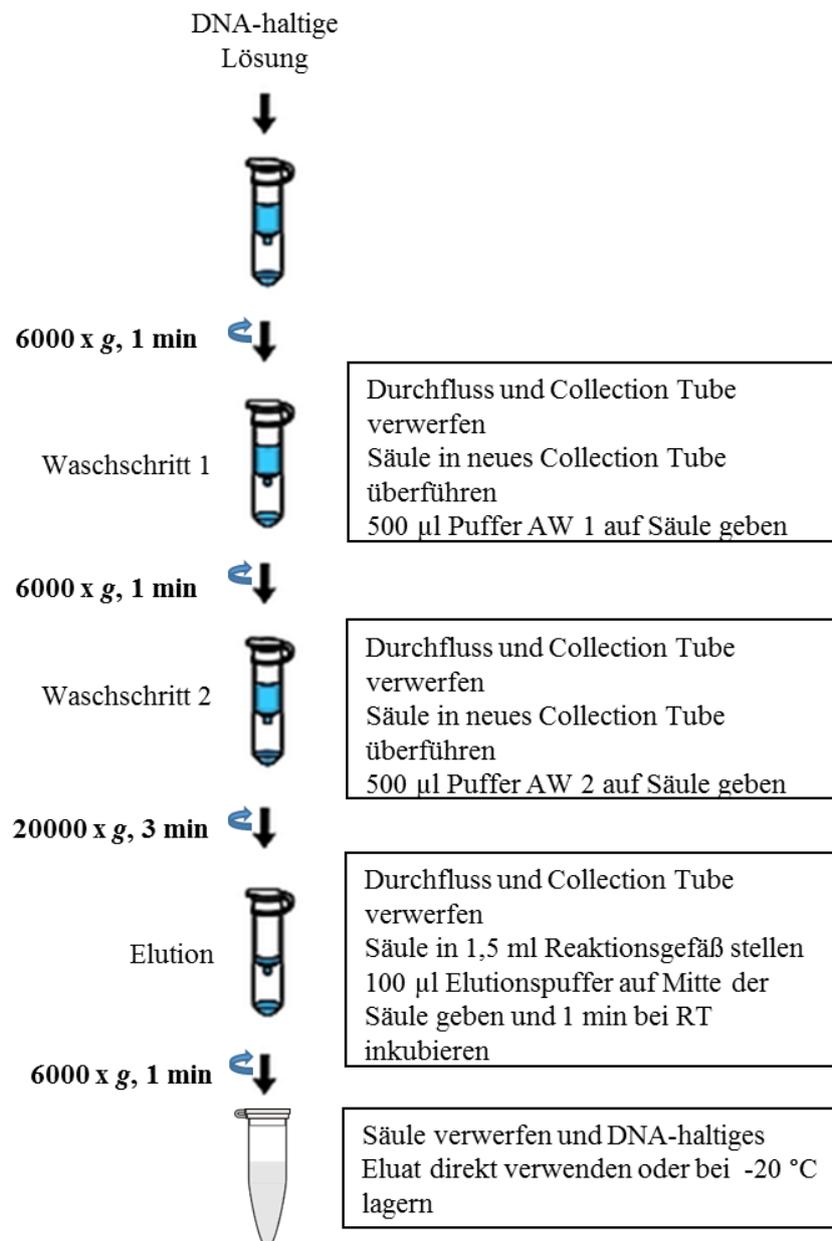


Abbildung 11: DNA-Isolierung mit DNeasy Blood and Tissue Kit von Qiagen

Protokoll 2: Protokoll 2 entsprach Protokoll 1 mit erhöhten Inkubationszeiten für Lysozym und Proteinase K mit jeweils 1,5 Std.

Protokoll 3: In diesem Ansatz sollte der Effekt einer zusätzlichen Kochlyse analysiert werden. Dafür wurden die Zellen nach Protokoll 2 aufbereitet. Nach der 1,5-stündigen Inkubation mit Proteinase K erfolgte ein Kochen der Suspension bei 99 °C für 10 min im Wasserbad. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 200 µl 100 %iger Ethanol zugegeben und mit dem Vortex-Gerät vermischt. Die restliche DNA-Aufbereitung entsprach den Angaben des Herstellers (siehe Abbildung 11).

Protokoll 4: In diesem Protokoll sollte als zusätzlicher Schritt zum Zellaufbruch die mechanische Beanspruchung der Zellen mittels Beads getestet werden. Dazu wurden die pelletierten Zellen in 180 µl Lysepuffer resuspendiert, die Suspension in Ribolyzer Tubes, die 20 mg Beads enthielten, überführt und im Ribolyzer mechanisch wie folgt beansprucht: 3 x 30 sek, Speed 6,0. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 37 °C für 1,5 Std im Wasserbad inkubiert. Es folgte die Zugabe von 25 µl Proteinase K und 200 µl Puffer AL mit anschließender Inkubation bei 56 °C im Wasserbad für 1,5 Std und Kochen der Suspension für 10 min im Wasserbad. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 200 µl 100 %iger Ethanol zugegeben und mit dem Vortex-Gerät vermischt. Die restliche DNA-Aufbereitung entsprach den Angaben des Herstellers (siehe Abbildung 11).

High Pure PCR Template Preparation Kit von Roche

Protokoll 1 entsprach den Angaben des Herstellers, aufgeführt im gelieferten Handbuch unter Isolation of Nucleic Acids from Bacteria and Yeast. Dazu wurde das abzentrifugierte Bakterienpellet (16000 x g, 10 min) in 200 µl PBS resuspendiert, 5 µl Lysozymlösung (10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8) zugegeben und 15 min bei 37 °C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 200 µl Binding Buffer und 40 µl Proteinase K und die Inkubation bei 70 °C für 10 min. Nach der Zellyse wurden 100 µl Isopropanol hinzu pipettiert und mit dem Vortex-Gerät vermischt. Die DNA-haltige Lösung wurde auf ein Säulchen gegeben, gewaschen und mit 100 µl eluiert (siehe Abbildung 12).

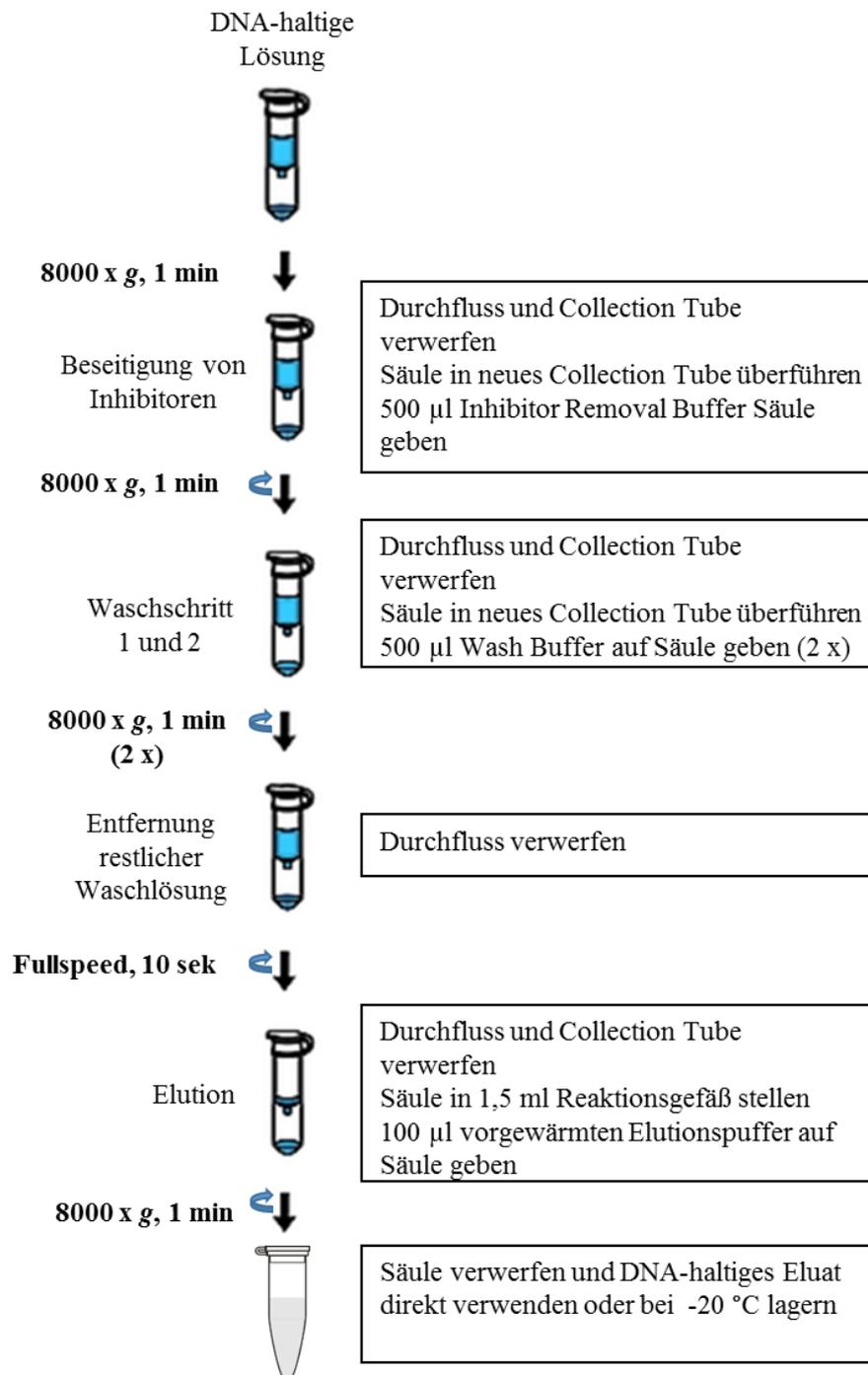


Abbildung 12: DNA-Isolierung mit High Pure PCR Template Kit von Roche

Protokoll 2: Protokoll 2 entsprach Protokoll 1 mit erhöhten Inkubationszeiten für Lysozym und Proteinase K mit jeweils 1,5 Std.

Protokoll 3: Protokoll 3 entsprach Protokoll 2 mit zusätzlicher Kochlyse. Nach der Inkubation mit Proteinase K erfolgte ein Kochen der Suspension bei 99 °C für 10 min im Wasserbad. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 100 µl 100 %iger Isopropanol zugegeben und mit dem Vortex-Gerät vermischt. Die weitere DNA-Aufbereitung entsprach den Angaben des Herstellers (siehe Abbildung 12).

Protokoll 4: In diesem Protokoll sollte wie in Protokoll 4 des Blood and Tissue Kits als zusätzlicher Schritt zum Zellaufbruch die mechanische Beanspruchung der Zellen mittels Beads getestet werden. Dazu wurden die pelletierten Zellen in 200 µl PBS resuspendiert und 5 µl Lysozymlösung (10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8) hinzu pipettiert. Die Suspension wurde in Ribolyzer Tubes mit 20 mg Beads/Ansatz mechanisch im Ribolyzer beansprucht (3 x 30 sek, Speed 6,0). Nach Überführen des Überstands in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß erfolgte die Inkubation im Wasserbad bei 37 °C für 1,5 Std. Es folgte die Zugabe von 200 µl Binding Buffer und 40 µl Proteinase K und die Inkubation bei 70 °C für 1,5 Std. Nach der Kochlyse wurden 100 µl Isopropanol hinzu pipettiert und mit dem Vortex-Gerät vermischt. Die DNA-haltige Lösung wurde auf ein Säulchen gegeben, gewaschen und mit 100 µl eluiert (siehe Abbildung 12).

Chelex 100-Extraktion

Chelex 100 sind kommerziell erhältliche Beads, die mit Iminodiacetat-Ionen verknüpft sind, wodurch mehrwertige Metallkationen wie beispielsweise Mg^{2+} - oder Ca^{2+} -Ionen gebunden werden können. Durch Entzug des DNase-Cofaktors Magnesium führt dies zu einer Verhinderung der DNA-Degradation (Charton-Cortes, 2014). In Anlehnung an die Ergebnisse der kitbasierten Methoden zum Zellaufbruch wurde folgendes Protokoll erarbeitet und getestet:

Die zu extrahierende MAP-PBS-Suspension wurde bei 16000 x g für 10 min abzentrifugiert, das Pellet in 180 µl Lysepuffer resuspendiert und für 1,5 Std bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Es folgte die Zugabe von 150 µl Chelex 100 (5 % in Aqua dest.) und 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) und eine 1,5-stündige Inkubation bei 56 °C im Wasserbad. Die Suspension wurde kurz mittels Vortex-Gerät vermischt und für 10 min bei 99 °C im Wasserbad erhitzt. Die Chelex-Kügelchen wurden bei 13000 x g für 3 min abzentrifugiert und der DNA-haltige Überstand abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und als Template in der PCR verwendet.

Phenol-Chloroform-Extraktion

In Anlehnung an ein am Lehrstuhl für *M. smegmatis* verwendetes Protokoll wurde die Extraktion folgendermaßen durchgeführt: Die zu extrahierende MAP-PBS-Suspension wurde bei 16000 x g für 10 min abzentrifugiert, das Pellet in 600 µl TE-Puffer resuspendiert, 6 µl Lysozym (100 mg/ml) und 6 µl RNase (10 µg/µl) hinzupipettiert und für 1,5 Std bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Es folgte die Zugabe von 42 µl 20 % SDS und 24 µl Proteinase K (20 mg/ml) und die Inkubation bei 56 °C für 1,5 Std im Wasserbad. Nach Zugabe von 120 µl

5 M NaCl und 96 μ l 10 % CTAB wurde für weitere 30 min bei 65 °C inkubiert. Zur Phenol-Chlorophorm-Extraktion wurden 900 μ l Phenol-Chlorophorm-Isoamyl Alkohol zugegeben, mit dem Vortex-Gerät vermischt und bei 8900 x g, 15 min und 4 °C abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das gleiche Volumen Chloroform-Isoamyl-Alkohol zugegeben, mittels Vortex-Gerät vermischt und bei 8900 x g und 4 °C für 15 min abzentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt, das gleiche Volumen an Isopropanol zugegeben und das Reaktionsgefäß sofort mehrmals geschwenkt. Nach der Zentrifugation bei 15000 x g und 4 °C für 30 min wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, verworfen und das Pellet zweimal mit 500 μ l 70 % Ethanol durch Zentrifugation bei 6500 x g für 10 min gewaschen, wobei das Pellet nicht durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert, sondern Ethanol lediglich hinzugegeben wurde. Der Überstand nach dem Waschen wurde vorsichtig abgenommen, das Reaktionsgefäß mit geöffnetem Deckel mindestens 10 min bei 37 °C getrocknet und das DNA-haltige Pellet mit 50 μ l Aqua dest. resuspendiert.

2.2.4.2 Validierung der MAP-Aufkonzentration aus Milch über Zentrifugation

Für eine möglichst hohe MAP-Gewinnung aus Milch wurden verschiedene Zentrifugationsprotokolle und Milchvorbehandlungen getestet. Dafür wurde MAP von HEYM-Agar abgeschwemmt, mit der Zählkammer ausgezählt und mit PBS auf eine Konzentration von 1×10^7 MAP/ml eingestellt. Es wurden 9 ml Milch (Vorzugsmilch) mit jeweils 1 ml MAP artifiziell kontaminiert. Die Aufbereitung zum Erhalt des zu extrahierenden Pellets erfolgte nach 6 unterschiedlichen Protokollen, die teilweise bereits publiziert, teilweise leicht abgeändert wurden. Protokoll 1 stellte das Protokoll mit höchster Rotation und längster Zentrifugationsdauer dar. Das jeweilig erhaltene Milchpellet wurde mit dem in dieser Arbeit optimierten Protokoll 3 des Blood and Tissue Kits extrahiert (siehe 2.2.4.1). Des Weiteren wurde undotierte Milch als Leerwert extrahiert. Jedes Protokoll wurde in Triplikaten anhand des MAP-Stammes DSM 44133 durchgeführt. Als Bezugswert wurden jeweils 1 ml der für die Dotierung verwendeten Verdünnungsstufe (1×10^7 MAP/ml) ebenfalls nach Protokoll 3 des Blood and Tissue Kits (siehe 2.2.4.1) direkt extrahiert. In der qPCR wurde das Primerpaar F57 verwendet mit dem optimierten Mastermix und PCR-Amplifikationsprogramm (siehe Tabelle 33 und Tabelle 34). Der Verlust, der sich aufgrund der MAP-Ernte aus Milch ergab, spiegelte sich in den Delta-CP-Werten ($CP_{\text{MAP aus Milch}} - CP_{\text{MAP direkt}}$) wider.

Protokoll 1

Die dotierte und undotierte Milch wurde bei 4900 x g für 60 min abzentrifugiert, die Rahmschicht vorsichtig mittels einer Pipettenspitze vom Rand gelöst und über Dekantieren entfernt. Die verbleibende Flüssigphase wurde vorsichtig mit einer Glaspipette abgenommen, verworfen und das erhaltene Pellet extrahiert.

Protokoll 2 (in Anlehnung an Tasara und Stephan, 2005)

Die dotierte und undotierte Milch wurde bei 4500 x g für 30 min abzentrifugiert, die Rahmschicht vorsichtig mittels einer Pipettenspitze vom Rand gelöst und über Dekantieren entfernt. Die verbleibende Flüssigphase wurde vorsichtig mit einer Glaspipette abgenommen, verworfen und das erhaltene Pellet extrahiert.

Protokoll 3 (Tasara und Stephan, 2005)

Die dotierte und undotierte Milch wurde bei 4500 x g für 30 min abzentrifugiert, die Rahmschicht vorsichtig mittels einer Pipettenspitze vom Rand gelöst und über Dekantieren entfernt. Die verbleibende Flüssigphase wurde vorsichtig mit einer Glaspipette bis auf 1 ml abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in der verbleibenden Restflüssigkeit resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 16000 x g für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet extrahiert.

Protokoll 4 (in Anlehnung an Molitor, 2014)

Die dotierte und undotierte Milch wurde mit 100 µl TritonX-100 versetzt, 30 min schüttelnd bei 100 rpm inkubiert und bei 2500 x g für 15 min abzentrifugiert. Die Rahmschicht wurde vorsichtig mittels einer Pipettenspitze vom Rand gelöst und über Dekantieren entfernt. Die verbleibende Flüssigphase wurde vorsichtig mit einer Glaspipette abgenommen, verworfen und das Pellet extrahiert.

Protokoll 5 (Molitor, 2014)

Die dotierte und undotierte Milch wurde mit 100 µl TritonX-100 versetzt, 30 min schüttelnd (100 rpm) inkubiert und bei 2500 x g für 15 min abzentrifugiert. Die Rahmschicht wurde vorsichtig mittels einer Pipettenspitze vom Rand gelöst und über Dekantieren entfernt. Die verbleibende Flüssigphase wurde vorsichtig mittels Glaspipette abgenommen, das Pellet in 1 ml PBS gewaschen und die Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zentrifugation bei 5400 x g für 15 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet extrahiert.

Protokoll 6 (Gao et al., 2007)

Die dotierte und undotierte Milch wurde bei 95 °C im Wasserbad für 10 min erhitzt und anschließend für 10 min auf Eis gestellt. Es folgte die Zentrifugation bei 3100 x g für 30 min. Mittels steriler Kanüle und einer Einwegspritze wurde die Flüssigphase abgenommen und das Pellet und die Rahmschicht mit 15 ml 0,75 %igem HPC resuspendiert. Es folgte die Inkubation auf Raumtemperatur für 30 min, wobei die Suspensionen in 5 Minuten-Intervallen händisch für ca. 5 sek geschüttelt wurden. Nach der Inkubation folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 2000 x g für 15 min, der Überstand wurde inklusive Fettschicht vorsichtig abgenommen und das Pellet extrahiert.

Prüfung auf PCR-Inhibition

Zur Überprüfung, ob der Anstieg der CP-Werte Inhibitoren im Extrakt geschuldet war, die eventuell protokollabhängig unterschiedlich stark auftraten, wurden die jeweiligen Extrakte undotierter Milch, sowie zum Abgleich Aqua dest., mit MAP-DNA (Reinkulturextrakt aus PBS) zu den Endkonzentrationen von 500 pg/µl (= 10⁵ MAP-Genome/µl) in Zehnerschritten bis 50 fg/µl (= 10 MAP-Genome/µl) dotiert und 2 µl als Template in die qPCR eingesetzt. Die Auswertung erfolgte durch Vergleich der einzelnen CP-Werte und Amplifikationskurven der dotierten Milchextrakte mit den CP-Werten und Amplifikationskurven des dotierten Aqua dest..

2.2.5 Erarbeitung eines Protokolls zum qPCR-basierten Nachweis von MAP mittels Sybr-Green in Milch und Ermittlung der Nachweisgrenze

Zur MAP-Gewinnung aus Milch wurde das Protokoll nach Gao et al. (2007) verwendet. Aufgrund der zu erwartenden hohen Verluste durch die Zentrifugation wurde, um die Nachweisgrenze zu erhöhen, mit 50 ml Ausgangsvolumen gearbeitet. Für die Extraktion des Pellets mit dem Blood and Tissue Kit von Qiagen ergaben sich nach hier nicht im Einzelnen aufgeführten Vorversuchen aufgrund der erhöhten abzentrifugierten Milchmenge folgende Änderungen in Anlehnung an Protokoll 3 der Blood and Tissue Kit-basierten Extraktion: Es wurden jeweils die dreifachen Volumina an Lysepuffer, Proteinase K, Puffer AL und Ethanol verwendet. Die Zellysate wurden portionsweise zu je 650 µl auf die Säule gegeben, abzentrifugiert, das Eluat verworfen und solange weiteres Lysat á 650 µl auf dieselbe Säule gegeben und abzentrifugiert, bis das komplette Zellysate aufgebraucht war. Nach Bindung der DNA an die Säule wurde nach Protokoll 3 (siehe 2.2.4.1) weiterverfahren. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurden dekadische Verdünnungsreihen von MAP DSM 44133 in PBS

hergestellt und 50 ml Milch mit 10^7 bis 10^1 MAP artifiziell kontaminiert. Der Versuch wurde sowohl mit Frischmilch als auch mit Vorzugsmilch in jeweils zwei biologischen Replikaten durchgeführt. Die Milchproben wurden über Kultur (siehe 2.1.5) auf die Anwesenheit von MAP vor der Dotierung überprüft. Ebenso wurde jeweils ein undotierter Leerwert bei der Bestimmung der Nachweisgrenze via qPCR mitgeführt. Die Auswertung erfolgte anhand folgender Primerpaare, die unterschiedliche Targets im MAP-Genom amplifizieren, wie in Tabelle 13 gezeigt:

Tabelle 13: Getestete Primerpaare zum MAP-Nachweis in Milchproben mittels Sybr-Green qPCR

Primer-paar	Target	Kopienzahl	Quelle zu Mastermix / PCR-Bedingungen für Sybr-Green qPCR	Quelle zu Primersequenzen
F57 FW/RV	<i>f57</i>	Single-copy	Diese Arbeit (Tabelle 33, Tabelle 34)	Tasara und Stephan, 2005
8771/B FW/RV	codierende Sequenz für ETB08771	Single-copy	Diese Arbeit (Tabelle 33, Tabelle 34)	Diese Arbeit
2420/A FW/RV	codierende Sequenz für AAS02420	Single-copy	Diese Arbeit (Tabelle 33, Tabelle 34)	Diese Arbeit
ISMAP04 FW/RV	<i>ISMAP04</i>	Multi-copy: 4 Kopien (Li et al., 2005)	De Kruijf et al., 2017	De Kruijf et al., 2017

Mittels F57-qPCR konnten anhand des Genomäquivalent-Standards die Genomausbeuten aus den unterschiedlichen dotierten Milchproben berechnet werden. Die Überprüfung der Amplifikate erfolgte über Gelelektrophorese.

Zur Sicherung der Nachweisgrenze wurden in 50 ml Frischmilch bzw. Vorzugsmilch zwei weitere MAP-Stämme (MAP DSM 44135 und MAP MS-4 Feldisolat) jeweils in den Verdünnungsstufen 10^4 , 10^3 und 10^2 MAP/50 ml eingemischt und die Nachweisgrenze anhand der Sybr-Green qPCR mit Primerpaar F57 bzw. ISMAP04 bestimmt.

2.2.6 Orientierender MAP-Nachweis in Konsummilch aus dem Handel

Es wurden 20 kommerziell erhältliche Packungen pasteurisierter Frischmilch sowohl kulturell als auch via qPCR analysiert. Zusätzlich erfolgte die Beprobung einer in Bayern erhältlichen Vorzugsmilch. Diese wurde insgesamt dreimal vor Ablauf der drei unterschiedlichen Verbrauchsdaten kulturell und PCR-basiert untersucht. Dazu wurden unter sterilen Bedingungen sowohl für den kulturellen als auch für den PCR-basierten Nachweis jeweils

50 ml entnommen und sofort gekühlt bei 4 °C gelagert. Die kulturelle Anzucht erfolgte unmittelbar am Tag nach Probennahme nach dem Protokoll von Dundee et al. (2001) (siehe 2.1.5). Für die Analyse mittels qPCR wurde das in dieser Arbeit etablierte Protokoll zur Probenaufbereitung verwendet (siehe 2.2.5). Die qPCR erfolgte mit dem hier etablierten PCR-Programm für das Primerpaar F57 (Tabelle 33 und Tabelle 34) und mit dem Primerpaar ISMAP04 nach De Kruijf et al. (2017). Als back-up wurden weitere 100 ml auf -20 °C gelagert, um im Falle eines Positivergebnisses die Untersuchung wiederholen zu können, mit dem Ziel, Kontaminationen auszuschließen.

2.2.7 Quantitative Lebend-Tot-Unterscheidung von MAP über DNA-interferierende Reagenzien und anschließender qPCR

Die herkömmliche qPCR erlaubt keine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen. Reagenzien wie EMA, PMA oder PMAxx versprechen eine Bindung an die DNA ausschließlich toter Zellen, was in der darauffolgenden PCR zur Hemmung der Amplifikation führen soll. Dadurch soll der Nachweis ausschließlich lebender Zellen ermöglicht werden.

2.2.7.1 Abtötungsstrategien für MAP

In Vorexperimenten wurden Abtötungsstrategien für MAP untersucht um geeignete Tot-Kontrollen zu erhalten. Es sollte eine Abtötungsmethode gefunden werden, die MAP einerseits sicher abtötet, andererseits sollten keine größeren Schäden an der DNA hervorgerufen werden. Solche Schäden könnten in der Validierung der weiter unten beschriebenen Experimente zu Störungen bei der Auswertung führen.

Autoklavieren bzw. Erhitzen im Wasserbad

MAP DSM 44133 wurde von HEYM abgeschwemmt, bei 16000 x g für 10 min abzentrifugiert und in 1 ml PBS resuspendiert. Die Probe wurde mit dem Vortex-Gerät vermischt und mittels Zählkammer auf eine Zellkonzentration von ca. 10^8 MAP/ml mit PBS eingestellt. Jeweils 100 µl dieser Suspension (entspricht 10^7 MAP absolut) wurden in elf 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Vier Ansätze wurden unter folgenden Bedingungen autoklaviert: 121 °C, 20 min. Weitere vier Ansätze wurden im Wasserbad für 30 min bei 90 °C erhitzt. Im Anschluss wurden jeweils zwei der autoklavierten und erhitzten Proben auf M7H10-Festagar + Mykobaktin (2 mg/l) ausplattiert, die Platten mit Parafilm verschlossen und 16 Wochen bei 37 °C bebrütet. Als Positivkontrolle diente ein unbehandeltes Aliquot, das ebenfalls auf M7H10-Festagar + Mykobaktin (2 mg/l) ausplattiert wurde. Zur Beurteilung der Abtötungseffizienz wurden die Platten nach 16 Wochen auf Koloniebildung untersucht. Zur

Beurteilung von möglichen DNA-Schäden, die die PCR negativ beeinflussen könnten, wurden jeweils zwei Aliquots der bei 90 °C inkubierten, der autoklavierten und nicht behandelten Zellen mittels Blood and Tissue Kit nach Protokoll 3 (siehe 2.2.4.1) extrahiert und die optimierte quantitative F57-PCR durchgeführt. Mastermix und PCR-Programm sind Tabelle 33 und Tabelle 34 zu entnehmen.

Durch Vergleich der CP-Werte aus der Gruppe ‚autoklaviert‘ bzw. ‚erhitzt‘ mit der Gruppe ‚nicht behandelt‘ konnte beurteilt werden, ob trotz Einsatzes der gleichen Menge an Zellen die extrahiert wurde, in der PCR signifikant höhere CP-Werte vorlagen, nachdem die Zellen behandelt wurden. Dies wäre ein Indiz für DNA-Schädigungen, die in der PCR auch ohne Wirkung eines DNA-interagierenden Reagenz zu einer niedrigeren Quantifizierung führen und so die Werte verfälschen.

2.2.7.2 Vergleich der Reagenzien EMA, PMA und PMAxx zur Lebend-Tot-Unterscheidung von MAP in Reinkultur

Pro Versuchsdurchgang wurde eine homogene MAP-Suspension (DSM 44133) durch Abschwemmen eines HEYM-Röhrchens nach 3–4 wöchiger Bebrütung hergestellt (siehe Abbildung 6), dies entspricht – nach der von Lambrecht et al. (1988) angegebenen Generationszeit von 24 Std – in etwa einer Anzahl von 21 bis 28 Generationen und somit in etwa der Generationszahl einer Übernachtkultur rasch wachsender Bakterien wie *E. coli*. Mit PBS wurde die Suspension auf eine Zellzahl von ca. 10^8 Zellen/ml eingestellt und in 12 durchsichtige 1,5 ml Reaktionsgefäße zu je 500 µl aufgeteilt. Die Hälfte wurde im Wasserbad bei 90 °C für 30 min zur Abtötung von MAP inkubiert. Jeder Versuch war folgendermaßen aufgebaut: 3 Proben enthielten 500 µl lebender MAP und wurden direkt extrahiert, 3 Proben enthielten 500 µl toter MAP und wurden direkt extrahiert, 3 Proben enthielten lebende MAP und wurden vor der Extraktion mit jeweiligem Reagenz behandelt, 3 Proben enthielten tote MAP und wurden vor der Extraktion mit dem jeweiligen Reagenz behandelt. Somit konnten die einzelnen Protokolle nach folgenden Berechnungen bewertet werden:

Delta CP 1: $CP_{\text{lebend mit Reagenz}} - CP_{\text{lebend ohne Reagenz}}$

Delta CP 2: $CP_{\text{tot mit Reagenz}} - CP_{\text{tot ohne Reagenz}}$

Delta CP 3: $CP_{\text{tot mit Reagenz}} - CP_{\text{lebend mit Reagenz}}$

Im Idealfall sollten sich folgende Situationen ergeben:

Delta CP 1 – niedriger Wert, da die Amplifikation der DNA lebender Zellen nicht gehemmt wird.

Delta CP 2 – hoher Wert, da die Amplifikation der DNA toter Zellen maximal gehemmt wird.

Delta CP 3 – hoher Wert, da nur die Amplifikation der DNA toter Zellen gehemmt wird.

In Abbildung 13 wird die Vorgehensweise bei Behandlung der Proben mit den Reagenzien beschrieben.

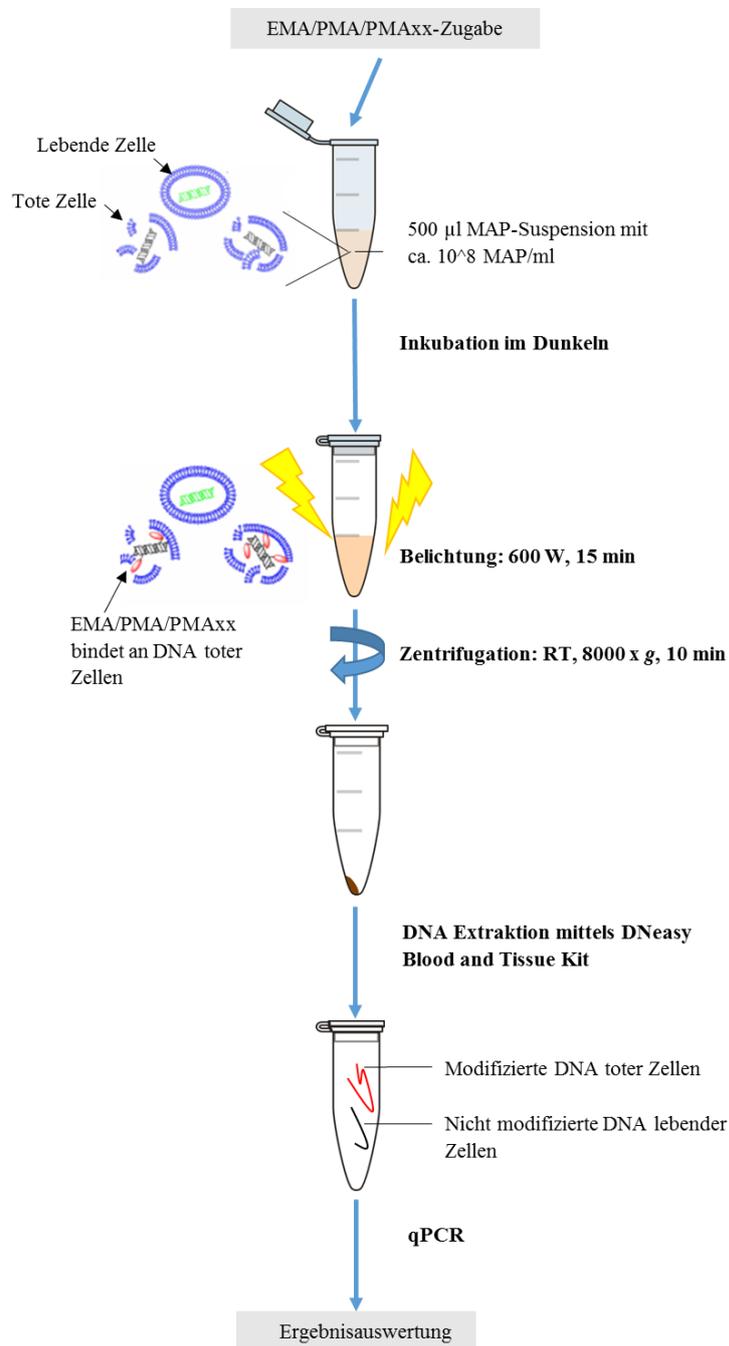


Abbildung 13: Prinzip der DNA-interagierenden Reagenzien EMA, PMA, PMAxx

Die Inkubation der Reagenzien erfolgte jeweils im Dunkeln für 5 min auf Raumtemperatur (RT) im Intellimixer bei 25 rpm. Die Lichtexpositionsdauer wurde bei allen Versuchen auf 15 min gesetzt. Gegen Erhitzung der Proben während der Bestrahlung wurden die Proben im 45 °-Winkel auf Eis gelegt. Die Extraktion erfolgte mit dem Blood and Tissue Kit nach Protokoll 3 (siehe 2.2.4.1), die Auswertung anhand der optimierten F57-qPCR (Tabelle 33

und Tabelle 34). Dabei wurden 2 Optimierungsversuche getestet. In Tabelle 14 sind die getesteten Parametervariationen für alle drei Reagenzien aufgelistet.

Tabelle 14: Getestete Optimierungsprotokolle für EMA, PMA und PMAxx

Reagenz	Versuchslauf 1		Versuchslauf 2		Versuchslauf 3	
	Konzentration final	Zahl der Behandlungen	Konzentration final	Zahl der Behandlungen	Konzentration final	Zahl der Behandlungen
EMA	10 µg/µl	1	10 µg/µl	2	100 µg/µl	1
PMA	25 µM	1	25 µM	2	50 µM	1
PMAxx	25 µM	1	25 µM	2	50 µM	1

Versuchslauf 1 entsprach dabei für PMA und PMAxx den Herstellerangaben, für EMA wurde die Konzentration aufgrund fehlender Herstellerangaben aus entsprechenden Publikationen gewählt (Nogva et al., 2003). Als Optimierungsversuche wurden höhere Konzentrationen des Reagenz eingesetzt oder die Inkubation mit Reagenz ein zweites Mal wiederholt: Dazu wurde nach erfolgter Inkubation und Lichtexposition die Zellsuspension abzentrifugiert, das Pellet mit PBS resuspendiert und ein weiteres Mal mit Reagenz zur gewünschten Endkonzentration versetzt, inkubiert und belichtet.

2.2.7.3 Optimierung der PMA-qPCR-Methode für MAP in Reinkultur

Nach den ersten Vorversuchen aus 2.2.7.2 wurde PMA als Reagenz der Wahl für MAP weiteren Optimierungsschritten unterzogen. In Tabelle 15 sind alle getesteten Protokolle zur Lebend-Tot-Unterscheidung von MAP in Reinkultur zusammengefasst. Jedes Protokoll wurde anhand von MAP DSM 44133 in Triplikaten durchgeführt.

Tabelle 15: Getestete Optimierungsprotokolle für PMA

Protokoll	Konzentration (µM final)	Inkubationsdauer (min)	Inkubationstemperatur (°C)	Zahl der Behandlungen	Zugabe von Sodimdeoxycholat (0,01 % final) vor PMA-Zugabe
1	25	5	RT	1x	nein
2	25	5	RT	2x	nein
3	50	5	RT	1x	nein
4	50	5	RT	2x	nein
5	25	30	RT	1x	nein
6	25	5	47	1x	nein
7	25	30	47	1x	nein
8	25	5	RT	1x	ja

Folgende Parameter wurden bei allen Protokollen als fix gesetzt: Die Belichtungszeit betrug 15 min, die Proben wurden mit dem Blood and Tissue Kit nach Protokoll 3 (siehe 2.2.4.1) extrahiert, die Auswertung erfolgte anhand der optimierten F57-qPCR (Tabelle 33 und Tabelle 34) und den oben bereits beschriebenen Delta-CP-Werten.

2.2.7.4 Validierung der optimierten PMA-qPCR-Methode

Das optimierte Protokoll (Protokoll 5 aus Tabelle 15) wurde an zwei weiteren MAP-Stämmen (DSM 44135 und MS-4 Feldisolat) getestet, um stammspezifische Varianzen initial zu überprüfen.

Um zu testen, ob die PMA-qPCR Methode dafür geeignet ist, sichere Aussagen über das Vorliegen lebender Zellen in MAP-Suspensionen zu treffen, wurden folgende, stufenweise minimierte prozentuale Anteile an lebenden Zellen zu toten Zellen in einem Gesamtvolumen von 500 μl eingemischt (Gesamtzellzahl 5×10^7 Zellen/Ansatz): 100 %, 75 %, 50 %, 25 %, 10 %, 1 %, 0,1 % und 0 % lebende Zellen. Die PMA-Behandlung erfolgte nach den etablierten Parametern: Finale Endkonzentration 25 μM , einmalige Inkubation für 30 min bei RT im Dunkeln und anschließender Belichtung für 15 min. Die Zellen wurden bei 8000 $\times g$ für 10 min abzentrifugiert, das Pellet mittels Blood and Tissue Kit nach Protokoll 3 (siehe 2.2.4.1) extrahiert und die F57-qPCR (Tabelle 33 und Tabelle 34) durchgeführt. Der Versuch wurde mit dem MAP-Stamm DSM 44133 in Triplikaten durchgeführt. Zur Berechnung der jeweiligen CP-Werte $CP_{\text{Probe mit PMA}} - CP_{\text{Probe ohne PMA}}$ wurden im Dreifachansatz 5×10^7 Zellen im Gesamtvolumen von 500 μl ohne PMA-Behandlung direkt extrahiert. Ziel war es zu überprüfen, ob sich die Suspension mit ausschließlich toten Zellen von Suspensionen, die lebende Zellen enthielten, durch die etablierte PMA-qPCR-Methode differenzieren lässt.

IV. ERGEBNISSE

1. Vorbereitende Arbeiten

1.1 Stammsammlung Mykobakterien-Stämme und Kontrollkeime

Die Anzucht der von der DSMZ bezogenen Mykobakterienstämme auf Löwenstein-Jensen-Schrägagar war erfolgreich, worauf sie über Subkultur weiter expandiert wurden. Nach maximal 2 bis 3 Wochen Inkubation zeigten alle Stämme sichtbares Wachstum und konnten für Experimente eingesetzt werden. Die Nicht-Mykobakterienstämme konnten bei Gebrauch jeweils von der lehrstuhleigenen Cryobank bezogen und nach spätestens zwei Tagen verwendet werden.

1.2 MAP-Anzucht

Von den 12 erhaltenen MAP-Lyophilisaten wiesen nach maximal 6 Monaten Inkubationszeit nur wenige Stämme sichtbares Wachstum auf; diese Stämme wurden einer genaueren Identifikation via Ziehl-Neelsen-Färbung und PCR unterzogen. Des Weiteren wurden makroskopisch nicht erkennbar bewachsene HEYM-Röhrchen nach 6 Monaten mit PBS abgeschwemmt und die Suspension ebenfalls untersucht. Tabelle 16 zeigt die Ergebnisse der Analysen auf.

Tabelle 16: Ergebnisse MAP-Anzucht

Bezeichnung	Wachstum			Färbung	PCR			Bewertung
	HEYM	M7H9 m. M. ¹	M7H10 o. M. ²	Ziehl- Neelsen	F57	IS900	MYCO	
MAP 442	nein	nein	nicht geprüft	vereinzelte rote Stäbchen	negativ	schwach positiv	schwach positiv	MAP nachweisbar, nicht kultivierbar
MAP 4102-116	nein	nein	nicht geprüft	keine Bakterien vorzufinden	negativ	schwach positiv	schwach positiv	MAP nachweisbar, nicht kultivierbar
MAP 4102-33	nein	nein	nicht geprüft	vereinzelte rote Stäbchen	negativ	schwach positiv	schwach positiv	MAP nachweisbar, nicht kultivierbar
MAP 4102-31	nein	nein	nicht geprüft	vereinzelte rote Klumpen	negativ	schwach positiv	negativ	MAP nachweisbar*, nicht kultivierbar
MAP 4102-95	nein	nein	nicht geprüft	vereinzelte rote Klumpen	negativ	schwach positiv	schwach positiv	MAP nachweisbar, nicht kultivierbar
MAP K3- Eimer	nein	nein	nicht geprüft	keine Bakterien vorzufinden	negativ	schwach positiv	schwach positiv	MAP nachweisbar, nicht kultivierbar
MAP DSM 44133	ja	ja	nicht geprüft	viele rote Stäbchen	stark positiv	stark positiv	stark positiv	MAP identifiziert und kultivierbar
MAP DSM 44135	ja	ja	nicht geprüft	viele rote Stäbchen	stark positiv	stark positiv	stark positiv	MAP identifiziert und kultivierbar
MAP MS-4	ja	ja	nicht geprüft	viele rote Stäbchen	stark positiv	stark positiv	stark positiv	MAP identifiziert und kultivierbar
MAP MS-6	nein	nein	nicht geprüft	keine Bakterien vorzufinden	negativ	negativ	schwach positiv	Mykobakterium nachweisbar, nicht kultivierbar
MAP MS-8	ja	ja	ja	viele rote Stäbchen	negativ	negativ	stark positiv	Mykobakterium identifiziert, MAP ausgeschlossen
MAP MS-10	ja	ja	ja	viele rote Stäbchen	negativ	negativ	stark positiv	Mykobakterium identifiziert, MAP ausgeschlossen

¹: m. M.: mit Mykobaktin, ²: o. M.: ohne Mykobaktin; * die IS900-PCR weist ein multi-copy-Element nach und ist daher als sensitiver anzusehen als die verwendete Genus-PCR

Wie der Tabelle 16 zu entnehmen, konnten 5 von 12 lyophilisierten Bakterienstämmen kultiviert werden. Die MAP-Typstämme DSM 44133 und 44135 sowie das Feldisolat MAP MS-4 konnten über Ziehl-Neelsen-Färbung und MAP-spezifische PCR eindeutig als MAP-Stämme identifiziert werden und wurden als Langzeitkultur weitergeführt. Die erhaltenen Lyophilisate MAP MS-8 und MAP MS-10 wurden aufgrund ihrer Vermehrungsfähigkeit auf Nährmedium ohne Mykobaktin und ihres negativ-Ergebnisses der MAP-spezifischen PCR als nicht MAP-zugehörig deklariert. Bei diesen zwei Isolaten handelte es sich um säurefeste Stäbchen, die über die Mykobakterien-spezifische PCR diesem Genus zugeordnet werden konnten. Es konnten demnach zwar Mykobakterien, nicht aber MAP kultiviert und identifiziert werden. MAP MS-6 zeigte lediglich bei der Mykobakterien-spezifischen PCR ein schwach positives Signal. In allen anderen Isolaten ließen sich zwar geringe DNA-Mengen mittels IS900-PCR nachweisen, jedoch misslang die Kultivierung – der Versuch, die nicht bewachsenen HEYM-Röhrchen nach 6 Monaten abzuschwemmen und evtl. vorhandene MAP-Zellen durch die Überführung in Flüssigmedium zum Wachstum zu aktivieren, blieb auch nach weiteren 6 Monaten Inkubation ebenso erfolglos wie der wiederholte Anzuchtversuch mit biologischen Replikaten, trotz einer unmittelbaren Flüssiganzucht in selektiv supplementierten M7H9-Flüssigmedium.

1.3 Koloniemorphologie

Zur Untersuchung der Koloniemorphologie wurden MAP-Suspensionen auf HEYM-Schrägagar und auf M7H10-Agar-Platten mit und ohne Tween 80-Zusatz inkubiert. MAP zeigte Medium-spezifische, mitunter auch Inkubationsdauer abhängige Koloniemorphologien, die in Abbildung 14 und Abbildung 15 dargestellt sind.



Abbildung 14: MAP-Kolonien auf HEYM-Schrägagar

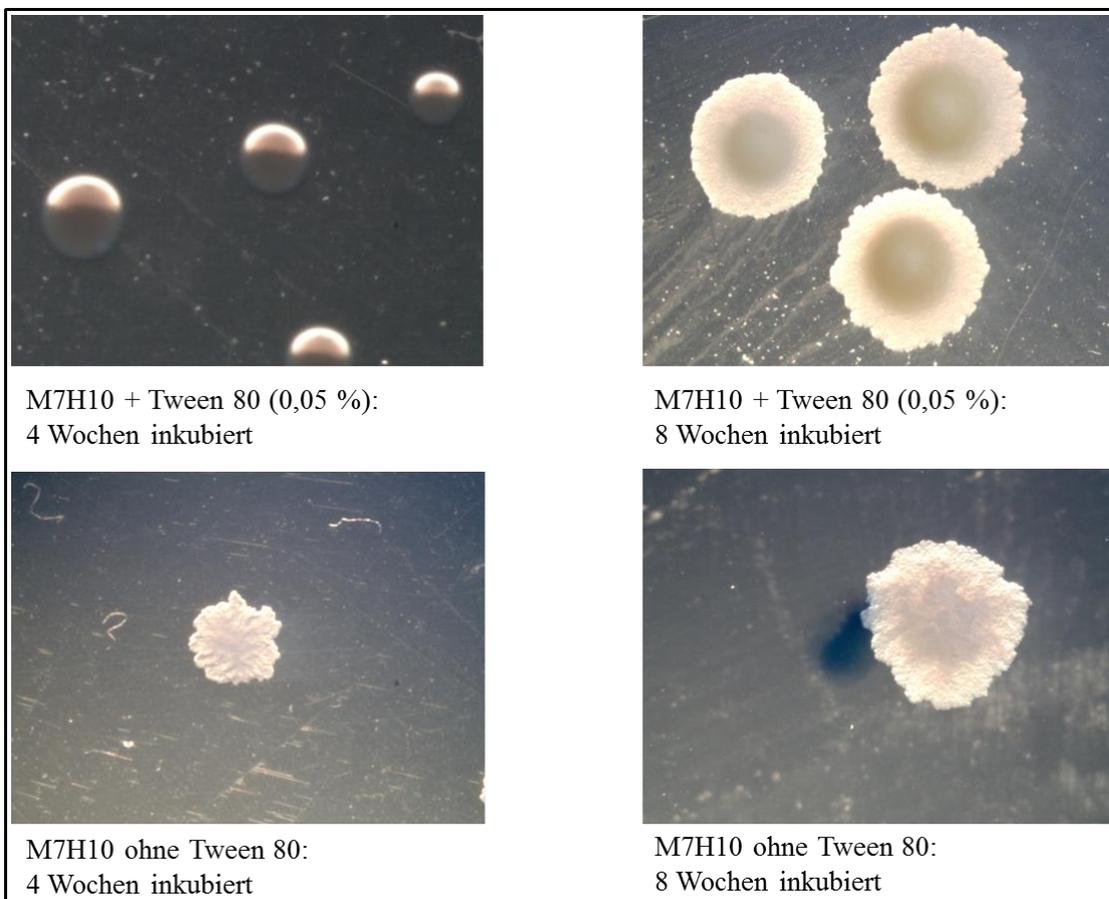


Abbildung 15: MAP-Kolonien auf M7H10-Platten

MAP bildet auf HEYM-Schrägagar glatte, kugelige, leicht glänzende, milchig erscheinende Kolonien mit einer Größe von ca. 2 mm nach 8 Wochen Inkubationszeit, wobei die Koloniegröße, je nach Dichte des Kolonierasens, stark variieren kann. Ähnlich erscheinen frühe Kolonien auf M7H10-Platten mit Tween 80-Zusatz, die ebenfalls eine kugelige, glatte Oberfläche aufweisen und nach 4 Wochen eine Größe von ca. 0,5–1 mm einnehmen. Mit längerer Inkubationsdauer bilden diese eine charakteristische Form mit rauem, abgeflachtem

weißem Rand und einer zentralen Erhebungen aus. Auf M7H10-Agar ohne Tween 80-Zusatz bilden sich schon in der frühen Phase raue, flache und ca. 0,5 mm große Kolonien, die mit der Zeit nur ihre Größe, nicht jedoch ihre Oberflächenbeschaffenheit verändern. Abbildung 16 zeigt die vergrößerte Oberflächenstruktur einer MAP-Kolonie nach 8 Wochen Bebrütung auf M7H10-Platten ohne Tween-Zusatz. Nach dieser Inkubationszeit erreichen einzelne Kolonien des MAP DSM-Stammes 44133 eine Größe von ca. 2 mm.



Abbildung 16: Oberflächenbeschaffenheit MAP-Kolonie auf M7H10-Platten

1.4 Aggregatbildung unter verschiedenen Anzuchtbedingungen

In diesem Versuch sollte die Aggregatbildung untersucht werden. Dazu wurde MAP im Flüssigmedium M7H9 + Mykobaktin (2 mg/l) mit unterschiedlichen Tween 80-Konzentrationen schüttelnd für 2,5 Wochen inkubiert und die Flüssigkulturen fotografiert bzw. nach erfolgter Ziehl-Neelsen-Färbung mikroskopiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt. Die gezeigten Gesichtsfelder stellen dabei exemplarisch das überwiegend vorgefundene Bild dar.

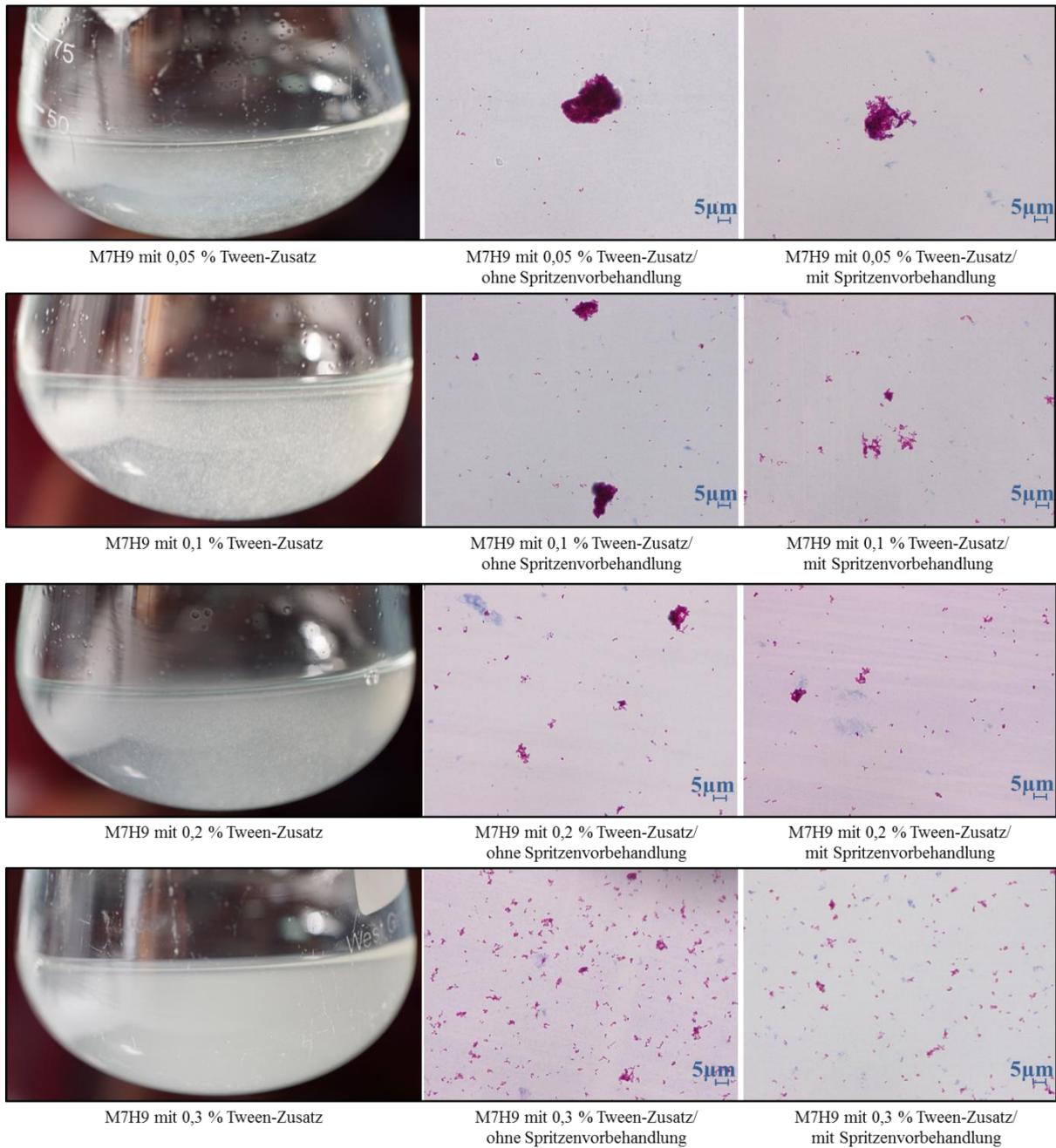


Abbildung 17: Aggregatbildung unter verschiedenen Anzuchtbedingungen

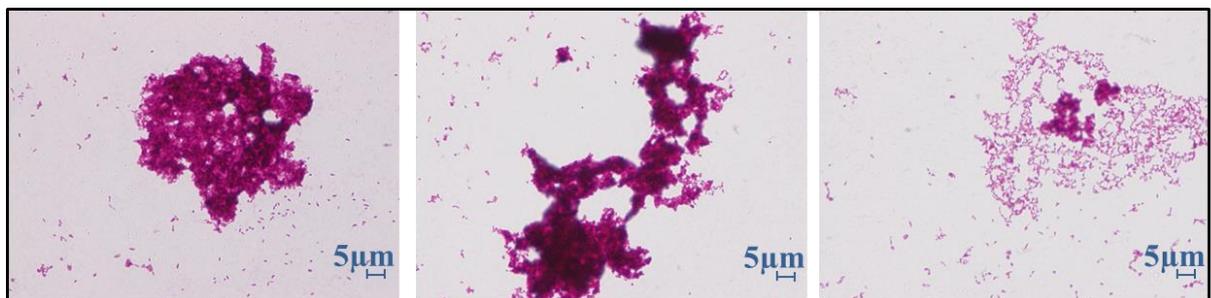


Abbildung 18: Große Aggregate verschiedener Kulturansätze (links 0,05 % Tween, mittig 0,1 % Tween, rechts 0,2 % Tween)

Die makroskopische Beurteilung der Flüssigkulturen erbrachte folgende Ergebnisse: Die MAP-Kulturen in M7H9-Medium mit 0,05 %, 0,1 % und 0,2 % Tween wiesen alle sichtbare Aggregate auf, die vereinzelt auf eine Durchmessergröße von über 100 μm geschätzt wurden (siehe dazu fotografische Aufnahmen aus Abbildung 17 und mikroskopische Aufnahmen aus Abbildung 18). Abbildung 17 zeigt die mit steigender Tween-Konzentration zunehmend homogene Trübung des Mediums, die sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch erkennbar durch eine Reduktion der Aggregatgröße und insbesondere im 0,3 % Tween-Ansatz durch vermehrt vorliegende Einzelzellen begleitet ist. Der Versuch, vorhandene Aggregate durch Auf- und Abpipettieren durch eine dünne Spritzennadel durch Scherkräfte aufzulösen, erwies sich in keinem der Ansätze als zufriedenstellend. In Abbildung 19 ist das mikroskopische Bild nach Ziehl-Neelsen-Färbung einer abgeschwemmten MAP-Suspension von HEYM-Agar ohne jegliche Vorbehandlung gezeigt. Die Zellen lagen homogen verteilt als Einzelzellen vor (Abbildung 19, links), vereinzelt zeigten sich Anhäufungen von höchstens 5 MAP-Zellen (Abbildung 19, rechts).

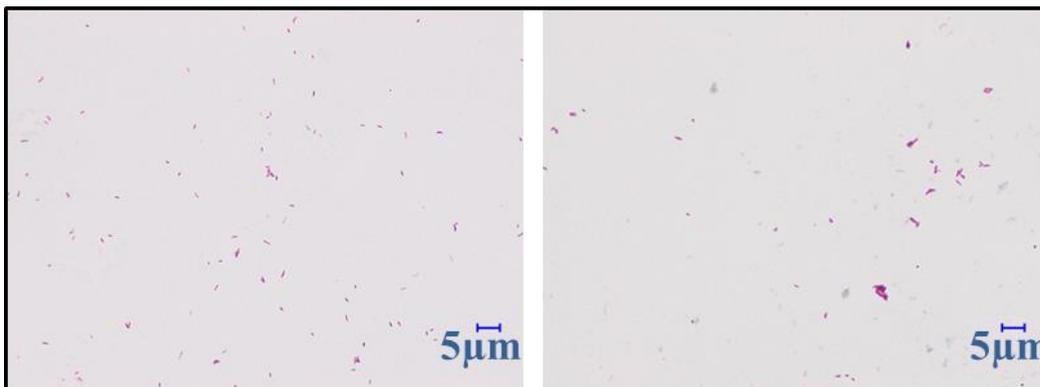


Abbildung 19: MAP-Suspension nach Abschwemmung eines HEYM-Agar-Röhrchens

1.5 Zellquantifizierung von MAP-Kulturen

Verschiedene Methoden der Zellzahlquantifizierung einer abgeschwemmten MAP-Suspension von HEYM-Schrägagar und Flüssigkulturen unterschiedlichen Tween-Zusatzes wurden vergleichend gegenübergestellt, um den Effekt der Aggregatbildung auf die Keimzahlbestimmung zu untersuchen. In Tabelle 17 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 17: Zellquantifizierungen unterschiedlicher MAP-Kulturen anhand unterschiedlicher Methoden

Kultur	A1	A2	B1	B2	C1	C2	D1	D2	E
OD									
MW	0,054	0,048	0,128	0,164	0,255	0,279	0,987	0,976	2,297
SD	0,018	0,007	0,019	0,011	0,032	0,023	0,043	0,027	0,051
Zählkammer: Zellen/ml									
MW	1,40E+07	1,60E+07	2,80E+07	4,50E+07	6,35E+07	5,80E+07	1,70E+08	1,70E+08	1,50E+09
SD	5,66E+06	1,41E+06	4,24E+06	4,24E+06	7,07E+05	0,00E+00	1,41E+07	2,83E+07	1,00E+08
Oberflächenspatelverfahren: KbE/ml									
MW	2,33E+07	2,52E+07	5,36E+07	5,55E+07	8,59E+07	9,14E+07	3,62E+08	2,88E+08	9,28E+08
SD	3,21E+06	9,64E+05	2,57E+06	3,86E+06	1,89E+07	1,09E+07	4,50E+06	1,41E+07	8,59E+07
qPCR: Zellen/ml									
Kultur	A		B		C		D		E
MW	3,66E+08		5,28E+08		6,36E+08		6,86E+08		9,43E+08
SD	2,69E+07		2,29E+07		3,81E+07		4,89E+07		1,20E+08

(**A1**: M7H9 Schüttelkultur mit 0,05 % Tween 80, **A2**: M7H9 Schüttelkultur mit 0,05 % Tween 80; mit Spritzenvorbehandlung, **B1**: M7H9 Schüttelkultur mit 0,1 % Tween 80, **B2**: M7H9 Schüttelkultur mit 0,1 % Tween 80; mit Spritzenvorbehandlung, **C1**: M7H9 Schüttelkultur mit 0,2 % Tween 80, **C2**: M7H9 Schüttelkultur mit 0,2 % Tween 80; mit Spritzenvorbehandlung, **D1**: M7H9 Schüttelkultur mit 0,3 % Tween 80, **D2**: M7H9 Schüttelkultur mit 0,3 % Tween 80; mit Spritzenvorbehandlung, **E**: HEYM-Abschwemmung, **A, B, C, D, E**: jeweiliger Komplettsatz, **MW**: Mittelwert, **SD**: Standardabweichung)

Bei der Analyse der Zahlenwerte in Tabelle 17 gilt es zu beachten, dass die wahre MAP-Konzentration in den Suspensionen unbekannt ist, da in den Flüssigkulturen zwischen der identischen Inokulierung mit 10^5 MAP pro ml und der Quantifizierung ein Inkubationszeitraum von 2,5 Wochen lag; auch zur von HEYM-Agar abgeschwemmten Suspension kann kein wahrer Wert vorab definiert werden. Somit müssen die Ergebnisse primär zwischen den unterschiedlichen Quantifizierungsmethoden innerhalb derselben Suspension verglichen werden. Hierbei zeigte sich, dass ausschließlich in der von HEYM-Agar abgeschwemmten MAP-Suspension mit allen verwendeten Zellquantifizierungsmethoden sehr ähnliche Werte erreicht werden konnten: Die Zellzahl der Suspension wurde anhand der unterschiedlichen Methoden auf Werte zwischen $9,28 \times 10^8$ /ml und $1,5 \times 10^9$ /ml gesetzt (maximale Differenz 0,2 \log_{10} -Stufen). Die

Quantifizierung der 0,3 %igen Tween-Kultur erbrachte für alle angewandten Methoden Unterschiede von maximal einer halben \log_{10} -Stufe: Während die Zellzahl mittels Zählkammer auf $1,7 \times 10^8/\text{ml}$ berechnet wurde, näherten sich die KbE mit $3,62 \times 10^8/\text{ml}$ bzw. $2,88 \times 10^8/\text{ml}$ mit Spritzenvorbehandlung dem qPCR-Wert von $6,86 \times 10^8/\text{ml}$ an. Mit sinkender Tween 80-Konzentration stieg die Differenz der anhand unterschiedlicher Methoden bestimmten Zellzahlen innerhalb eines Ansatzes an und erreichte bei 0,05 % Tween 80-Konzentration einen Unterschied von weit über einer log-Stufe. Dabei galt für alle Flüssigkulturen: Die Werte aller Zellquantifizierungsmethoden, die auf ein Aliquotieren der Probe beruhten und durch Hochrechnung auf die Zellzahl/ml geschlossen wurde (Zählkammer, KbE), wiesen untereinander ähnliche Werte auf (vgl. Tabelle 17). Erst die Quantifizierungsmethode über qPCR des Gesamtansatzes zeigte, dass alle anderen Methoden zur Zellzahlbestimmung eine deutliche Unterschätzung der tatsächlich in Suspension befindlichen MAP-Zellen erbrachte. Dies galt auch dann, wenn vor Verwendung der Methoden OD-Messung, Zählkammer und KbE versucht wurde, durch Einwirkung von Scherkräften anhand einer Spritzennadel die Aggregate zu lösen. Vergleicht man die Zellzahlen zwischen den Ansätzen in Flüssigkultur miteinander, so steigt, unabhängig von der gewählten Quantifizierungsart, die Zellzahl mit steigender Tween-Konzentration an.

Die Werte der einzelnen Verdünnungsstufen innerhalb einer Quantifizierungsmethode waren weitestgehend plausibel (siehe dazu Tabelle 38 im Anhang). Korreliert man OD-Werte mit der über Zählkammer ermittelten Zellzahl der Suspension des abgeschwemmten HEYM-Röhrchens zur Erstellung eines Standards, so entsprach für den MAP-Stamm DSM 44133 eine OD von 1,033 einer Zellzahl von ca. $6,3 \times 10^8/\text{ml}$. Diese Korrelation ist annähernd vergleichbar zum Ansatz in Flüssigkultur mit 0,3 % Tween, hier entsprach eine OD von 0,987 einer molekularbiologisch quantifizierten Zellzahl von $6,86 \times 10^8/\text{ml}$.

1.6 Bestimmung der Nachweisgrenze beim kulturellen Nachweis von MAP in pasteurisierter Frischmilch und Vorzugsmilch

Zum kulturellen Nachweis von MAP wurde vor dem Aufbringen der Milchprobe auf HEYM-Agar die Dekontamination mittels 5-stündiger HPC-Inkubation nach Dundee et al. (2001) durchgeführt. In den eigenen Untersuchungen gelang mit dem MAP-Stamm DSM 44133 in 50 ml Vorzugsmilch wie auch in pasteurisierter Frischmilch eine Nachweisgrenze von 2×10^0 KbE/ml (Kolonien *f57*-positiv in der nachgeschalteten qualitativen PCR). Die undotierten Milchproben wiesen kein Koloniewachstum auf. Die Wiederfindungsraten betragen jeweils ca. 10–20 % des kultivierungsfähigen Dotierungs-Levels (vgl. Tabelle 18).

Tabelle 18: KbE nach Dekontamination

Spiking-Level (KbE)	Frischmilch (KbE nach Dekontamination)		Vorzugsmilch (KbE nach Dekontamination)	
	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 1	Ansatz 2
$\sim 10^3/50$ ml	87	103	95	140
$\sim 10^2/50$ ml	13	25	19	23

Exemplarisch sind in Abbildung 20 bewachsene HEYM-Röhrchen nach 12-wöchiger Inkubation der mit 10^3 und 10^2 MAP dotierten Vorzugsmilch gezeigt.

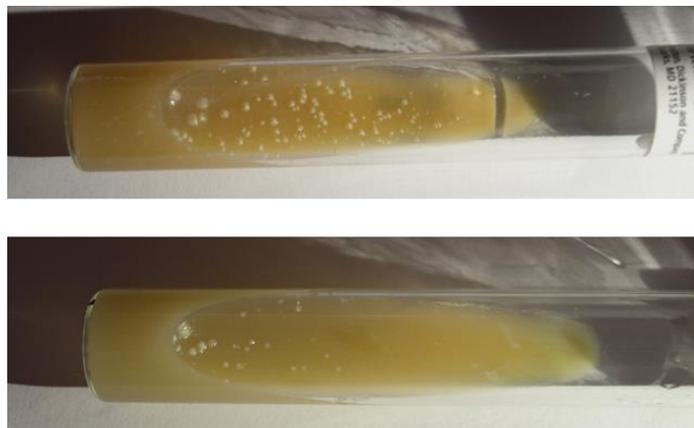


Abbildung 20: Kultureller Nachweis von 10^3 (oben) und 10^2 (unten) MAP in 50 ml Vorzugsmilch nach HPC-Dekontamination

Ein HEYM-Röhrchen zeigte nach Dekontamination von mit 10^5 MAP dotierter Vorzugsmilch eine Kontamination mit Begleitflora (siehe Abbildung 21) noch bevor MAP-Wachstum erkennbar war und musste somit verworfen werden.



Abbildung 21: Kontamination durch Begleitflora nach Dekontamination dotierter Vorzugsmilch

2. Molekularbiologischer Nachweis von MAP

2.1 Etablierung neuer MAP-spezifischer Primer

2.1.1 Generierung neuer MAP-spezifischer Primer auf Basis der Proteomanalyse

In der Proteomanalyse von MAP durch Kollegen des Lehrstuhls für Tierphysiologie am Helmholtz Zentrum München (Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt; *Research Unit Protein Science*) konnten insgesamt 2197 MAP-Proteine identifiziert werden, worunter 36 % hypothetische Proteine vorzufinden waren, was bedeutet, dass die bisher nur aufgrund der Sequenzierung des MAP-Genoms vermutete Existenz dieser Proteine nun bewiesen werden konnte. Die Mehrzahl der identifizierten Proteine zeigte in den drei Kulturansätzen (M7H9, Milch 4 °C und Milch 37 °C) eine gleichmäßige Expression und steht daher in Zukunft als Kandidaten zur Etablierung eines komplexen molekularbiologischen Nachweises zur Verfügung. Die Kandidatenproteine wurden am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch bereits über das Online-Tool BLAST umfassend auf ihre MAP-Spezifität hin überprüft, also darauf, ob sich die Sequenzen der Kandidatenproteine aus MAP deutlich von entsprechenden Sequenzen in anderen (Myko-)Bakterien unterscheiden. Für diese Arbeit wurden drei hoch abundante, MAP-spezifische Kandidatenpeptide ausgewählt, über deren Nukleotidsequenz folgende MAP-spezifische Primerpaare für den in dieser Arbeit relevanten molekularbiologischen Nachweis generiert wurden (Tabelle 19 bis Tabelle 30):

Tabelle 19: Primerpaar 4470/A

Target 1	Primer	Sequenz (5'→3')	Amplikonlänge
codierende	4470/A FW	TGAAGAGCACTTTCCCGACC	524
Sequenz für AAS04470	4470/A RV	GCCCAGGAATTGGGCTAGTT	

Tabelle 20: Spezifikation Primerpaar 4470/A

	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' compl.
FW	Plus	20	4060409	4060428	60.04	60.00	6.00	2.00
RV	Minus	20	4060715	4060969	59.97	60.00	5.00	2.00

Tabelle 21: Primerpaar 4470/B

Target 1	Primer	Sequenz (5'→3')	Amplikonlänge
codierende	4470/B FW	TAAGCTGCGGTGGGAGTTTC	192
Sequenz für AAS04470	4470/B RV	ATGGAGTTTCGGTGGTCTGG	

Tabelle 22: Spezifikation Primerpaar 4470/B

	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' compl.
FW	Plus	20	2385628	2385647	60.32	55.00	4.00	1.00
RV	Minus	20	2385819	2385800	59.68	55.00	2.00	0.00

Tabelle 23: Primerpaar 8771/A

Target 2	Primer	Sequenz (5'→3')	Amplikonlänge
codierende	8771/A FW	CATCGAATGACAGCGCAAGG	352
Sequenz für ETB08771	8771/A RV	CTAAAGCATGAACGAGCGGC	

Tabelle 24: Spezifikation Primerpaar 8771/A

	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' compl.
FW	Plus	20	4411509	4411528	59.97	55.00	4.00	0.00
RV	Minus	20	4411860	4411841	59,97	55.00	4.00	3.00

Tabelle 25: Primerpaar 8771/B

Target 2	Primer	Sequenz (5'→3')	Amplikonlänge
codierende	8771/B FW	GGTTGGTCTTCGGGGAATG	137
Sequenz für ETB08771	8771/B RV	CGGATCGGCAAGCCATAAGT	

Tabelle 26: Spezifikation Primerpaar 8771/B

	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' compl.
FW	Plus	20	4411540	4411559	60.68	60.00	3.00	1.00
RV	Minus	20	4411676	4411667	60,53	55.00	4.00	1.00

Tabelle 27: Primerpaar 2420/A

Target 5	Primer	Sequenz (5'→3')	Amplikonlänge
codierende	2420/A FW	CTACGAGCGGTCGAGAATCC	307
Sequenz für AAS02420	2420/A RV	CTGATCCTAGCAGGCTGACG	

Tabelle 28: Spezifikation Primerpaar 2420/A

	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' compl.
FW	Plus	20	4060409	4060428	60.04	60.00	6.00	2.00
RV	Minus	20	4060715	4060696	59.97	60.00	5.00	2.00

Tabelle 29: Primerpaar 2420/B

Target 5	Primer	Sequenz (5'→3')	Amplikonlänge
codierende	2420/B FW	GCGCCAACCTATCTCAACC	161
Sequenz für AAS02420	2420/B RV	GGATCCCCAGAAGCCGATCTA	

Tabelle 30: Spezifikation Primerpaar 2420/B

	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' compl.
FW	Plus	19	4056195	4056195	58.61	57.89	4.00	0.00
RV	Minus	21	4056355	4056335	60.83	57.14	6.00	2.00

2.1.2 Thermocyclerprogramme der neuen Primerpaare mit optimalen Annealing-Temperaturen zum qualitativen MAP-Nachweis

Für die Etablierung neuer Primerpaare zum molekularbiologischen Nachweis von MAP wurde für jedes neu generierte Primerpaar die optimale Annealing-Temperatur anhand einer Gradienten-PCR experimentell bestimmt. Für das Primerpaar 4470/A sind in Abbildung 22 und Abbildung 23 exemplarisch das Ergebnis der Gradienten-PCR und die TotalLab-Auswertung der Bandenintensitäten gezeigt.

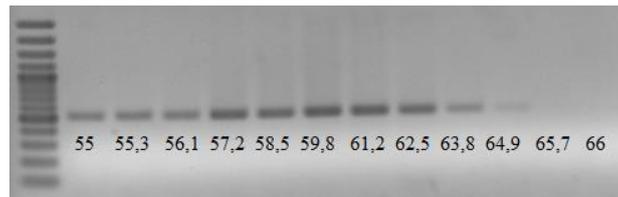


Abbildung 22: Gradienten-PCR 4470/A

(von links nach rechts: 100 bp ladder, Gradient für Annealing-Temperatur von 55 °C bis 66 °C)

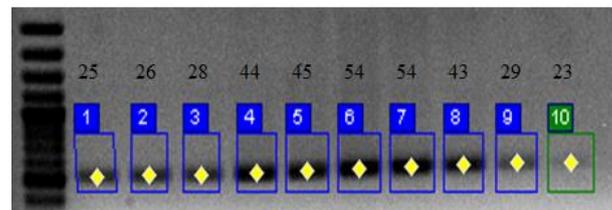


Abbildung 23: Berechnung der Bandenintensitäten zur Bestimmung der Annealing-Temperatur über Total Lab Software

(von links nach rechts: 100 bp ladder, Gradient für Annealing-Temperatur von 55 °C bis 66 °C; berechnete Bandenintensität jeweils oberhalb der Bande)

Auf Basis der Bandenintensitäten der Gradienten-PCR wurden folgende Thermocyclerprogramme für die verschiedenen MAP-spezifischen Primerpaare zur qualitativen PCR etabliert.

Tabelle 31: Thermocyclerprogramme für neue Primerpaare mit optimalen Annealing-Temperaturen

Schritt	Temperatur (°C)						Zeit
	4470/A	4470/B	8771/A	8771/B	2420/A	2420/B	
Initiale Denaturierung	94						3 min
Denaturierung	94						30 sek
Annealing	60	58	59	59	59	60	20 sek
Elongation	72						45 sek
Finale Elongation	72						5 min
Kühlung	4						∞

2.1.3 Spezifität der neu generierten Primerpaare

Die Konservierung der codierenden Sequenzen der neuen Targets im MAP-Genom wurde anhand drei verschiedener MAP-Stämme (MAP DSM 44133, MAP DSM 44135 und MAP MS-4 Feldisolat) getestet. Die Spezifität der Primerpaare wurde über die *in silico* Analysen hinaus an neun Mykobakterienstämmen, darunter zwei Vertreter der *M. avium*-Gruppe, sowie

13 Kontrollkeimen, die in Tank- und Konsummilchproben vorkommen, via qualitativer PCR experimentell überprüft. Folgende Abbildungen zeigen die visualisierten Amplifikate auf dem Agarosegel:

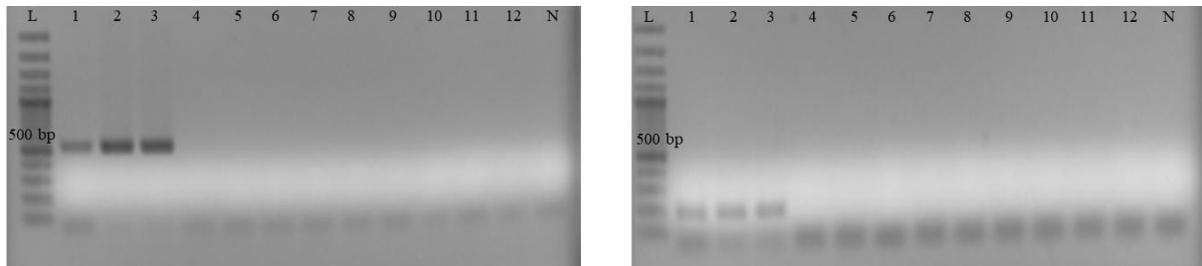


Abbildung 24: Spezifitätstest der neuen Primerpaare anhand unterschiedlicher Mykobakterienstämme. Links: Primerpaar 4470/A (spezifische Amplikonlänge: 524 bp). Rechts: Primerpaar 4470/B (spezifische Amplikonlänge: 192 bp)

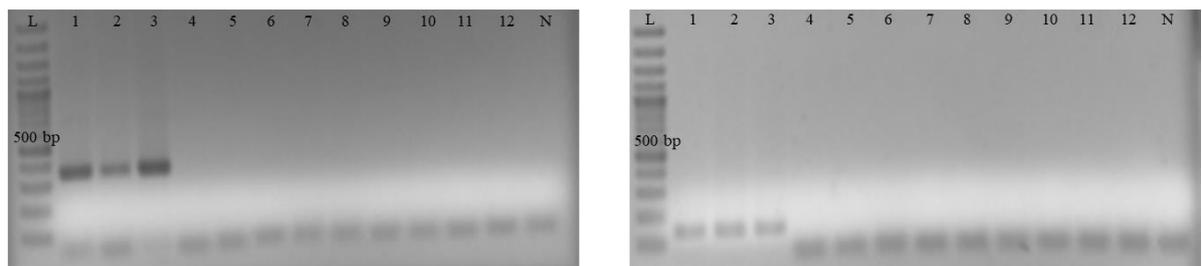


Abbildung 25: Spezifitätstest der neuen Primerpaare anhand unterschiedlicher Mykobakterienstämme. Links: Primerpaar 8771/A (spezifische Amplikonlänge: 352 bp). Rechts: Primerpaar 8771/B (spezifische Amplikonlänge: 137 bp)

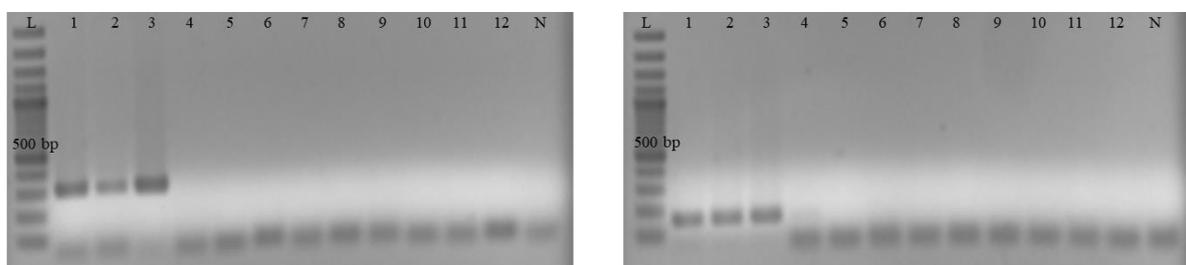


Abbildung 26: Spezifitätstest der neuen Primerpaare anhand unterschiedlicher Mykobakterienstämme. Links: Primerpaar 2420/A (spezifische Amplikonlänge: 307 bp). Rechts: Primerpaar 2420/B (spezifische Amplikonlänge: 161 bp)

(Abbildung 24 bis 26: L: 100 bp ladder, 1: MAP DSM 44133, 2: MAP DSM 44135, 3: MAP MS-4 Feldisolat, 4: *M. smegmatis*, 5: *M. celatum*, 6: *M. terrae*, 7: *M. intracellulare*, 8: *M. scrofulaceum*, 9: *M. avium* subsp. *avium*, 10: *M. avium* subsp. *silvaticum*, 11: *M. asiaticum*, 12: BCG, N: Negativkontrolle)

Alle sechs neu generierten Primerpaare zeigten ein positives Signal auf jeweilig erwarteter Bandenhöhe in der qualitativen PCR bei allen drei getesteten MAP-Stämmen. Es konnte keine Kreuzreaktivität mit den getesteten Mykobakterienstämmen festgestellt werden, ebenso wenig mit den 13 weiteren Kontrollkeimen (nicht gezeigt).

Des Weiteren wurde eine Kreuzreaktivität mit der Matrix Milch (Frischmilch und Vorzugsmilch) überprüft. Abbildung 27 bis Abbildung 29 zeigen die Ergebnisse der Gelelektrophorese nach der jeweiligen PCR.

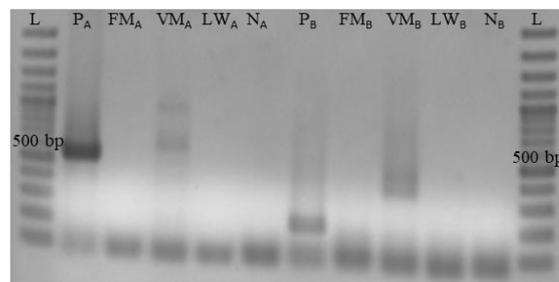


Abbildung 27: Spezifität in Matrix Milch: 4470/A, 4470/B Primer

(L: 100 bp ladder, A: Primerpaar 4470/A, B: Primerpaar 4470/B, P: Positivkontrolle, FM: Frischmilchextrakt, VM: Vorzugsmilchextrakt, LW: Extraktionsleerwert, N: Negativkontrolle)

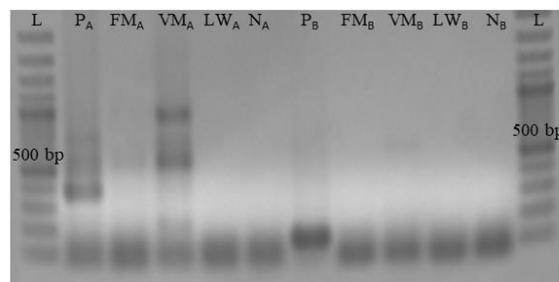


Abbildung 28: Spezifität in Matrix Milch: 8771/A, 8771/B Primer

(L: 100 bp ladder, A: Primerpaar 8771/A, B: Primerpaar 8771/B, P: Positivkontrolle, FM: Frischmilchextrakt, VM: Vorzugsmilchextrakt, LW: Extraktionsleerwert, N: Negativkontrolle)

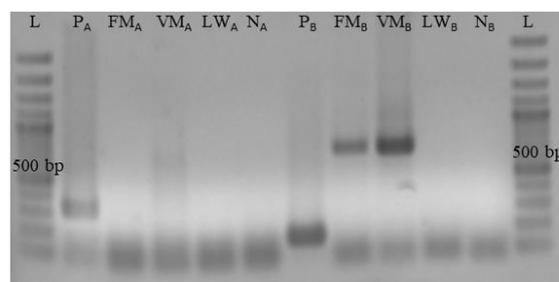


Abbildung 29: Spezifität in Matrix Milch: 2420/A, 2420/B Primer

(L: 100 bp ladder, A: Primerpaar 2420/A, B: Primerpaar 2420/B, P: Positivkontrolle, FM: Frischmilchextrakt, VM: Vorzugsmilchextrakt, LW: Extraktionsleerwert, N: Negativkontrolle)

Jedes der getesteten Primerpaare amplifizierte in der Matrix Vorzugsmilch unspezifische DNA-Abschnitte: Die Primerpaare 8771/B und 2420/A jedoch nur in sehr geringem Ausmaß mit unspezifischer Bandenhöhe bei ca. 700 bp, während die übrigen Primerpaare mitunter sehr starke unspezifische Amplifikationen (vgl. Abbildung 27, Abbildung 28 und Abbildung 29) bedingten. Primerpaar 2420/B generierte darüber hinaus starke unspezifische Banden im Frischmilchextrakt. Zum Vergleich: mit den bereits etablierten und in dieser Arbeit verwendeten Primerpaaren F57 und ISMAP04 wurden keine unspezifischen Banden in der Matrix Milch generiert (siehe dazu unter 2.5 im Ergebnisteil Abbildung 41 und im Anhang Abbildung 62).

2.2 Einstellen der PCR-Parameter zum quantitativen MAP-Nachweis via Sybr-Green qPCR anhand der Primerpaare F57, 8771/B und 2420/A

Optimierung der Primerkonzentration

Anhand einer dekadischen Verdünnungsreihe von MAP-DNA in Aqua dest. wurden die in der qPCR erreichten Effizienzen und Nachweisgrenzen bei Verwendung unterschiedlicher Primerkonzentrationen analysiert. Im Folgenden ist exemplarisch die Schritt-für-Schritt-Optimierung der Sybr-Green qPCR für das MAP-spezifische Primerpaar F57 dargestellt.

Tabelle 32: Rohdaten der Standardkurve: F57 Primerkonzentration 300 nM

Name	Sample Type	CP	Concentration	Tm Peak 1	Tm Peak 2	Standard
Verdünnungsstufe 1	Standard	14,92	1,03E1	88,70	X	1,00E1 ng
Verdünnungsstufe 2	Standard	18,51	9,24E-1	88,68	X	1,00E0 ng
Verdünnungsstufe 3	Standard	21,77	1,03E-1	88,72	X	1,00E-1 ng
Verdünnungsstufe 4	Standard	25,19	1,03E-2	88,65	X	1,00E-2 ng
Verdünnungsstufe 5	Standard	28,69	9,80E-4	88,70	X	1,00E-3 ng
Verdünnungsstufe 6	Standard	31,69	1,05E-4	88,74	X	1,00E-4 ng
Verdünnungsstufe 7	Standard	34,36	9,87E-6	74,03	88,60	1,00E-5 ng
Negativkontrolle	Negativ	35,00	1,00E-5	74,87	78,90	Neg

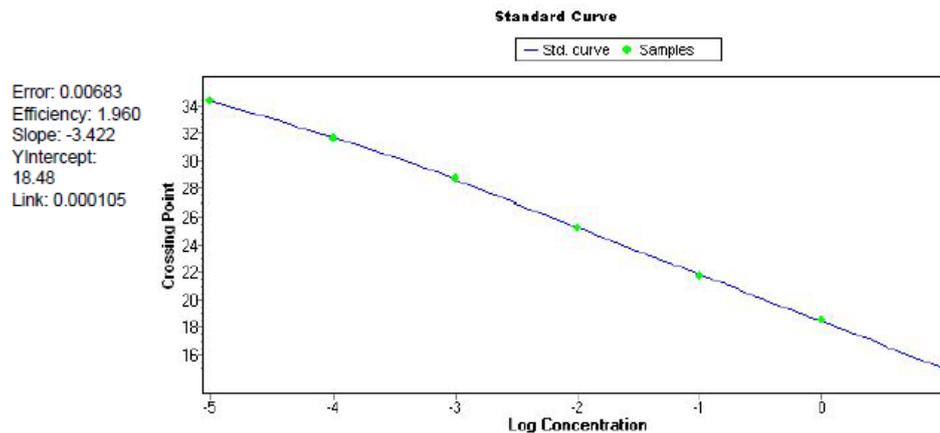


Abbildung 30: Standardkurve: F57 Primerkonzentration 300 nM

Abbildung 30 zeigt die Standardkurve, ermittelt über alle eingesetzten Verdünnungsstufen von 10 ng/PCR-Ansatz bis 10 fg/PCR-Ansatz bei einer Primerkonzentration von 300 nM in der F57-Sybr-Green qPCR. Die Nachweisgrenze lag bei 10 fg/PCR-Ansatz (vgl. Tabelle 32 Verdünnungsstufe 7: T_m-Peak bei 88,60 °C), was ca. 2 Genomen/Ansatz entspricht. Die Effizienz der Amplifikation erreichte 1,960. Die Negativkontrolle wies ebenfalls einen CP-Wert aufgrund von fluoreszierenden Primer-Dimeren auf (vgl. Tabelle 32 Negativkontrolle: T_m-Peaks bei 74,87 °C und 78,90 °C). Die Effizienz bei Einsatz geringerer Primerkonzentrationen erreichte einen Wert von 1,939 (200 nM Primerkonzentration) bzw. 1,846 im PCR-Ansatz mit 100 nM Primerkonzentration (siehe dazu Abbildung 54 und Abbildung 55 im Anhang). Die Nachweisgrenze betrug bei diesen geringeren Primerkonzentrationen jeweils 100 fg/PCR-Ansatz (siehe dazu Tabelle 40 und Tabelle 41 im Anhang).

Die Primerkonzentration von 300 nM im PCR-Ansatz erwies sich als geeignet, um in der qPCR eine möglichst hohe Amplifikationseffizienz und niedrige Nachweisgrenze zu erhalten. Da durch Reduktion der Primerkonzentration die Problematik der Primer-Dimer-Bildung nicht vermieden werden konnte, wurde ein weiterer PCR-Schritt eingeführt und getestet.

Einführung eines vierten PCR-Schrittes

Da die qPCR mittels Sybr-Green nicht unterscheidet, ob das Fluoreszenzsignal von dem spezifischen Amplikon oder Primer-Dimeren generiert wird, wurde ein zusätzlicher PCR-Schritt eingeführt, der Primer-Dimere, nicht aber das spezifische Amplikon aufschmilzt. Die Fluoreszenz wurde erst nach diesem Schmelzschrift gemessen. Abbildung 31 verdeutlicht das Prinzip anhand der T_m-Peaks eines F57-Amplifikationslaufes:

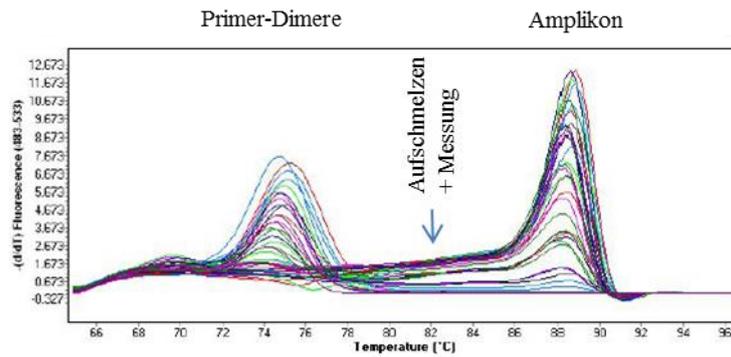


Abbildung 31: Einführung eines vierten PCR-Schrittes

Mit dem optimierten Mastermix und den optimierten PCR-Einstellungen am Lightcycler mit viertem PCR-Schritt bei 82 °C wurde über eine dekadische Verdünnungsreihe an MAP-DNA von 10 ng/ PCR-Ansatz bis 10 fg/ PCR-Ansatz wiederum Effizienz und Nachweisgrenze ermittelt. Die Ergebnisse zeigten, dass auch mit dem vierten PCR-Schritt die Effizienzen bei über 1,9 lagen (siehe dazu Abbildung 56 und Abbildung 57 im Anhang), der Nachweis wiederum bis 10 fg/PCR-Ansatz gelang und die Primer-Dimere sich nicht mehr in den CP-Werten und somit in der Konzentrationsberechnung wiederfanden (Tabelle 42 im Anhang). Damit wurde die optimale Amplifikation des MAP-spezifischen *f57*-Targets mit einer Primerkonzentration von 300 nM und dem Amplifikationsprogramm aus Tabelle 34 erreicht.

In Tabelle 33 und Tabelle 34 sind für alle 3 Primerpaare die erarbeiteten optimalen Mastermix-Zusammensetzungen und Amplifikationsprogramme zusammenfassend dargestellt:

Tabelle 33: optimierte Mastermixzusammensetzungen der Primerpaare F57, 8771/B und 2420/A zum quantitativen MAP-Nachweis via Sybr-Green qPCR

Reagenz	F57 (µl)	8771/B (µl)	2420/A (µl)
H ₂ O	6,8	7,2	7,2
Primer FW (10 µM)	0,6	0,4	0,4
Primer RV (10 µM)	0,6	0,4	0,4
KAPA Mastermix (2 x)	10 (1 x)	10 (1 x)	10 (1 x)
Template	2,0	2,0	2,0

Tabelle 34: optimierte Amplifikationsprogramme der Primerpaare F57, 8771/B und 2420/A für Sybr-Green qPCR

Program Name			amplification								
Cycles			40	Analysis Mode			Quantification				
Target (°C)			Acquisition Mode	Hold (sec)			Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95			None	10			4.40		0	0	0
F57	8771/B	2420/A	None	15			2.20		0	0	0
58	59	59									
72			None	F57	8771/B	2420/A	4.40		0	0	0
				11	10	12					
F57	8771/B	2420/A	Single	05			4.40		0	0	0
82	80	85									

Die Nachweisgrenzen lagen in Reinkultur-Extrakten bei allen drei Primerpaaren bei 100 fg/PCR-Ansatz (entspricht 20 Genomen/Ansatz) mit einer Wiederfindungsrate von 100 % und Effizienzen zwischen 1,9 und 2,0 in allen in dieser Arbeit ausgewerteten Läufen. Die Primerpaare F57 und 2420/A konnten in ca. 50 % aller während dieser Arbeit getätigten Läufe auch 10 fg/PCR-Ansatz detektieren.

2.3 Optimierung und Validierung der DNA-Extraktion aus MAP in Reinkultur

Zum Erreichen einer hohen Sensitivität des qPCR-Nachweises von MAP wurden verschiedene Extraktionsverfahren und Optimierungsprotokolle getestet. Es wurden jeweils Zellsuspensionen mit 10^7 MAP extrahiert und die CP-Werte der jeweiligen Extraktion und deren Optimierungsprotokollen untereinander verglichen.

Abbildung 32 zeigt die Ergebnisse der Extraktion mit dem Blood and Tissue Kit von Qiagen bei Anwendung unterschiedlicher Protokolle.

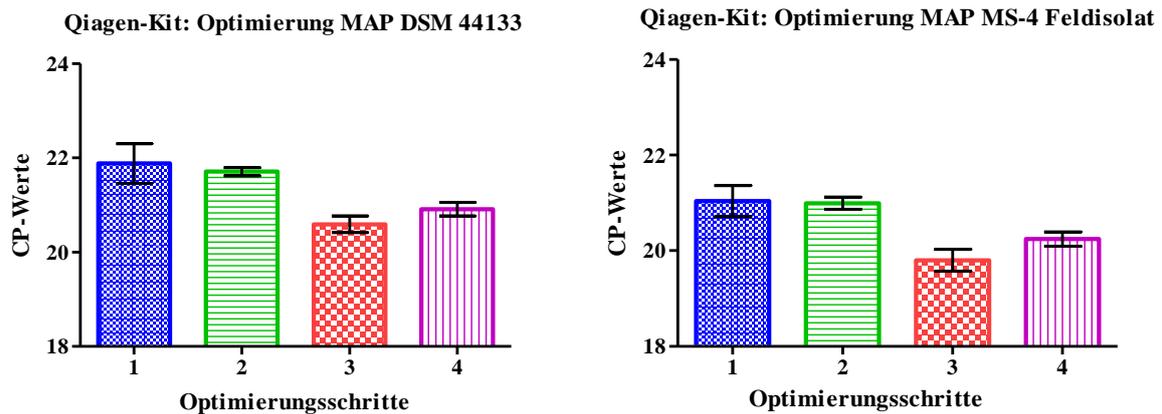


Abbildung 32: CP-Werte in F57-qPCR nach DNA-Extraktion anhand unterschiedlicher Protokolle des Blood and Tissue Kits (links: MAP DSM 44133, rechts: MAP MS-4 Feldisolat)

(1: Herstellerangabe, 2: verlängerte Inkubationszeiten für Proteinase K und Lysozym, 3: 2 + zusätzlicher Kochlyse, 4: 3 + zusätzlichem Bead-beating)

Das Kit von Qiagen zeigte durch verlängerte Inkubationszeiten keine erniedrigten CP-Werte – also keinen verbesserten Nachweis – auf. Die Kochlyse verringerte die CP-Werte deutlich. Ein zusätzlicher mechanischer Aufschluss mittels Beads hingegen führte im Vergleich zu Protokoll 3 zu erhöhten CP-Werten. Dieses Bild zeigte sich bei beiden getesteten MAP-Stämmen. Damit konnte anhand von Protokoll 3 die DNA-Extraktion aus MAP in Reinkultur mittels Blood and Tissue Kit optimiert werden.

Als mögliche Alternative zum Extraktionskit von Qiagen wurde das High Pure PCR Template Preparation Kit von Roche optimiert (vgl. Abbildung 33).

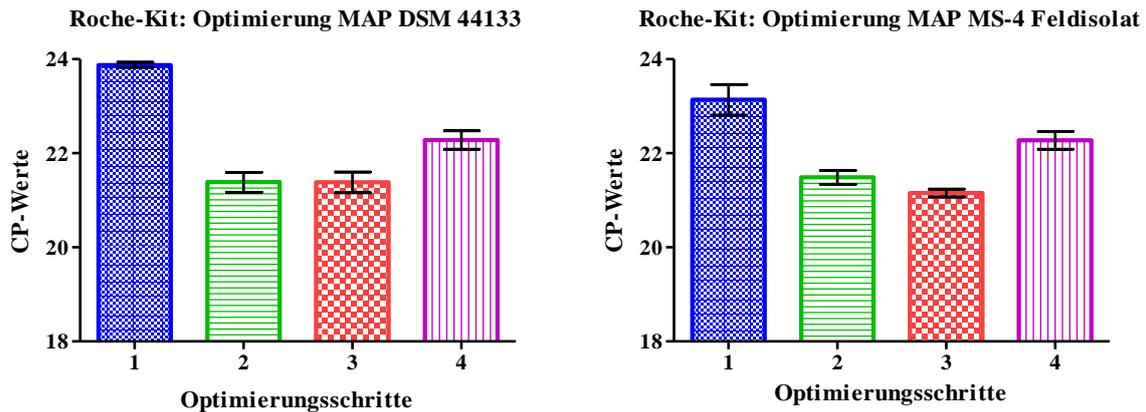


Abbildung 33: CP-Werte in F57-qPCR nach DNA-Extraktion anhand unterschiedlicher Protokolle des High Pure PCR Template Preparation Kits (links: MAP DSM 44133, rechts: MAP MS-4 Feldisolat)

(1: Herstellerangabe, 2: verlängerte Inkubationszeiten für Proteinase K und Lysozym, 3: 2 + zusätzlicher Kochlyse, 4: 3 + zusätzlichem Bead-beating)

Durch die verlängerten Inkubationszeiten sank der CP-Wert deutlich, es verbesserte sich also der Nachweis. Durch zusätzliche Kochlyse konnte lediglich eine Tendenz zu verringerten CP-Werten gezeigt werden. Ein zusätzlicher mechanischer Aufschluss wies im Vergleich zu Protokoll 2 und 3 gesteigerte CP-Werte auf. Somit konnten durch die Extraktion mit Protokoll 3 des High Pure Template Preparation Kits von Roche die niedrigsten CP-Werte nach Extraktion von 10^7 MAP-Zellen aus Reinkultur erreicht werden.

Als nicht kitbasierte Verfahren sollten außerdem ein erarbeitetes Protokoll mittels Chelex und ein etabliertes Protokoll zur Phenol-Chlorophorm-Extraktion erprobt werden. In Abbildung 34 und Abbildung 35 sind die Ergebnisse für beide getesteten MAP-Stämme gezeigt.

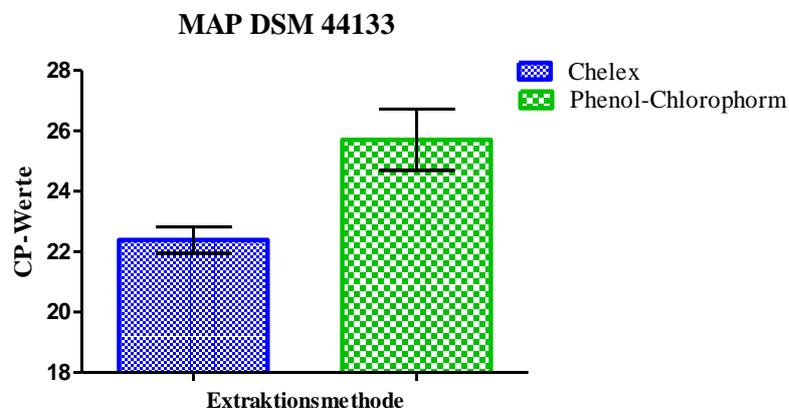


Abbildung 34: CP-Werte in F57-qPCR nach Extraktion von 10^7 MAP (DSM 44133) mittels Chelex-Extraktion und Phenol-Chlorophorm-Extraktion

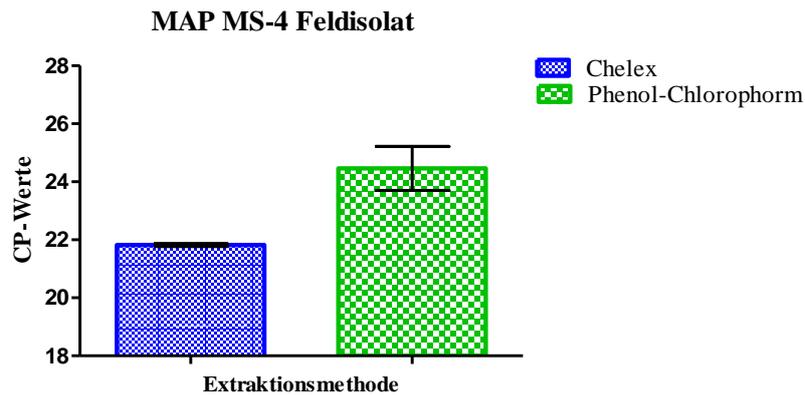


Abbildung 35: CP-Werte in F57-qPCR nach Extraktion von 10^7 MAP (MS-4 Feldisolat) mittels Chelex-Extraktion und Phenol-Chlorophorm-Extraktion

Die Phenol-Chlorophorm-Extraktion resultierte in der anschließenden F57-qPCR in deutlich erhöhten CP-Werten im Vergleich zur Chelex-Methode, obwohl die DNA in geringerem Volumen vorlag als nach der Chelex-Extraktion; dies hätte – bei Vorliegen annähernd derselben absoluten DNA-Menge nach Anwendung beider Methoden – in niedrigeren CP-Werten nach der Phenol-Chlorophorm-Extraktion resultieren müssen. Ein erhöhter CP-Wert wie hier lässt auf ineffizientere DNA-Extraktion im Vergleich zur Chelex-Methode schließen. Dies war für beide getesteten MAP-Stämme zu beobachten.

Die absoluten CP-Werte sind nur innerhalb eines Verfahrens und ein und desselben Laufs untereinander aussagekräftig vergleichbar. Ein unmittelbarer CP-Wert-Vergleich wird insbesondere durch die in gewissen Grenzen variable Amplifikationseffizienz zwischen den Läufen und das Vorliegen der DNA in unterschiedlichen Volumina erschwert. Dem wird durch die Normalisierung der CP-Werte anhand eines Standards Rechnung getragen, hier eines sogenannten Genomäquivalent-Standards. Dieser Standard stellt hier eine logarithmische Verdünnungsreihe von Genomäquivalenten pro $2 \mu\text{l}$ PCR-Template dar (zur Berechnung vgl. 2.2.3.2). Hieraus lässt sich Lauf-übergreifend die Genomausbeute pro $2 \mu\text{l}$ Template des jeweiligen Extraktionsverfahrens berechnen. Nach den einzelnen Extraktionsverfahren liegt die DNA in jeweils unterschiedlichen Volumina vor. Deshalb wird das Ergebnis der anhand des Standards kalkulierten Genomäquivalente in der darauffolgenden Auswertung mit einem entsprechenden Faktor multipliziert, um die absolute Genomausbeute aus 10^7 Zellen in der DNA-haltigen Probe zu errechnen. Dies sei in der folgenden Abbildung 36 gezeigt.

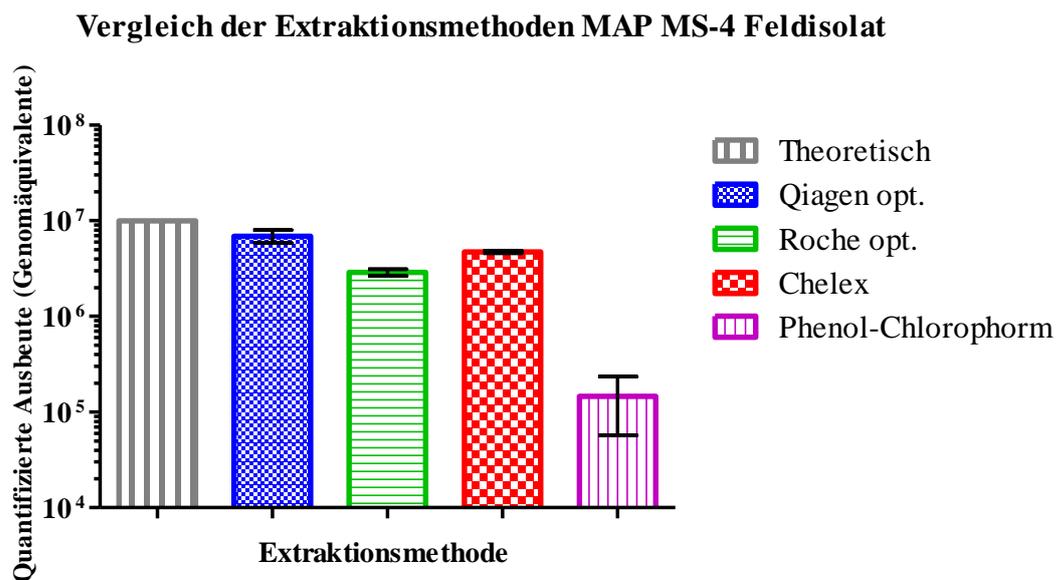
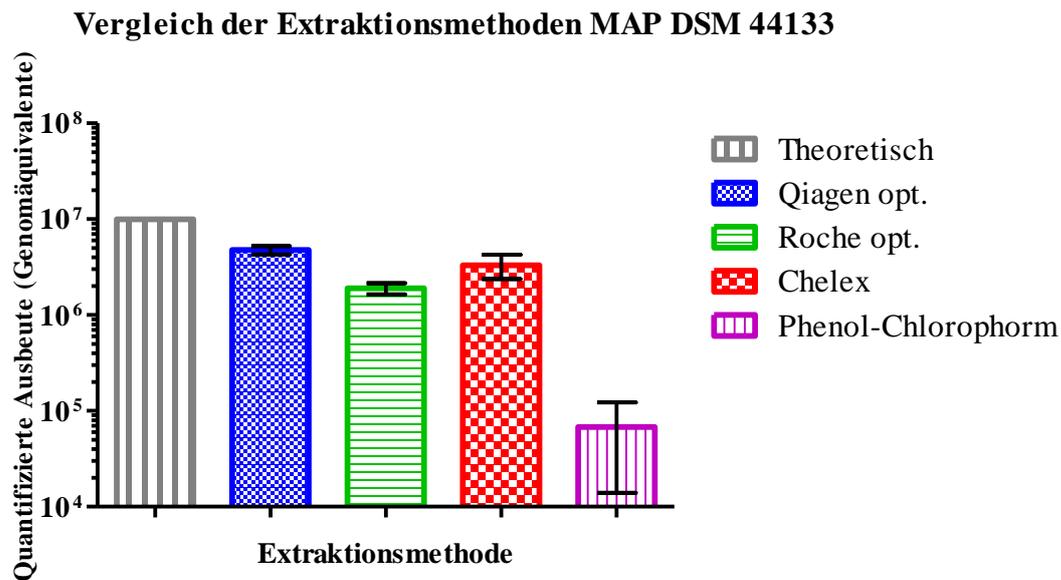


Abbildung 36: Über F57-qPCR kalkulierte Genomäquivalent-Ausbeuten aus MAP DSM 44133 (oben) und MAP MS-4 Feldisolat (unten) anhand unterschiedlicher DNA-Extraktionsverfahren aus 10^7 Zellen

Durch das optimierte Protokoll des Blood and Tissue Kits von Qiagen konnte die höchste nachweisbare DNA-Ausbeute von bis zu 70 % des theoretisch berechneten Werts erreicht werden. Es folgte die nicht-kitbasierte Chelex-Extraktion mit bis zu 47 % Ausbeute, gefolgt von dem optimierten Protokoll von Roche mit knappen 30 %. Durch das verwendete Phenol-Chlorophorm-Extraktionsprotokoll konnte lediglich 1 % der eingesetzten Zellen molekularbiologisch nachgewiesen werden. Als DNA-Extraktionsverfahren, das die höchste

DNA-Ausbeute einbringt, wurde demnach das Blood and Tissue Kit von Qiagen mit den Modifikationen nach Protokoll 3 ausgewählt und in allen weiteren Verfahren, die eine hohe Sensitivität zum Ziel hatten, verwendet. Für die DNA-Aufbereitung zur qualitativen PCR wurde in dieser Arbeit die kostengünstigere Chelex-Extraktion durchgeführt.

2.4 Validierung der MAP-DNA-Extraktion aus dotierten Milchproben

Erhöhung des CP-Wertes durch MAP-DNA-Extraktion aus 10 ml dotierter Milch im Vergleich zur direkten DNA-Extraktion aus MAP

Neben der DNA-Ausbeute aus den MAP-Zellen stellt die Zellgewinnung aus komplexen Probenmatrices wie Milch eine weitere Möglichkeit dar, die Sensitivität eines Nachweisverfahrens zu beeinflussen. Um Verluste weitgehend minimieren zu können, wurden verschiedene Protokolle zur Rückgewinnung von 10^7 MAP aus 10 ml Milch mittels Zentrifugation getestet und über qPCR analysiert, inwieweit sich der CP-Wert verändert bei Extraktion von 10^7 MAP aus der komplexen Matrix Milch im Vergleich zur direkten Extraktion von 10^7 MAP-Zellen. In Abbildung 37 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt. Es zeigte sich, dass bei der Extraktion von 10^7 MAP-Zellen aus Milch anhand der ersten fünf getesteten Protokolle mit einer CP-Wert-Erhöhung ($\Delta \text{CP} = \text{CP}_{10^7 \text{ MAP aus Milch}} - \text{CP}_{10^7 \text{ MAP direkt}}$) von 4 bis 5 Einheiten zu rechnen ist, unabhängig von Rotationsgeschwindigkeit und Zentrifugationsdauer. Ein Waschschriff vor der Extraktion führte zu keiner Minimierung der CP-Wert-Differenz (vgl. Protokoll 4 mit Protokoll 5). Des Weiteren ergaben sich durch Resuspension des erhaltenen Pellets nach erster Zentrifugation in einer Restflüssigphase, Überführen der erhaltenen Suspension in ein kleineres Reaktionsgefäß und erneuter Zentrifugation bei High-Speed tendenziell höhere Verluste als bei direkter Extraktion des Pellets nach erster Zentrifugation (vgl. Protokoll 2 mit Protokoll 3). Protokoll 6 (Gao et al., 2007) beinhaltet einen zusätzlichen Erwärmungsschritt und HPC-Inkubation des Milchpellets und der Rahmfraktion zur verbesserten Ansammlung der MAP aus der Rahmschicht im Pellet während der darauffolgenden Zentrifugation. Mit diesem Protokoll konnte die CP-Differenz auf 3 Einheiten gesenkt werden. Zum Vergleich: Eine dekadische Verdünnung geht mit einer CP-Wert-Erhöhung von 3,3 bei optimaler Amplifikation einher; dies bedeutet, dass die CP-Wert-Erhöhung um 3 Einheiten bei Extraktion der MAP-Zellen aus Milch im Vergleich zur direkten Extraktion derselben Zellzahl einem Verlust durch die Rückgewinnung aus der komplexen Matrix von knapp einer log-Stufe entspricht.

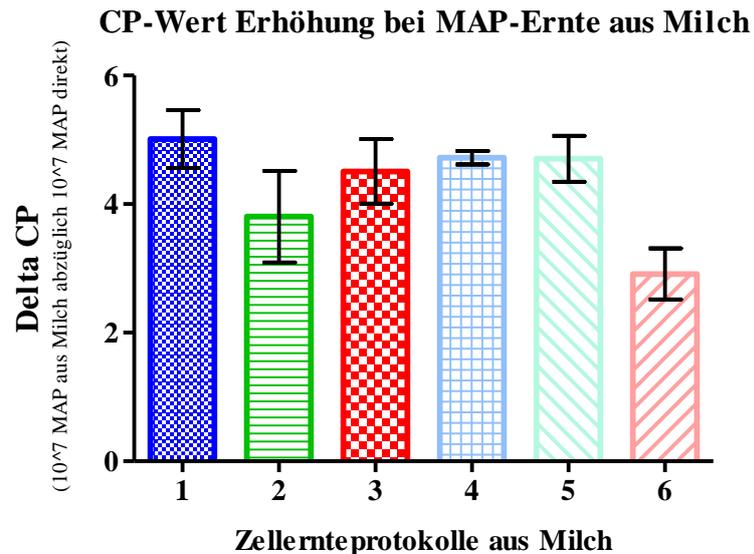


Abbildung 37: CP-Wert-Verschiebung in F57-qPCR durch MAP-DNA-Extraktion aus dotierter Milch nach Anwendung verschiedener Protokolle zur Zellernte

(1: 4700 rpm, 60 min, 2: 4900 x g, 30 min, 3: 4500 x g, 30 min + 16000 x g, 10 min, 4: 2500 x g, 15 min, 5: 2500 x g, 15 min, 1 x waschen in PBS: 5400 x g, 15 min, 6: Gao et al., 2007)

Untersuchung auf PCR-Inhibition

Zur Überprüfung auf PCR-Inhibitoren, die ebenfalls in einer CP-Wert-Erhöhung resultieren würden, wurden die – nach Anwendung der verschiedenen Protokolle an undotierter Milch – erhaltenen Extrakte mit einer definierten Menge an MAP-DNA dotiert und über qPCR analysiert. Im Vergleich dazu wurde dotiertes Aqua dest. eingesetzt. Die Ergebnisse in Tabelle 35 zeigen, dass es keine Verschiebung der CP-Werte zwischen dem dotierten Wasser und den dotierten Milchextrakten gibt, eine Hemmung der PCR durch co-eluierte Hemmstoffe war somit ausgeschlossen.

Tabelle 35: CP-Werte in F57-qPCR: dotierte Milchextrakte im Vergleich zu dotiertem Aqua dest.

MAP-DNA-Konzentration	CP _{Extrakt 1} dotiert	CP _{Extrakt 2} dotiert	CP _{Extrakt 3} dotiert	CP _{Extrakt 4} dotiert	CP _{Extrakt 5} dotiert	CP _{wasser} dotiert
500 pg/µl	19,14	19,03	18,99	19,34	19,24	19,51
50 pg/µl	22,09	22,21	21,76	22,25	22,12	22,49
5 pg/ µl	25,22	26,51	25,76	25,62	26,53	25,72
500 fg/µl	29,13	29,60	28,89	29,59	29,24	29,19
50 fg/µl	32,79	32,35	31,15	32,44	32,34	31,70

(**Extrakt 1-5:** Milchvorbehandlung nach Protokoll 1-5 (siehe 2.2.4.2) und Extraktion des Pellets mit optimiertem Protokoll für das Blood and Tissue Kit von Qiagen)

Für das in dieser Arbeit weiter verwendete Protokoll 6 (Gao et al., 2007) sind zur Veranschaulichung in Abbildung 38 die einzelnen Amplifikationskurven dargestellt.

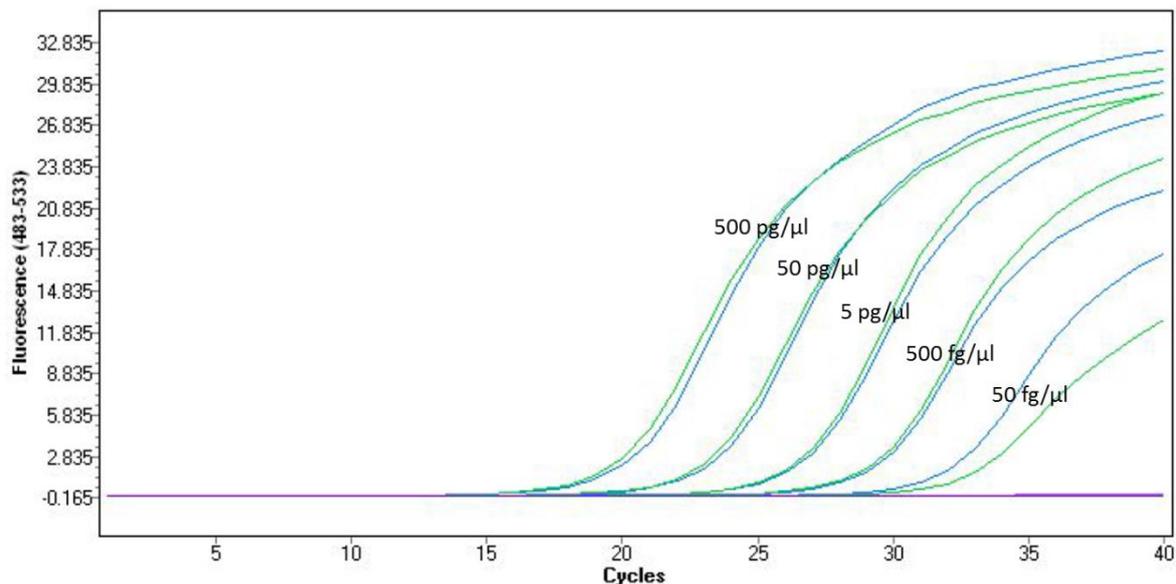


Abbildung 38: Amplifikationskurven dotierter Milchextrakte nach Protokoll 6 (Gao et al., 2007) bei F57-Sybr-Green qPCR

(blau: Template = dotiertes Wasser, grün: Template = dotierter Milchextrakt, lila: Template = undotierter Milchextrakt)

Auch hier zeigte sich, dass bei Verwendung des Protokolls 6 (Gao et al., 2007) zur Milchvorbehandlung und der Extraktion des Pellets mit dem optimierten Blood and Tissue Kit in den Extrakten keine die PCR beeinflussenden Hemmstoffe enthalten waren.

2.5 Validierung des erarbeiteten Protokolls zum MAP-Nachweis aus Milchproben mittels Sybr-Green qPCR und Ermittlung der Nachweisgrenze

Die mit 10^7 bis 10^1 MAP-Zellen dotierte Frischmilch (50 ml) bzw. Vorzugsmilch (50 ml) wurde nach Protokoll 6 (Gao et al., 2007) vorbehandelt, das erhaltene Pellet mit dem optimierten und an das erhöhte Probenvolumen angepassten Protokoll des Blood and Tissue Kits von Qiagen extrahiert und über die in dieser Arbeit optimierte F57-Sybr-Green qPCR analysiert. Über den Genomäquivalent-Standard konnten die Genomausbeuten aus den einzelnen Dotierungsstufen bestimmt werden. Abbildung 39 zeigt die Genomausbeuten verschiedener Spiking-Level: Beim molekularbiologischen Nachweis nach der in dieser Arbeit etablierten Methode ist im Gesamtsystem mit dem Verlust einer ganzen log-Stufe zu rechnen, unabhängig von der getesteten Milchart und Konzentrationsstufe.

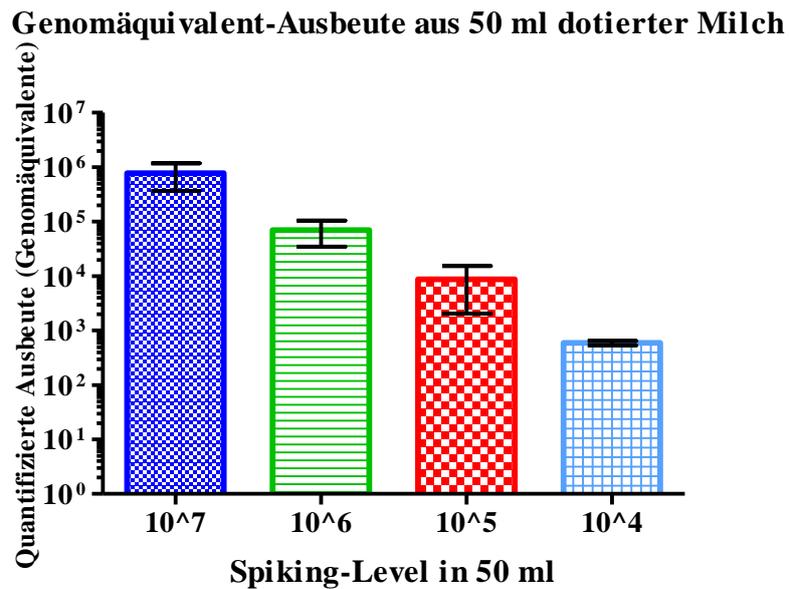


Abbildung 39: Über F57-qPCR quantifizierte Genomausbeuten aus dotierten Milchproben

Dies bedeutet, dass bei artifizierlicher Kontamination von 50 ml Frischmilch bzw. Vorzugsmilch mit 10^X MAP eine durch F57-qPCR nachweisbare Genomausbeute von ca. 10^{X-1} erwartet werden kann, was einer ca. 10 %igen Wiederfindungsrate entspricht. Eine quantitative Aussage, also eine verlässliche Berechnung der enthaltenen Konzentrationen anhand der Standardwerte, war bis 2×10^2 MAP/ml (10^4 MAP/50 ml) möglich.

Die Nachweisgrenze konnte auf 2×10^2 MAP/ml in den hier durchgeführten Versuchen mit MAP DSM 44133, MAP DSM 44135 und MAP MS-4 Feldisolat als sicher detektierbar gesetzt werden, wohingegen bei dem Spiking-Level von 2×10^1 MAP-Zellen/ml in der darauffolgenden qPCR mit keinem der verwendeten Primerpaare eine 100 %ige Wiederfindungsrate gelang. In Tabelle 36 sind die Ergebnisse zur Bestimmung der Nachweisgrenze anhand der verschiedenen Primerpaare zusammengefasst.

Tabelle 36: Nachweisgrenze in 50 ml Milch anhand verschiedener Primerpaare

Primerpaar	Kopienzahl	Minimales Detektionslimit in 50 ml Frischmilch	Minimales Detektionslimit in 50 ml Vorzugsmilch	Beurteilung der Ergebnisse der Sybr-Green qPCR ohne zusätzlichen Gelauftrag (nur über Schmelzkurvenanalyse) möglich
F57	1	2 x 10 ¹ /ml in ca. 50 % der durchgeführten Versuche	2 x 10 ¹ /ml in ca. 50 % der durchgeführten Versuche	Ja
8771/B	1	2 x 10 ² /ml in 100 % der durchgeführten Versuche	2 x 10 ² /ml in 100 % der durchgeführten Versuche	Nein
2420/A	1	2 x 10 ² /ml in 100 % der durchgeführten Versuche	2 x 10 ² /ml in 100 % der durchgeführten Versuche	Nein
ISMAP04	4	2 x 10 ¹ /ml in ca. 50 % der durchgeführten Versuche	2 x 10 ¹ /ml in ca. 50 % der durchgeführten Versuche	Ja

Die Beurteilung der Ergebnisse bei Verwendung der Primerpaare 2420/A bzw. 8771/B anhand der Schmelzkurvenanalyse war aufgrund unspezifischer Bindungen nicht möglich. Aufgrund der eng zusammenliegenden Schmelztemperaturen von spezifischen und diesen unspezifischen Amplifikaten ließ sich hierbei kein vierter PCR-Schritt zur Messung definieren. Ein zusätzlicher Gelauftrag war bei der Auswertung der Ergebnisse unbedingt erforderlich, eine exakte Quantifizierung somit nicht möglich. Abbildung 40 zeigt die Problematik der Auswertung anhand des Primerpaares 8771/B in Vorzugsmilch auf, dasselbe galt jedoch auch für das Primerpaar 2420/A. Es fand eine Amplifikation in allen Ansätzen, einschließlich der undotierten Milch statt (vgl. Abbildung 40 A). Bei allen getesteten Dotierungs-Leveln wurden während der Schmelzkurvenanalyse Zielamplikon-spezifische Melting-Peaks bei ca. 83 °C generiert (vgl. Abbildung 40 B und C). Die anschließende Überprüfung der Amplifikate auf dem Agarosegel zeigte, dass nur bis zu dem Spiking-Level von 10⁴ MAP/50 ml Vorzugsmilch auch gesichert ein spezifisches Amplikon generiert wurde (vgl. Abbildung 40 D).

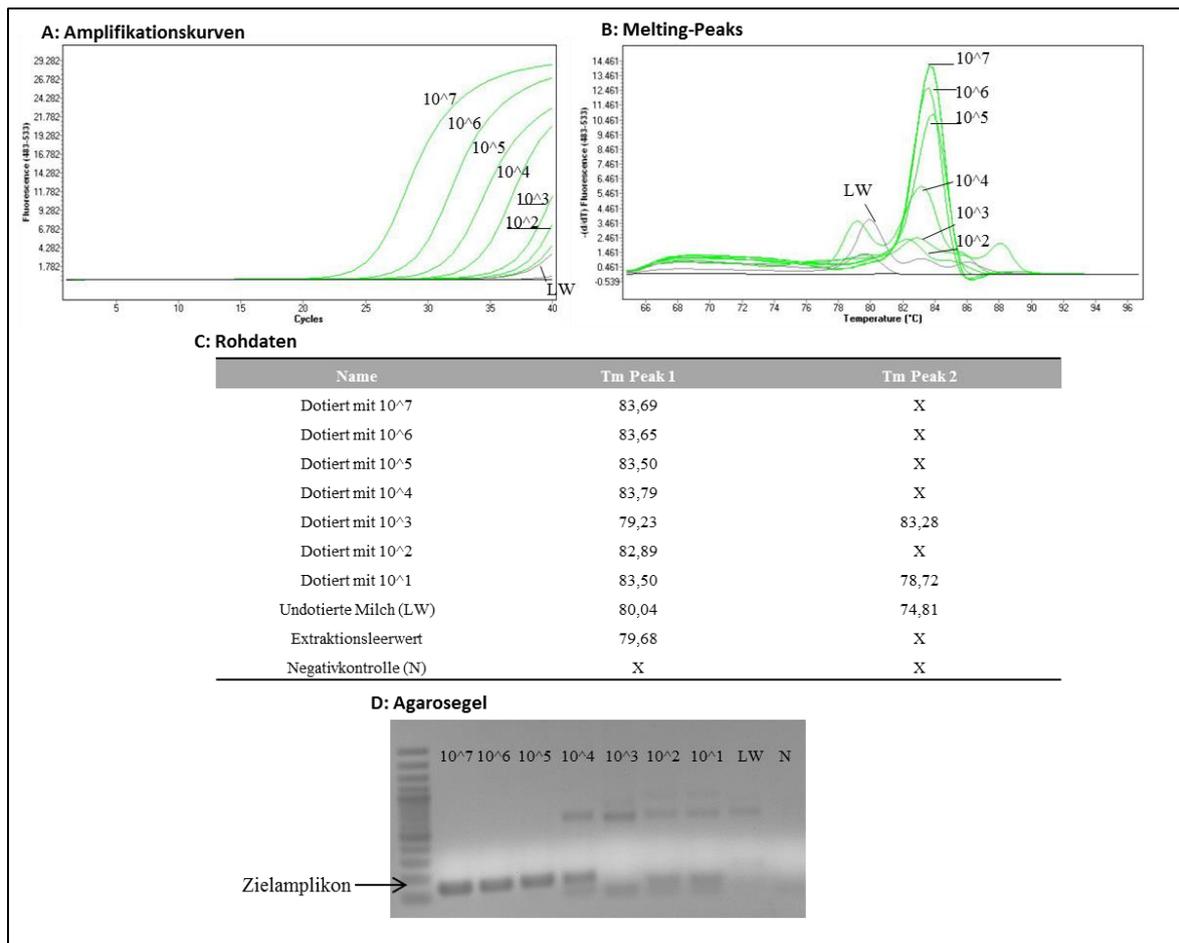


Abbildung 40: Übersicht zur Problematik der unspezifischen Amplifikate in Vorzugsmilch bei Sybr-Green qPCR mit neuem Primerpaar 8771/B

Auch bei den übrigen Primerpaaren wurde ein zusätzlicher Gelauftrag durchgeführt — dieser korrelierte mit der Auswertung der Schmelzkurven. Beispielhaft sei dies anhand des PCR-Laufes von dotierter Vorzugsmilch des Primerpaares F57 gezeigt. Wie in Abbildung 41 A ersichtlich, fand eine Amplifikation ausschließlich in den von 10⁷ bis 10³ dotierten Milchproben statt. In diesen wurden Zielamplicon-spezifische Peaks bei T_m = ca. 88 °C bis zum Dotierungslevel von 10³ MAP-Zellen/50 ml während der Schmelzkurvenanalyse generiert, wobei die Peak-Höhe mit der eingemischten MAP-Zahl korrelierte; die schwächste Bande im Agarosegel korrelierte mit einer Peak-Höhe von ca. 2 Fluoreszenzeinheiten (vgl. Abbildung 41 B und D). Niedrigere Dotierungslevel zeigten keine Amplifikation und in der Schmelzkurvenanalyse lediglich Peaks in Höhe der Primer-Dimere bei ca. 74 °C und 78 °C (Abbildung 41 C). In der nachgeschalteten Gelelektrophorese konnten die Amplifikate auf erwarteter Bandenhöhe visualisiert werden (vgl. Abbildung 41 D).

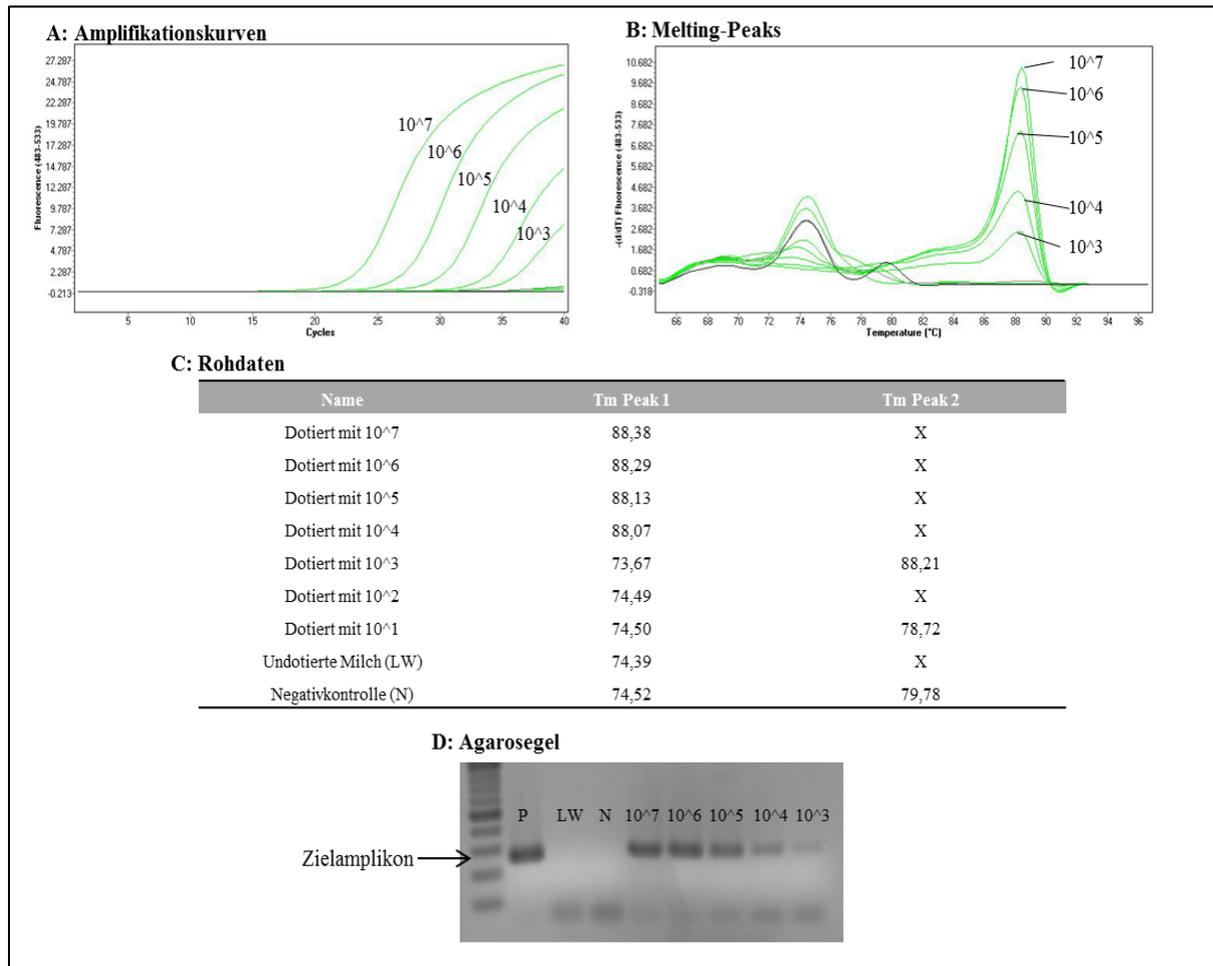


Abbildung 41: Beurteilung der F57-Sybr-Green qPCR in Milchproben

Dasselbe galt für die Verwendung des Primerpaares ISMAP04. Auch hier spiegelten die Banden auf dem Agarosegel die Analyse der Melting-Peaks wider und war somit für den Sybr-Green qPCR-Nachweis von MAP aus Milchproben geeignet (siehe Anhang, Abbildung 62).

2.6 Konsummilch aus dem Handel

Orientierend wurden 20 pasteurisierte Milchproben sowie die in Bayern erhältliche Vorzugsmilch mit drei unterschiedlichen Verbrauchsdaten molekularbiologisch anhand der hier etablierten Methode untersucht. Dabei konnte in keiner der untersuchten Milchproben MAP-DNA nachgewiesen werden. Auch über kulturellen Nachweis konnte MAP in keiner der hier untersuchten Proben nachgewiesen werden.

2.7 Lebend-Tot-Unterscheidung mit EMA, PMA und PMAxx und anschließender F57-qPCR

2.7.1 Abtötungsstrategie für geeignete Tot-Kontrolle

MAP-Suspensionen gleicher Zellzahl wurden entweder bei 121 °C autoklaviert oder bei 90 °C für 30 min im Wasserbad inkubiert, im Anschluss auf M7H10-Platten mit Mykobaktin (2 mg/l) ausplattiert und nach 16 Wochen auf Wachstum untersucht. Nach keiner dieser Behandlungen konnte Koloniewachstum festgestellt werden. Bei der unbehandelten Positivkontrolle hingegen zeigte sich MAP-Wachstum in Form eines Bakterienrasens.

In der qPCR konnte gezeigt werden, dass die CP-Werte der autoklavierten Bakteriensuspensionen signifikant (Bonferroni's Multiple Comparison Test, $P < 0,05$) anstiegen im Vergleich zur unbehandelten Positivkontrolle. Dies spricht dafür, dass während des Autoklaviervorgangs Teile der Ziel-DNA degradiert wurden. Die bei 90 °C für 30 min abgetöteten MAP-Suspensionen zeigten im Vergleich zur unbehandelten Probe keine Unterschiede der CP-Werte nach der Probenaufbereitung (siehe Abbildung 42).

Einfluss der Abtötungsstrategie auf CP-Wert in F57-qPCR

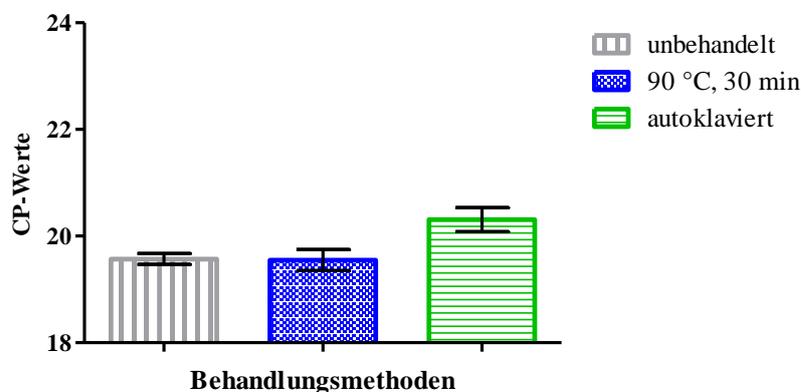


Abbildung 42: Abtötungsstrategien der Tot-Kontrollen für EMA/PMA/PMAxx-Experimente

Für die weiterfolgenden Experimente wurden daher die bei 90 °C für 30 min abgetöteten MAP als Tot-Kontrollen verwendet, die – wie gezeigt – sicher abgetötet wurden, jedoch keine DNA-Schäden aufwiesen.

2.7.2 Vergleich der Reagenzien EMA, PMA und PMAxx

Die Reagenzien EMA, PMA und PMAxx wurden in Initialexperimenten miteinander verglichen. In Protokoll 1 wurde MAP in Gegenwart geringer Konzentrationen der jeweiligen Reagenzien für 5 min inkubiert. Die Effekte dieser Inkubation sind anhand der Delta-CP-Werte in Abbildung 43 A dargestellt. Ziel war es, lebende Zellen in nur möglichst geringem Umfang zu beeinflussen, was durch den Delta CP-Wert $CP_{\text{lebend mit Reagenz}} - CP_{\text{lebend ohne Reagenz}}$ beurteilt wurde. Der Delta-CP-Wert $CP_{\text{tot mit Reagenz}} - CP_{\text{tot ohne Reagenz}}$ sollte einen möglichst hohen Wert annehmen, da dies die hier erwünschte hohe Amplifikationshemmung toter Zellen widerspiegelt. Letztlich bestimmen diese beiden Faktoren – eine etwaige unerwünschte Amplifikationshemmung in lebenden Zellen und das Ausmaß der erwünschten Amplifikationshemmung in toten Zellen – den eigentlich relevanten Messwert, nämlich die Differenz der CP-Werte von lebenden und toten Zellen in Anwesenheit des jeweiligen chemischen Agens (grüner Balken in Abbildung 43), die idealerweise einen möglichst hohen Wert einnimmt.

In Abbildung 43 A zeigt PMAxx einen geringeren Einfluss auf lebende Zellen als EMA und PMA. Dieser Vorteil von PMAxx wird jedoch durch dessen geringen Einfluss auch auf tote Zellen relativiert. In einem zweiten Versuchsdurchgang wurden die Reagenz-Konzentrationen jeweils verdoppelt, was weder für lebende, noch für tote Zellen einen nennenswerten Einfluss auf die Amplifikationshemmung durch das Reagenz PMA zeigte (vgl. Abbildung 43 A mit Abbildung 43 B). Die Inkubation mit einer erhöhten Konzentration der Reagenzien EMA und PMAxx resultierten zwar in einer verbesserten Amplifikationshemmung toter Zellen, jedoch wurden auch lebende Zellen stärker beeinflusst (vgl. Abbildung 43 A mit Abbildung 43 B).

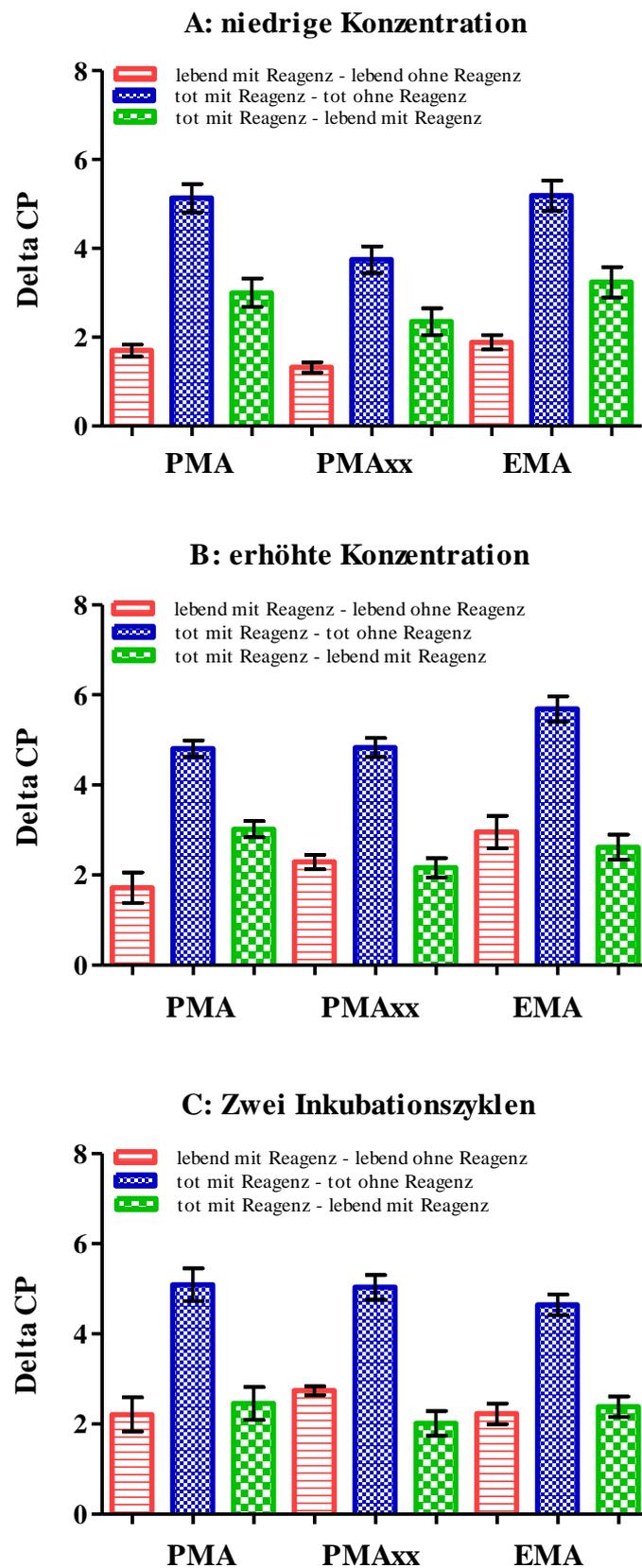


Abbildung 43: Optimierungsversuche der Reagenzien PMA, PMAxx und EMA

In einem weiteren Schritt wurde eine 2 x Inkubation bei geringer Reagenzkonzentration getestet. Hierbei zeigte sich, dass PMA lebende Zellen stärker beeinflusst, als bei den zuvor durchgeführten Protokollen, es jedoch zu keiner erheblich verbesserten Amplifikationshemmung toter Zellen führte. Insgesamt erbrachte dieses Protokoll für alle drei Reagenzien ähnliche Ergebnisse (vgl. Abbildung 43 C). Zusammenfassend zeigte PMA_{xx} in allen Versuchsdurchgängen die geringste Eignung zur Unterscheidung lebender und toter Zellen (vgl. Abbildung 43 A, B, C: $CP_{\text{tot mit PMAxx}} - CP_{\text{lebend mit PMAxx}}$), EMA und PMA wiesen ähnliche Ergebnisse bezüglich dieses Delta CP-Wertes auf. Aufgrund der tendenziell geringeren Beeinflussung lebender Zellen durch das Reagenz PMA im Vergleich zu EMA insbesondere bei höheren Konzentrationen wurde PMA weiter optimiert.

2.7.3 Optimierung der PMA-F57-qPCR

Die Optimierung der Lebend-Tot-Unterscheidung via PMA-qPCR wurde in acht verschiedenen Protokollen getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 44 dargestellt.

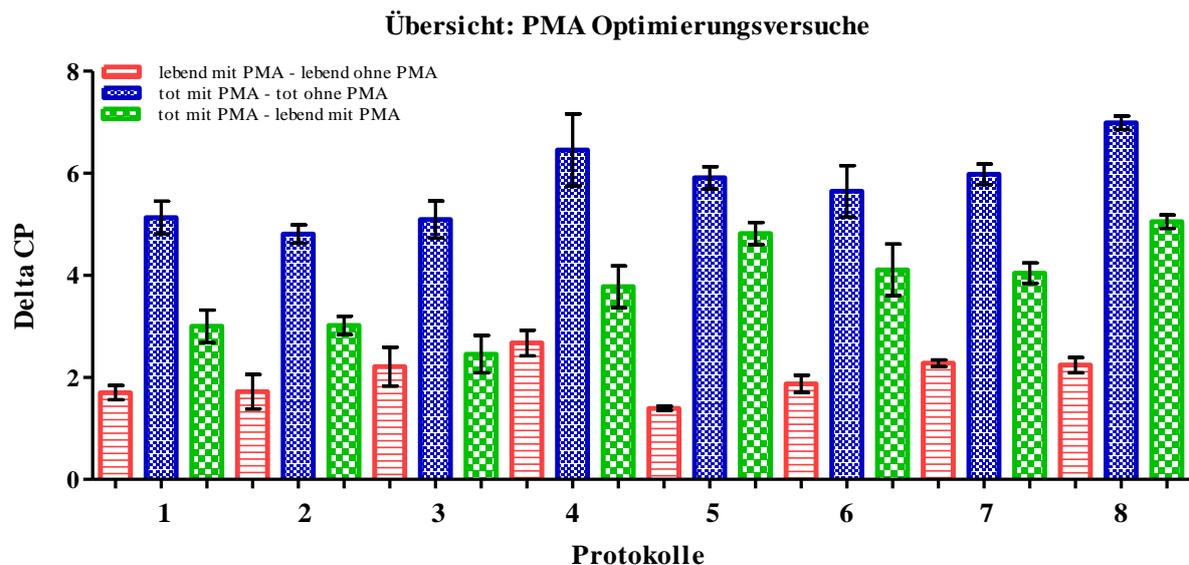


Abbildung 44: PMA Optimierungen

(1: 25 μM , 5 min, RT, 1 x Inkubation, 2: 50 μM , 5 min, RT, 1 x Inkubation, 3: 25 μM , 5 min, RT, 2 x Inkubation, 4: 50 μM , 5 min, RT, 2 x Inkubation, 5: 25 μM , 30 min, RT, 1 x Inkubation, 6: 25 μM , 5 min, 47 $^{\circ}\text{C}$, 1 x Inkubation, 7: 25 μM , 30 min, 47 $^{\circ}\text{C}$, 1 x Inkubation, 8: 25 μM , 5 min, RT, 1 x Inkubation + Sodiumdeoxycholat)

Es zeigte sich, dass mit Erhöhung der PMA-Konzentration und/oder bei Verwendung eines zweiten Inkubationszyklus eine verbesserte Amplifikationshemmung toter Zellen mit einer stärkeren Beeinflussung lebender Zellen einherging (vgl. Protokolle 1 bis 4 Abbildung 44). Die Spannweite der Werte toter und lebender Zellen ($CP_{\text{tot mit PMA}} - CP_{\text{lebend mit PMA}}$) blieb unter 4 CP-Werten. In weiteren Protokollen wurde daher versucht, bei gleichbleibend geringer

Konzentration und nur einem Inkubationszyklus durch Erhöhung der Inkubationszeit, Inkubationstemperatur bzw. Zugabe des Reagenz Sodiumdeoxycholat den Delta-CP-Wert ($CP_{\text{tot mit PMA}} - CP_{\text{lebend mit PMA}}$) zu erhöhen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Inkubation bei RT für 30 min lebende Zellen in nur geringem Maße (Delta CP: 1,39) beeinflusst, tote Zellen aber zu ca. 99 % in ihrer Amplifikation gehemmt werden – der Wert $CP_{\text{tot mit PMA}} - CP_{\text{tot ohne PMA}}$ lag bei ca. 6 und die Differenz zwischen den CP-Werten toter und lebender Zellen bei ungefähr 5. Dieses Protokoll (Protokoll 5 in Abbildung 44) wurde daher aufgrund der relativ geringen Beeinflussung lebender Zellen und relativ hohen Amplifikationshemmung toter Zellen als optimiertes Protokoll festgelegt.

2.7.4 Validierung der Lebend-Tot-Unterscheidung von MAP in Reinkultur durch PMA-F57-qPCR

Zur Validierung der PMA-qPCR-Methode wurden zwei weitere MAP-Stämme dem optimierten Protokoll unterzogen. Wie in Abbildung 45 dargestellt, zeigten die beiden DSM-Stämme sehr ähnliche Delta-CP-Werte. Das Feldisolat hingegen wies dazu erhöhte Amplifikationshemmung in toten Zellen auf, die jedoch auch mit einer verstärkten Beeinflussung lebender Zellen einherging; mit gewissen Varianzen des Assays ist demnach zu rechnen.

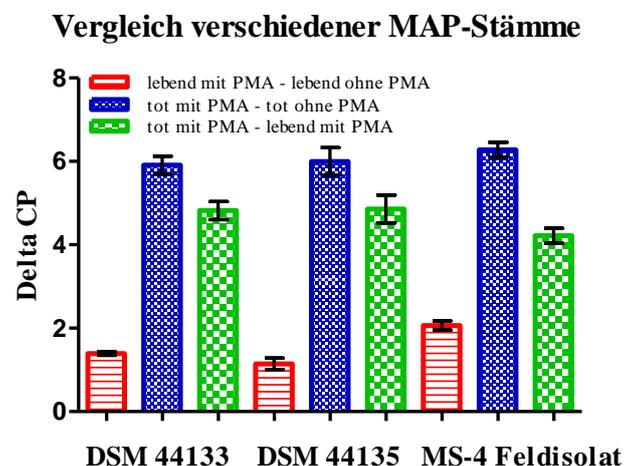


Abbildung 45: Vergleich der Lebend-Tot-Unterscheidung anhand unterschiedlicher MAP-Stämme im PMA-F57-qPCR-Assay

Um zu ermitteln, inwieweit die PMA-qPCR-Methodik dafür geeignet ist, eine sichere Aussage darüber zu treffen, ob in einer unbekanntem Suspension ausschließlich tote MAP-Zellen vorliegen, wurden Suspensionen mit unterschiedlichem Lebend-Anteil analysiert.

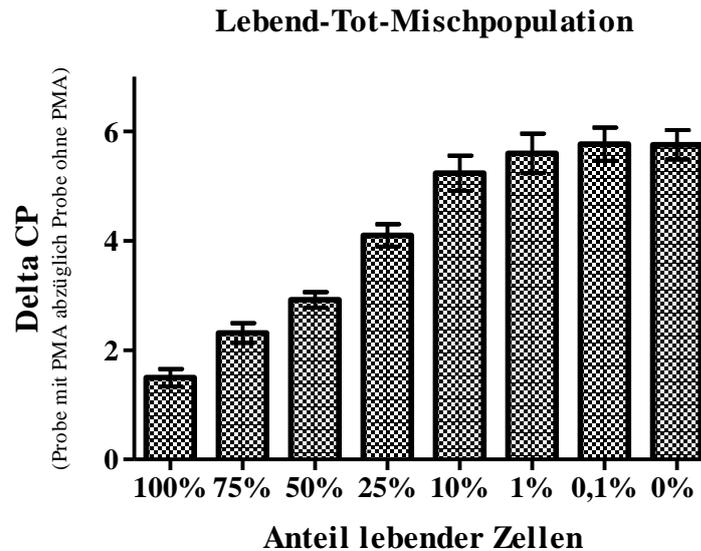


Abbildung 46: Delta CP-Werte unterschiedlicher Lebend-Tot-Mischpopulationen nach PMA-F57-qPCR

Wie in Abbildung 46 dargestellt, kann anhand der hier optimierten PMA-qPCR-Methode differenziert werden, ob sich in einer Reinkultur-Suspension mit ursprünglich 5×10^7 MAP zu 100 % tote, oder nur lebende Zellen befinden. Auch lassen sich Suspensionen mit bis zu 25 % überlebende Zellen deutlich von Suspensionen ohne überlebende Zellen differenzieren. Bei geringerem Lebend-Anteil kann die PMA-Methode keine statistisch abgesicherte Aussage mehr darüber treffen (Bonferroni's Multiple Comparison Test, $P > 0,05$), ob die Suspension ausschließlich tote MAP-Zellen enthielt oder nicht.

V. DISKUSSION

1. Vorarbeiten

1.1 Kontrollkeimstammsammlung und MAP-Anzucht

Der Aufbau einer Kontrollstammsammlung ist wesentlicher Bestandteil bei der Etablierung spezifischer Detektionssysteme. Unerwünschte Kreuzreaktionen im Nachweissystem können anhand solcher Kontrollen identifiziert und zielgerichtete Optimierungen eingeleitet werden. Aus diesem Grund wurden nach intensiver Literaturrecherche die hier verwendeten Kontrollkeime ausgewählt und kultiviert, um für Experimente zur Verfügung zu stehen. Neben den in Milchproben vorzufindenden, nicht dem Genus *Mycobacterium* zugehörigen Bakterien *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, Enterokokken, Laktobazillen, Streptokokken, *Serratia rubidaea*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter* subsp. und *Pseudomonas* subsp. (Ahmed et al., 1983, Ruegg et al., 1992, Arizcun et al., 1997, Heuvelink et al., 1998, Mora et al., 2002, Lafarge et al., 2004, Zadoks et al., 2005, Tenhagen et al., 2006, Morandi et al., 2007, Immanuel et al., 2008, Franciosi et al., 2009), wurden auf Basis einer Studie aus den USA zur Prävalenz von Umweltmykobakterien in Milchviehbetrieben (Roussel et al., 2007) und einer Studie zu Kreuzreagenten im MAP-spezifischen ELISA-Testsystem (Osterstock et al., 2007) die Mykobakterienspezies *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. terrae*, *M. avium* subsp. *avium*, *M. asiaticum* und *M. celatum* ausgewählt. Abgerundet wurde die Stammsammlung durch ein weiteres, zu MAP nah verwandtes Mykobakterium der *avium*-Gruppe – *M. avium silvaticum*, sowie den schnellwachsenden Vertreter *M. smegmatis*; BCG wurde stellvertretend für *M. bovis*, dem Erreger der bovinen Tuberkulose, aufgenommen (Bezoz et al., 2014). Anhand dieser Kontrollkeime konnte ein breites Spektrum eventuell vorkommender Kreuzreagenten in Milchviehbetrieben und letztlich in der zu untersuchenden Matrix Milch aufgestellt werden und steht auch in Zukunft für die Etablierung eines Nachweissystems von MAP zur Verfügung.

Die Anzucht unterschiedlicher MAP-Stämme sollte insbesondere für die Validierung von Protokollen umgesetzt werden, um nicht Gefahr zu laufen, lediglich MAP-typstammspezifische Protokolle zu etablieren. Die Anzucht verschiedener MAP-Stämme aus Lyophilisaten stellte sich als nicht trivial dar. Lediglich 3 Stämme konnten kultiviert und über Ziehl-Neelsen-Färbung und MAP-spezifische PCR auch als MAP identifiziert werden. Die Kolonien zweier bewachsener HEYM-Röhrchen wurden aufgrund der Fähigkeit der Bakterien auf Medium ohne Mykobaktin zu replizieren und ihres Negativergebnisses in der MAP-

spezifischen PCR zwar nicht als MAP, aufgrund ihrer Säurefestigkeit und positiven Mykobakterien-Genus-PCR jedoch als eine andere Mykobakterienspezies identifiziert, trotz vorberichtlich gesicherter MAP-Diagnose des überlassenden Labors. Ein Grund dafür könnte sein, dass die entsprechenden Lyophilisate ursprünglich aus einer Mischkultur aus *M. avium* subsp. *paratuberculosis* und schnellerwachsenden Mykobakterien bestanden, sodass die unbekanntere weitere Spezies durch ihre geringere Generationszeit die Anzucht von MAP negativ beeinflusste. Sofern solche Kontaminationen durch Mykobakterien ungleich MAP nicht bereits über die atypische Wachstumsgeschwindigkeit auffallen, erlaubt die molekularbiologische Typisierung des Kulturmaterials schnell und kostengünstig eine Speziesdiagnose und kann so die früher übliche parallele Anzucht auf Mykobaktin-freien Nährmedien (vgl. Whipple et al., 1991) ersetzen. Allerdings stößt das Verfahren im Fall von Mischkulturen an Grenzen, da eine solche Mischkultur bei positiver MAP-spezifischer PCR als MAP ausgegeben wird.

Die weiteren erhaltenen Lyophilisate konnten in der hier vorliegenden Arbeit weder über Festmedium-Kultur, noch über die als sensitiver beschriebene Flüssigkultur (Ellingson et al., 2005) zum Wachstum aktiviert werden. Die teils positiven Ergebnisse der abgeschwemmten HEYM-Röhrchen in der IS900-PCR ließen zwar darauf schließen, dass sich eine geringe Anzahl an MAP-Bakterien auf den HEYM-Röhrchen befand, jedoch zeigten sich diese als nicht kultivierbar. In einem Übersichtsartikel von Nocker und Camper (2009) stellen die Autoren vier Lebensfähigkeitsstadien von Bakterien vor, beurteilt anhand der Kriterien Kultivierbarkeit, metabolische Aktivität und Membranintegrität. „Lebende Zellen“ weisen demnach alle drei Kriterien auf, „Zellen mit geschädigter Zellmembran“ keines der drei Kriterien. In Bakterien-Kulturen lassen sich jedoch auch Zwischenformen wie „metabolisch aktive, aber nicht kultivierbare Zellen“ oder sogenannte „Ghosts“ mit lediglich intakter Zellmembran, jedoch keinerlei metabolischer Aktivität oder Kultivierbarkeit finden (Nocker und Camper, 2009). Auch Mukamolova und Kollegen (2003) berichten von transienten, nicht kultivierbaren Stadien bei Bakterien, die als spezielle Überlebensstrategie interpretiert wurden und dazu führen, dass Bakterien auf Medien, auf denen sie normalerweise replizieren, vorübergehend nicht kultivierbar sind. Das Vorliegen ausschließlich solcher Bakterien in nicht kultivierbaren Stadien könnte erklären, dass eine PCR, die nicht zwischen lebenden Zellen, diesen Zwischenstadien oder toten Zellen differenziert, positive Ergebnisse erbrachte, ein Koloniewachstum aber dennoch nicht beobachtet werden konnte.

1.2 Koloniemorphologie, Flüssiganzucht und Zellzahlbestimmung für Dotierungsversuche

Koloniemorphologie auf Festmedium

Abhängig vom verwendeten Anzuchtmedium kann die Koloniemorphologie eines Bakterienstammes stark variieren (Sousa et al., 2013). Um dies für MAP zu testen, wurde MAP auf den Medien HEYM-Agar, M7H10-Medium mit und ohne Tween 80 kultiviert und jeweils die Koloniemorphologie beurteilt. Es zeigte sich, dass MAP – abhängig vom verwendeten Medium und in Abhängigkeit der Kulturdauer – glatte, kugelige Kolonien, Kolonien mit zentrischer Erhebung oder mit unregelmäßig rauher Oberflächenstruktur hervorbrachte. Eine kulturdauerabhängige Veränderung sowie die mamillenförmige Erhabenheit einiger Kolonien konnte von mehreren unabhängigen Autoren ebenfalls beobachtet werden (Merkal und Curran, 1974, Pfeiffer, 2017). Des Weiteren publizierten Merkal und Curran, dass die Kultivierung von MAP auf HEYM-Agar zu glatten Kolonien führt, wie auch in dieser Arbeit gezeigt, auf M7H10-Agar wurden von den Autoren unterschiedliche Morphologien beobachtet (Merkal und Curran, 1974). Das Supplement Tween 80 führte in der vorliegenden Arbeit zu einer glatten Kolonieform, im Unterschied zum rauen Typ auf M7H10-Medium ohne Tween 80-Zusatz. Diese Beobachtung wird ebenfalls in der Fachwelt geteilt: Mit der Zugabe von Tween 80 zum Anzuchtmedium konnte in Studien von Boxtel et al. (1990) der glatte Morphologietyp, ohne Zugabe der raue unregelmäßige Typ induziert werden. Des Weiteren fand die Arbeitsgruppe heraus, dass durch die Zugabe von Tween 80 in der Voranreicherung von MAP dessen Empfindlichkeit gegen Antibiotika signifikant stieg. Die Autoren verwiesen darauf, dass abhängig vom Anzuchtmedium, insbesondere durch Tween 80-Zugabe, die zelluläre Struktur des Bakteriums verändert wird (Boxtel et al., 1990, Van Boxtel et al., 1990), was die medienabhängigen, unterschiedlichen Koloniemorphologien erklären könnte.

Tween 80 Einfluss auf Flüssiganzucht und Zellzahlbestimmung

Neben dem Einfluss von Tween 80 bei Anzucht auf Festmedien zeigte sich im M7H9-Flüssigmedium ebenfalls ein beobachtbarer Effekt: Während MAP in der sogenannten Schüttelkultur bei nur geringer Tween 80-Konzentration zu starker Aggregatbildung neigte, nahm mit zunehmender Tween-Konzentration die Homogenität zu. Bei 0,3 %iger Tween-Konzentration waren makroskopisch keine Aggregate mehr sichtbar, die mikroskopische Beurteilung bestätigte dies in überwiegend vorliegenden Einzelzellen bzw. nur kleineren Zellansammlungen. Eine weitere Homogenisierung durch mehrmaliges Auf- und Abziehen

der Suspensionen durch eine feine Kanüle erbrachte in der vorliegenden Studie keine weitere Auflösung der Aggregate, obwohl dies in der Literatur als Methode zur Homogenisierung beschrieben wird (Herman et al., 2005). Außerdem finden in einigen Publikationen MAP-Kulturen in M7H9-Medium ohne bzw. mit geringerer Tween 80-Konzentration Verwendung (Dundee et al., 2001, Kralik et al., 2010, Ricchi et al., 2014, O'Brien et al., 2016). Werden keine weiteren Schritte unternommen, um die Aggregate aufzulösen – wie beispielsweise kurzes Anzentrifugieren der Suspension und Verwendung ausschließlich des Überstandes oder mechanische Beanspruchung zum Aggregataufbruch durch Glasbeads (Ricchi et al., 2014) – so kann es, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, zu starker Fehleinschätzung der Zellzahl kommen. Für Experimente – wie Dotierungsversuche zur Etablierung von Nachweissystemen –, deren Ergebnisse stark abhängig sind von einem Vorliegen homogener Suspensionen und einer daraus resultierenden guten Annäherung der Zellzahl in der Dotierungssuspension, sollte dies unbedingt beachtet werden.

Anhand vierer unabhängiger Methoden wurde parallel die Zellzahl in Kulturen mit abnehmender Tween-Konzentration bestimmt; mit Abnahme der Tween 80-Konzentration in der Kultur variierten zunehmend die ermittelten Zellzahlen methodenabhängig für ein und dieselbe Kultur – bis hin zu über einer log-Stufe. Bei der Quantifizierung der Kulturen mit 0,05 %, 0,1 % und 0,2 % Tween ist hervorzuheben, dass einzelne Verdünnungsstufen innerhalb einer Methode in sich schlüssig waren, erst die Ergebnisse der qPCR zeigten, dass über Zählkammer und Oberflächen-Spatel-Verfahren die Zellzahl aggregathaltiger Suspensionen mitunter stark unterschätzt wurde. Als Grund ist in Betracht zu ziehen, dass in den jeweiligen Kulturen zwar ein beträchtlicher Teil der Zellen zu Aggregaten verklumpt ist, diese größeren Aggregate jedoch nur an wenigen Orten in der Suspension zu finden sind, während in der restlichen Suspension eine annähernd homogene Verteilung der Zellen vorliegt. Aus stöchiometrischen Gründen wird also mit großer Wahrscheinlichkeit im ersten Aliquotierschritt eine aggregatfreie Suspension aufgenommen, in der die einzelnen Zellen homogen verteilt vorliegen, was in den nachfolgenden Verdünnungsstufen zu schlüssigen Ergebnissen führt. Bei der Auszählung in der Zählkammer könnte folgender Grund für die Unterschätzung der tatsächlichen Zellzahl in nicht-homogenen Suspensionen eine Rolle spielen: Die Suspension wird in den Zählkammerspalt von lediglich 0,01 mm Tiefe gesogen. Wie in dieser Arbeit gezeigt, befanden sich insbesondere in den Flüssigkulturen mit geringer Tween 80-Konzentration Aggregate mit Größen von über 10 μm ; diese gelangen somit erst gar nicht in das Zählgitternetz. Dass Zellzahlen, die über qPCR bzw. Zählkammer ermittelt werden, im Vergleich zur kulturellen Bestimmung gewisse Unterschiede aufweisen, ergibt

sich zwangsläufig aufgrund der ausschließlichen Zählung lebender Zellen bei der KbE-Bestimmung, während sowohl Zählkammer als auch qPCR lebende und tote Zellen gleichermaßen detektieren (Herthnek, 2006). Aus diesem Grund sollten jedoch die Resultate aus den beiden letzteren Methoden nah beieinander liegen; lediglich in erheblichem Maß membrandefekte Zellen können hier zu abweichenden Ergebnissen führen. Es liegt die Vermutung nahe, dass insbesondere in inhomogenen Suspensionen die Zellzahlbestimmung mittels qPCR dem realen Wert am nächsten kommt, da zum einen der Komplettansatz verwendet werden kann und zum anderen bei dieser Methode Zellen, unabhängig davon, ob als Einzelzelle oder im Zellaggregat vorliegend, in der Extraktion aufgeschlossen und über ihre DNA in der PCR erfasst werden.

Des Weiteren konnte eine Tendenz der Flüssigkulturen zu schnellerem Wachstum mit steigender Tween 80-Konzentration festgestellt werden, was auch Boxtel und Kollegen (1990) beobachten konnten: In ihrer Studie beschreiben die Autoren, dass eine Tween 80-Konzentration zwischen 0,01 % und 0,1 % das Wachstum von MAP hemmen soll, zwischen 0,1 % und 1,0 % das Wachstum jedoch fördert.

Dotierungsversuche

Für die Schüttelkultur in M7H9-Medium mit 0,3 % Tween-Zusatz sowie für eine von HEYM-Agar abgeschwemmte Suspension konnten in der Bestimmung der Zellzahl anhand unterschiedlicher Methoden in sich stimmige Ergebnisse erzielt werden, sowohl intra- als auch intermethodisch, was letztlich in Verbindung mit der makroskopischen und mikroskopischen Untersuchung als ein Vorliegen homogen verteilter Zellen interpretiert wurde – die Voraussetzung für eine gute Annäherung bei der Zellzahlbestimmung einer (Dotierungs-) Suspension.

Für Dotierungsversuche standen nach diesen Analysen die Anzucht von HEYM-Agar mit sehr guter Voraussetzung für eine schnelle und korrekte Zellzahlbestimmung und Kulturen aus M7H9-Medium mit 0,3 % Tween mit etwas unsichererer, aber dennoch annehmbarer Möglichkeit zur Abschätzung der Zellzahl zur Verfügung. In Studien von Boxtel und Kollegen wird allerdings zur Vorsicht bei der Interpretation von Ergebnissen geraten, die auf Basis von MAP aus Tween 80-Anzuchten resultieren, da sich die Zellwandstruktur des Bakteriums bei Anzucht in Tween 80-haltigen Medien verändert (Boxtel et al., 1990, Van Boxtel et al., 1990). Demnach müssen Eigenschaften, die ein bestimmtes Bakterium unter bestimmten Laborbedingungen zeigt, nicht immer in Konsens mit dessen Verhalten in Realproben stehen. Aus diesem Grund – neben der unsichereren Zellzahlbestimmung im Vergleich zur HEYM-Abschwemmung – wurde in der vorliegenden Arbeit auf die Kultur von

MAP in Tween 80-haltigen Medien für weiterführende Experimente verzichtet. Die Dotierungsversuche wurden mit Abschwemmungen von HEYM durchgeführt, deren Zellzahl mittels Zählkammer bestimmt wurde, da für den angestrebten molekularbiologischen Nachweis zunächst sowohl lebende als auch tote Zellen erfasst werden sollten. Anhand dieses Vorversuches kann in der vorliegenden Arbeit davon ausgegangen werden, dass die mittels Zählkammer bestimmten Zellzahlen eine gute Näherung der tatsächlich in der Probe befindlichen Zellen darstellt. Zur Etablierung der Zellzahlbestimmung homogener Suspensionen über OD-Messung, die ebenfalls lebende und tote Zellen erfasst, müsste ein Standard festgesetzt werden, um die Bestimmung der Zellzahl anhand des gemessenen OD-Wertes zu ermöglichen. In den eigenen Untersuchungen korrelierte ein OD-Wert von 1,0 mit der über Zählkammer definierten Zellzahl von ca. 6×10^8 Zellen/ml für den DSM-Stamm 44133 von HEYM; dies liegt in plausiblen Verhältnis zu der von Bradner und Kollegen veröffentlichten Korrelation des OD-Wertes 1,15 mit einer MAP-Zellzahl von 10^9 /ml (Bradner et al., 2013), sodass für die hier beschriebene homogene Suspension eine Quantifizierung über OD-Werte grundsätzlich möglich erscheint. Die Bestimmung der Zellzahl über KbE der Dotierungssuspension bei Einsatz der PCR-Methodik hingegen könnten zu einer Unterschätzung der Gesamtzellzahl der dotierten Probe und dies wiederum zum Vortäuschen niedrigerer Nachweisgrenzen führen, da trotz der geringen Wachstums- und Absterberate von MAP in Kultur bei Verwendung der drei bis vier Wochen alten Kulturen unter Umständen bereits mit einem gewissen Anteil toter Zellen in der abgeschwemmten Suspension zu rechnen ist; nach den Resultaten der vergleichenden Quantifizierung mittels kultureller Anzucht und qPCR bzw. Zählkammer (Tabelle 17) ist jedoch nicht mit einer nennenswerten Beeinflussung des Dotierungslevels zu rechnen: Die Differenz zwischen kultivierbaren Zellen und insgesamt vorhandenen Zellen bzw. Target-DNA-Molekülen lag bei maximal 0,2 \log_{10} -Stufen (Unterschätzung der Gesamtzahl um den Faktor 0,62).

1.3 Kultureller Nachweis von MAP aus Milchproben

In der hier vorliegenden Arbeit sollte der kulturelle Nachweis von MAP in Milchproben als Vergleichsansatz zur etablierten PCR-Methode dienen. Bis dato gilt der kulturelle Nachweis von MAP als Gold-Standard, für die Matrix Milch steht jedoch kein universelles Protokoll für den nötigen Dekontaminationsschritt zur Verfügung (Grant und Rowe, 2001). Aufgrund der Tatsache, dass nach eingehender Literaturrecherche sich die Dekontamination mit HPC für 5 Std bei anschließender Anzucht auf HEYM-Agar als erfolgversprechend darstellte (Dundee et al., 2001) und HPC vom Nationalen Referenzlabor für Paratuberkulose zur

Dekontamination von Kotproben verwendet wird (Donat et al., 2012), wurde dies als Methode der Wahl genutzt. In den eigenen Untersuchungen gelang in den Matrices pasteurisierte Frischmilch und Vorzugsmilch der Nachweis von eingemischtem MAP bis zu der Nachweisgrenze von 2 Kbe/ml Milch bei einem Ausgangsvolumen von 50 ml (100 Kbe/50 ml). Publierte Sensitivitäten bei der kulturellen Anzucht von MAP aus Milch variieren abhängig vom verwendeten Dekontaminationsprotokoll und Anzuchtmedium. Neben HEYM-Agar sind Flüssigmedien wie BACTEC mit PANTA-Zusatz oder modifiziertes Dubos-Medium im Einsatz, Dekontaminationsprotokolle basieren häufig auf HPC, doch werden auch andere chemische Substanzen verwendet. Die publizierten Nachweisgrenzen liegen im Bereich von 10–30 Kbe/50 ml bis hin zu 100 Kbe/ml (Grant und Rowe, 2001). Die Wiederfindungsrate im Vergleich zum Spiking-Level betrug in dieser Arbeit lediglich 10 bis 20 % des kultivierungsfähigen Inokulums; anders als beim molekularbiologischen Nachweis wurde beim kulturellen Nachweis von MAP aus Milch das Spiking-Level über das Oberflächen-Spatel-Verfahren kontrolliert, um den Bezug von Dotierung und Wiederfindung korrekt herstellen zu können. Die Ergebnisse zeigen, dass selbst bei der als Gold-Standard bezeichneten kulturellen Anzucht von MAP die Gefahr falsch negativer Ergebnisse insbesondere bei geringer MAP-Anzahl in der Probe gegeben ist; des Weiteren bei positivem Resultat die Anzahl in der Probe möglicherweise unterschätzt wird. Auf diese Problematik wird auch in der Literatur hingewiesen (O'Reilly et al., 2004). Die Gründe dafür sind vielfältig: Zum einen ist das bekannte Problem der Aggregatbildung von MAP zu nennen. Zwar wurde in der hier vorliegenden Arbeit mit homogenen Suspensionen dotiert, doch kann der nachfolgende Dekontaminationsschritt zu einer Aggregatbildung von MAP geführt haben. Diese Vermutung teilen auch Grant und Rowe in ihrer Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2001 (Grant und Rowe, 2001). Bei der Bestimmung der Kbe führt dies zwangsläufig zu einer Unterschätzung der tatsächlichen MAP-Zahl: Es kann nicht nachvollzogen werden, ob eine Kolonie aus lediglich einer Einzelzelle oder einem Aggregat aus mehreren hundert Zellen entstand – daher die Bezeichnung „koloniebildende Einheit“ anstelle von „Zellzahl“ o. ä. (Antranikian, 2006).

Zusätzlich dürfte auch in der Dekontamination an sich die optimierungsbedürftige Wiederfindungsrate begründet sein. Aufgrund der langen Anzuchtdauer von MAP ist eine Dekontamination der Milchprobe vor der Kultivierung unerlässlich, um schnellwachsende Begleitflora zu eliminieren. Diese Begleitorganismen sollten mit hoher Effizienz abgetötet werden, ein negativer Einfluss auf das Wachstum von MAP sollte möglichst vermieden werden. In den eigenen Untersuchungen konnte trotz vorgeschalteter Dekontamination in

einem Ansatz Begleitflora nicht unterdrückt werden. In einer Studie von Grant et al. (2002) konnten knapp 30 % der HEYM-Röhrchen nach Dekontamination von Rohmilch, 6,9 % nach Dekontamination von pasteurisierter Milch aufgrund der Überwucherung durch Begleitflora nicht ausgewertet werden. Auf der anderen Seite könnte die HPC-Behandlung insbesondere bei bereits vorgeschädigten MAP-Zellen – beispielsweise durch den Pasteurisierungsprozess – als zusätzlicher Stressor deren Kultivierfähigkeit herabsetzen, was auch von Grand und Rowe (2001) vermutet wird. Um den Einfluss von HPC auf MAP-Zellen zu testen, könnte das Inokulum selbst der HPC-Behandlung unterzogen werden. Durch parallele Anzucht des nicht-behandelten Inokulums könnte somit der schädigende Einfluss des Dekontaminationsvorgangs auf MAP analysiert werden – ein Faktor, der in der vorliegenden Arbeit noch nicht evaluiert wurde.

Eine weitere Problematik stellt die hydrophobe Zellwand von MAP dar und dessen mögliche Einlagerung in der Rahmschicht während der Zentrifugation. Die in dieser Arbeit dotierten Milchproben pasteurisierte Frischmilch und Vorzugsmilch wiesen beide Fettgehalte von mindestens 3,5 % auf. Dieser unter der handelsüblich erhältlichen Milch vergleichsweise hohe Fettgehalt wurde bewusst gewählt, um in den vorliegenden Untersuchungen diese Problematik im worst-case-Fall zu untersuchen. Während der Zentrifugation setzte sich ein Teil der MAP-Zellen möglicherweise in der dicken Rahmschicht ab, die bei der gewählten Aufbereitungsmethode zur kulturellen Anzucht jedoch verworfen wurde. Die Arbeitsgruppe von O'Reilly stieß auf dieselbe Problematik. Sie sammelten aus milchverarbeitenden Betrieben einzelne Fraktionen der Milch und untersuchten diese mittels IMS-PCR. Dabei konnten aus den gesammelten Rahmproben prozentual die meisten MAP-positiven Ergebnisse erzielt werden. Zur kulturellen Anzucht wurde jedoch auch in dieser Studie lediglich das Pellet verwendet und auf zukünftige weitere Untersuchungen bezüglich einer Optimierung durch Einbezug der Rahmschicht verwiesen (O'Reilly et al., 2004). Gao und Kollegen berichteten ebenfalls von einer Verbesserung der Wiederfindungsrate von MAP in Milchproben bei Dekontamination des Pellets und der Rahmfraction vor der kulturellen Anzucht (Gao et al., 2005). Hätte diese Arbeit als Ziel gehabt, eine optimierte kulturelle Detektion von MAP aus Milchproben zu etablieren, so wären diesbezügliche Optimierungen auch des kulturellen Verfahrens unumgänglich gewesen. Da die vorliegende Arbeit jedoch primär den PCR-Nachweis im Fokus hatte, beschränkten sich entsprechende Optimierungen des Protokolls auf die Probenvorbereitung zur DNA-Extraktion: Zur optimierten MAP-Ernte aus der Milch mit dem Ziel des PCR-Nachweises wurde letztlich ein Protokoll verwendet, das die Problematik der möglichen Einlagerung von MAP in die Rahmschicht berücksichtigt.

2. Molekularbiologischer Nachweis von MAP in Milchproben

In der vorliegenden Arbeit wurden einzelne Schritte für einen molekularbiologischen Nachweis von MAP in Milchproben optimiert und Verlustraten analysiert, um in Zukunft erfolgversprechende Lösungsansätze zur weiteren Verbesserung der Nachweisgrenze etablieren zu können. Für einen möglichst sensitiven und spezifischen Nachweis müssen die in Abbildung 47 dargestellten Stellschrauben optimal justiert werden.

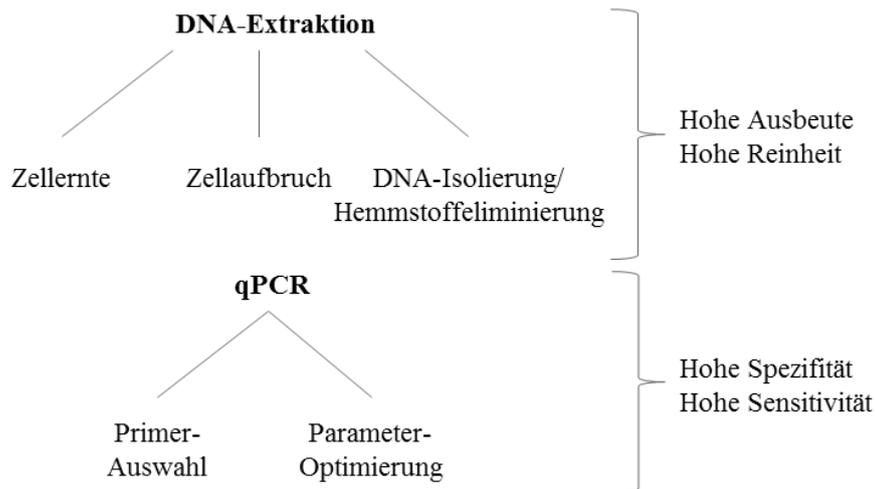


Abbildung 47: Beeinflussende Faktoren für die Sensitivität und Spezifität molekularbiologischer Detektionssysteme

Für eine hohe Spezifität und Sensitivität musste zunächst eine effiziente Amplifikation der Targetsequenz sichergestellt werden. Dafür wurden Annealing-Temperaturen sowie die Primerkonzentration zur Amplifikation bereits publizierter, aber auch neuer MAP-spezifischer Targets optimal eingestellt. Nach Etablierung eines spezifischen und sensitiven Sybr-Green qPCR-Systems lag ein Augenmerk auf der Probenvorbereitung. Die DNA-Extraktion aus dem Zielorganismus selbst sollte dabei mit möglichst geringen Verlusten stattfinden. Ebenso wurde die MAP-Rückgewinnung aus Milch über Zentrifugation validiert und versucht, diesen Schritt entsprechend zu optimieren sowie mögliche PCR-Inhibitionen auszuschließen. Auf den ersten Blick kontraintuitiv wurde mit der Validierung und Optimierung rückwärts begonnen: qPCR vor DNA-Extraktion vor Zellernte. Dies liegt darin begründet, dass sich im weiter oben geschilderten Vergleich der Quantifizierungsverfahren letztlich nur die molekularbiologische Quantifizierung als optimal geeignetes Verfahren darstellte. Zur quantitativen Beurteilung der Aufkonzentrierung war es deshalb nötig, bereits über ein optimiertes Extraktions- und PCR-Verfahren zu verfügen. Ebenso konnte die Effizienz der unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren nur über ein zu diesem Zeitpunkt bereits optimiertes qPCR-Verfahren beurteilt werden.

2.1 Optimierung der Parameter zur optimalen Amplifikation der Targetsequenzen im Sybr-Green qPCR-Assay

Neue MAP-spezifische Targets

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst über Proteomanalyse und anschließender Analyse über das Online-Tool BLAST neue MAP-spezifische Targets identifiziert und nach Übersetzen der Aminosäuresequenz in die entsprechende Nukleotidsequenz Primerpaare generiert. Anhand der Primerpaare konnte die MAP-Spezifität dreier Targets experimentell anhand von Kontrollkeimen gezeigt werden. Die Konservierung dieser Targets wurde anhand von drei unterschiedlichen MAP-Stämmen überprüft, wobei für jeden MAP-Stamm nach der qualitativen PCR eine spezifische Bande generiert werden konnte. Dies bedeutet, dass die in dieser Arbeit überprüften Targets grundsätzlich erfolgversprechend sind, um in Zukunft für einen komplexen molekularbiologischen Nachweis Verwendung zu finden.

Etablierung des Sybr-Green qPCR-Systems

Zunächst wurde anhand ausgewählter neu generierter Primerpaare und einem bereits publizierten MAP-spezifischen Primerpaar (F57 FW/RV) ein qPCR-Assay für eine optimale Amplifikation der Targetsequenzen etabliert und die jeweilige Nachweisgrenze der optimierten Testsysteme anhand extrahierter MAP-DNA aus Reinkultur überprüft. Eine Alternative zu sondenbasierten qPCR-Systemen stellt eine Detektion und Quantifizierung über das kostengünstigere Reagenz Sybr-Green dar – ein Verfahren, das auch in publizierten Arbeiten zur Detektion und Quantifizierung von MAP verwendet wird (O'Mahony und Hill, 2002). Aus Kostengründen fand der Sybr-Green-Ansatz in der vorliegenden Arbeit ebenfalls Verwendung, insbesondere in Anbetracht vergleichbarer Sensitivitäten von Sybr-Green- und Taqman-qPCR-Assays (Ravva und Stanker, 2005) beim MAP-Nachweis. Der Nachteil von Sybr-Green im Vergleich zu sondenbasierten Systemen liegt in der unspezifischen Bindung des Reagenz an doppelsträngige DNA. Gerade bei der Quantifizierung geringer DNA-Mengen kann dadurch unspezifisches Fluoreszenzsignal, ausgehend von unspezifischer doppelsträngiger DNA wie beispielsweise Primer-Dimeren, mit dem Fluoreszenzsignal des spezifischen Amplikons interferieren, was zu inkorrekten Quantifizierungen führt. In der vorliegenden Arbeit konnte dies dadurch verhindert werden, dass ein vierter PCR-Schritt eingeführt wurde, der durch Temperaturerhöhung vor Messung des Fluoreszenzsignals Primer-Dimere, nicht aber das spezifische Amplikon aufschmilzt. Hierbei wird genutzt, dass Primer-Dimere aufgrund der Kürze ihrer Sequenz nur eine geringe Anzahl aufschmelzender Base-zu-Base-Interaktionen besitzen, so dass ihre Schmelztemperatur bei deutlich geringeren

Werten liegt als die Schmelztemperatur der Ziel-Amplifikate der vorliegenden Studie. Die Analyse der Amplifikationseffizienz ergab, dass keine Beeinträchtigung der Amplifikation durch diesen vierten PCR-Schritt zu erwarten ist und als Mittel zur Überwindung des Problems bei der Quantifizierung mittels Sybr-Green genutzt werden kann. Nach Optimierung weiterer Parameter wie Einstellen optimaler Annealing-Temperaturen und Primerkonzentrationen waren mit allen drei Primerpaaren MAP-DNA-Mengen bis zu 100 fg (ca. 20 Genome) quantifizierbar, die in 100 % der PCR-Läufe detektiert werden konnten; mit dem Primerpaar F57 sowie dem Primerpaar 2420/A konnten in einigen Fällen auch 10 fg MAP-DNA (entspricht ca. 2 Genomen/PCR-Ansatz) nachgewiesen werden; Konzentrationen zwischen diesen beiden Stufen (10 fg / 100 fg) wurden in der vorliegenden Arbeit nicht getestet. Die Ergebnisse entsprechen annähernd dem publizierten Detektionslimit von Slana und Kollegen, die in 100 % der Fälle 50 Kopien eines *f57* Plasmids detektieren konnten, teils sogar 5 Kopien (Slana et al., 2008). Tasara und Stephan (2005) verwendeten für ihr Testsystem dasselbe Primerpaar für das Target *f57*, wie es auch in der vorliegenden Arbeit Verwendung fand. In ihrem Taqman-Assay geben sie das minimale Detektionslimit mit ebenfalls 10 fg MAP-DNA an, jedoch mit schlechter Reproduzierbarkeit. 35 fg konnten in 100 % der Fälle detektiert werden (Tasara und Stephan, 2005). Obwohl das Target *f57* im MAP-Genom als single-copy-Target vorliegt, konnten im etablierten System vergleichbare Sensitivitäten wie bei Verwendung von multi-copy-Targets erreicht werden: So gaben O'Mahony und Hill für ihr Sybr-Green-Testsystem eine Sensitivität von 20 Kopien (äquivalent zu 1,5 Genomen) an bei Verwendung *IS900*-spezifischer Primerpaare (O'Mahony und Hill, 2002), Ravva und Kollegen konnten sowohl im Sybr-Green als auch einem Taqman-basierten qPCR-System bis zu 4 fg gereinigter MAP-DNA nachweisen, ebenfalls bei Verwendung des multi-copy-Targets *IS900* (Ravva und Stanker, 2005). Dies zeigt, dass die hier etablierten Sybr-Green-Assays mit den Primerpaaren F57, 2420/A und 8771/B mit Sensitivitäten zwischen 10 fg und 100 fg in guter Vergleichbarkeit stehen zu publizierten Sybr-Green- und sondenbasierten qPCR-Systemen.

2.2 Probenaufbereitung

Ziel der vorliegenden Arbeit sollte es sein, im Rahmen des Verbundprojektes zu analysieren, welche Schritte in der Probenvorbereitung für den molekularbiologischen MAP-Nachweis in Milch die größten zu überwindenden Probleme enthalten, um in Zukunft erfolversprechende Lösungsansätze zur Etablierung eines komplexen, spezifischen molekularbasierten MAP-Nachweises in Milchproben zu leisten, der mit einer hohen Sensitivität und Spezifität

bestehen kann. Dafür wurde die Probenvorbereitung in ihre einzelnen Schritte zerlegt und Wiederfindungsraten bei der DNA-Extraktion anhand eines Genomäquivalent-Standards berechnet sowie die Aufkonzentrierung von MAP aus Milch mittels Zentrifugation analysiert; des Weiteren wurde auf die in der Literatur beschriebenen möglichen PCR-Inhibitoren in Milchproben eingegangen.

DNA-Extraktion aus MAP-Zellen

Die DNA-Extraktion aus MAP-Zellen mit möglichst hoher DNA-Ausbeute stellt aufgrund der robusten Zellwandstruktur des Bakteriums die Wahl eines geeigneten Extraktionsprotokolls voraus. In der Literatur sind viele Studien zu diesem Thema zu finden, explizite Berechnungen, die die Verluste während eines solchen Extraktionsvorganges beziffern, konnten jedoch nicht vorgefunden werden. Studien sind meist vergleichender Natur und analysieren Delta-CP-Werte in der qPCR oder semiquantitativ Bandenintensitäten im Agarosegel nach qualitativer PCR nach Extraktion gleicher Zellzahlen anhand unterschiedlicher Methoden (Tasara und Stephan, 2005, Gao et al., 2007); oft definieren sie dasjenige Protokoll als optimal, das unter den geprüften Protokollen die höchste Sensitivität erreichte (Odumeru et al., 2001), ohne Verluste zu quantifizieren bzw. Wiederfindungsraten zu benennen. Dies liegt teils auch darin begründet, dass die letztlich angestrebten qPCR-Nachweis-Systeme die kalkulierten Werte oft *per se* um solche Verluste korrigieren, da der Konzentrationswert anhand eines Standards ermittelt wird, der unter vergleichbaren Bedingungen – ggf. aus derselben Matrix (matrix-matched-standard, vgl. Guertler et al., 2009) extrahiert wurde. Hierbei wird einem gemessenen CP-Wert ein bestimmter Konzentrationswert – anhand der bekannten eingesetzten Konzentration im Standard – zugeordnet, unabhängig davon, ob die komplette eingesetzte Menge an Ziel-DNA im Standard letztlich real in den PCR-Ansatz eingebracht oder aber während der Extraktion reduziert wurde. Eine solche „interne Korrektur“ erfüllt ihren Zweck bei der Ausgabe valider Konzentrationswerte, ist aber unbefriedigend, sobald es um die Optimierung von Nachweisgrenzen geht. So ist es für diese Optimierung von entscheidender Bedeutung, ob zu wenig Keime in die eigentliche Extraktion eingebracht werden (Verluste bei der Aufkonzentrierung), ob die eigentliche Extraktion die Bakterienzellen unzureichend aufschließt, oder ob die Effizienz der Amplifikation durch Inhibitoren beeinträchtigt wird. Ein „matrix-matched-Standard“ kann zwar die ausgegebenen Werte um alle diese Faktoren gleichzeitig korrigieren, eine Ermittlung der Nachweisgrenze lediglich für das Gesamtverfahren lässt es aber nicht zu, einzelne Schritte unabhängig voneinander zu validieren und zu optimieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden in einem ersten Schritt zwei kitbasierte Extraktions-Systeme optimiert; anhand des CP-Wert-Vergleichs wurde orientierend untersucht, welches (modifizierte) Protokoll die DNA am effektivsten aus den MAP-Zellen isoliert, d. h. mit welchem Protokoll nach Extraktion derselben Zellzahl der tendenziell niedrigste CP-Wert erreicht werden kann. In einem zweiten Schritt wurden zwei weitere Extraktionsverfahren in die Validierung einbezogen und anhand eines Genomäquivalent-Standards die jeweiligen Verluste tatsächlich berechnet, mit denen während der Extraktion zu rechnen ist.

Bei der Optimierung der beiden kitbasierten Systeme lag das Augenmerk auf der Optimierung des Zellaufbruchs. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Extraktion mit dem Blood and Tissue Kit von Qiagen durch eine zusätzliche Kochlyse verbessert werden konnte. Odumeru und Kollegen (2011) validierten ebenfalls verschiedene Zellaufbruchverfahren und stellten fest, dass bei Verwendung eines Präzipitationsprotokolls mit mechanischem Zellaufbruch durch bead-beating als Basisprotokoll die Nachweisgrenze durch zusätzliche Kochlyse ebenfalls signifikant verbessert werden konnte. Während verlängerte Inkubationszeiten mit Lysozym und Proteinase K für das Blood and Tissue Kit keine Verbesserung zeigten, waren diese Modifikationen für das High Pure Template Preparation Kit von Roche die Methode der Wahl zur optimierten DNA-Extraktion. Solche Unterschiede lassen sich mit den unterschiedlichen Lysepuffer-Zusammensetzungen und Inkubationszeiten im Ausgangsprotokoll erklären und zeigen, dass je nach verwendetem Kit oder Verfahren eingangs Validierungsstudien durchgeführt werden sollten, um für jedes Verfahren das optimale Protokoll zu erhalten. Diese Vermutung wird auch dadurch gestützt, dass es in der Literatur zu kontroversen Aussagen bezüglich der Verbesserung der DNA-Extraktion aus MAP kommt: Geben O'Mahony und Hill (2004) beispielsweise an, dass – ausgehend von einem bead-beating- und Kochlyseverfahren – zusätzliche Schritte wie Proteinase K-Zugabe oder veränderte Lysepuffer-Zusammensetzungen das erhaltene Signal sogar reduzierten, resultierte eine verbesserte Nachweisgrenze in einer Studie von Tasara und Stephan aus intensiver Proteinase K-Behandlung (Tasara und Stephan, 2005). Odumeru und Kollegen gaben an, dass ihr Basisprotokoll unter anderem durch einen speziellen Lysepuffer signifikant verbessert werden konnte (Odumeru et al., 2001).

Zusätzlich zum säulenbasierten System wurden des Weiteren ein Protokoll mittels Chelex-Kügelchen sowie ein Präzipitationsprotokoll in die Validierung einbezogen. Die Verlustberechnungen anhand des Genomäquivalent-Standards zeigten, dass mit dem optimierten Protokoll des Blood and Tissue Kits bis zu 70 % der eingesetzten Zellen im qPCR-System wiedergefunden werden konnten. Auf einen ähnlichen Wert kam das In-House-

Verfahren mit Chelex-Kügelchen, was dadurch erklärbar ist, dass für den Zellaufbruch derselbe Lysepuffer wie für die Extraktion mit dem Blood and Tissue Kit gewählt wurde und im Anschluss – auf Basis der Ergebnisse der Optimierungsarbeiten für dieses Kit – eine zusätzliche Kochlyse erfolgte. Das kitbasierte Verfahren von Roche zeigte Wiederfindungsraten um die 30 %. Die Ausbeuten bei Extraktion mit diesen Verfahren lagen demnach nahe beieinander. Die DNA-Extraktion mit dem hier verwendeten In-House-Präzipitationsprotokoll hatte die mit Abstand größten Verluste zu verzeichnen. Ein Grund der geringen Wiederfindungsrate von lediglich ca. 1 % stellte vermutlich ein Handling-Problem dar. Bei dem verwendeten Präzipitationsprotokoll sind eine hohe Anzahl an Zentrifugations- und Proben-Überführungs-Schritten inkludiert, jeder für sich birgt die Gefahr, DNA-Moleküle in den zu verwerfenden Überstand bzw. als Restflüssigkeit im Reaktionsgefäß zu verlieren. Andere Autoren publizieren für MAP durchaus Präzipitationsprotokolle und erreichen damit gute Sensitivitäten, gerade in Anbetracht dessen, dass das DNA-Pellet nach Präzipitation in geringem Volumen resuspendiert und somit hoch konzentriert in die PCR eingesetzt werden kann (Gao et al., 2007).

Mit dem hier weiterverwendeten säulenbasierten System von Qiagen ist aufgrund der geringen Anzahl solcher kritischen Schritte eine hohe – auch Experimentatoren-unabhängige – Reproduzierbarkeit gewährleistet; somit fand dieses Verfahren aufgrund der hohen berechneten Wiederfindungsraten als Protokoll der Wahl Verwendung. Gerade auch unter Berücksichtigung der weiteren Verwendung in komplexen Matrices wie Milch sollte ein säulenbasiertes System, das die DNA nach Bindung an die Säule durch Waschschriffe von anderen Komponenten der Matrix säubert, einen Vorteil zum hier validierten Chelex-Protokoll bieten. Letzteres Verfahren überzeugte durch ähnliche Wiederfindungsraten in Reinkultur und kann kostengünstig für DNA-Extraktionen aus unkomplizierten Matrices eingesetzt werden, bei denen keine PCR-Inhibitoren zu erwarten sind.

MAP-Aufkonzentrierung aus Milch über Zentrifugation

Nach Optimierung der eigentlichen DNA-Extraktion aus MAP-Zellen wurde in einem weiteren Schritt getestet, inwieweit sich der CP-Wert in der qPCR verändert bei Extraktion von mit definierter Zellzahl dotierter Milch im Vergleich zur direkten Extraktion derselben MAP-Anzahl, suspendiert in PBS. Mögliche Einflussfaktoren an dieser Stelle wären einerseits Verluste bei der Aufkonzentrierung der MAP aus Milch und andererseits Inhibitoren, die aus der Milch in die PCR gelangen. In der Literatur wird häufig ein Ausgangsvolumen von 10 ml verwendet (Grant et al., 1998, Tasara und Stephan, 2005, Molitor, 2014), weshalb die ersten Vorversuche ebenfalls mit diesem Volumen durchgeführt wurden. In der Regel wird in einem

ersten Schritt die Milch abzentrifugiert, wobei Zentrifugationsdauer und g -Zahl von Protokoll zu Protokoll stark variieren können (Grant und Rowe, 2001). Nach der Zentrifugation wird entweder nur das Pellet extrahiert (Tasara und Stephan, 2005, Molitor, 2014) oder Rahmschicht und Pellet in die Extraktion einbezogen (O'Mahony und Hill, 2004, Gao et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit wurden daher verschiedene Zentrifugationsprotokolle getestet, die unterschiedliche Zentrifugationsdauern und g -Zahlen beinhalteten; das erhaltene Pellet wurde entweder direkt extrahiert oder einem zusätzlichen Waschschrift unterzogen, die Flüssigphase nach der Zentrifugation wurde entweder direkt komplett entfernt oder das Pellet in 1 ml Restflüssigkeit resuspendiert und ein weiterer Zentrifugationsschritt bei High-Speed angeschlossen; ein Protokoll berücksichtigte zusätzlich die Rahmfraction. Diejenigen Protokolle, bei denen ausschließlich das Pellet weiterverarbeitet wurde, zeigten die größten CP-Wert-Erhöhungen in der qPCR, also die höchsten Verluste auf. Dies war unabhängig von Zentrifugations-Parametern und unabhängig davon, ob das Pellet vor der Extraktion gewaschen wurde, oder nicht. Auch Gao und Kollegen (2007) untersuchten den Einfluss eines Waschschriftes und stellten tendenzielle Verschlechterungen der Sensitivitäten fest, wenn das Pellet vor Extraktion gewaschen wurde. Trotzdem sind auch Protokolle publiziert, die zur Reduktion von Inhibitoren einen Waschschrift vor der Extraktion durchführen (Giese und Ahrens, 2000) und damit eine Verbesserung der Sensitivität erzielen. Solche Unterschiede könnten dadurch erklärbar sein, dass unterschiedliche Extraktionsverfahren verwendet werden: Dabei werden Inhibitoren teils im eigentlichen Extraktionsschritt entfernt (beispielsweise bei säulenbasierten Verfahren wie in dieser Arbeit verwendet oder bei Verwendung eines Präzipitationsprotokolls, vgl. Gao et al, 2007), sodass eine Vorab-Entfernung während der Zellernte keine weitere Verbesserung einbringt. Andere Verfahren sehen nach der Zellyse keine weitere Reinigung der erhaltenen DNA vor, so dass hier eine Inhibitoreneliminierung durch den Waschschrift bereits vor der DNA-Extraktion vorteilhaft sein kann (vgl. Giese und Ahrens, 2000). Ein erneutes Resuspendieren des Pellets in Restflüssigkeit der Flüssigphase und erneutes Zentrifugieren bei High-Speed, wie es von Tasara und Stephan vorgenommen wird (Tasara und Stephan, 2005), führte in den eigenen Untersuchungen tendenziell zu höheren Verlusten als bei direkter Extraktion des Pellets nach erster Zentrifugation, was wiederum mit oben bereits beschriebenen Überführungs-Verlusten erklärt werden könnte. Durch Berücksichtigung der Rahmfraction bei der Extraktion – dort angesammelte MAP-Zellen sollten im verwendeten Protokoll von Gao et al. (2007) durch Erwärmen und HPC-Vorbehandlung der Rahmschicht ins Pellet überführt werden – konnte die CP-Differenz $CP_{MAP \text{ aus Milch}} - CP_{MAP \text{ direkt}}$ auf 3 gesenkt werden; dies stellte in den hier

durchgeführten Versuchen das Protokoll mit den geringsten Verlusten dar. Grund für die trotzdem erhebliche CP-Wert-Verschiebung könnte sein, dass entgegen der Aussage der entsprechenden Publikation und trotz empfohlener Vorbehandlung der Milch kein vollständiger Übergang der MAP-Zellen aus der Rahmschicht ins Pellet während der Zentrifugation stattfand (Gao et al., 2007). Ferner kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine ineffizientere DNA-Extraktion stattfand, da während der Zentrifugation neben dem Zielorganismus weitere Milchbestandteile unspezifisch aufkonzentriert werden, die möglicherweise die DNA-Extraktion aus dem Zielorganismus stören. Die Aufkonzentration der MAP aus Milch stellt daher den eigenen Untersuchungen zufolge einen äußerst kritischen Punkt bei der Etablierung sensitiver Nachweissysteme dar, weshalb diesem Schritt besondere Aufmerksamkeit zukommen sollte. Eine alternative Vorgehensweise wäre die Antigen-Antikörper-basierte Separation. Dabei könnte der Zielorganismus spezifisch aus den übrigen Bestandteilen der Milch separiert werden, was die weitere DNA-Extraktion aus MAP und damit die Detektion über PCR vereinfachen und das Detektionslimit herabsetzen könnte. Allerdings sind die bisher publizierten Verfahren, die sich dieses Prinzip, etwa durch immunomagnetische Separation, zunutze machen (z. B. Grant et al., 2000), in ihrer Gesamtnachweisgrenze dem hier in dieser Arbeit beschriebenen Verfahren nur unwesentlich überlegen, was den weiteren Optimierungsbedarf der bisher etablierten Antikörper-basierten Verfahren belegt.

Die Ergebnisse legen nahe, dass sich ein nicht unerheblicher Anteil von MAP-Zellen aufgrund der lipophilen Zellwand während der Zentrifugation in der Rahmfraktion ansammelt. Obwohl auch weitere Studien auf die Notwendigkeit verweisen, die Rahmfraktion beim MAP-Nachweis zu berücksichtigen (Millar et al., 1996, O'Reilly et al., 2004, Gao et al., 2005, Gao et al., 2007), wird häufig mit validen Resultaten lediglich das Pellet extrahiert (Corti und Stephan, 2002, Jayarao et al., 2004, Tasara und Stephan, 2005, Molitor, 2014), wenn sich dies auch in der hier vorliegenden Studie für einen sensitiven Nachweis nachteilig darstellte.

PCR-Inhibitoren

Die Methode der Wahl bei der Quantifizierung von MAP stellte der PCR-Nachweis dar. Aus diesem Grund war es nicht unmittelbar möglich, eine Erhöhung des CP-Wertes bei Zellernte und Extraktion von MAP aus dotierter Milch im Vergleich zur Extraktion von MAP aus PBS unzweifelhaft den Verlusten bei der Aufkonzentrierung zuzuordnen; auch ein beeinträchtigter PCR-Nachweis aufgrund der Co-Extraktion von Inhibitoren kommt als Ursache in Betracht. Um die Rolle von Inhibitoren beurteilen zu können, wurde DNA-Extrakt undotierter Milch

mit dem DNA-Extrakt aus MAP in Reinkultur versetzt und vergleichend zum Extrakt der Reinkultur (aus PBS) in Aqua dest. gemessen. Im Gegensatz zur unzureichenden Aufkonzentration der MAP aus Milch spielten nach den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen PCR-Inhibitoren keine kritische Rolle für den sensitiven MAP-Nachweis aus Milch. Milch wird in der Literatur aufgrund des Calciumionengehalts als schwierige Matrix beschrieben, da Calcium-Ionen in der PCR als Inhibitoren fungieren (Bickley et al., 1996). Bei Verwendung eines säulenbasierten Systems wie dem Blood and Tissue Kit von Qiagen werden vermutlich PCR-Inhibitoren vor dem Eluieren der DNA von den Säulchen abgetrennt und verworfen: In den eigenen Untersuchungen konnten keine Verschiebungen der CP-Werte von dotierten Milchextrakten im Vergleich zu dotiertem Aqua dest. gezeigt werden, eine Hemmung der PCR durch co-eluierte Milchinhaltsstoffe konnte somit in den hier getesteten Fällen ausgeschlossen werden. Zur Absicherung des Testsystems, das im Rahmen des Verbundprojektes etabliert werden soll, könnte dennoch eine interne Amplifikationskontrolle eingeführt werden. Durch Amplifikation des internen Standards, der zu jeder individuellen Probe zugegeben und durch ein anderes Primerpaar amplifiziert wird, können falsch negative Ergebnisse, die sich aus PCR-Inhibitoren ergeben, identifiziert und verhindert werden (Tasara und Stephan, 2005).

2.3 Etablierter Sybr-Green qPCR-Assay zur Detektion von MAP aus Milchproben

Trotz einer Optimierung unter Berücksichtigung aller in dieser Arbeit aufgeführten und diskutierten Problematiken (Berücksichtigung der Klumpenbildung als Fehlerquelle für Dotierungen, nicht triviale DNA-Extraktion aus MAP-Zellen aufgrund besonderer Zellwandstruktur, Aufkonzentration der MAP über Zentrifugation und Berücksichtigung der Rahmfraction aufgrund lipophiler Zellwand, Prüfung auf PCR-Inhibitoren) konnten in dem hier etablierten Gesamtsystem nur ca. 10 % der eingemischten MAP-Zellen über F57-qPCR wiedergefunden werden (berechnet über Genomäquivalent-Standard); 90 % der Zellen / Genome gingen in den unterschiedlichen Schritten des Nachweissystems – überwiegend bei der Aufkonzentration – verloren. Als positiv zu bewerten war dabei, dass die Wiederfindungsrate von 10 % auch noch bei niedrigem Spiking-Level (2×10^2 MAP/ml Milch) erhalten blieb.

Das minimale Detektions-Limit lag bei Verwendung des Primerpaares F57 und ISMAP04 bei 20 MAP/ml Milch, unabhängig davon, ob es sich um Vorzugsmilch oder pasteurisierte Frischmilch handelte. Dieses minimale Detektionslimit wurde jedoch nur mit mangelhafter Reproduzierbarkeit von lediglich 50 % erreicht. Auch Herthneck und Kollegen (2008)

berichten über schlechte Reproduzierbarkeit positiver Ergebnisse ihres PCR-Assays zur MAP-Detektion in Milchproben bei MAP-Konzentrationen von unter 100 MAP-Zellen/ml Milch. Die sicher detektierbare Nachweisgrenze lag in dem hier etablierten System mit allen verwendeten Primerpaaren bei 200 MAP/ml Milch bei 50 ml Ausgangsvolumen – Konzentrationen zwischen 20 und 200 MAP-Zellen wurden nicht getestet. In den eigenen Untersuchungen wurde nach den qPCR-Läufen jeweils ein Gelauftrag vorgenommen, um die erhaltenen Amplifikationskurven und Schmelztemperaturen zu verifizieren. Dabei stellte sich heraus, dass die neu generierten Primerpaare trotz Optimierung der Annealing-Temperatur nach wie vor unspezifische Bindungen generierten. Diese unspezifischen Bindungen machten eine Analyse ohne Gelauftrag unmöglich. Diese Primerpaare sind demnach für einen MAP-Nachweis in der Probenmatrix Milch den bereits publizierten Primerpaaren F57 und ISMAP04 unterlegen. Die Schmelzkurvenanalyse und Bandenanalyse auf dem Agarosegel der bereits publizierten Primerpaare zeigte, dass in undotierten Milchproben neben den Primer-Dimeren keine unspezifischen Amplikons generiert wurden. Das 255 bp-Fragment des *f57*-genetischen Elements wies einen spezifischen Peak bei 88 °C während der Schmelzkurvenanalyse auf, die Peak-Höhe korrelierte mit der eingemischten MAP-Anzahl; der Peak von Primer-Dimeren lag deutlich abgrenzbar im Minimum 8 °C darunter. Dies bedeutet, dass in dem hier etablierten Sybr-Green-Assay für jede Reaktion eine erfolgreiche Amplifikation via Schmelzkurvenanalyse über einen vorhandenen Peak bei 88 °C beurteilt werden kann, zudem war es möglich, durch die Einführung eines vierten PCR-Schritts das unspezifische Fluoreszenzsignal aufgrund von Primer-Dimeren aus der Quantifizierung auszuschließen und so valide Quantifizierungen zu erhalten. Die Schlussfolgerungen über die Beurteilung einer erfolgreichen Amplifikation des Zieltargets auch ohne Gelauftrag wurden auch von O'Mahony und Hill in ihren Sybr-Green Assay zur Detektion von MAP anhand des *IS900* Elements gezogen; ebenso wie in der vorliegenden Arbeit korrespondierte die letzte sichtbare spezifische Bande auf dem Agarosegel mit einer Peakhöhe von 2 bis 3 Fluoreszenzeinheiten in der Schmelzkurvenanalyse (O'Mahony und Hill, 2002).

Im Folgenden sollen die eigenen Ergebnisse mit bereits publizierten Nachweisgrenzen abgeglichen werden. Ein Vergleich der eigenen Ergebnisse mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen sowie der Arbeitsgruppen untereinander ist immer unter Vorbehalt zu betrachten: Wie oben bereits ausführlich diskutiert, werden unterschiedliche Probenvolumina, Probenaufbereitungsprotokolle oder andere PCR-Systeme verwendet. Des Weiteren werden Dotierungen mit unterschiedlichen MAP-Kulturen durchgeführt; wie eingangs diskutiert, kann dies – bei Vorliegen nicht-homogener Dotierungssuspensionen – als Fehlerquelle bei der

Quantifizierung des Spiking-Levels fungieren. Auch Nachweisgrenzen-Angaben in KbE/ml anstatt Zellen/ml in PCR-Systemen sind aufgrund der tendenziellen Vortäuschung niedrigerer Nachweisgrenzen mit Vorsicht zu betrachten, da hier über tote Zellen zusätzlich DNA ins PCR-System eingebracht wird, die jedoch in der kulturellen KbE-Quantifizierung nicht berücksichtigt wird. Die Bestimmung des Dotierungslevels über KbE könnte demnach zu einer Unterschätzung des tatsächlichen Spiking-Levels und entsprechend zum Vortäuschen niedrigerer Nachweisgrenzen führen. So korrelieren nach Studien von Herthnek 100 MAP-Zellen mit lediglich 1–10 KbE (Herthnek, 2006, Herthnek et al., 2008). In Tabelle 37 sollen nun einige Publikationen zum MAP-Nachweis in Milch, aufgeschlüsselt in die einzelnen Bereiche Dotierungssuspension, Probenaufbereitung, PCR-System, mit ihren publizierten Nachweisgrenzen zusammengefasst dargestellt werden.

Tabelle 37: Nachweisgrenzen verschiedener Arbeitsgruppen beim molekularen biologischen Nachweis von MAP in Milchproben

Arbeitsgruppe	Ausgangssuspension für Dotierung	Probenvolumen	Aufkonzentrierung	Extraktionsmethodik	PCR-System	Target	Nachweisgrenze
Tasara und Stephan, 2005	Keine Angabe	10 ml	Zentrifugation Verwendung des Pellets	Präzipitation	Sondenbasierte Real-Time-PCR	<i>f57</i>	10-100 Zellen/ml
Gao et al., 2007	Flüssigkultur ohne Tween-Zusatz: Aufbruch von Klumpen durch Vortexen mit Glasbeads	50 ml	Zentrifugation Verwendung Rahm und Pellet	Präzipitation	Qualitative PCR	<i>IS900</i>	< 1 KbE/ml
O'Mahony und Hill, 2004	Flüssigkultur ohne Tween/keine weitere Behandlung	25 ml	Zentrifugation Verwendung Rahm und Pellet	Säulenbasiert	Sondenbasierte Real-Time-PCR	<i>IS900</i>	< 100 KbE/ml
Molitor, 2014	Flüssigkultur mit Tween-Zusatz	10 ml	Zentrifugation Verwendung Pellet	Säulenbasiert	Sondenbasierte Real-Time-PCR	<i>f57</i>	70 Zellen/ml
Odumeru et al., 2001	M7H11 Festmedium/Aufbruch von Klumpen durch Spritzenadelbehandlung	1 ml	Zentrifugation Verwendung Rahm und Pellet	Präzipitation	Qualitative PCR	<i>IS900</i>	100 KbE/ml

In einer veröffentlichten Umfrage von Grant und Rowe werden des Weiteren Detektionslimits in PCR-basierten Systemen mit < 1 bis 1000 KbE/ml Milch von unterschiedlichen Laboren angegeben (Grant und Rowe, 2001). Der hier etablierte Sybr-Green-Assay mit dem Target *f57* und einem Detektionslimit von 20–200 MAP/ml Milch gliedert sich in diese Ergebnisse ein.

Eine Optimierung in Bezug auf die Sensitivität ist jedoch unbedingt erforderlich. In der vorliegenden Arbeit wurde als größte Schwachstelle des Assays die Aufkonzentrierung der MAP über Zentrifugation definiert. Im Verbundprojekt soll daher in Zukunft ein Capture-Antikörper zur Antigen-Antikörper-basierten Separation Verwendung finden. Ob und inwieweit dies einen positiven Beitrag zur Verbesserung der Sensitivität leisten kann, bleibt abzuwarten.

3. Feldproben

Dreiundzwanzig kommerziell erhältliche Milchproben (20 pasteurisierte und 3 Vorzugsmilchproben) wurden sowohl kulturell als auch mit der hier etablierten molekularbiologischen Methode auf MAP getestet; in keiner der Proben konnte der Erreger oder dessen DNA nachgewiesen werden. Dass MAP in Milchproben auch aus dem bayerischen Handel vorkommt, kann auf Basis dieser Ergebnisse dennoch aus folgenden Gründen nicht ausgeschlossen werden: Die Stichprobengröße war nur orientierender Natur, für aussagekräftige Ergebnisse zur Risikobewertungen müsste eine hohe Anzahl an Milchproben untersucht werden. In einer Studie aus den USA wurden beispielsweise über 700 pasteurisierte Milchproben kulturell untersucht, die innerhalb eines Jahres aus verschiedenen Staaten bezogen wurden. Dabei konnten in knappen 3 % der Proben lebende MAP nachgewiesen werden; aufgrund des langen Zeitraums, in dem die Beprobung stattfand, konnte zudem ein saisonaler Einfluss auf das MAP-Vorkommen in Milch notiert werden (Ellingson et al., 2005). Ein weiteres Problem stellen falsch negative Ergebnisse und die unzureichenden Nachweisgrenzen beider Verfahren dar. Giese und Kollegen untersuchten unterschiedliches Probenmaterial von klinisch auffälligen Rindern. In lediglich fünf von acht fäkalpositiven Tieren konnten lebende MAP in deren Milch nachgewiesen werden, jedoch in Konzentrationen von nur < 100 KbE/ml (Giese und Ahrens, 2000). Diese Konzentration liegt bei beiden Verfahren nah am Detektionslimit, obwohl es sich um Milch bereits klinisch auffälliger Tiere handelte. Dass gerade bei pasteurisierten Milchproben – resultierend aus einer erheblichen Vorschädigung der MAP-Zellen durch Hitzeinwirkung – das kulturelle Verfahren mit großen Nachteilen aufgrund der notwendigen vorgeschalteten HPC-Behandlung behaftet ist und demnach große Gefahr eines falsch negativen Ergebnisses birgt, wurde bereits unter 1.3 ausführlich diskutiert. Der hier etablierte PCR-Nachweis von MAP wäre zwar nicht auf überlebende MAP zur Detektion angewiesen, zeigte jedoch ein höheres Detektionslimit im Vergleich zum kulturellen Verfahren auf (20–200 Zellen/ml vs. 2 KbE/ml) und ist demnach – zum derzeitigen Zeitpunkt – ebenso stark mit dem Risiko behaftet, falsch

negative Ergebnisse zu generieren. Herthnek und Kollegen stießen in ihrer Studie auf dieselbe Problematik. Ihren Ergebnissen zufolge ist in Tankmilchproben mit geringen MAP-Konzentrationen zu rechnen, die nah am Detektionslimit ihrer PCR-Methodik von 100 KBE/ml Milch lagen (Herthnek et al., 2008). Ergänzend ist hier zu erwähnen, dass die Verwendung eines multi-copy-Targets wie *IS900* sich generell positiv auf die Sensitivität des PCR-Nachweises auswirkt. In der vorliegenden Arbeit wurde auf die Verwendung eines solchen *IS900*-basierten Verfahrens jedoch verzichtet, da zum einen die Spezifität für MAP nicht gewährleistet ist (Grant, 2005) und zum anderen die Verwendung eines single-copy-Targets die Rückschlüsse von Target zu Genom zu Zelle erleichtert, was die angestrebte Aufschlüsselung der Verlustquellen über die Schritte hinweg – von der Aufkonzentrierung ganzer Zellen bis hin zur Amplifikation des Targets – begünstigt.

4. Lebend-Tot-Unterscheidung von MAP im qPCR-System

Das ideale Szenario im Lebensmittelbereich stellt häufig die ausschließliche Detektion lebender Zellen dar: Lebensmittel-Proben mit lebenden (potenziellen) Pathogenen oder Zoonose-Erregern sollten einerseits zum Schutz des Verbrauchers sicher detektiert und aus dem Verkehr gezogen werden können, auf der anderen Seite sollten bei ausschließlichem Vorliegen toter Erreger falsch positive Befunde vermieden werden. Anhand der herkömmlichen PCR-Methodik ist eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen jedoch nicht möglich; Abhilfe könnten DNA-interkalierende Reagenzien schaffen, die an einer Vielzahl von Bakterienspezies bereits getestet wurden (Cawthorn und Witthuhn, 2008, Kobayashi et al., 2009, Kralik et al., 2010, Nkuipou-Kenfack et al., 2013).

Optimierungsarbeiten

In der vorliegenden Arbeit sollten als Vorversuch die Reagenzien EMA, PMA und PMAxx auf ihre Tauglichkeit zur Lebend-Tot-Unterscheidung in Reinkultur geprüft werden. Es stellte sich heraus, dass im direkten Vergleich die Reagenzien EMA und PMA ähnliche Ergebnisse erzielen konnten, die leicht erhöhte Tendenz des Reagenz EMA, auch lebende Zellen zu penetrieren, wurde auch an anderen Bakterienspezies beobachtet (Flekna et al., 2007). Das weiterentwickelte Produkt PMAxx konnte sich gegen die bereits länger auf dem Markt befindlichen Reagenzien nicht durchsetzen. Vergleichsstudien für Bakterien zu diesem Produkt fehlen laut Eigenrecherche bislang; Verwendung fand es bisher an eukaryotischen Zellen im Rahmen von Virus-Studien (Randazzo et al., 2016, Randazzo et al., 2017). Laut Hersteller soll PMAxx im Vergleich zu PMA eine weitere CP-Wert-Verschiebung um ca. 7 CP-Werte verursachen (Testkeim *B. subtilis*) (<https://biotium.com/wp-content/uploads/2013>

[/07/PMAxx-PMA-Flyer.pdf](#), letzter Zugriff 03/2018), was für MAP in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden konnte. Die weitere Optimierung des Reagenz PMA ergab, dass bei einer PMA-Konzentration von 25 μM und 30-minütiger Inkubation die besten Ergebnisse erzielt werden konnten. Kralik und Kollegen untersuchten ebenso verschiedene PMA-Behandlungen für MAP in Reinkultur und kamen bezüglich der Konzentration auf dasselbe Ergebnis. Auch in ihrer Studie wurden 25 μM als Konzentration der Wahl genutzt (Kralik et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit konnte das Protokoll durch verlängerte PMA-Inkubation optimiert werden, was auch für *Bacillus subtilis* Sporen publiziert ist (Rawsthorne et al., 2009). Die Zugabe von Natriumdeoxycholat resultierte in der höchsten Amplifikationshemmung toter MAP-Zellen. Eine Destabilisierung bereits geschädigter MAP-Zellen durch das Surfactant, wie es bereits für *Vibrio vulnificus* beschrieben wurde, scheint demnach auch für MAP zu gelten (Lee und Levin, 2009). Nachteil war wiederum der verstärkte Einfluss auch auf lebende Zellen, wie es auch schon für *Listeria monocytogenes* gezeigt werden konnte (Nkuipou-Kenfack et al., 2013).

Ein gewisser Einfluss von PMA auch auf die Lebend-Kontrollen wird dadurch erklärbar, dass zu einem bestimmten Prozentsatz in der hier verwendeten Abschwemmung von HEYM-Festagar auch vorgeschädigte Zellen enthalten waren (vgl. Tabelle 17: Differenz aus Gesamtzellzahl und kultivierbaren Zellen rund 0,2 \log_{10} -Stufen). Die Anzahl der insgesamt vorhandenen Zellen lag also etwa um den Faktor 1,58 höher als die Anzahl kultivierbarer Zellen; dies erklärt allerdings nur einen geringen Anteil der beobachtbaren CP-Wert-Verschiebungen von rund 2 (eine Differenz von 3,3 CP-Werten entspricht in etwa einem Konzentrationsunterschied mit Faktor 10, d. h. von einer \log_{10} -Stufe), selbst wenn man davon ausgeht, dass diese nicht-kultivierbaren Zellen tatsächlich ausschließlich tote Zellen (und nicht VBNC-Zellen) darstellten. Auch andere Studien berichteten von Differenzen von 1-2 CP-Werten in Präparationen „lebender“ Zellen aufgrund der PMA-Behandlung (Kralik et al., 2010, Ricchi et al., 2014). Die Tatsache, dass die hier beobachtbare CP-Wert-Verschiebung erheblich deutlicher ausfiel, als es aus der oben beschriebenen \log -Stufen-Differenz aus Gesamtzellzahl und kultivierbaren Zellen erklärbar ist, und die gesteigerte CP-Verschiebung in lebenden Zellen aufgrund intensiver PMA-Behandlung wie Doppelbehandlungen, Doppelbehandlungen mit erhöhten Konzentrationen oder erhöhter Inkubationstemperatur lassen jedoch darauf schließen, dass tatsächlich mit steigender Behandlungsintensität auch eine Penetration lebender Zellen stattfand und MAP bis zu einem gewissen Grad sensitiv auf PMA reagiert. Diese Vermutung wird von Kralik und Kollegen ebenfalls geteilt (Kralik et al., 2010). Die Ergebnisse zeigten, dass bei der PMA-Methodik ein

schmaler Grat herrscht, um eine maximale Amplifikationshemmung in toten Zellen zu gewährleisten, was falsch positiven Befunden entgegenwirkt, aber auch lebende Zellen möglichst unbeeinflusst zu lassen, um falsch negativen Ergebnissen vorzubeugen.

Anwendbarkeit der PMA-Methode im Lebensmittelbereich

Zur Validierung der etablierten Methode wurden zunächst zwei weitere MAP-Stämme mit dem optimierten Protokoll analysiert. Es zeigte sich, dass geringe Varianzen in den berechneten Delta CP-Werten auftreten können, was auch in einer Studie von Kralik et al. dokumentiert wurde (Kralik et al., 2010). Das Feldisolat zeigte sowohl in der Lebend-Kontrolle als auch in der Tot-Kontrolle erhöhte Amplifikationshemmungen. Dies könnte mit einer erhöhten Sensitivität des MAP-Stammes für PMA erklärt werden, gewisse Varianzen des prozentualen Anteils bereits vorgeschädigter Zellen der Ausgangssuspensionen der verschiedenen MAP-Stämme können jedoch ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.

Durch Einsatz verschiedener Lebend-Tot-Verhältnisse sollte überprüft werden, ob und bis zu welchem Ausmaß die etablierte PMA-Methodik in der Lage ist, Suspensionen mit ausschließlich toten Zellen von solchen mit lebenden Zellen zu unterscheiden. Es zeigte sich, dass bis zu einem Anteil von 25 % lebende Zellen in der Suspension diese von Suspensionen mit 100 % toten Zellen deutlich unterschieden werden konnte. Ab lediglich 10 % und weniger lebenden Zellen in der zu untersuchenden Suspension konnte keine statistisch abgesicherte Aussage mehr getroffen werden, ob die Suspension nun lebende Zellen enthielt oder nicht. Im Lebensmittelbereich ist diese Spezifität unzureichend. Soll eine Probe darauf überprüft werden, ob Lebensmittel lebende potenzielle Zoonose-Erreger wie MAP enthalten, so ist die mit dieser Methode machbare Aussage „es befinden sich entweder keine lebenden Zellen oder es befinden sich noch 10 % lebende MAP in der Probe“ nicht akzeptabel. In einer Publikation, die sich mit der PMA-Methodik zur Überwachung des Pasteurisierungsprozesses beschäftigt, konnten über statistische Auswertungen der erhaltenen Ergebnisse lediglich Aussagen mit 80 %iger Wahrscheinlichkeit darüber getroffen werden, ob sich in einer Milchprobe lebende MAP, lebende und tote MAP oder nur tote MAP befanden. Die Mischkulturen aus lebenden und toten Zellen wurden dabei lediglich mit minimal 25 % lebenden MAP-Zellen in der Probe durchgeführt (Ricchi et al., 2014), also unter vergleichsweise günstigen Bedingungen. Eine weitere Problematik der PMA-Methode stellt die bereits diskutierte unzulängliche Nachweisgrenze der PCR-basierten Systeme im Allgemeinen dar, worauf auch Ricchi et al. (2014) verweisen. Der eigenen Auffassung zufolge erbringt die PMA-Methode zum derzeitigen Stand für den Lebensmittelbereich nicht die erforderliche Aussagekraft. Alternativen wie RNA-basierte RT-qPCR-Assays könnten Abhilfe schaffen, wie für

kommensale Bakterien bereits publiziert (Matsuda et al., 2007). RNA-Moleküle liegen, je nach Target, in der Zelle oftmals in hohen Kopienzahlen vor. Diese Technik könnte somit sowohl zur Optimierung der Nachweisgrenze, als auch wegen der erwarteten Aussagekraft über das Vorliegen lebender Zellen eine erfolgversprechende Alternative darstellen. Dziecol et al. (2010) beschäftigten sich mit einem RNA-basierten qPCR-Assay für MAP und konnten bereits erfolgversprechende Ansätze liefern, verwiesen jedoch auch darauf, dass – durch eventuelle geringe Expression des gewählten Targets Mptb52.16, optimierungsbedürftige RNA-Isolation und/oder ineffiziente reverse Transkription – das Detektionslimit bisher im Vergleich zu DNA-basierten Systemen nicht deutlich gesenkt werden konnte. Neben klassischen mRNA-basierten Nachweissystemen wäre Cangelosi und Meschke (2014) zufolge die Pre-rRNA-Analyse eine weitere Möglichkeit, ausschließlich lebende Zellen zu detektieren. Das Prinzip beruht darauf, Bakterien mit Nährstoffen zu stimulieren, woraufhin in lebenden Zellen rRNA Precursors synthetisiert werden. Diese Pre-rRNA liegt nach Stimulation in hunderten bis tausenden Kopien in der Zelle vor, was die PCR-basierte Detektion vereinfachen sollte. Aufgrund der hypervariablen Regionen in der Nukleotid-Sequenz von Pre-rRNA-Molekülen sollte ein spezifischer Nachweis möglich sein (Cangelosi und Meschke, 2014). Diese relativ neue Anwendung der RNA-basierten Detektion könnte auch für den Nachweis lebender MAP in Milch getestet werden. Dafür müssten spezifische Primer etabliert und die Stimulation optimiert werden, um möglichst hohe Pre-rRNA-Ausbeuten zu erreichen. Eine solche Stimulation gerade für MAP zu etablieren erscheint als keine geringe Aufgabe. Dies zeigt, dass weitere Forschungsarbeit an diesem komplexen Themenfeld unbedingt erforderlich ist, um in Zukunft für den präventiven Verbraucherschutz mit praxistauglichen, sensitiven und spezifischen Nachweissystemen für MAP, im Lebensmittelbereich inklusive gesicherter Lebend-Tot-Unterscheidung, aufwarten zu können.

VI. SCHLUSSFOLGERUNGEN

1) Die Aggregatbildung von MAP stellt ein bekanntes Problem bei dessen Kultur in Flüssigmedium dar. Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Tween 80 in einer Endkonzentration von 0,3 % mit einer Reduktion der Aggregatbildung einherging, was sich positiv auf die Möglichkeiten zur Zellzahlbestimmung auswirkte. Alternativ zur Zugabe von Tween – mit der damit verbundenen möglichen Beeinflussung von (antigenen) Zellwandstrukturen – kann dieser Arbeit zufolge auch die Direktabschwemmung von HEYM-Medium genutzt werden. Bei beiden Präparationsarten kann mit einer guten Annäherungen an die tatsächlich in der Probe befindlichen MAP-Anzahl gerechnet werden – eine Grundvoraussetzung für alle Versuchsansätze, bei denen mit einem definierten Inokulum gearbeitet werden soll. Wird die Problematik der Aggregatbildung ignoriert, so kann dies zu Fehleinschätzungen der Zellzahl um mehr als eine log-Stufe führen.

2) Die kulturelle Anzucht von MAP aus Milchproben gilt als Gold-Standard zur Detektion lebender MAP. In den eigenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass auch beim kulturellen Verfahren die Gefahr falsch negativer Ergebnisse sowie einer Unterschätzung der tatsächlich in der Probe befindlichen Zellzahl gegeben ist. Die Gründe dafür sind vielfältig: So ist der aufgrund der langen Inkubationszeit nötige, vorangeschaltete Dekontaminationsschritt gerade für bereits vorgeschädigte MAP ein weiterer Stressor, der die kulturelle Anzucht erschweren kann; auch die Fraktionierung der MAP in die Rahmschicht aufgrund seiner lipophilen Zellwandstruktur erschwert die Detektion. Die Wiederfindungsrate in den eigenen Untersuchungen betrug lediglich 10–20 %, das Detektionslimit lag bei 2 Erregern pro ml bei einem Ausgangsvolumen von 50 ml. Gerade in pasteurisierten Realproben mit vorgeschädigten MAP ist davon auszugehen, dass das Risiko eines falsch-negativen Ergebnisses beim als Gold-Standard deklarierten kulturellen Verfahren als relativ hoch eingeschätzt werden muss.

3) Die über Proteomanalyse gefundenen Protein-Targets AAS04470, ETB08771 und AAS02420 konnten über das Online-Tool BLAST und auf DNA-Ebene auch experimentell als in MAP konserviert und MAP-spezifisch deklariert werden. Sie stehen daher in Zukunft zur Etablierung eines komplexen Nachweissystems zur Verfügung. Die neu generierten Primerpaare zur Amplifikation der codierenden Sequenzen waren beim molekularbiologischen Nachweis über Sybr-Green qPCR in Milchproben bereits publizierten Primerpaaren aufgrund von unspezifischen Bindungen in der Matrix Milch unterlegen.

4) Die Sensitivität beim molekularbiologischen Nachweis von MAP in Milchproben lässt sich durch die Schritte Aufkonzentration von MAP aus der Matrix Milch, Zellaufbruch und DNA-Isolierung aus dem Zielorganismus, sowie Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein von PCR-Inhibitoren in der als Template eingesetzten DNA-haltigen Lösung beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass in der Aufkonzentration von MAP aus Milch über Zentrifugation die höchsten Verluste begründet liegen. Die Rahmfraction sollte bei Extraktion berücksichtigt werden: Unter den sechs verschiedenen evaluierten Protokollen erzielte das einzige Protokoll, das die Rahmschicht gezielt einbezog, die besten Ergebnisse; ein Resultat, das aufgrund der lipophilen Zellwandstruktur von MAP plausibel erscheint. Bei Verwendung eines in Hinblick auf den Zellaufbruch optimierten Protokolls des Blood and Tissue Kits von Qiagen wurden ferner keine die Amplifikation beeinflussenden PCR-Inhibitoren co-eluiert. Die Nachweisgrenze des etablierten kostengünstigen Sybr-Green qPCR-Verfahrens lag mit 20-200 Erregern pro ml Milch im Bereich bereits publizierter Nachweisgrenzen mit kostenintensiveren sondenbasierten Verfahren.

5) Einen Nachteil des molekularbiologischen Verfahrens im Vergleich zum kulturellen Nachweis stellt die mangelnde Unterscheidung lebender und toter MAP-Zellen dar. Im Lebensmittelbereich ist für den vorsorgenden Verbraucherschutz jedoch ausschließlich das Vorhandensein lebender MAP-Erreger von Relevanz. Es konnte gezeigt werden, dass die PMA-Methodik zur PCR-basierten Lebend-Tot-Unterscheidung von MAP für den Lebensmittelbereich unzureichende Aussagekraft besitzt: Aufgrund mangelhafter Unterscheidungsfähigkeit lebender und toter MAP-Zellen im geringen Lebend-Anteil-Bereich konnte keine sichere Aussage getroffen werden, ob sich tatsächlich nur tote MAP in der Probe befinden oder ein geringer Prozentsatz an MAP-Zellen beispielsweise den Pasteurisierungsprozess überlebt haben.

VII. AUSBLICK

Im Rahmen des Verbundprojekts stehen drei neue Targets für einen komplexen molekularbiologischen Nachweis von MAP in komplexen Matrices wie Milchproben zur Verfügung. Die hoch abundanten Protein-Targets AAS04470, ETB08771 und AAS02420 wurden als in MAP konserviert und als MAP-spezifisch deklariert und können in Zukunft beispielsweise darauf getestet werden, ob sie an der Oberfläche der MAP-Zellen lokalisiert sind und somit als Targets für einen Capture-Antikörper zur Aufkonzentration der MAP aus komplizierten Matrices Verwendung finden können. Hierbei könnten synthetisierte Peptide als Immunogen fungieren, letztlich mit dem Ziel, monoklonale Antikörper für Immunoassays zum Nachweis dieser MAP-Proteine oder – bei zugänglicher Lokalisation – die Aufkonzentration von MAP-Zellen zu generieren. Als Alternative könnte anhand der Targets ein RNA-basierter Nachweis etabliert werden. Die ausgewählten Protein-Targets wurden sowohl unter Laborbedingungen in M7H9-Medium als auch in MAP-dotierten Milchproben detektiert, was einen Nachweis in Milch über mRNA-Detektion erhoffen lässt.

Zur Verbesserung der Nachweisgrenze stehen im Verbundprojekt mehrere Alternativen zur Verfügung. Dem – in dieser Arbeit als kritischster Schritt identifizierte – „Aufkonzentrieren der MAP aus Milch über Zentrifugation“ soll durch eine Separation beruhend auf Antigen-Antikörper-Bindung begegnet werden. Dafür sollen MAP-spezifische Antikörper an magnetische Beads gekoppelt werden und dort als Capture-Antikörper fungieren. Neben der Identifizierung möglicher Kandidatenantigene über Proteomanalysen wurden dafür über Immunisierungen von Mäusen und Kaninchen mit gammabestrahlten MAP bereits Antikörper gewonnen, die derzeit charakterisiert werden. Inwieweit dieser Ansatz die Nachweisgrenze verbessert, bleibt abzuwarten. Als alternativer Lösungsweg könnte anhand der neuen Targets ein RNA-basierter Nachweis in einem Reverse-Transkriptase-Assay etabliert werden. Dafür sollten die Expressions-Level der Proteine analysiert werden – stellen diese sich als relativ hoch dar, was aufgrund der hohen Abundanz der gewählten Proteine zu erhoffen ist, so könnte anhand eines mRNA-Nachweises aufgrund der höheren Anzahl an Targetkopien pro Zelle die Nachweisgrenze optimiert werden.

Ein RNA-basierter molekularbiologischer Nachweis hätte ferner in der Theorie – aufgrund der instabilen Natur von RNA-Molekülen – den Vorteil einer inkludierten Detektion ausschließlich lebender Zellen. Dies wäre demnach für den Lebensmittelbereich eine hoffnungsbringende Alternative zur getesteten und für in diesem Kontext bisher unzureichend befundenen PMA-Methodik.

VIII. ZUSAMMENFASSUNG

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) ist der Erreger der in Deutschland meldepflichtigen Paratuberkulose bei Wiederkäuern. Über MAP als potenziellen Zoonose-Erreger wird breit diskutiert. Milch und Milchprodukte stehen dabei als MAP-Expositionsquellen im Fokus der Forschung zum vorbeugenden Verbraucherschutz – insbesondere unter Berücksichtigung des möglichen Überlebens des Erregers während Pasteurisierungsprozessen. Für den Direktnachweis in Milchproben stehen kulturelle Verfahren – die sich jedoch aufgrund der Inkubationsdauer von mindestens 12 Wochen als nicht praxistauglich darstellen – sowie molekularbiologische Verfahren zur Verfügung. Aufgrund der zu erwartenden niedrigen Konzentration von MAP in Milch müssen die Detektionssysteme niedrige Nachweisgrenzen erreichen. Im Rahmen eines Verbundprojektes stand in der vorliegenden Arbeit der molekularbiologische Nachweis von MAP in Milchproben im Fokus. Ziel war es, den molekularbiologischen Nachweis unter anderem über Verlustberechnungen zu analysieren, um in Zukunft erfolgversprechende Ansätze zur Verbesserung des Nachweissystems bei gewährleisteter Spezifität zu generieren.

Dabei wurde zunächst sichergestellt, dass eine sichere und korrekte Bestimmung der Zellzahl von Suspensionen für Dotierungsversuche gewährleistet ist, was aufgrund der Aggregatbildung von MAP in Flüssigkultur nicht trivial ist. In MAP-Flüssigkulturen resultierte eine Tween 80-Zugabe von 0,3 % in einer Minimierung von Zellaggregaten, was sich positiv auf eine akzeptable Annäherung der in der Probe befindlichen Zellzahl auswirkte. Die Ergebnisse der Quantifizierung von Abschwemmungen von HEYM-Agar anhand unterschiedlicher Methoden ließen das Abschwemm-Verfahren als Methode der Wahl erscheinen, die eine optimale Annäherung an die tatsächlich in der Probe befindliche Zellzahl bietet.

Für einen komplexen molekularbiologischen Nachweis wurden über Proteomanalyse des Verbundpartners die neuen MAP-spezifischen Protein-Targets AAS04470, ETB08771 und AAS02420 identifiziert, die nach den hier durchgeführten Analysen als MAP-spezifisch gelten können und deren codierende Sequenzen in MAP konserviert vorliegen. Daraus ergibt sich, dass diese als Protein-Targets für Immunoassays überprüft werden können oder die jeweilig codierenden Sequenzen als Nukleinsäure-Targets in einem DNA- oder RNA-basierten molekularbiologischen Nachweis fungieren können.

Bei der Analyse einzelner Schritte, die Einfluss auf die Spezifität und Sensitivität eines molekularbiologischen Nachweises von MAP in Milchproben ausüben, wurde die Aufkonzentrierung von MAP aus der Probenmatrix Milch als kritischster Punkt zum

Erreichen hoher Sensitivität identifiziert, so dass in das Verbundprojekt als Ersatz alternative Aufkonzentrierungs-Verfahren, wie beispielsweise Antikörper-basierte Capture-Verfahren, eingebunden werden sollen. Anhand der hier etablierten Methode zum MAP-Nachweis in Milchproben konnte über Optimierung des Probenaufbereitungsprotokolls und Etablierung des im Vergleich zu sondenbasierten Systemen kostengünstigeren Sybr-Green-qPCR-Assays mit dem Target *f57* bzw. *ISMAP04* ein Detektionslimit von 20 MAP/ml erreicht werden, jedoch mit mangelhafter Reproduzierbarkeit. Konzentrationen von 200 MAP/ml waren im hier etablierten System sicher detektierbar. Neu generierte Primerpaare, die Teile der codierenden Nukleotidsequenzen der neuen MAP-spezifischen Protein-Targets amplifizieren, waren trotz Optimierung der Sybr-Green-Assays den bereits publizierten Primerpaaren F57 bzw. ISMAP04 aufgrund unspezifischer Bindungen in der Probenmatrix Milch unterlegen, sind jedoch für unkomplizierte Matrices durchaus verwendbar und können künftig zudem für andere Matrices wie beispielsweise Kotproben zur Diagnostik überprüft werden.

Über kulturelles Verfahren und anhand des etablierten molekularbiologischen Nachweis-Systems wurde in einer Stichprobe ein breites Spektrum an handelsüblicher Vorzugsmilch und pasteurisierter Frischmilch auf MAP untersucht, wobei in keiner der getesteten 23 Proben MAP detektiert werden konnte.

Der Nachteil des etablierten qPCR-Systems liegt in der mangelnden Unterscheidung lebender und toter Zellen, wobei im Lebensmittelbereich die Detektion ausschließlich lebender Zellen erwünscht ist, da nur diese für den Verbraucherschutz von Relevanz sind. Anhand DNA-interkalierender Reagenzien wie Ethidiummonoazid (EMA), Propidiummonoazid (PMA) und dem weiterentwickelten Produkt „PMAxxTM“ sollte verifiziert werden, ob diese ein Instrument für die Detektion lebender MAP in Milchproben darstellen könnten. Die besten Ergebnisse ergab die Verwendung von PMA. Nach eingehenden Validierungs- und Optimierungsarbeiten zeigte sich diese Methode für den Lebensmittelbereich jedoch als derzeit unzureichend, da der PMA-Assay keine Aussage darüber ermöglichte, ob sich ausschließlich tote Zellen oder aber auch lebende Zellen bis zu einem Prozentsatz von 10 % in der zu untersuchenden Suspension befanden.

IX. SUMMARY

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) is the causative agent of paratuberculosis in ruminants, a notifiable disease in Germany. MAP is widely discussed as a potential zoonotic agent. Milk and milk products are at the focus of research on preventive consumer protection, since they pose a source of exposure for MAP – particularly because MAP is possibly able to survive pasteurization processes. Culture dependent techniques are available for direct detection of MAP in milk – being impracticable, however, due to long incubation times of 12 weeks or longer – as well as molecular biological techniques. Since MAP occurs in a relatively low concentration in milk, detection systems need to achieve a low limit of detection. This study, as part of a cooperative project, focused on the molecular biological technique for detection of MAP in milk. The purpose of this study was to analyze the molecular biological detection assay, using, among others, loss calculations during sample preparation to generate promising strategies in the future for improved detection while guaranteeing specificity.

First, a correct cell count determination of the spiking-suspension had to be ensured, which proved to be challenging due to aggregation of MAP cells in liquid culture. Addition of Tween 80 to an end concentration of 0.3 % resulted in decreased cell aggregation, positively affecting the accuracy of the cell count determination. Quantification results of cell suspensions obtained from HEYM agar by different methods revealed this washing off technique as method of choice, offering an optimal approximation of the actual cell number in the sample.

With regard to the development of a complex molecular biological detection assay the novel MAP specific protein targets AAS04470, ETB08771 and AAS02420 were initially identified via proteome analysis performed by the cooperation partner. The results of this study showed the MAP-specificity of these targets and the conservation of their coding sequences in the MAP genome. This means that the proteins itself can be tested as potential protein targets in immuno-assays and their respective coding sequences could be utilized as nucleid acid targets in a DNA or RNA based molecular biological detection assay.

The analysis of single steps which influence the specificity and sensitivity of the molecular biological based detection of MAP revealed that the concentration of MAP from the matrix milk is a critical parameter for achieving high sensitivity; therefore it is planned to test alternative strategies like antibody-based capture assays for the concentration of MAP from milk in the near future. Based on the established method for detection of MAP in milk samples, a detection limit of 20 MAP/ml (with poor reproducibility, though) could be

achieved by optimization of sample preparation and establishing a sybr-green-assay targeting *f57* or *ISMAP04*, which is more cost-effective compared to probe based assays. 200 MAP/ml can be reliably detected with the system established in this study. Newly generated primer pairs, amplifying parts of the coding regions of the new MAP specific protein targets, proved to be inferior to the already published primer pairs F57 and ISMAP04 for milk samples due to non-specific bindings in the milk-matrix. They can, however, be used in non-complex matrices and could furthermore be tested for the use in other matrices like fecal samples for diagnostic approaches.

No MAP-cells could be detected by either of the two methods in 23 samples when we randomly sampled and tested a broad spectrum of commercial certified raw milk and pasteurized milk for MAP, using culture and the established molecular biological technique.

Not being able to differentiate between living and dead cells is the main drawback of the newly established qPCR-system, as only the detection of living cells is relevant in the food sector with regard to consumer protection. Therefore, another aim of this study was to evaluate the usability of DNA intercalating reagents like ethidium monoazide (EMA), propidium monoazide (PMA) and "PMAxxTM" for the detection of living MAP cells in milk samples. Best results were obtained with PMA. After initial validation and optimization work this method was found to be currently insufficient for the food sector; the PMA-assay could not determine whether only dead cells or additional living cells, within the tested range of up to 10 %, were in the initial sample.

X. LITERATURVERZEICHNIS

Ahmed, A., et al. (1983). "Incidence of *Bacillus cereus* in milk and some milk products." Journal of food protection **46**(2): 126-128.

Alderman, D. (1985). "Malachite green: a review." Journal of fish diseases **8**(3): 289-298.

Aly, S. S., et al. (2010). "Correlation between Herrold egg yolk medium culture and real-time quantitative polymerase chain reaction results for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in pooled fecal and environmental samples." Journal of veterinary diagnostic investigation **22**(5): 677-683.

Antranikian G. (2006). "Angewandte Mikrobiologie." Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: 272.

Arizcun, C., et al. (1997). "Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus* spp. isolated from milk and Roncal and Idiazabal cheese." International journal of food microbiology **38**(1): 17-24.

Atreya, R., et al. (2014). "Facts, myths and hypotheses on the zoonotic nature of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*." International journal of medical microbiology **304**(7): 858-867.

Ayele, W. Y., et al. (2005). "*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic." Applied and environmental microbiology **71**(3): 1210-1214.

Bastida, F. und R. A. Juste (2011). "Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination." Journal of immune based therapies and vaccines **9**: 8.

Behr, M. A. und D. M. Collins (2010). "Paratuberculosis: organism, disease, control." CABI-Verlag: 1-375.

Benedictus, G., et al. (1987). "Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle." Veterinary Record **121**(7): 142-146.

Beran, V., et al. (2006). "Cell wall deficient forms of mycobacteria: a review." Veterinarni Medicina **51**(7): 365-389.

Bezoz, J., et al. (2014). "Current ante-mortem techniques for diagnosis of bovine tuberculosis." Research in veterinary science **97**: 44-52.

- Bickley, J., et al. (1996). "Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions." Letters in applied microbiology **22**(2): 153-158.
- Birch, L., et al. (2001). "A comparison of nucleic acid amplification techniques for the assessment of bacterial viability." Letters in applied microbiology **33**(4): 296-301.
- Birmingham, P., et al. (2008). "Simulated joint infection assessment by rapid detection of live bacteria with real-time reverse transcription polymerase chain reaction." Journal of bone and joint surgery **90**(3): 602-608.
- Bishop, P. und G. Neumann (1970). "The history of the Ziehl-Neelsen stain." Tubercle **51**(2): 196-206.
- Boelaert, F., et al. (2000). "Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population." Veterinary microbiology **77**(3): 269-281.
- Bögli-Stuber, K., et al. (2005). "Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss dairy cattle by real-time PCR and culture: a comparison of the two assays." Journal of applied microbiology **99**(3): 587-597.
- Boxtel, R. M., et al. (1990). "Effect of polyoxyethylene sorbate compounds (Tweens) on colonial morphology, growth, and ultrastructure of *Mycobacterium paratuberculosis*." Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica **98**(7-12): 901-908.
- Bradner, L., et al. (2013). "Chemical Decontamination with N-Acetyl-L-Cysteine–Sodium Hydroxide Improves Recovery of Viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Organisms from Cultured Milk." Journal of clinical microbiology **51**(7): 2139-2146.
- Brajtburg, J., et al. (1990). "Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action." Antimicrobial agents and chemotherapy **34**(2): 183.
- Büttner, M., et al. (2006). "Paratuberkulose beim Rind—Morbus Crohn beim Menschen: ein ursächlicher Zusammenhang." Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (ed): 1-114.
- Cangelosi, G. A. und J. S. Meschke (2014). "Dead or alive: molecular assessment of microbial viability." Applied and environmental microbiology **80**(19): 5884-5891.
- Cawthorn, D. M. und R. Witthuhn (2008). "Selective PCR detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide." Journal of applied microbiology **105**(4): 1178-1185.

- Chi, J., et al. (2002). "Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea virus, bovine leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum*." Preventive veterinary medicine **55**(2): 137-153.
- Chiodini, R. J., et al. (1984). "Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease." Journal of clinical microbiology **20**(5): 966-971.
- Cocito, C., et al. (1994). "Paratuberculosis." Clinical microbiology reviews **7**(3): 328-345.
- Cook, G. M., et al. (2009). "Physiology of mycobacteria." Advances in microbial physiology **55**: 81-319.
- Corti, S. und R. Stephan (2002). "Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* specific IS900 insertion sequences in bulk-tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland." BMC Microbiology **2**(1): 15.
- Cossu, D., et al. (2011). "Association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with multiple sclerosis in Sardinian patients." PLoS One **6**(4): e18482.
- Coussens, P. M. (2001). "*Mycobacterium paratuberculosis* and the bovine immune system." Animal Health Research Reviews **2**(2): 141-162.
- D'amore, M., et al. (2010). "Molecular identification of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in an Italian patient with Hashimoto's thyroiditis and Melkersson–Rosenthal syndrome." Journal of medical microbiology **59**(1): 137-139.
- De Kruijf, M., et al. (2017). "A comparative study evaluating the efficacy of IS_MAP04 with IS900 and IS_MAP02 as a new diagnostic target for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from bovine faeces." Veterinary microbiology **204**: 104-109.
- De Voss, J. J., et al. (1999). "Iron acquisition and metabolism by mycobacteria." Journal of bacteriology **181**(15): 4443-4451.
- Donat, K., et al. (2012). "Untersuchungen zur Herdenprävalenz von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in Rinderbeständen mithilfe serologischer Testverfahren: Möglichkeiten, Grenzen und Kosten." Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift **125**(9/10): 361-370.
- Dow, C. T. (2006). "Paratuberculosis and Type I diabetes Is this the trigger?" Medical hypotheses **67**(4): 782-785.

Dundee, L., et al. (2001). "Comparative evaluation of four decontamination protocols for the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk." Letters in applied microbiology **33**(3): 173-177.

Dzieciol, M., et al. (2010). "A novel real-time PCR assay for specific detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk with the inherent possibility of differentiation between viable and dead cells." BMC research notes **3**(1): 251.

Ellingson, J. L., et al. (2005). "Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR." Journal of food protection **68**(5): 966-972.

Eriksson, E. und A. Aspan (2007). "Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for *salmonella* detection in faecal samples for cattle, pig and poultry." BMC veterinary research **3**(1): 21.

Fang, Y., et al. (2002). "Comparison of real-time, quantitative PCR with molecular beacons to nested PCR and culture methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine fecal samples." Journal of clinical microbiology **40**(1): 287-291.

Feller, M., et al. (2007). "*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis." The Lancet infectious diseases **7**(9): 607-613.

Flekna, G., et al. (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.

Franciosi, E., et al. (2009). "Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk." International dairy journal **19**(1): 3-11.

Gao, A., et al. (2007). "Improved template DNA preparation procedure for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by PCR." Journal of microbiological methods **69**(2): 417-420.

Gao, A., et al. (2005). "Development of improved method for isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bulk tank milk: effect of age of milk, centrifugation, and decontamination." Canadian journal of veterinary research **69**(2): 81.

Garry, F. (2011). "Control of paratuberculosis in dairy herds." Veterinary clinics: Food Animal Practice **27**(3): 599-607.

- Giese, S. B. and P. Ahrens (2000). "Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture." Veterinary microbiology **77**(3): 291-297.
- Gill, P. und A. Ghaemi (2008). "Nucleic acid isothermal amplification technologies—a review." Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids **27**(3): 224-243.
- Grant, I. (2005). "Zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: the current position." Journal of applied microbiology **98**(6): 1282-1293.
- Grant, I., et al. (2000). "Improved detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by immunomagnetic PCR." Veterinary microbiology **77**(3): 369-378.
- Grant, I. und M. Rowe (2001). "Methods for detection and enumeration of viable *Mycobacterium paratuberculosis* from milk and milk products." Bulletin-International Dairy Federation(362): 41-52.
- Grant, I. R., et al. (1998). "Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from milk by immunomagnetic separation." Applied and environmental microbiology **64**(9): 3153-3158.
- Grant, I. R., et al. (2002). "Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom." Applied and environmental microbiology **68**(5): 2428-2435.
- Greenstein, R. J. (2003). "Is Crohn's disease caused by a mycobacterium? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease." The Lancet infectious diseases **3**(8): 507-514.
- Guérin, I. und C. de Chastellier (2000). "Pathogenic mycobacteria disrupt the macrophage actin filament network." Infection and immunity **68**(5): 2655-2662.
- Guertler, P., et al. (2009). "Sensitive and highly specific quantitative real-time PCR and ELISA for recording a potential transfer of novel DNA and Cry1Ab protein from feed into bovine milk." Analytical and bioanalytical chemistry **393**(6-7): 1629-1638.
- Hagan, W. (1938). "Age as a Factor in Susceptibility to Johne's Disease." Cornell Veterinarian **28**: 34-40.
- Hahn, N., et al. (2017). "Evaluation of different diagnostic methods for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in boot swabs and liquid manure samples." BMC veterinary research **13**(1): 259.
- Harris, N. B. und R. G. Barletta (2001). "*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine." Clinical microbiology reviews **14**(3): 489-512.

- Herman, L., et al. (2005). "Clumping of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and feces and growth activation after milk heating." Proceedings of the eighth international colloquium on paratuberculosis **3**(b).
- Hermon-Taylor, J. (2009). "*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, Crohn's disease and the Doomsday scenario." Gut pathogens **1**(1): 15.
- Herrold, R. D. (1931). "Egg yolk agar medium for the growth of tubercle bacilli." Journal of infectious diseases **48**(2): 236-241.
- Herthnek, D. (2006). "Detection and Confirmation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Clinical Samples". Licentiate Thesis, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Swedish University of Agricultural Sciences.
- Herthnek, D., et al. (2008). "A robust method for bacterial lysis and DNA purification to be used with real-time PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk." Journal of microbiological methods **75**(2): 335-340.
- Heuvelink, A., et al. (1998). "Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in raw cow's milk in The Netherlands." Journal of food protection **61**(12): 1597-1601.
- Hubbard, B. K. und C. T. Walsh (2003). "Der Aufbau von Vancomycin: so macht es die Natur." Angewandte Chemie **115**(7): 752-789.
- Ikonomopoulos, J., et al. (2005). "Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail cheeses from Greece and the Czech Republic." Applied and environmental microbiology **71**(12): 8934-8936.
- Immanuel, G., et al. (2008). "Investigation of lipase production by milk isolate *Serratia rubidaea*." Food technology and biotechnology **46**(1): 60.
- Innis, M. und D. Gelfand (1999). "Optimization of PCR: conversations between Michael and David." PCR applications: protocols for functional genomics: 3-22.
- Jakobsen, M., et al. (2000). "A cross-sectional study of paratuberculosis in 1155 Danish dairy cows." Preventive veterinary medicine **46**(1): 15-27.
- Jayarao, B., et al. (2004). "Evaluation of IS900-PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cattle using quarter milk and bulk tank milk samples." Foodborne pathogens & disease **1**(1): 17-26.

Keller, S. M., et al. (2014). "Comparison of fecal culture and F57 real-time polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss cattle herds with a history of paratuberculosis." Acta Veterinaria Scandinavica **56**(1): 68.

Khol, J. L. und W. Baumgartner (2012). "Examples and suggestions for the control of paratuberculosis in European cattle." Japanese journal of veterinary research **60**: 1-7

Kobayashi, H., et al. (2009). "Improving clinical significance of PCR: use of propidium monoazide to distinguish viable from dead *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*." Journal of orthopaedic research **27**(9): 1243-1247.

Koets, A. P., et al. (2015). "The within host dynamics of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection in cattle: where time and place matter." Veterinary research **46**(1): 61.

Kralik, P., et al. (2010). "*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability determination using F57 quantitative PCR in combination with propidium monoazide treatment." International journal of food microbiology **141**: 80-86.

Kuehnel, M. P., et al. (2001). "Characterization of the intracellular survival of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: phagosomal pH and fusogenicity in J774 macrophages compared with other mycobacteria." Cellular microbiology **3**(8): 551-566.

Lafarge, V., et al. (2004). "Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration." Applied and environmental microbiology **70**(9): 5644-5650.

Lambrecht, R. S., et al. (1988). "A model for analyzing growth kinetics of a slowly growing *Mycobacterium* sp." Applied and environmental microbiology **54**(4): 910-916.

Lambrecht, R. S. und M. T. Collins (1993). "Inability to detect mycobactin in mycobacteria-infected tissues suggests an alternative iron acquisition mechanism by mycobacteria in vivo." Microbial pathogenesis **14**(3): 229-238.

Lamont, E. A., et al. (2012). "Identification and characterization of a spore-like morphotype in chronically starved *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cultures." PLoS One **7**(1): e30648.

Larsen, A., et al. (1975). "Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*." American journal of veterinary research **36**(3): 255-257.

Lee, J.-L. und R. E. Levin (2009). "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. und R. E. Levin (2009). "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.
- Li, L., et al. (2005). "The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(35): 12344-12349.
- Linz, U. und H. Degenhardt (1990). "Die Polymerase-Kettenreaktion." Naturwissenschaften **77**(11): 515-530.
- Livak, K. J. und T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ ΔΔCT method." Methods **25**(4): 402-408.
- Lombard, J. E. (2011). "Epidemiology and economics of paratuberculosis." Veterinary clinics of North America: food animal practice **27**(3): 525-535.
- Manning, E. und M. Collins (2001). "*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis." Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics) **20**(1): 133-150.
- Marcé, C., et al. (2011). "Within-herd contact structure and transmission of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in a persistently infected dairy cattle herd." Preventive veterinary medicine **100**(2): 116-125.
- Matsuda, K., et al. (2007). "Sensitive quantitative detection of commensal bacteria by rRNA-targeted reverse transcription-PCR." Applied and environmental microbiology **73**(1): 32-39.
- Merkal, R. und B. Curran (1974). "Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*." Applied microbiology **28**(2): 276-279.
- Millar, D., et al. (1996). "IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales." Applied and environmental microbiology **62**(9): 3446-3452.
- Möbius, P., et al. (2008). "Comparison of 13 single-round and nested PCR assays targeting IS900, ISMav2, f57 and locus 255 for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*." Veterinary microbiology **126**(4): 324-333.
- Molitor, A. (2014). "Vergleichende Untersuchungen zum molekularbiologischen Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in Milch und Säuglingsanfangsnahrung." Dissertation, Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Justus-Liebig-Universität Gießen.

- Momotani, E., et al. (1988). "Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves." Veterinary pathology online **25**(2): 131-137.
- Mora, D., et al. (2002). "Genetic diversity and technological properties of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products." Journal of applied microbiology **93**(2): 278-287.
- Morandi, S., et al. (2007). "Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products." Veterinary microbiology **124**(1): 66-72.
- Mukamolova, G. V., et al. (2003). "Adoption of the transiently non-culturable state—a bacterial survival strategy?" Advances in microbial physiology **47**: 65-129.
- Naser, S. A., et al. (2010). "Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) from the Blood of Patients with Crohn's disease: A Follow-Up Blind Multi Center Investigation." Open inflammation journal **3**: 22-23.
- Naser, S. A., et al. (2000). "Isolation of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* from breast milk of Crohn's disease patients." The american journal of gastroenterology **95**(4): 1094.
- Nielsen, S. S. und N. Toft (2009). "A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe." Preventive veterinary medicine **88**(1): 1-14.
- Nkuipou-Kenfack, E., et al. (2013). "Improving efficiency of viability-PCR for selective detection of live cells." Journal of microbiological methods **93**(1): 20-24.
- Nocker, A. und A. K. Camper (2006). "Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide." Applied and environmental microbiology **72**(3): 1997-2004.
- Nocker, A. und A. K. Camper (2009). "Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques." FEMS microbiology letters **291**(2): 137-142.
- Nocker, A., et al. (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.
- Nocker, A., et al. (2007). "Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR." Journal of microbiological methods **70**(2): 252-260.

Nogva, H. K., et al. (2003). "Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR." Biotechniques **34**(4): 804-813.

O'Mahony, J. und C. Hill (2002). "A real time PCR assay for the detection and quantitation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using SYBR Green and the Light Cycler." Journal of microbiological methods **51**(3): 283-293.

O'Mahony, J. und C. Hill (2004). "Rapid real-time PCR assay for detection and quantitation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in artificially contaminated milk." Applied and environmental microbiology **70**(8): 4561-4568.

O'Reilly, C. E., et al. (2004). "Surveillance of bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved Irish liquid-milk pasteurization plants to determine the incidence of *Mycobacterium paratuberculosis*." Applied and environmental microbiology **70**(9): 5138-5144.

O'Brien, L. M., et al. (2016). "Novel monoclonal antibody and peptide binders for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and their application for magnetic separation." PLoS One **11**(1): e0147870.

Odumeru, J., et al. (2001). "Use of the bead beater for preparation of *Mycobacterium paratuberculosis* template DNA in milk." Canadian journal of veterinary research **65**(4): 201.

Osterstock, J. B., et al. (2007). "Contribution of environmental mycobacteria to false-positive serum ELISA results for paratuberculosis." Journal of the american veterinary medical association **230**(6): 896-901.

Ott, S. L., et al. (1999). "Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations." Preventive veterinary medicine **40**(3-4): 179-192.

Pan, Y. und F. Breidt (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.

Peters, G., et al. (1979). "Antibakterielle In-vitro-Wirksamkeit von Pipemidsäure und Nalidixinsäure." DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift **104**(26): 946-948.

Pfeiffer, A. (2017). "Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* bei Rindern in unterschiedlichem Alter." Dissertation, Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Justus-Liebig-Universität Gießen.

Pierce, E. S. (2010). "Ulcerative colitis and Crohn's disease: is *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* the common villain?" Gut pathogens **2**: 21.

- Pillai, S. und B. Jayarao (2002). "Application of IS900 PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* directly from raw milk." Journal of dairy science **85**(5): 1052-1057.
- Primm, T. P., et al. (2004). "Health impacts of environmental mycobacteria." Clinical microbiology reviews **17**(1): 98-106.
- Rabinow, P. (2011). "Making PCR: A story of biotechnology." University of Chicago Press: 4.
- Randazzo, W., et al. (2016). "Evaluation of viability PCR performance for assessing norovirus infectivity in fresh-cut vegetables and irrigation water." International journal of food microbiology **229**: 1-6.
- Randazzo, W., et al. (2017). "Improving efficiency of viability-qPCR for selective detection of infectious HAV in food and water samples." Journal of applied microbiology.
- Rappaport, F. und N. Konforti (1959). "Selective Enrichment Medium for Paratyphoid Bacteria Inhibitory and Growth Promoting Factors." Applied microbiology **7**(2): 63-66.
- Ravva, S. V. und L. H. Stanker (2005). "Real-time quantitative PCR detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and differentiation from other mycobacteria using SYBR Green and TaqMan assays." Journal of microbiological methods **63**(3): 305-317.
- Rawsthorne, H., et al. (2009). "PCR-based method using propidium monoazide to distinguish viable from nonviable *Bacillus subtilis* spores." Applied and environmental microbiology **75**(9): 2936-2939.
- Ricchi, M., et al. (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.
- Richards, W. und C. Thoen (1977). "Effect of freezing on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine feces." Journal of clinical microbiology **6**(4): 392-395.
- Rieder, A., et al. (2008). "Molecular monitoring of inactivation efficiencies of bacteria during pulsed electric field treatment of clinical wastewater." Journal of applied microbiology **105**(6): 2035-2045.
- Rochelle, P. A., et al. (1997). "Comparison of primers and optimization of PCR conditions for detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* in water." Applied and environmental microbiology **63**(1): 106-114.

Roussel, A. J., et al. (2007). "Association of fecal shedding of mycobacteria with high ELISA-determined seroprevalence for paratuberculosis in beef herds." Journal of the american veterinary medical association **230**(6): 890-895.

Rowe, M. and I. Grant (2006). "*Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* and its potential survival tactics." Letters in applied microbiology **42**(4): 305-311.

Rowe, M., et al. (2000). "Heat resistance of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk." Irish journal of agricultural and food research: 203-208.

Rudi, K., et al. (2005). "Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples." Applied and environmental microbiology **71**(2): 1018-1024.

Ruegg, P., et al. (1992). "Microbiologic investigation of an epizootic of mastitis caused by *Serratia marcescens* in a dairy herd." Journal of the american veterinary medical association **200**(2): 184-189.

Sachse, K., et al. (2003). "Detection of *Chlamydia suis* from clinical specimens: comparison of PCR, antigen ELISA, and culture." Journal of microbiological methods **54**(2): 233-238.

Sartor, R. B. (2005). "Does *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cause Crohn's disease?" Gut **54**(7): 896-898.

Schwartz, D., et al. (2000). "Use of short-term culture for identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue from Crohn's disease patients." Clinical microbiology and infection **6**(6): 303-307.

Sechi, L. A., et al. (2008). "*Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* bacteremia in type 1 diabetes mellitus: an infectious trigger?" Clinical infectious diseases **46**(1): 148-149.

Shanahan, F. (2002). "Crohn's disease." The Lancet **359**(9300): 62-69.

Shankar, H., et al. (2010). "Presence, characterization, and genotype profiles of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from unpasteurized individual and pooled milk, commercial pasteurized milk, and milk products in India by culture, PCR, and PCR-REA methods." International journal of infectious diseases **14**(2): e121-e126.

Singh, S., et al. (2011). "Molecular identification and characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in free living non-human primate (Rhesus macaques) from North India." Comparative immunology, microbiology and infectious diseases **34**(3): 267-271.

- Sisto, M., et al. (2010). "Proposing a relationship between *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection and Hashimoto's thyroiditis." Scandinavian journal of infectious diseases **42**(10): 787-790.
- Slana, I., et al. (2008). "On-farm spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk studied by IS900 and F57 competitive real time quantitative PCR and culture examination." International journal of food microbiology **128**(2): 250-257.
- Sousa, A. M., et al. (2013). "Improvements on colony morphology identification towards bacterial profiling." Journal of microbiological methods **95**(3): 327-335.
- Stott, A., et al. (2005). "Financial incentive to control paratuberculosis (Johne's disease) on dairy farms in the United Kingdom." Veterinary record-english edition **156**(26): 825-830.
- Stratmann, J., et al. (2002). "Development of a peptide-mediated capture PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk." Journal of clinical microbiology **40**(11): 4244-4250.
- Streeter, R. N., et al. (1995). "Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows." American journal of veterinary research **56**(10): 1322-1324.
- Sung, N. und M. T. Collins (2003). "Variation in resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* to acid environments as a function of culture medium." Applied and environmental microbiology **69**(11): 6833-6840.
- Sweeney, R. W. (1996). "Transmission of paratuberculosis." Veterinary clinics of North America: food animal practice **12**(2): 305-312.
- Tasara, T. und R. Stephan (2005). "Development of an F57 sequence-based real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk." Applied and environmental microbiology **71**(10): 5957-5968.
- Tenhagen, B.-A., et al. (2006). "Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany." Journal of dairy science **89**(7): 2542-2551.
- Van Boxtel, R., et al. (1990). "Effects of colonial morphology and tween 80 on antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium paratuberculosis*." Antimicrobial agents and chemotherapy **34**(12): 2300-2303.
- Van der Velden, V., et al. (2003). "Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects." Leukemia **17**(6): 1013-1034.

Varma, M., et al. (2009). "Quantitative real-time PCR analysis of total and propidium monoazide-resistant fecal indicator bacteria in wastewater." Water research **43**(19): 4790-4801.

Westermeier, R. (2016). "Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations." Wiley-VHC Verlag GmbH & Co. KGaA: 1-6.

Whipple, D. L., et al. (1991). "Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedure." Journal of veterinary diagnostic investigation **3**(4): 368-373.

Whitlock, R., et al. (1989). "Laboratory culture techniques for Johne's disease: a critical evaluation of contamination and incubation times." Proceedings, annual meeting of the United States animal health association **93**: 382-386.

Whitlock, R., et al. (2000). "ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method." Veterinary microbiology **77**(3): 387-398.

Whitlock, R. H. und C. Buergelt (1996). "Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology)." Veterinary clinics of North America: food animal practice **12**(2): 345-356.

Whittington, R. J., et al. (2004). "Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment." Applied and environmental microbiology **70**(5): 2989-3004.

Zadoks, R. N., et al. (2005). "Ribotyping of *Streptococcus uberis* from a dairy's environment, bovine feces and milk." Veterinary microbiology **109**(3): 257-265.

Zurbrick, B. G. und C. J. Czuprynski (1987). "Ingestion and intracellular growth of *Mycobacterium paratuberculosis* within bovine blood monocytes and monocyte-derived macrophages." Infection and immunity **55**(7): 1588-1593.

XI. ANHANG

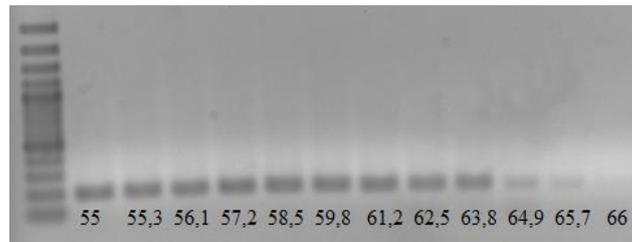
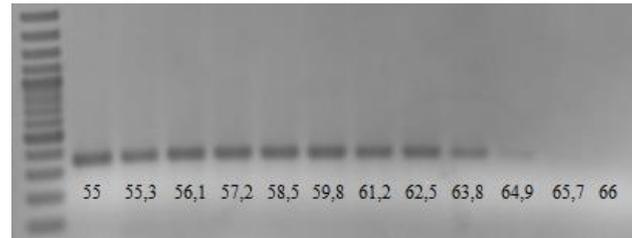
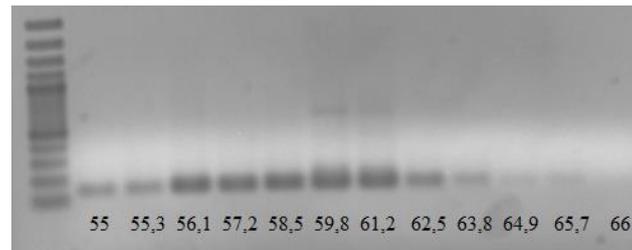
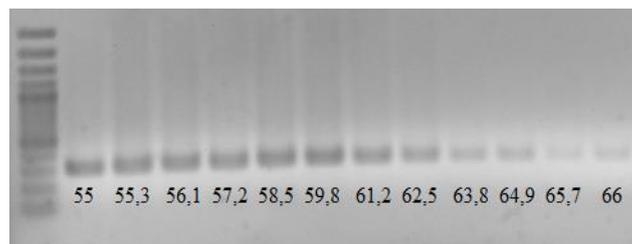
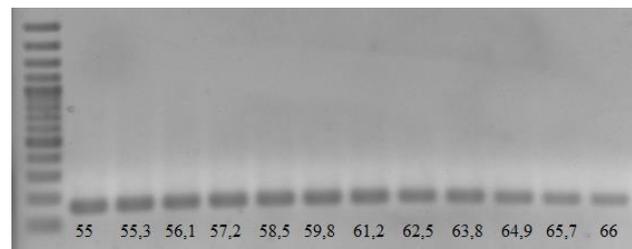
Zu 1.5: Zellquantifizierung von MAP-Kulturen

Tabelle 38: Korrelation einzelner Verdünnungsstufen bei der Zellquantifizierung

Kultur	A1	A2	B1	B2	C1	C2	D1	D2	E
OD									
Original	0,054	0,048	0,128	0,164	0,255	0,279	0,987	0,976	2,340
1:2	0,026	0,016	0,083	0,090	0,170	0,105	0,517	0,449	n.d.
1:4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,076	0,044	0,250	0,212	n.d.
1:2,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,033
1:4,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,453
1:9,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,220
Zählkammer: Zellen/ml									
Original	1,4E+07	1,6E+07	2,8E+07	4,5E+07	6,35E+07	5,80E+07	1,7E+08	1,7E+08	1,5E+09
1:2	2,2E+06	3,3E+06	1,25E+07	2,10E+07	2,85E+07	3,15E+07	9,0E+07	9,35E+07	n.d.
1:2,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6,3E+08
1:23	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5,9E+07
Oberflächenspatelverfahren: KbE/ml									
Verdünnungsstufe 10 ⁻⁵	235	262	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Verdünnungsstufe 10 ⁻⁶	21	23	55	56	85	93,5	363	292	
Verdünnungsstufe 10 ⁻⁷	n.d.	n.d.	4	5	9	7	36	25	96
Verdünnungsstufe 10 ⁻⁸	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7

(**A1:** M7H9 Schüttelkultur mit 0,05 % Tween 80, **A2:** M7H9 Schüttelkultur mit 0,05 % Tween 80; mit Spritzenvorbehandlung, **B1:** M7H9 Schüttelkultur mit 0,1 % Tween 80, **B2:** M7H9 Schüttelkultur mit 0,1 % Tween 80; mit Spritzenvorbehandlung, **C1:** M7H9 Schüttelkultur mit 0,2 % Tween 80, **C2:** M7H9 Schüttelkultur mit 0,2 % Tween 80; mit Spritzenvorbehandlung, **D1:** M7H9 Schüttelkultur mit 0,3 % Tween 80, **D2:** M7H9 Schüttelkultur mit 0,3 % Tween 80; mit Spritzenvorbehandlung, **E:** HEYM-Abschwemmung; **A, B, C, D, E:** jeweiliger Komplettansatz)

Zu 2.1: Gradienten-PCR verschiedener Primerpaare

**Abbildung 48: Gradienten-PCR Primer 4470/B****Abbildung 49: Gradienten-PCR Primer 8771/A****Abbildung 50: Gradienten-PCR Primer 8771/B****Abbildung 51: Gradienten-PCR Primer 2420/A****Abbildung 52: Gradienten-PCR Primer 2420/B**

(Abbildung 48 bis Abbildung 52: Temperaturgradient von links nach rechts von 55 °C bis 66 °C)

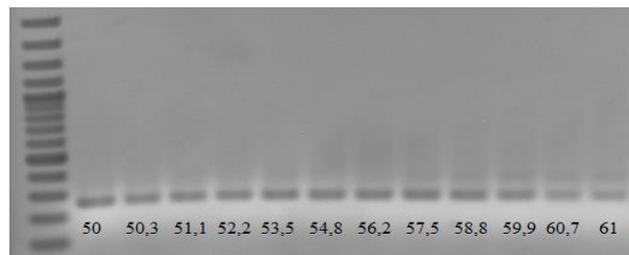


Abbildung 53: Gradienten-PCR F57 (Temperaturgradient von links nach rechts von 50 bis 61 °C)

Tabelle 39: Über die Software TotalLab berechnete Bandenintensitäten nach Gradienten-PCR für verschiedene Primerpaare

	Bandenintensität											
Temp. °C:	55	55,3	56,1	57,2	58,5	59,8	61,2	62,5	63,8	64,9	65,7	66
Primer 4470/A	25,17	25,68	27,55	44,04	45,2	53,52	54,45	42,76	29,02	23,26		
Primer 4470/B	44,97	42,58	38,69	44,24	41,19	41,23	40,82	32,11	31,53	17,16	15,98	11,46
Primer 8771/A	67,28	59,95	56,69	57,37	58,18	72,63	56,56	57,29	54,03	34,81		
Primer 8771/B	52,69	51,22	91,95	86,57	88,32	94,61	85,55	63,77	39,41	31,88	26,66	
Primer 2420/A	53,2	53,34	50,62	52,48	56,07	56,52	45,36	29,86	20,61	19,91	9,53	13,17
Primer 2420/B	55,37	60,62	51,73	56,94	56,7	55,33	56,74	50,36	50,59	45,88	44,48	38,31
Temp. °C	50	50,3	51,1	52,2	53,5	54,8	56,2	57,5	58,8	59,9	60,7	61
Primer F57	58,69	45,99	48,58	50,79	54,88	54,65	53,95	54,21	53,53	43,7	38,44	34,57

Zu 2.2: Optimierung der Primerkonzentration für die quantitative F57-Sybr-Green-PCR

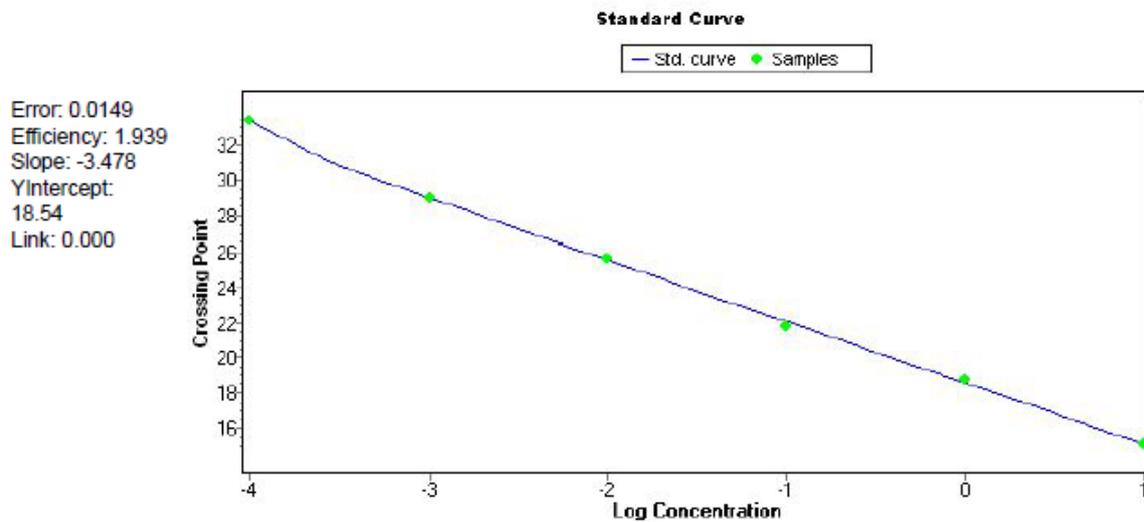


Abbildung 54: Standardkurve F57: Primerkonzentration 200 nM

Tabelle 40: Rohdaten der Standardkurve F57: Primerkonzentration 200 nM

Name	Sample Type	CP	Concentration	Tm Peak 1	Tm Peak 2	Standard
Verdünnungsstufe 1	Standard	15,09	1,01E1	88,55	X	1,00E1 ng
Verdünnungsstufe 2	Standard	18,73	9,06E-1	88,62	X	1,00E0 ng
Verdünnungsstufe 3	Standard	21,81	1,18E-1	88,63	X	1,00E-1 ng
Verdünnungsstufe 4	Standard	25,65	9,27E-3	88,70	X	1,00E-2 ng
Verdünnungsstufe 5	Standard	29,00	1,00E-3	88,62	X	1,00E-3 ng
Verdünnungsstufe 6	Standard	33,41	1,00E-4	88,31	X	1,00E-4 ng
Verdünnungsstufe 7	Standard	35,00	1,00E-5	74,81	X	1,00E-5 ng
Negativkontrolle	Negativ	35,00	1,00E-5	70,28	75,07	Neg

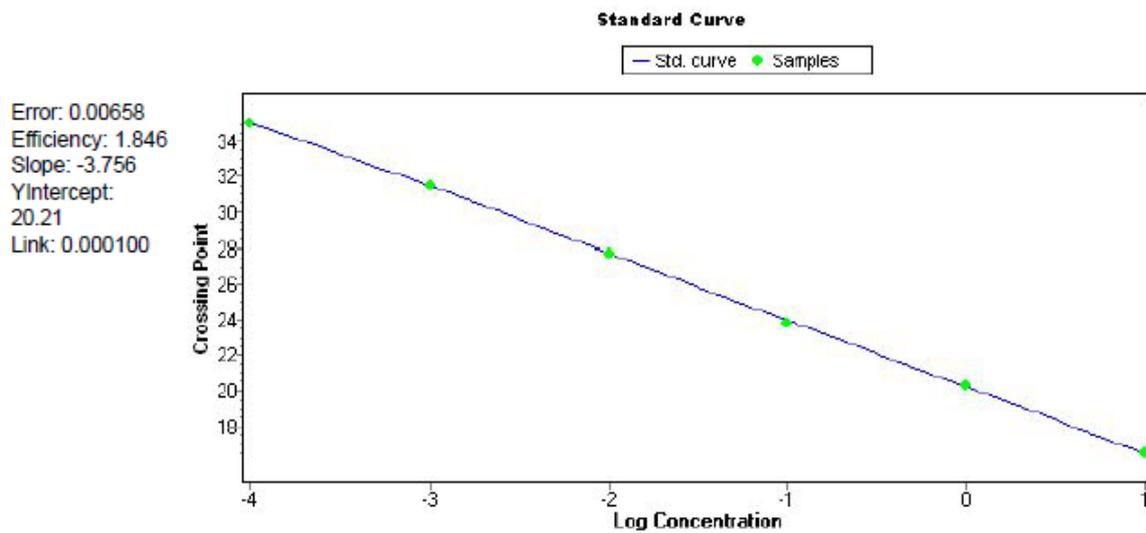


Abbildung 55: Standardkurve F57: Primerkonzentration 100 nM

Tabelle 41: Rohdaten der Standardkurve F57: Primerkonzentration 100 nM

Name	Sample Type	CP	Concentration	Tm Peak 1	Tm Peak 2	Standard
Verdünnungsstufe 1	Standard	16,48	9,81E0	88,61	X	1,00E1 ng
Verdünnungsstufe 2	Standard	20,25	9,74E-1	88,50	X	1,00E0 ng
Verdünnungsstufe 3	Standard	23,83	1,08E-1	88,60	X	1,00E-1 ng
Verdünnungsstufe 4	Standard	27,73	9,90E-3	88,66	X	1,00E-2 ng
Verdünnungsstufe 5	Standard	31,51	9,75E-4	88,39	X	1,00E-3 ng
Verdünnungsstufe 6	Standard	35,00	1,00E-5	88,36	X	1,00E-4 ng
Verdünnungsstufe 7	Standard	35,00	1,00E-5	74,75	78,72	1,00E-5 ng
Negativkontrolle	Negativ	35,00	1,00E-5	70,49	74,81	Neg

Zu 2.2: Standardkurve mit optimierter Primerkonzentration und viertem PCR-Schritt für das Primerpaar F57

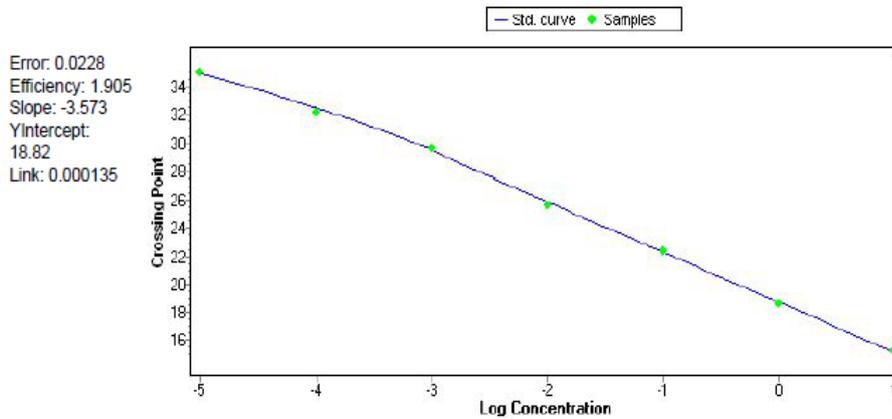


Abbildung 56: Standardkurve optimiertes F57-Amplifikationsprogramm Ansatz 1

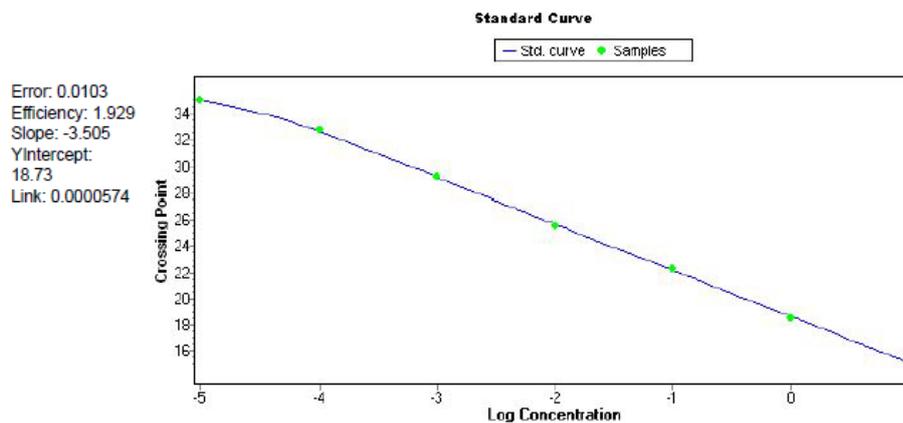


Abbildung 57: Standardkurve optimiertes F57-Amplifikationsprogramm Ansatz 2

Tabelle 42: Rohdaten der Standardkurve im 2 x Ansatz: optimiertes Amplifikationsprogramm für Primerpaar F57

Name	Sample Type	CP Ansatz1/Ansatz2	Concentration Ansatz1/Ansatz2	Tm Peak 1 Ansatz1/Ansatz2	Tm Peak 2 A1/A2	Standard
Verdünnungsstufe 1	Standard	15,25 / 15,25	9,31E0 / 9,30E0	88,77 / 88,75	X/X	1,00E1 ng
Verdünnungsstufe 2	Standard	18,49 / 18,58	1,10E0 / 1,09E0	88,75 / 88,77	X/X	1,00E0 ng
Verdünnungsstufe 3	Standard	22,25 / 22,36	9,32E-2 / 9,47E-2	88,79 / 88,64	X/X	1,00E-1 ng
Verdünnungsstufe 4	Standard	25,53 / 25,64	1,08E-2 / 1,14E-2	88,83 / 88,76	X/X	1,00E-2 ng
Verdünnungsstufe 5	Standard	29,15 / 29,56	1,00E-3 / 9,14E-4	88,82 / 88,73	X/X	1,00E-3 ng
Verdünnungsstufe 6	Standard	32,72 / 32,15	9,61E-5 / 1,35E-4	88,71 / 88,34	X/X	1,00E-4 ng
Verdünnungsstufe 7	Standard	35,00 / 35,00	1,00E-5 / 9,34E-6	74,26 / 74,01	88,73 / 88,60	1,00E-5 ng
Negativkontrolle	Negativ	X / X	X / X	75,57 / 75,08	79,69 / X	Neg

Zu 2.2: Standardkurve mit optimierter Primerkonzentration und viertem PCR-Schritt für das Primerpaar 8771/B

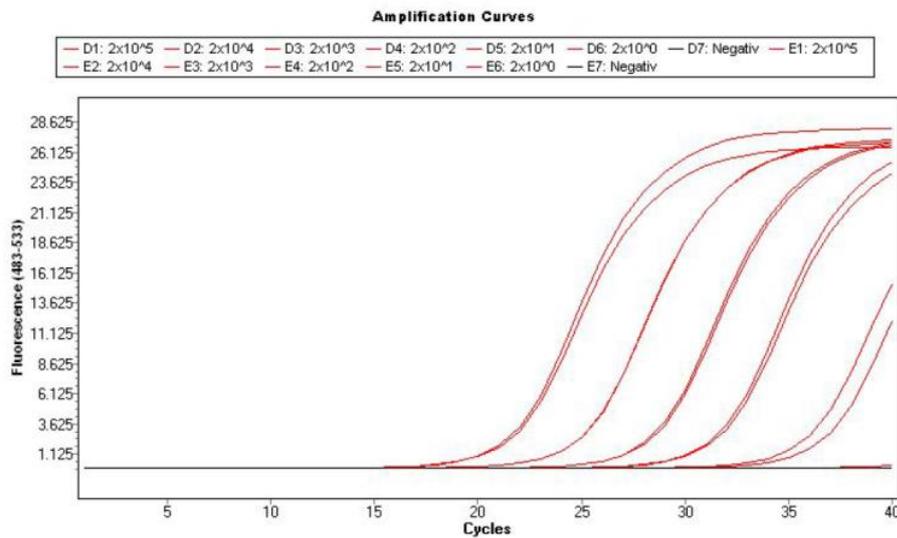


Abbildung 58: Amplifikationskurven der optimierten 8771/B-PCR

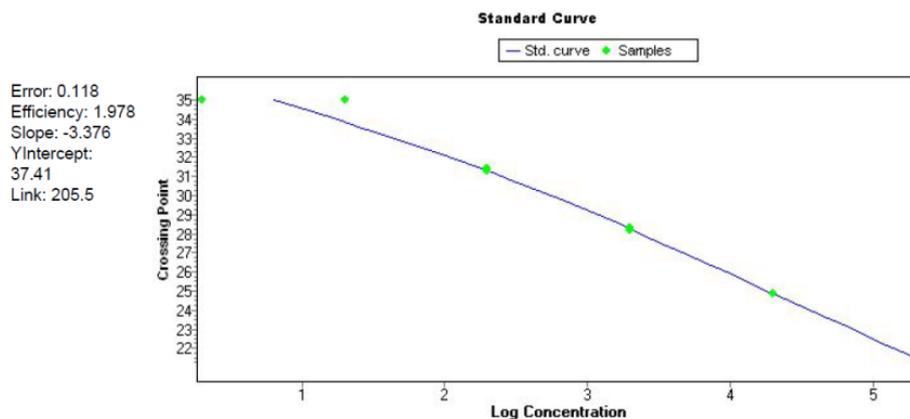


Abbildung 59: Standardkurve der optimierten 8771/B-PCR

Tabelle 43: Rohdaten der optimierten 8771/B-PCR

Name	Sample Type	CP Ansatz1/Ansatz2	Concentration Ansatz1/Ansatz2	Tm Peak 1 Ansatz1/Ansatz2	Standard
Verdünnungsstufe 1	Standard	21,53/21,48	1,95E5/2,01E5	83,88/83,99	2x10 ⁵ Genome (1 ng)
Verdünnungsstufe 2	Standard	24,85/24,83	2,02E4/2,05E4	83,83/83,82	2x10 ⁴ Genome (100 pg)
Verdünnungsstufe 3	Standard	28,31/28,20	1,91E3/2,06E3	83,77/83,79	2x10 ³ Genome (10 pg)
Verdünnungsstufe 4	Standard	31,25/31,44	2,05E2/1,76E2	83,89/83,86	2x10 ² Genome (1 pg)
Verdünnungsstufe 5	Standard	35,00/35,00	6,36E0/6,36E0	84,07/83,95	2x10 ¹ Genome (100 fg)
Verdünnungsstufe 6	Standard	35,00/X	6,36E0/X	80,86/X	2x10 ⁰ Genome (10 fg)
Negativkontrolle	Negativ	X/X	X/X	X/70,01	Neg

Zu 2.2: Standardkurve mit optimierter Primerkonzentration und viertem PCR-Schritt für das Primerpaar 2420/A

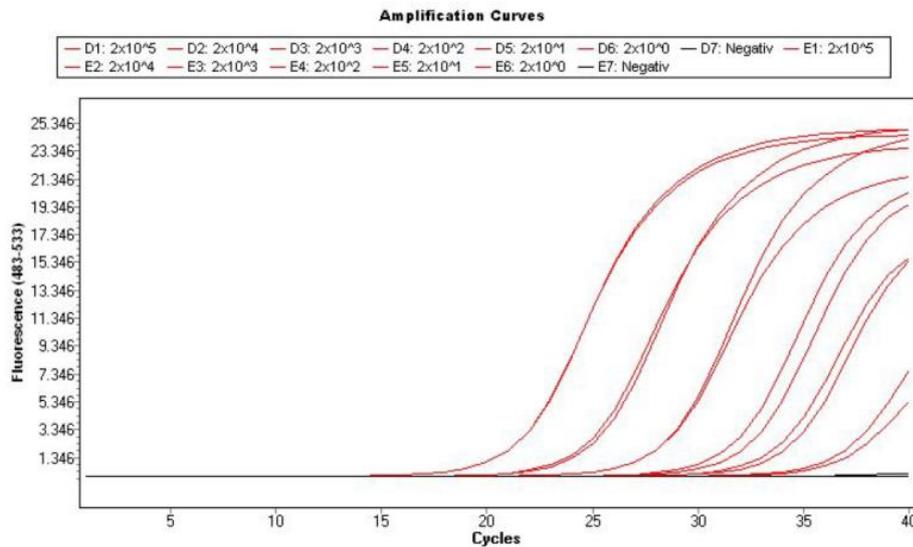


Abbildung 60: Amplifikationskurven der optimierten 2420/A-PCR

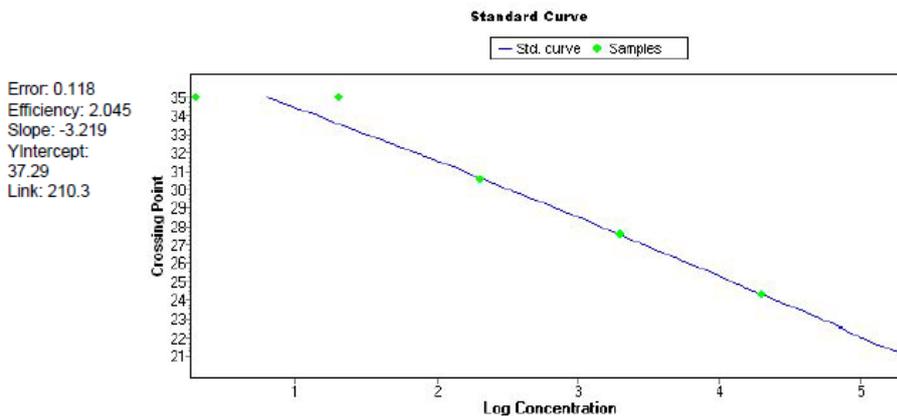


Abbildung 61: Standardkurve der optimierten 2420/A-PCR

Tabelle 44: Rohdaten der optimierten 2420/A-PCR

Name	Sample Type	CP		Concentration		Tm Peak 1		Tm Peak 2		Standard
		Ansatz1/Ansatz2	Ansatz1/Ansatz2	Ansatz1/Ansatz2	Ansatz1/Ansatz2	Ansatz1/Ansatz2	Ansatz1/Ansatz2			
Verdünnungsstufe 1	Standard	21,27/21,23	1,97E5/2,02E5	89,59/89,58	X/X					2x10 ⁵ Genome (1 ng)
Verdünnungsstufe 2	Standard	24,58/24,90	2,21E4/1,79E4	89,59/89,55	X/X					2x 10 ⁴ Genome (100 pg)
Verdünnungsstufe 3	Standard	28,11/28,27	2,15E3/1,94E3	89,56/89,55	X/X					2x 10 ³ Genome (10 pg)
Verdünnungsstufe 4	Standard	32,03/31,43	1,59E2/2,40E2	89,60/89,59	X/X					2x 10 ² Genome (1 pg)
Verdünnungsstufe 5	Standard	34,34/33,30	7,57E0/4,01E1	89,50/89,39	X/X					2x 10 ¹ Genom (100fg)
Verdünnungsstufe 6	Standard	35,00/35,00	2,06E0/2,06E0	77,92/77,89	89,63/89,52					2x 10 ⁰ Genome (10 fg)
Negativkontrolle	Negativ	X/X	X/X	69,99/78,17	78,49/81,28					Neg

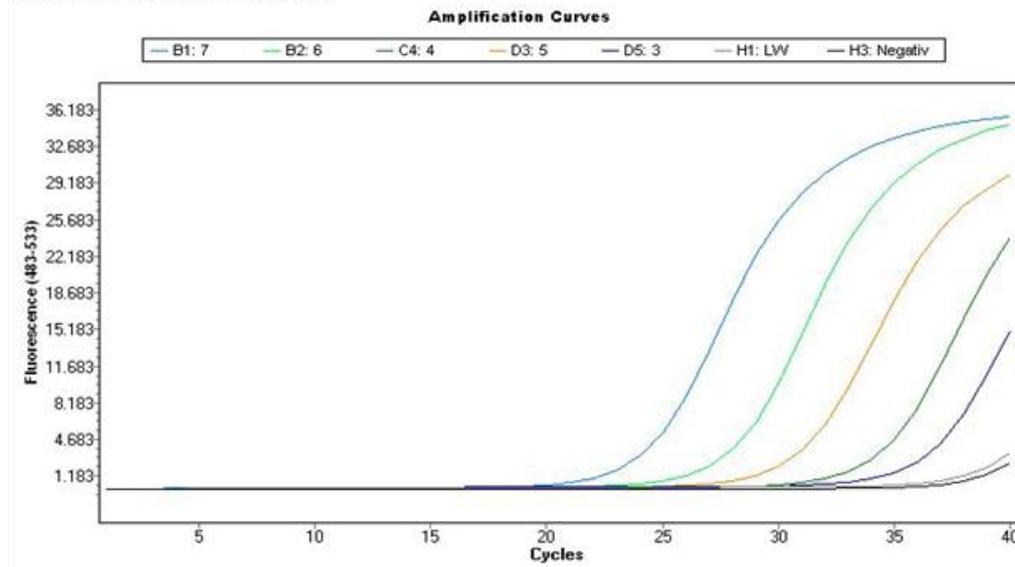
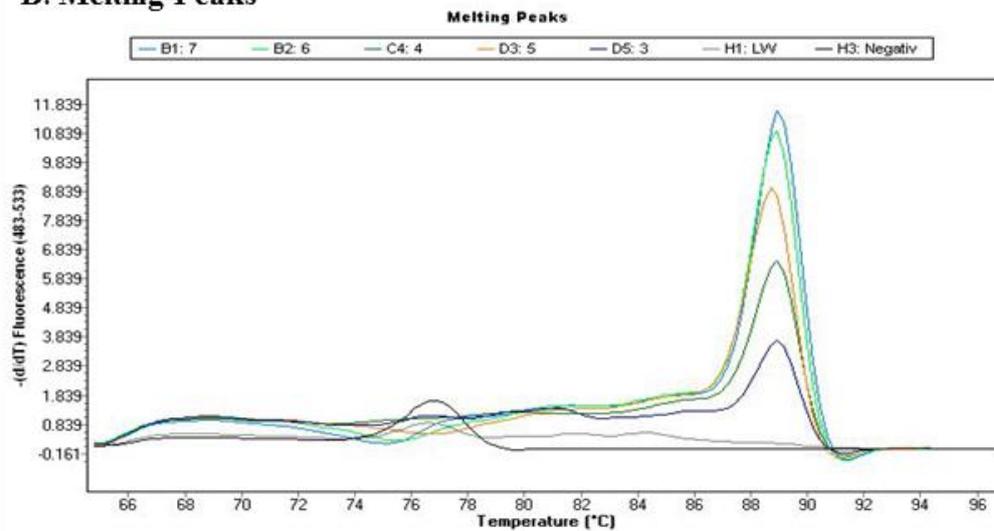
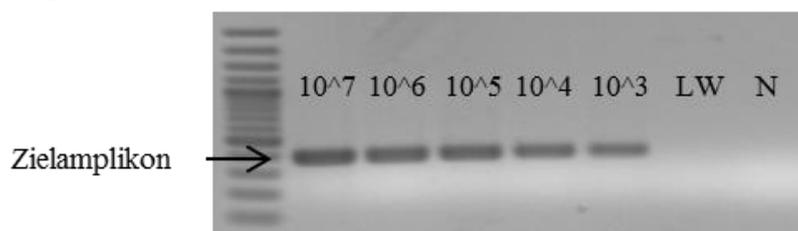
Zu 2.5 Nachweis von MAP in Milchproben anhand des Targets *ISMAP04***A: Amplifikationskurven****B: Melting-Peaks****C: Agarosegel**

Abbildung 62: MAP-Nachweis in dotierter Vorzugsmilch anhand des Primerpaares ISMAP04

(LW: Milchextrakt undotierter Milch, N: Negativkontrolle)

XII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Möglichkeiten der Diagnostik.....	7
Abbildung 2: Verteilung der gemeldeten Paratuberkulose-Fälle in Deutschland 2016	9
Abbildung 3: PCR-Prinzip	17
Abbildung 4: Generierung einer Standardkurve.....	19
Abbildung 5: Prinzip DNA-modifizierender Reagenzien zur PCR-basierten Lebend-Tot-Unterscheidung	23
Abbildung 6: Herstellung einer MAP-Suspension von HEYM-Agar	38
Abbildung 7: Untersuchungsschema unterschiedlicher MAP-Kulturen	39
Abbildung 8: Zählkammer	40
Abbildung 9: Versuchsablauf zur Vorbereitung der Proteomanalyse Schritt 1	43
Abbildung 10: Versuchsablauf zur Vorbereitung der Proteomanalyse Schritt 2.....	44
Abbildung 11: DNA-Isolierung mit DNeasy Blood and Tissue Kit von Qiagen	51
Abbildung 12: DNA-Isolierung mit High Pure PCR Template Kit von Roche	53
Abbildung 13: Prinzip der DNA-interagierenden Reagenzien EMA, PMA, PMAxx.....	61
Abbildung 14: MAP-Kolonien auf HEYM-Schrägagar.....	67
Abbildung 15: MAP-Kolonien auf M7H10-Platten	67
Abbildung 16: Oberflächenbeschaffenheit MAP-Kolonie auf M7H10-Platten	68
Abbildung 17: Aggregatbildung unter verschiedenen Anzuchtbedingungen.....	69
Abbildung 18: Große Aggregate verschiedener Kulturansätze (links 0,05 % Tween, mittig 0,1 % Tween, rechts 0,2 % Tween).....	69
Abbildung 19: MAP-Suspension nach Abschwemmung eines HEYM-Agar-Röhrchens.....	70
Abbildung 20: Kultureller Nachweis von 10^3 (oben) und 10^2 (unten) MAP in 50 ml Vorzugsmilch nach HPC Dekontamination.....	73
Abbildung 21: Kontamination durch Begleitflora nach Dekontamination dotierter Vorzugsmilch.....	73
Abbildung 22: Gradienten-PCR 4470/A	77
Abbildung 23: Berechnung der Bandenintensitäten zur Bestimmung der Annealing-Temperatur über Total Lab Software.....	77
Abbildung 24: Spezifitätstest der neuen Primerpaare anhand unterschiedlicher Mykobakterienstämme. Links: Primerpaar 4470/A (spezifische Amplikonlänge: 524 bp) Rechts: Primerpaar 4470/B (spezifische Amplikonlänge: 192 bp)	78
Abbildung 25: Spezifitätstest der neuen Primerpaare anhand unterschiedlicher Mykobakterienstämme. Links: Primerpaar 8771/A (spezifische Amplikonlänge: 352 bp) Rechts: Primerpaar 8771/B (spezifische Amplikonlänge: 137 bp)	78
Abbildung 26: Spezifitätstest der neuen Primerpaare anhand unterschiedlicher Mykobakterienstämme. Links: Primerpaar 2420/A (spezifische Amplikonlänge: 307 bp) Rechts: Primerpaar 2420/B (spezifische Amplikonlänge: 161 bp)	78
Abbildung 27: Spezifität in Matrix Milch: 4470/A, 4470/B Primer	79
Abbildung 28: Spezifität in Matrix Milch: 8771/A, 8771/B Primer	79
Abbildung 29: Spezifität in Matrix Milch: 2420/A, 2420/B Primer	79
Abbildung 30: Standardkurve: F57 Primerkonzentration 300 nM.....	81

Abbildung 31: Einführung eines vierten PCR-Schrittes	82
Abbildung 32: CP-Werte in F57-qPCR nach DNA-Extraktion anhand unterschiedlicher Protokolle des Blood and Tissue Kits (links: MAP DSM 44133, rechts: MAP MS-4 Feldisolat)	84
Abbildung 33: CP-Werte in F57-qPCR nach DNA-Extraktion anhand unterschiedlicher Protokolle des High Pure PCR Template Preparation Kits (links: MAP DSM 44133, rechts: MAP MS-4 Feldisolat)	85
Abbildung 34: CP-Werte in F57-qPCR nach Extraktion von 10^7 MAP (DSM 44133) mittels Chelex-Extraktion und Phenol-Chlorophorm-Extraktion	85
Abbildung 35: CP-Werte in F57-qPCR nach Extraktion von 10^7 MAP (MS-4 Feldisolat) mittels Chelex-Extraktion und Phenol-Chlorophorm-Extraktion.....	86
Abbildung 36: Über F57-qPCR kalkulierte Genomäquivalent-Ausbeuten aus MAP DSM 44133 (oben) und MAP MS-4 Feldisolat (unten) anhand unterschiedlicher DNA-Extraktionsverfahren aus 10^7 Zellen	87
Abbildung 37: CP-Wert-Verschiebung in F57-qPCR durch MAP-DNA-Extraktion aus dotierter Milch nach Anwendung verschiedener Protokolle zur Zellernte	89
Abbildung 38: Amplifikationskurven dotierter Milchextrakte nach Protokoll 6 (Gao et al., 2007) bei F57-Sybr-Green qPCR.....	90
Abbildung 39: Über F57-qPCR quantifizierte Genomausbeuten aus dotierten Milchproben	91
Abbildung 40: Übersicht zur Problematik der unspezifischen Amplifikate in Vorzugsmilch bei Sybr-Green qPCR mit neuem Primerpaar 8771/B	93
Abbildung 41: Beurteilung der F57-Sybr-Green qPCR in Milchproben.....	94
Abbildung 42: Abtötungsstrategien der Tot-Kontrollen für EMA/PMA/PMAxx-Experimente	95
Abbildung 43: Optimierungsversuche der Reagenzien PMA, PMAxx und EMA	97
Abbildung 44: PMA Optimierungen.....	98
Abbildung 45: Vergleich der Lebend-Tot-Unterscheidung anhand unterschiedlicher MAP-Stämme im PMA-F57-qPCR-Assay	99
Abbildung 46: Delta CP-Werte unterschiedlicher Lebend-Tot-Mischpopulationen nach PMA-F57-qPCR.....	100
Abbildung 47: Beeinflussende Faktoren für die Sensitivität und Spezifität molekularbiologischer Detektionssysteme	109
Abbildung 48: Gradienten-PCR Primer 4470/B	147
Abbildung 49: Gradienten-PCR Primer 8771/A	147
Abbildung 50: Gradienten-PCR Primer 8771/B	147
Abbildung 51: Gradienten-PCR Primer 2420/A	147
Abbildung 52: Gradienten-PCR Primer 2420/B	147
Abbildung 53: Gradienten-PCR F57 (Temperaturgradient von links nach rechts von 50 bis 61 °C)	148
Abbildung 54: Standardkurve F57: Primerkonzentration 200 nM	149
Abbildung 55: Standardkurve F57: Primerkonzentration 100 nM.....	150
Abbildung 56: Standardkurve optimiertes F57-Amplifikationsprogramm Ansatz 1	151
Abbildung 57: Standardkurve optimiertes F57-Amplifikationsprogramm Ansatz 2	151
Abbildung 58: Amplifikationskurven der optimierten 8771/B-PCR	152
Abbildung 59: Standardkurve der optimierten 8771/B-PCR	152
Abbildung 60: Amplifikaionskurven der optimierten 2420/A-PCR	153

Abbildung 61: Standardkurve der optimierten 2420/A-PCR	153
Abbildung 62: MAP-Nachweis in dotierter Vorzugsmilch anhand des Primerpaares ISMAP04	154

XIII. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Der Eisberg-Effekt	5
Tabelle 2: Anforderungen an Vorzugsmilch vom Rind	12
Tabelle 3: Argumente für und gegen einen kausalen Zusammenhang von MAP und Morbus Crohn	14
Tabelle 4: Magermilch-Lyophilisate verschiedener MAP-Isolate	33
Tabelle 5: Lyophilisate verschiedener DSMZ-Stämme	34
Tabelle 6: PCR-Pipettierschema zum Nachweis des Genus Mycobacterium und zur Identifikation von MAP .	36
Tabelle 7: Thermocycler-Programme zum Nachweis des Genus Mycobacterium (links) und zur Identifikation von MAP via IS900-PCR (links) und F57-PCR (rechts).....	36
Tabelle 8: Testkeime	45
Tabelle 9: Mastermix (links) und Thermocycler-Programm (rechts) vor Optimierung: neue MAP-spezifische Primerpaare 4470/A, 4470/B, 8771/A, 8771/B, 2420/A und 2420/B.....	46
Tabelle 10: Mastermix und Gradienten-PCR-Programm.....	47
Tabelle 11: Mastermix für unterschiedliche Primerkonzentrationen zur Optimierung der Amplifikationsbedingungen	48
Tabelle 12: Lightcycler-Amplifikationsprogramm mit viertem PCR-Schritt: F57-qPCR	49
Tabelle 13: Getestete Primerpaare zum MAP-Nachweis in Milchproben mittels Sybr-Green qPCR.....	58
Tabelle 14: Getestete Optimierungsprotokolle für EMA, PMA und PMAxx	62
Tabelle 15: Getestete Optimierungsprotokolle für PMA	62
Tabelle 16: Ergebnisse MAP-Anzucht.....	65
Tabelle 17: Zellquantifizierungen unterschiedlicher MAP-Kulturen anhand unterschiedlicher Methoden.....	71
Tabelle 18: KbE nach Dekontamination	73
Tabelle 19: Primerpaar 4470/A	74
Tabelle 20: Spezifikation Primerpaar 4470/A.....	74
Tabelle 21: Primerpaar 4470/B	75
Tabelle 22: Spezifikation Primerpaar 4470/B	75
Tabelle 23: Primerpaar 8771/A.....	75
Tabelle 24: Spezifikation Primerpaar 8771/A.....	75
Tabelle 25: Primerpaar 8771/B	75
Tabelle 26: Spezifikation Primerpaar 8771/B	75
Tabelle 27: Primerpaar 2420/A	76
Tabelle 28: Spezifikation Primerpaar 2420/A.....	76
Tabelle 29: Primerpaar 2420/B	76
Tabelle 30: Spezifikation Primerpaar 2420/B	76
Tabelle 31: Thermocyclerprogramme für neue Primerpaare mit optimalen Annealing-Temperaturen	77
Tabelle 32: Rohdaten der Standardkurve: F57 Primerkonzentration 300 nM.....	80
Tabelle 33: optimierte Mastermixzusammensetzungen der Primerpaare F57, 8771/B und 2420/A zum quantitativen MAP-Nachweis via Sybr-Green qPCR.....	82
Tabelle 34: optimierte Amplifikationsprogramme der Primerpaare F57, 8771/B und 2420/A für Sybr-Green qPCR	83

Tabelle 35: CP-Werte in F57-qPCR: dotierte Milchextrakte im Vergleich zu dotiertem Aqua dest.	89
Tabelle 36: Nachweisgrenze in 50 ml Milch anhand verschiedener Primerpaare.....	92
Tabelle 37: Nachweisgrenzen verschiedener Arbeitsgruppen beim molekularbiologischen Nachweis von MAP in Milchproben	119
Tabelle 38: Korrelation einzelner Verdünnungsstufen bei der Zellquantifizierung	146
Tabelle 39: Über die Software TotalLab berechnete Bandenintensitäten nach Gradienten-PCR für verschiedene Primerpaare	148
Tabelle 40: Rohdaten der Standardkurve F57: Primerkonzentration 200 nM.....	149
Tabelle 41: Rohdaten der Standardkurve F57: Primerkonzentration 100 nM.....	150
Tabelle 42: Rohdaten der Standardkurve im 2 x Ansatz: optimiertes Amplifikationsprogramm für Primerpaar F57.....	151
Tabelle 43: Rohdaten der optimierten 8771/B-PCR	152
Tabelle 44: Rohdaten der optimierten 2420/A-PCR	153

XIV. DANKSAGUNG

Großer Dank gilt an erster Stelle Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Erwin Märtlbauer für die mir gebotene Möglichkeit, am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch zu promovieren und mich in dem brisanten und brandaktuellen Themengebiet der Paratuberkulose einbringen zu können. Es war eine äußerst interessante Erfahrung, in Zeiten des Umbruchs bei der Bekämpfung der Paratuberkulose, Teil der wissenschaftlichen Gemeinschaft gewesen zu sein.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Christina Hölzel bedanken. Dank ihres Vertrauens konnte ich ein hohes Maß an Eigenständigkeit entwickeln und lernen, mich in komplexe Fragestellungen unterschiedlichster Art einzuarbeiten. Dabei konnte ich immer und zu jeder Tages- und Nachtzeit auf hilfreiche Tipps und Anregungen zählen. Danke auch für die aufheiternden Worte in frustrierenden Phasen. Und nicht zu vergessen: Danke für die Zeit und Mühen zur überaus sorgfältig durchgeführten Durchsicht und Korrektur von Abstracts, Postern, Vorträgen und natürlich der Dissertation!

Außerdem möchte ich mich bei allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch bedanken, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen. Besonders hervorheben möchte ich dabei Frau Dr. Andrea Didier, die mich mit einer Riesenportion Engagement insbesondere in der praktischen Phase meiner Arbeit unterstützt hat und mir mit zahlreichen Tipps und Tricks zur Seite stand.

Besonderer Dank gilt meinem ehemaligen Bürokollegen Herrn Dr. Rupert Bassitta, der leider nur ein gutes Jahr an meiner Seite war, bevor er sich neuen beruflichen Herausforderungen stellte. Die Zeit war großartig! Es hat wirklich Spaß gemacht mit dir zusammenzuarbeiten. Mit dir waren selbst stundenlange Makrophagen-Präparationen oder Keimzahlbestimmungen nur noch halb so wild. Danke für die Spaziergänge in der Mittagspause in schweren Zeiten und die immer aufheiternden und Mut machenden Worte! Und merci für den hinterlassenen Stressball!

Vielen Dank auch an Elena Feltl. Ich hätte mir keine bessere neue Kollegin wünschen können. Mir dir im Sommer auf unserer Sonnenbank mit einem Eiskaffee zu sitzen war einfach herrlich um aufzutanken und mit frischem Schwung und Elan an die Arbeit zu gehen. Danke für die schöne Zeit, halte durch und ich hoffe ich lese meinen Namen in einem Jahr auch in deiner Dissertation.

Ich möchte meiner Familie und meinen Freunden danken, die immer aufheiternde Worte parat hatten, wenn die Grenze der Frustrationstoleranz kurz vorm Überschreiten war.

Danke Mama, Papa und Schwesterlein, auf euch ist einfach Verlass! Obs gerade läuft oder nicht, es mir schlecht geht oder gut, ihr weint oder lacht einfach mit. Vielen Dank, dass ihr an meiner Seite seid!

Und zu guter Letzt: Vielen, vielen Dank, Stefan. Was durftest du dir alles anhören die letzten Jahre, wo du doch aus einer komplett anderen Fachrichtung kommst. Danke dafür, dass du mir trotzdem voller Interesse zugehört hast, auch wenn du vielleicht manchmal so gar nicht verstanden hast, wovon ich da eigentlich rede. Danke für deine Unterstützung! Danke, dass du immer hinter mir stehst und mich in allem was ich vorhabe so tatkräftig unterstützt! Danke für deine Kunst, im richtigen Moment die richtigen Dinge zu sagen und zu tun! Du bist mein Fels in der Brandung!