

**Tenazität von hochpathogenen Erregern in Lebensmitteln
und Schnellmethoden zu deren Nachweis
am Beispiel *Brucella***

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Diplom-Biologe Alexander Falenski
aus Hamburg, Deutschland

Berlin, 2012

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Appel
2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am 19.07.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Gattung <i>Brucella</i>	1
1.1.1	Taxonomie	3
1.1.2	Epidemiologie.....	6
1.1.3	Pathogenität	8
1.1.4	Klinik und Therapie	10
1.2	Brucellen als B-Waffe	12
1.3	Diagnostik von Brucellen.....	13
1.3.1	Direkter Nachweis	13
1.3.1.1	Kultureller Nachweis.....	13
1.3.1.2	Molekularbiologischer Nachweis.....	15
1.3.1.3	Immunomagnetische Separation	22
1.3.1.3.1	Herstellung, Eigenschaften und Verwendung magnetischer Partikel	23
1.3.1.3.2	Nachweis von immobilisierten Mikroorganismen.....	25
1.3.2	Indirekter Nachweis.....	26
1.4	Tenazität von <i>Brucella</i> in Lebensmitteln	29
1.4.1	Wasser.....	30
1.4.2	Milch.....	31
1.4.3	Joghurt	31
1.4.4	Käse	32
1.4.5	Andere Lebensmittel.....	32
2	Zielsetzung.....	33
3	Material	35
3.1	Chemikalien und Puffer	35
3.2	Enzyme, Seren und Antikörper	36
3.3	Primer, Sonden und Marker	37
3.4	Bakterienstämme.....	37
3.5	Nährmedien	38
3.6	Verbrauchsmaterialien, Kits und Geräte	39
3.7	Software	40

4	Methoden.....	41
4.1	Mikrobiologische Methoden.....	41
4.1.1	Tenazität von Brucellen in Lebensmitteln.....	41
4.1.1.1	Untersuchte Lebensmittel.....	41
4.1.1.2	Kultivierung der <i>Brucella</i> -Stämme.....	42
4.1.1.3	Spiken der Lebensmittelproben mit Brucellen.....	43
4.1.1.4	Bestimmung der Zellzahl in kontaminierten Lebensmittelproben.....	43
4.1.1.5	Bestimmung der Wachstums- und Reduktionsraten.....	44
4.2	Molekularbiologische Methoden.....	45
4.2.1	Extraktion der <i>Brucella</i> -DNA aus den Lebensmittelproben.....	45
4.2.1.1	DNA-Extraktion aus flüssigen Matrices.....	45
4.2.1.2	DNA-Extraktion aus festen Matrices.....	47
4.2.1.3	Protokolle zu den eingesetzten Methoden der DNA-Extraktion.....	47
4.2.1.3.1	DNA-Extraktion mittels Lysepuffer.....	47
4.2.1.3.2	DNA-Extraktion mittels Lysepuffer und mechanischen Aufschlusses.....	48
4.2.1.3.3	DNA-Extraktion mittels Lysepuffer und DNA-bindender Säulen.....	49
4.2.2	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	50
4.2.3	Agarosegelelektrophorese.....	51
4.2.4	Real-Time PCR.....	51
4.3	Immunomagnetische Separation von Brucellen.....	52
4.3.1	Beschichtung der magnetischen Partikel.....	52
4.3.2	Sensitivität der immunomagnetischen Separation.....	53
4.3.3	Protokoll zur immunomagnetischen Separation.....	53
4.3.4	Wiederfindungsrate und Spezifität.....	55
4.3.5	Nachweis von Brucellen in Lebensmittelproben.....	55
5	Ergebnisse.....	57
5.1	Tenazität von Brucellen in Lebensmitteln.....	57
5.1.1	Tenazität von Brucellen in Milch.....	57
5.1.2	Tenazität von Brucellen in Joghurt.....	63
5.1.3	Tenazität von Brucellen in stillem Mineralwasser.....	65
5.2	Extraktion von <i>Brucella</i>-DNA aus Lebensmitteln.....	67
5.2.1	Vergleich von Tests zur Extraktion von <i>Brucella</i> -DNA aus Rohmilch, Joghurt, stillem Mineralwasser und physiologischer Kochsalzlösung.....	67

5.2.1.1	Rohmilch	69
5.2.1.2	Joghurt	69
5.2.1.3	Stilles Mineralwasser	69
5.2.1.4	Physiologische Kochsalzlösung	70
5.2.2	Nachweisgrenzen der ausgewählten Tests zur Extraktion von DNA aus Brucellen in Rohmilch, Joghurt, stillem Mineralwasser, physiologischer Kochsalzlösung sowie in Camembert und Ziegenfrischkäse	70
5.3	Nachweis von <i>Brucella</i>-DNA mittels Real-Time PCR	73
5.4	Immunomagnetische Separation	78
5.4.1	Bestimmung der Serum- bzw. der Antikörper-Verdünnung	78
5.4.2	Sensitivität der immunomagnetischen Separation	79
5.4.3	Wiederfindungsrate und Spezifität	81
5.4.4	Nachweis von Brucellen in Lebensmittelproben	84
6	Diskussion	86
6.1	Tenazität von Brucellen in Lebensmitteln	86
6.1.1	Begründung der gewählten Versuchs-Parameter	86
6.1.2	Tenazität in Milch	88
6.1.3	Tenazität in Joghurt	91
6.1.4	Tenazität in stillem Mineralwasser	92
6.2	Extraktion von <i>Brucella</i>-DNA aus Lebensmitteln und Nachweis mittels PCR	94
6.2.1	Begründung der gewählten Zelldichten	94
6.2.2	Wahl der PCR	95
6.2.3	Vergleich der Sensitivität der <i>bcbp31</i> -Real-Time PCR mit der <i>bcbp31</i> - PCR	102
6.3	Immunomagnetische Separation	107
6.3.1	Wahl der magnetischen Partikel, der für die Beschichtung verwendeten Antikörper sowie der Antikörperverdünnungen	107
6.3.2	Sensitivität der immunomagnetischen Separation	109
6.3.3	Wiederfindungsrate und Spezifität	112
6.3.4	Nachweis von Brucellen aus Lebensmitteln	115
7	Zusammenfassung	118
8	Summary	120
9	Anhang	122

9.1	Erklärung.....	122
9.2	Publikationen.....	123
9.3	Datentabellen	124
9.3.1	Tabellen mit Real-Time PCR-Ergebnissen zur DNA-Extraktion.....	124
9.3.2	Tabellen zur immunomagnetischen Separation.....	129
9.4	Marker für die Agarose-Gelelektrophorese	130
9.5	Abkürzungsverzeichnis.....	131
9.6	Abbildungsverzeichnis	132
9.7	Tabellenverzeichnis.....	134
10	Literaturverzeichnis	136
11	Danksagung.....	155

1 Einleitung

1.1 Die Gattung *Brucella*

Brucellen sind gramnegative kokkoide Stäbchen der Größe $0,5-0,7 \mu\text{m} \times 0,6-1,5 \mu\text{m}$. Sie liegen meist als einzelne Zellen vor, kommen jedoch auch paarweise und als kleine Ketten oder Grüppchen vor (siehe Abbildung 1-1). Sie leben unter aeroben Bedingungen, sind unbeweglich und bilden keine Sporen (Corbel und Banai, 2005). Brucellen sind fakultativ intrazellulär lebende Bakterien, die jedoch gut auf Kulturmedien wachsen und auch in der Umwelt überleben können.



Abbildung 1-1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Brucella abortus*; REM-Aufnahme bei 3.900facher Vergrößerung.

Bisher wurden zehn *Brucella*-Spezies beschrieben, die verschiedene Wirte bevorzugen (siehe Tabelle 1-1):

Tabelle 1-1: Spezies der Gattung *Brucella*.

Spezies	Wirt	Referenz
<i>B. melitensis</i>	Schaf, Ziege	(Hughes, 1893; Meyer und Shaw, 1920)
<i>B. abortus</i>	Rind	(Meyer und Shaw, 1920; Schmidt, 1901)
<i>B. suis</i>	Schwein, Wildschwein, Feldhase, Rentier, Nager	(Huddleson, 1929)
<i>B. ovis</i>	Schaf	(Buddle, 1956)
<i>B. neotomae</i>	Amerikanische Buschratte	(Stoenner und Lackman, 1957)
<i>B. canis</i>	Hund	(Carmichael und Bruner, 1968)
<i>B. ceti</i>	Schweinswal, Tümmler	(Cloekaert et al., 2001; Foster et al., 2007)
<i>B. pinnipedialis</i>	Seehund	(Cloekaert et al., 2001; Foster et al., 2007)
<i>B. microti</i>	Feldmaus	(Hubalek et al., 2007; Scholz et al., 2008b)
<i>B. inopinata</i>	Wirt unbekannt	(De et al., 2008; Scholz et al., 2010)

Einige *Brucella*-Spezies werden weiter in Biovare unterteilt. Für *B. melitensis* sind die Biovare 1-3 beschrieben, für *B. abortus* die Biovare 1-7 und 9 und für *B. suis* die Biovare 1-5. Während bei *B. melitensis* und *B. abortus* alle Biovare die in Tabelle 1-1 angegebenen Wirte bevorzugen, finden sich die Biovare von *B. suis* in unterschiedlichen Wirten: Die Biovare 1 und 3 infizieren Haus- und Wildschweine, Biovar 2 Hausschweine und Feldhasen; Biovar 4 ist aus Rentieren isoliert und Biovar 5 in Nagern nachgewiesen worden (Whatmore, 2009). *B. microti* konnte nicht nur aus der Feldmaus, sondern auch aus Lymphknoten von Rotfüchsen isoliert werden. Des Weiteren wird ein natürliches Habitat im Boden diskutiert (Scholz et al., 2008a; Scholz et al., 2009). Damit ist dies die bisher einzige nachgewiesene *Brucella*-Art, die außerhalb des Säugetier-Wirtes ein Reservoir hat (Audic et al., 2009). Zu der kürzlich beschriebenen Spezies *B. inopinata* konnte noch kein bevorzugter Wirt identifiziert werden. Allerdings zeigte sich, dass bei einer phylogenetischen Analyse aufgrund der *omp2a/2b*-Gene die beiden einzigen bekannten *B. inopinata*-Stämme BO1 und BO2 am nächsten mit dem atypischen *B. suis*-Stamm 83-210 verwandt sind, der aus einem Nager aus Australien isoliert worden war. Möglicherweise könnte diese Verwandtschaft einen Rückschluss auf das Reservoir von *B. inopinata* ermöglichen (Tiller et al., 2010). Grundsätzlich können alle *Brucella* spp. Säugetiere infizieren (Glynn und Lynn, 2008).

Die Einteilung in Biovare erfolgt auf Grundlage der biochemischen Eigenschaften der Stämme. Dabei wird untersucht, ob für das Wachstum CO₂ benötigt wird, die Bildung von H₂S, Urease- und Oxidase-Aktivität, Wachstum auf Medien, die Thionin bzw. Fuchsin enthalten, Agglutination mit monospezifischen Antisera A, M und R und die Lyse durch Phagen Tbilisi (Tb), Weybridge (Wb), Berkeley (Bk₂) und Firenze (Fi) (Alton et al., 1988b; Whatmore, 2009). Eine noch weiter gehende Methode ist die Analyse mittels Micronaut-System, bei dem der Metabolismus von *Brucella* anhand von 93 Substraten (z. B. Kohlenhydrate und Aminosäuren) untersucht wird (Al Dahouk et al., 2010b).

1.1.1 Taxonomie

Die Gattung *Brucella* gehört zur Klasse der α -Proteobacteria. Auf Basis von 16S rRNA-Sequenzen wurde aus 65 α -Proteobacteria ein phylogenetischer Stammbaum erstellt, nach dem die Familie der Brucellaceae zusammen mit den Rhizobiaceae und den Phyllobacteriaceae zur Ordnung der Rhizobiales gehört (Gupta, 2005). Zur Familie der Brucellaceae gehören die Gattungen *Brucella*, *Mycoplana*, *Ochrobactrum*, *Pseudochrobactrum*, *Daeguia* und *Crabtreeella*, wobei die Gattung *Ochrobactrum* am nächsten mit *Brucella* verwandt ist (Velasco et al., 1998; Whatmore, 2009). *Ochrobactrum intermedium* ist die Spezies, die auf Grundlage der 16S rRNA-Analyse mit Brucellen am nächsten verwandt ist. Dabei unterstreicht das Epitheton „*intermedium*“ die intermediäre Position zwischen *Ochrobactrum anthropi* und *Brucella* spp. in der Taxonomie (Velasco et al., 1998). Durch die enge Verwandtschaft beider Gattungen kam es bereits zu Fehldiagnosen, in denen der biochemische Routinetest API20NE *B. melitensis* bzw. *B. inopinata* BO1 und BO2 als *O. anthropi* identifizierte (Elsaghir und James, 2003; Scholz et al., 2010; Tiller et al., 2010).

Innerhalb der Gattung *Brucella* sind alle Spezies sehr nahe miteinander verwandt: Bei der Analyse mittels DNA-DNA-Hybridisierungsmethode konnten Übereinstimmungen zwischen dem Genom von *B. melitensis* 16M und 50 Stämmen von *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotomae* und *B. canis* von 96 ± 5 % ermittelt werden (Verger et al., 1985). Auch die Spezies *B. ceti* und *B. pinnipedialis* (> 77 %) (Foster et al., 2007), *B. microti* (> 84 %) (Scholz et al., 2008b) und *B. inopinata* (80 %) (De et al., 2008) weisen einen Homologiegrad von über 70 % auf und gehören infolge dessen zur Gattung *Brucella* (Verger et al., 2000).

Eine Analyse der 16S rRNA-Sequenzen zeigte, dass diese bei der Gattung *Brucella* zu 100 % bzw. (bei *B. inopinata*) zu 99,6 % identisch sind (Gee et al., 2004; Tiller et al., 2010). Dies und die Daten aus den DNA-DNA-Hybridisierungen führten in der Vergangenheit dazu, dass *Brucella* als monospezifische Gattung angesehen wurde. 1986 wurde aufgrund der DNA-DNA-Hybridisierungsergebnisse vorgeschlagen, die damals sechs bekannten Spezies unter dem Namen *Brucella melitensis* zusammenzufassen (Osterman und Moriyon, 2006; Verger et al., 1985). Da die DNA-DNA-Hybridisierungs-Methode nicht ausreicht, um die Abgrenzung bakterieller Spezies zu gewährleisten (Osterman und Moriyon, 2006) und weil der Vorteil der Unterscheidung in mehrere *Brucella*-Spezies nach unterschiedlicher Wirts-Spezifität (*host preference*) und Humanpathogenität einen praktischen Nutzen hat, wurde bei der Tagung des *Subcommittee on the taxonomy of Brucella* 2003 in Pamplona die ursprüngliche

Unterscheidung in mehrere *Brucella*-Spezies (siehe Tabelle 1-1) wieder eingeführt (Osterman und Moriyon, 2006; Whatmore, 2009).

Ergebnisse aus Untersuchungen mit anderen Methoden (PFGE, IS711, RFLP, *omp* Genfragmente, AFLP, *infrequent restriction site PCR*, *multilocus sequence analysis*, VNTR; siehe Abschnitt 1.3) unterstützen diese Taxonomie (Whatmore, 2009). Zur Veranschaulichung ist die aktuelle Systematik in Abbildung 1-2 als Stammbaum auf Basis der Untersuchung mittels MLVA-16 abgebildet. *B. inopinata* ist innerhalb der Gattung die am entferntesten verwandte Spezies (De et al., 2008). Im folgenden Stammbaum ist sie nicht abgebildet.

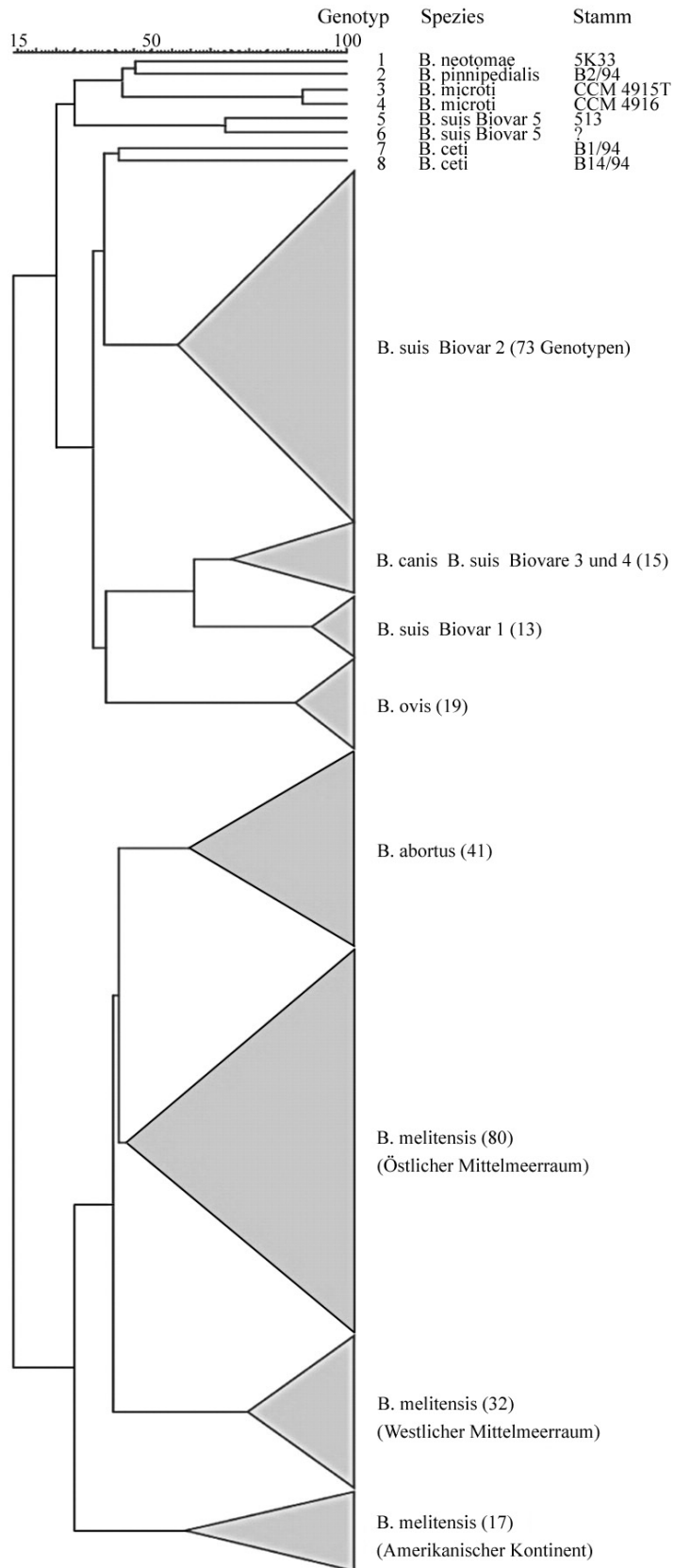


Abbildung 1-2: Kondensiertes Dendrogramm mit Clustern der MLVA-16-Genotypen; ermittelt aus 424 *Brucella*-Isolaten mit 296 verschiedenen Genotypen. Balken – prozentuale Sequenzabweichung (nach Scholz et al., 2008b).

1.1.2 Epidemiologie

Die Brucellose ist mit jährlich weltweit über 500 000 neu gemeldeten Fällen die bedeutendste bakterielle Zoonose weltweit (Pappas et al., 2006). Die Bekämpfungs- und Surveillance-Programme sind aufgrund notwendiger Impfungen von Tieren und Keulungen infizierter Tiere kostenintensiv, was in ärmeren Regionen ein Problem darstellt. In einer Gegenüberstellung des Bruttoinlandsproduktes (BIP) mit der Brucellose-Inzidenz zeigte sich, dass Regionen in Europa, deren BIP unter 80 % des mittleren europäischen BIP lag, größtenteils eine Inzidenz von fünf bis 90 Fällen pro 1.000.000 Einwohner haben. In Regionen mit höherem BIP lag die Inzidenz dagegen zwischen null und sechs Fällen pro 1.000.000 Einwohner (Pappas et al., 2006).

Die *Brucella*-Spezies finden sich in zahlreichen Wirten und mit unterschiedlicher geografischer Verteilung (siehe Abbildung 1-3):

B. melitensis ist in den Ländern um das Mittelmeer und auf dem Balkan endemisch, besonders in der Türkei, in Mazedonien, Algerien, Albanien, Tunesien, Griechenland und Bosnien und Herzegowina. Ebenfalls endemisch ist *B. melitensis* im Nahen Osten und in Indien, in der Mongolei und in China, wobei Syrien mit über 1.600 Brucellose-Fällen pro einer Million Einwohner weltweit die höchste Inzidenz aufweist (Pappas et al., 2006). Neben Schafen und Ziegen, die häufig in kleineren Gruppen in Privathaushalten gehalten werden und daher schwer zu kontrollieren sind, stellen im Nahen Osten auch Kamele ein bedeutendes Brucellose-Reservoir dar (Al-Majali et al., 2008).

B. abortus ist in Südamerika endemisch, vor allem in den Rinderpopulationen in Peru, Mexiko und Argentinien (Pappas et al., 2006). Für Brasilien können aufgrund fehlender Daten keine Aussagen darüber gemacht werden, ob *B. abortus* in diesem Land endemisch ist. Eine Studie über das Vorkommen von *B. abortus*-Antikörpern bei Personen mit Kontakt zu Rindern (Arbeiter in Schlachthäusern, Landarbeiter (*cowboys*), Veterinäre) zeigte für die Region Araguaína, Tocantins, dass 4,1 % der 645 untersuchten Personen seropositiv waren. Das zeigt, dass zumindest in dieser Region Brasiliens, dem Land mit der größten Rinderpopulation der Welt, mit *B. abortus* infizierte Tiere leben (Ramos et al., 2008b). In den USA und Nordeuropa (außer Nordirland) wurde diese Spezies in Haus- und Nutztieren erfolgreich durch staatliche Programme bekämpft (Glynn und Lynn, 2008; Godfroid und Käsbohrer, 2002). *B. abortus* hält sich jedoch beständig im Wildtierreservoir, z. B. in Elchen und Bisons der großen nordamerikanischen Nationalparks (Beja-Pereira et al., 2009; Maichak et al., 2009).

B. suis ist in Südostasien, Südamerika, im Südosten der USA und in Queensland in Australien endemisch. Diese Spezies wird auch in Hasen und Wildschweinen innerhalb Europas nachgewiesen, jedoch hier nur Biovar 2, dessen Humanpathogenität gering ist (Godfroid und Käsböhrer, 2002; Paton et al., 2001). Hochinfektiös für Menschen ist Biovar 1, das in Argentinien für ebenso viele Brucellose-Erkrankungen verantwortlich ist wie *B. melitensis* (Lucero et al., 2008), und Biovar 3, welches kürzlich erstmals in Europa (Kroatien) nachgewiesen wurde (Cvetnic et al., 2009).

Die in Seehunden bzw. in Schweinswalen und Tümmlern entdeckten marinen Brucellen *B. pinnipedialis* und *B. ceti* wurden in den 90er Jahren erstmals beschrieben (Cloekaert et al., 2001; Foster et al., 2007; Jahans et al., 1997). Bisher wurden erst drei humane Infektionen in Peru und Neuseeland diagnostiziert, in denen marine Stämme zu schwerer Neurobrucellose bzw. Osteomyelitis geführt haben. Der Genotyp der drei isolierten *Brucella*-Spezies war bei allen Patienten identisch: Es handelte sich jeweils um den MLST-Typ ST27 (Whatmore et al., 2008).

Insgesamt ist *Brucella melitensis* weltweit in der Klinik die am häufigsten beim Menschen isolierte *Brucella*-Spezies (Pappas et al., 2005). In brucellosefreien Gebieten kann es in Einzelfällen bei internationalen Touristen oder durch illegal importierte Lebensmittel zu Krankheitsfällen kommen. Hochrisikogruppen sind Personen mit Migrationshintergrund in Endemiegebieten, zum Beispiel Mexikaner an den mexikanisch-US-amerikanischen Grenzstaaten oder auch türkische Einwanderer in Deutschland und Dänemark (Al Dahouk et al., 2007; Doyle und Bryan, 2000; Eriksen et al., 2002).

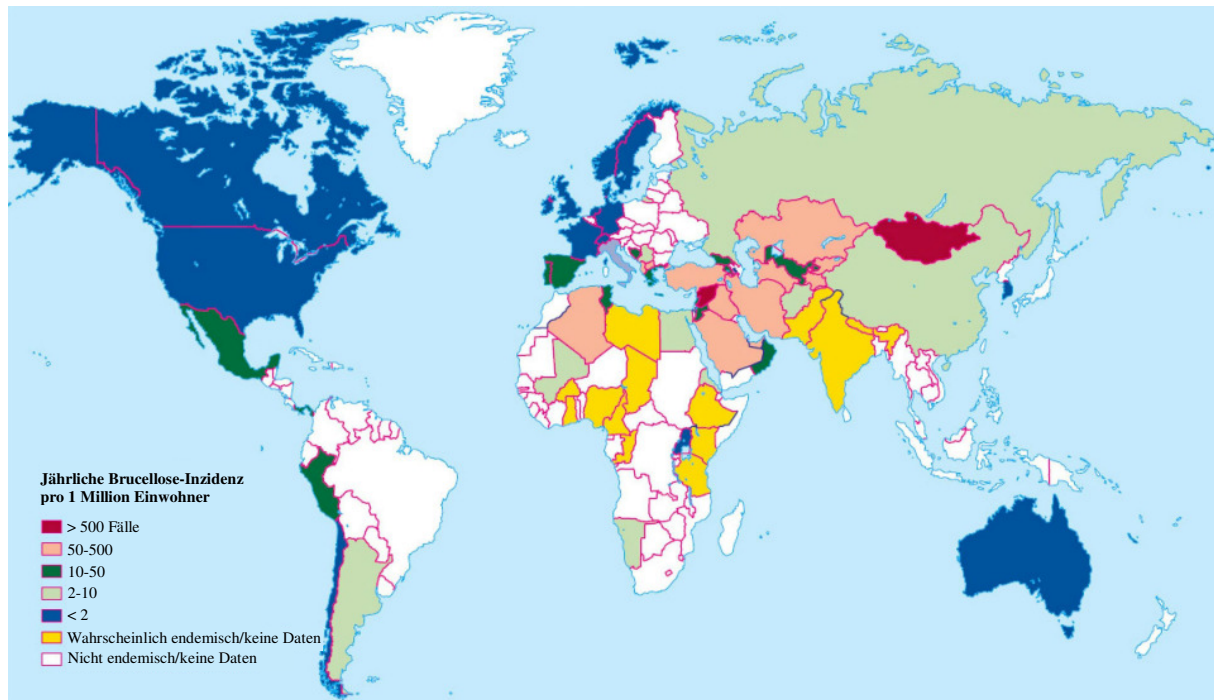


Abbildung 1-3: Weltweite Inzidenz der humanen Brucellose (nach Pappas et al., 2006).

1.1.3 Pathogenität

Brucellen sind fakultativ intrazelluläre Erreger (Price et al., 1990). Sie können in Wirtszellen über sogenannte *lipid rafts* eindringen (Porte et al., 2003). Dies sind Aggregate aus Cholesterin, Glykolipiden und Glykosylphosphatidylinositol-verankerten Molekülen (Naroeni und Porte, 2002). Die Interaktion mit der Wirtszellmembran wird durch mehrere Faktoren ermöglicht: Zum einen hat die LPS-Schicht von Brucellen im Vergleich mit anderen Pathogenen eine reduzierte Endotoxin-Wirkung (Moreno et al., 1981). Diese wird durch ein verändertes Lipid A hervorgerufen, das aus einer C28-Fettsäure und Diaminoglucose besteht (Iriarte et al., 2004). Eine *Brucella*-*bacA*-Mutante mit Lipid A, dem die C28-Fettsäure fehlte, löste in Mäusen eine stärkere Entzündungsreaktion aus als das natürliche Lipid A (Parent et al., 2007). Des Weiteren wird die Perosamin-O-Kette der *Brucella*-LPS durch Makrophagen nur geringfügig abgebaut (Forestier et al., 1999). Sie bildet mit MHCII-Molekülen Komplexe und wirkt der Antigen-Prozessierung entgegen (Forestier et al., 2000; Roop et al., 2009).

Im frühen Phagosom (*early phagosome*) wird verhindert, dass die Brucellen enthaltende Vakuole (BEV) mit Lysosomen fusioniert. Dabei helfen von Brucellen produzierte periplasmatische zyklische beta-1,2-Glucane, die *lipid rafts* der Membran der BEV zu verändern, womit Interaktionen mit Lysosomen vermieden werden (Arellano-Reynoso et al., 2005; Roop et al., 2009). Des Weiteren ist das BvrR/BvrS-Zweikomponentensystem daran beteiligt. Es kontrolliert die äußeren Membranproteine Omp3a und Omp3b (Guzman-Verri et

al., 2002) und Gene, die bei der Acylierung des Lipid A eine Rolle spielen (Manterola et al., 2005; Roop et al., 2009). Außerdem kontrolliert es auf direktem Weg sowie über den Transkriptionsfaktor VjbR auch indirekt die Expression von *virB* (Martinez-Nunez et al., 2010).

Dieses Operon codiert für das Typ IV-Sekretionssystem (O'Callaghan et al., 1999) und ist ein wichtiger Virulenzfaktor, da es durch Sekretion von Effektor-Proteinen die intrazelluläre Wanderung beeinflusst und die Interaktion mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) ermöglicht. Aktiviert wird dessen Expression durch das Absinken des pH-Wertes innerhalb der BEV (Boschioli et al., 2002), der auf Werte von pH 4,0 bis 4,5 absinkt (Porte et al., 1999). Gegenwärtig wird davon ausgegangen, dass der pH-Wert durch eine transiente Interaktion mit Endosomen absinkt (Starr et al., 2008). Die Fusion mit Lysosomen wird durch VirB-Proteine verhindert (Celli et al., 2003). Teile des ERs fusionieren mit der BEV (Celli et al., 2003) wobei der pH-Wert wieder ansteigt (Roop et al., 2009) und schließlich die replikative Vakuole entsteht (Moreno und Gorvel, 2004), die auch replikatives Phagosom (Kim et al., 2002) oder Brucellosom (Köhler et al., 2003) genannt wird (siehe Abbildung 1-4). Diese Vakuole wird von der Wirtszelle nicht als fremd erkannt und ermöglicht den Brucellen die Replikation (Pizarro-Cerda et al., 1998).

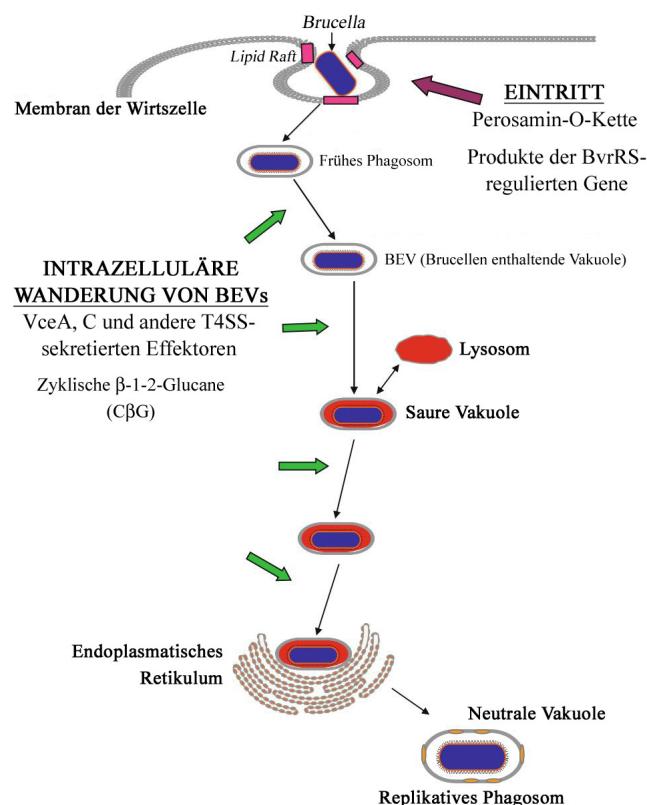


Abbildung 1-4: Intrazelluläre Wanderung von Brucellen in Wirtszellen (nach Roop et al., 2009).

Durch die intrazelluläre Lebensweise in Makrophagen sind die Bakterien während der Ausbreitung im Wirt vor Antikörpern und Complement-Faktoren geschützt. Sie können in Makrophagen in der Milz oder in der Leber für lange Zeit überleben (Moreno und Gorvel, 2004), so dass es zur chronischen und - im natürlichen Wirt - auch zur lebenslangen Infektion mit *Brucella* kommen kann (Enright, 1990; Young, 1995). Es wurden sogar Hinweise darauf gefunden, dass Brucellen die Fähigkeit besitzen, eine Apoptose „ihrer“ Makrophagen zu verhindern (Gross et al., 2000).

Brucellen können ebenfalls in dendritischen Zellen überleben und sich dort auch vermehren. Dabei zeigte sich, dass Brucellen die Reifung von dendritischen Zellen behindern (Salcedo et al., 2008) und somit ihre replikative Nische aufrechterhalten.

Auch nicht-professionelle Phagozyten können von Brucellen infiziert werden. Besonders hohe Zellzahlen von *B. abortus* wurden in der Plazenta von infizierten Kühen nachgewiesen, wo zwischen $5,2 \times 10^{11}$ und $1,4 \times 10^{13}$ KBE/g gezählt wurden (Alexander et al., 1981). Dort fanden sie sich sowohl in Phagozyten, als auch im Exsudat und im Interstitium. Die meisten Brucellen waren jedoch im rauen ER der plazentalen Trophoblasten enthalten (Meador und Deyoe, 1989). Die Plazenta von Kühen ist reich an Erythritol, einem Zucker, der von Brucellen bevorzugt verstoffwechselt wird (Samartino und Enright, 1993).

1.1.4 Klinik und Therapie

Eine Ansteckung mit Brucellen erfolgt sehr häufig durch die orale Aufnahme, besonders durch den Verzehr von Rohmilch und Rohmilchprodukten (Buzgan et al., 2010). In einer Studie von Buzgan et al. (2010) waren 1.028 Brucellose-Fälle in der Türkei 63,6 % auf diesen Infektionsweg zurückzuführen. In Spanien infizierten sich 23,6 % (Colmenero et al., 1996), in Kuwait 69 % (Mousa et al., 1988), auf der arabischen Halbinsel 34,7 % (Bosilkovski et al., 2007) und im Iran 22,4 % (Hasanjani Roushan et al., 2004) oral-alimentär mit Brucellen. Weitere Lebensmittel sind lokale Spezialitäten wie z. B. der Konsum von rohen Fleischbällchen (Gür et al., 2003) oder roher Leber (Malik, 1997). Auch Kontaktinfektionen spielen für die Übertragung der Brucellen eine wichtige Rolle. In 42,3 % der Fälle wurde in der Türkei das Halten von Tieren und in 2,5 % das Arbeiten in sogenannten Risikoberufen wie Veterinär, Metzger und Laborant angegeben (Buzgan et al., 2010).

Die Inkubationszeit ist sehr variabel und liegt meist zwischen zwei und drei Wochen, wobei sie zwischen einer Woche und mehreren Monaten dauern kann (WHO, 1995; Williams, 1973). Die längste bisher erfasste Inkubationszeit dauerte zehn Monate (Georghiou und Young, 1991).

Der Verlauf der Brucellose ist am häufigsten akut: In mehreren Studien aus der Türkei sowie aus Kuwait, Indien und dem Iran mit jeweils zwischen 140 und 1.028 untersuchten Fällen verlief die Brucellose durchschnittlich zu 58,3 % akut (Symptome über 0-2 Monate), zu 26,2 % subakut (2-12 Monate) und zu 14,9 % chronisch (> 12 Monate) (Akdeniz et al., 1998; Aygen et al., 2002; Buzgan et al., 2010; Demiroglu et al., 2007; Gür et al., 2003; Hasanjani Roushan et al., 2004; Kökoglul et al., 2006; Lulu et al., 1988; Mantur et al., 2006; Savas et al., 2007). Rezidive treten zu 3,6-4,7 % auf (Buzgan et al., 2010; Colmenero et al., 1996). Die meisten Ansteckungen mit Brucellen erfolgen im Frühjahr und Sommer (Chang et al., 2003). Bei der akuten und subakuten Brucellose sind die häufigsten Symptome Arthralgie, Fieber, Erschöpfungserscheinungen, Schwitzen, Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust, Myalgie, Schüttelfrost, Übelkeit, Rücken- und Kopfschmerzen in Verbindung mit Hepatomegalie, Splenomegalie und peripherer Arthritis, wobei diese Symptome bei den subakuten Verläufen weniger ausgeprägt sind. Bei den chronischen Fällen kommen diese Symptome bei einem geringeren Anteil der Patienten vor (Buzgan et al., 2010). Zusätzlich treten unspezifische Symptome auf, z. B. sind Unwohlsein, Nervosität, emotionale Labilität, Depression oder Muskelschmerz typisch für den chronischen Verlauf (Young, 1983). Fieber ist beim akuten Verlauf stärker ausgeprägt als beim chronischen, und es kann zu allmählich ansteigendem und wieder zurückgehendem Fieber mit fieberfreien Perioden – zum sogenannten *febris undulans* – kommen.

Neurobrucellose, die sich als Meningitis oder Meningoenzephalitis äußert, und Endokarditis treten in < 5 % bzw. < 2 % der Fälle auf. Diese sind mehrheitlich für die letalen Verläufe (< 1 % aller Fälle) verantwortlich (Buzgan et al., 2010), wobei Endokarditis in 80 % der Fälle die Todesursache ist (Peery und Belter, 1960). Auch Organmanifestationen wie z. B. Gelenkentzündungen, treten auf. Hierbei sind Rezidive häufiger, denn bis zu 8,5 % der Patienten müssen erneut behandelt werden (Buzgan et al., 2010).

Bei Brucellose in der Schwangerschaft kann es zu Komplikationen kommen. Besonders in den ersten beiden Trimestern besteht die Gefahr des Aborts (43 %), während die Inzidenz im dritten Trimester auf 2 % sinkt (Khan et al., 2001). Bei einer zeitnah angesetzten Therapie erhöht sich die Wahrscheinlichkeit einer normalen Geburt (Karcaaltincaba et al., 2010).

Die empfohlene Therapie bei Brucellose besteht aus einer Kombination aus Doxycyclin für sechs Wochen zusammen mit Gentamicin oder Streptomycin für zwei Wochen (Skalsky et al., 2008). Bei Komplikationen werden bis zu vier Antibiotika parallel empfohlen und eine verlängerte Therapie von bis zu sechs Monaten durchgeführt (Acar et al., 2009). Dies ist z. B. bei der Neurobrucellose der Fall, wobei sich Cephalosporine der dritten Generation wie

Ceftriaxon wegen der guten Diffusion in die Cerebrospinal-Flüssigkeit als nützlich erwiesen haben (Buzgan et al., 2010). Bei Endokarditis ist möglichst früh nach der Diagnose eine Operation erforderlich (Kula et al., 2001). In der Schwangerschaft dürfen keine Tetracycline, Streptomycine und Quinolone verordnet werden, weshalb entweder eine Monotherapie mit Rifampicin oder Cotrimoxazol oder eine Therapie mit beiden Antibiotika empfohlen wird (Skalsky et al., 2008; Solera, 2010).

Da es noch keinen zugelassenen Humanimpfstoff gibt (Perkins et al., 2010), kommt der Infektionsprävention eine besondere Bedeutung zu. Das Monitoring in den Tierbeständen ist ein wichtiger Baustein der Prävention auf dem Gebiet der Tiergesundheit. Bei positiven Befunden werden geeignete Maßnahmen getroffen, wie das Separieren und die Keulung infizierter Tiere oder die Einführung von Impfprogrammen. Einer Ausbreitung der Brucellose wird auf diese Weise entgegen gewirkt. Da die Übertragung von Brucellen durch Lebensmittel am häufigsten über Milch und Milchprodukte erfolgt, ist die Pasteurisation der Milch eine wichtige präventive Maßnahme auf dem Gebiet der Lebensmittelsicherheit (Glynn und Lynn, 2008). Diese wurde in Deutschland ab den 30er Jahren zur Vermeidung von Infektionen mit Brucellen durch Milch angewandt (Lerche, 1931).

1.2 Brucellen als B-Waffe

Die humanpathogenen Brucellen sind ein ideales bioterroristisches Agens: Sie können als Aerosol ausgebracht werden und führen in dieser Form bereits bei 10-100 Keimen zur Infektion (Franz et al., 1997). Außerdem ist der Erreger in Endemiegebieten leicht verfügbar. Bei einer Infektion sind die Symptome unspezifisch und leicht mit einer Grippe zu verwechseln (siehe Abschnitt 1.1.4). Einen Humanimpfstoff gibt es nicht.

Beim Vorkommen von Brucellen in Tierbeständen entsteht ein hoher wirtschaftlicher Schaden: Beim Auftreten der Brucellose sinkt die Reproduktionsrate der Tiere und die Rohmilch ist nicht mehr verkäuflich. Für den Bauern besteht die Pflicht zur Keulung infizierter Tiere. Außerdem sind die erforderlichen Dekontaminationsmaßnahmen teuer. Die Therapie von Krankheitsfällen im humanen Bereich mit Medikamenten und Krankenhausaufenthalten verursacht Kosten im Gesundheitssystem und ein Ausfall an Arbeitskräften. Schließlich sinkt als Folge das Bruttoinlandsprodukt (Neubauer, 2010).

Die Verwendung von Brucellen als Biowaffe wurde bereits zwischen 1952 und 1954 in Studien zur Aerosol-Dispersion getestet. Ab 1953 wurde *B. suis* waffenfähig gemacht. Die USA zerstörten diese Waffen jedoch 1969 vollständig (Hoover und Borschel, 2005). Eine Ausbringung von 50 kg lyophilisierter Brucellen in der Nähe einer Stadt mit fünf Millionen

Einwohnern soll laut Berechnungen der WHO zu 150.000 Erkrankungen und 600 Toten führen (WHO, 1970). Einer anderen Schätzung zufolge würde eine Ausbringung von *B. melitensis* als Aerosol über einer Stadt mit 100.000 Einwohnern zu 82.500 Erkrankten, 413 Toten und Kosten von 478-650 Millionen Dollar verursachen (Davis, 2004; Kaufmann et al., 1997).

Brucellen gehören zur Kategorie B bioterroristischer Agenzien (CDC, 2011). Das bedeutet, dass der Erreger leicht verteilt werden kann, das Potenzial für eine starke Beeinträchtigung des öffentlichen Gesundheitssystems hat, ein Anschlag die Öffentlichkeit in Panik und Chaos stürzen kann und dass der Gesundheitssektor im Fall eines Anschlages reagieren muss (CDC, 2011).

1.3 Diagnostik von Brucellen

1.3.1 Direkter Nachweis

1.3.1.1 Kultureller Nachweis

Brucella spp. können auf vielen der gängigen Agar- und Flüssigmedien angezüchtet werden (Al Dahouk et al., 2003). Das Wachstum ist bei 20-40 °C möglich, wobei eine Temperatur von 37 °C optimal ist (Burrows und Freeman, 1985). *B. ovis* benötigt zum Wachstum 5-10 % CO₂ und *B. pinnipedialis* sowie Stämme der Biovare 1-4 von *B. abortus* wachsen mit CO₂ besser, so dass bei unbekanntem Stämmen immer mit CO₂ inkubiert werden sollte. Eine Luftfeuchtigkeit von 90 % ist ebenfalls dem Wachstum förderlich.

Als feste Wachstumsmedien stehen *Brucella*-Agar (zusammengesetzt aus Pepton aus Fleisch, Pepton aus Casein, Dextrose, Hefeextrakt, Natriumchlorid und Agar), Blutagar, Schokoladen-Agar und *trypticase soy agar* zur Verfügung. Das Wachstum von Kolonien ist nach 48 bis 72 Stunden erkennbar.

Sind aufgrund der Beschaffenheit der Probe Fremdkeime zu erwarten (z. B. Fäkalien, Gewebe, Rohmilchprodukte), müssen mit Antibiotika supplementierte Selektivmedien verwendet werden, gegen die Brucellen resistent sind. Dabei hat sich die Kombination mehrerer Antibiotika bewährt, z. B. Nalidixinsäure, Bacitracin, Polymyxin B, Cycloheximid, Nystatin und Vancomycin (Oxoid; siehe Farrell und Robertson, 1972).

Flüssigmedien dienen der Anreicherung von Bakterien aus klinischem Probenmaterial und sollten alle drei bis fünf Tage subkultiviert werden (Al Dahouk et al., 2003). Durch Verwendung biphasischer Medien, bei denen sowohl festes als auch flüssiges Medium in

einer Flasche enthalten ist, kann die Subkultivierung umgangen werden. Die Sensitivität der Kultivierungssysteme ist neben dem Medium abhängig vom klinischen Stadium der Erkrankung, von der Vorbehandlung mit Antibiotika, vom Inokulum und von der Begleitflora (40-90 % in akuten, 5-20 % in chronischen Fällen und bei Organmanifestationen). Zudem muss für bis zu sechs Wochen inkubiert werden, bevor eine Probe als eindeutig *Brucella*-negativ bewertet werden kann (Araj, 2010). Ein schnellerer Nachweis mit höherer Nachweisrate ist mit automatisierten Systemen wie den Blutkultur-Systemen BACTEC (Becton Dickinson, Heidelberg, D) oder BACT/ALERT (BioMerieux, Nürtingen, D) möglich, bei denen durch Messung der bakteriellen CO₂-Abgabe das Wachstum der Mikroorganismen detektiert wird (Al Dahouk et al., 2003; Araj, 2010; Yagupsky, 1999).

In Abhängigkeit von der Art des exprimierten LPS wachsen Brucellen in unterschiedlichen Kolonieformen: Kolonien der S-Form (*smooth*) sind konvex, kreisrund, durchscheinend und je nach Stamm und Inkubationsdauer 0,1 bis 5 mm im Durchmesser (Al Dahouk et al., 2003). Wird *Brucella* subkultiviert oder längere Zeit auf Agar im Brutschrank inkubiert, können sich die Kolonien ändern. Sie werden flacher und von gelblich-weißer, trüb aussehender Farbe (R-Form). Virulenz, Antigen-Eigenschaften und Phagen-Sensitivität ändern sich ebenfalls. Des Weiteren tritt auch eine mucoide Form (M-Form) auf, bei der die Kolonien schleimig sind und eine durchscheinende, gräulich bis leicht orange Färbung aufweisen (Al Dahouk et al., 2003).

Die Einteilung in Spezies und Biovare erfolgt auf Grundlage der biochemischen Eigenschaften der Stämme. Dabei wird das CO₂-abhängige Wachstum, die Bildung von H₂S, die Urease- und Oxidase-Aktivität, das Wachstum auf farbstoffhaltigen Medien (Thionin bzw. Fuchsin), die Agglutination mit monospezifischen Antiseren (A, M und R) und die Lyse durch Phagen (Tbilisi (Tb), Weybridge (Wb), Berkeley (Bk₂) und Firenze (Fi)) untersucht (Alton et al., 1988b; Whatmore, 2009).

Zu Fehldiagnosen führen kommerzielle Identifikationssysteme wie der API 20 NE von BioMerieux. Hierbei wird *Brucella* als *Moraxella phenylpyruvica* oder *Ochrobactrum anthropi* identifiziert (Barham et al., 1993; Elsaghir und James, 2003). Neue semi-automatische Phänotypisierungs-Systeme, z. B. Micronaut (Merlin Diagnostika, Bornheim-Hersel, D) könnten in Zukunft die klassische Biochemie ablösen (Al Dahouk et al., 2010a).

Tabelle 1-2: Eigenschaften der *Brucella*-Spezies, die bei der klassischen Biotypisierung bestimmt werden (nach Whatmore, 2009).

Spezies	Biovar	Urease	CO ₂ -Bedarf	H ₂ S-Produktion	Wachstum auf Medien mit		Agglutination mit monospezifischen Antisera			Lyse durch Phagen bei RTD					
					Thionin ^a	Fuchsin ^a	A	M	R	Tb	Wb	Bk ₂	Fi	R/C	Tb x 10 ⁴
Klassische Spezies															
<i>B. abortus</i>	1	(+) ^b	(+)	+	-	+	+	-	-	L	L	L	L	KL	L
	2	+	(+)	+	-	-	+	-	-	L	L	L	L	KL	L
	3 ^c	+	(+)	+	+	+ ^d	+	-	-	L	L	L	L	KL	L
	4	+	(+)	+	-	+	-	+	-	L	L	L	L	KL	L
	5	+	-	-	+	+	-	+	-	L	L	L	L	KL	L
	6 ^c	+	-	(+)	+	+	+	-	-	L	L	L	L	KL	L
	7	+	-	(+)	+	+	+	+	-	L	L	L	L	KL	L
	9	+	-	+	+	+	-	+	-	L	L	L	L	KL	L
	<i>B. suis</i>	1	+	-	+	+	- ^e	+	-	-	KL	L	L	PL	KL
2		+	-	-	+	-	+	-	-	KL	L	L	PL	KL	L
3		+	-	-	+	+	+	-	-	KL	L	L	PL	KL	L
4		+	-	-	+	(-)	+	+	-	KL	L	L	PL/L	KL	L
5		+	-	-	+	-	-	+	-	KL	L	L	PL	KL	L
<i>B. melitensis</i>	1	+	-	-	+	+	-	+	-	KL	KL	L	KL	KL	KL
	2	+	-	-	+	+	+	-	-	KL	KL	L	KL	KL	KL
	3	+	-	-	+	+	+	+	-	KL	KL	L	KL	KL	KL
<i>B. ovis</i>		-	+	-	+	(+)	-	-	+	KL	KL	KL	KL	L	KL
<i>B. canis</i>		+	-	-	+	-	-	-	+	KL	KL	KL	KL	L	KL
<i>B. neotomae</i>		+	+	+	-	-	+	-	-	KL/PL	L	L	L	KL	L
Neu beschriebene Spezies															
<i>B. ceti</i>		+	(-)	-	(+)	(+)	+	(-)	-	KL ^a	L ^β	L ^β	KL/PL	KL	
<i>B. pinnipedialis</i>		+	(+)	-	+	+	(+)	(-)	-	KL ^a	L ^β	L ^β	KL/PL	KL	
<i>B. microti</i>		+	-	-	+	+	-	+		KL	L		KL		L
<i>B. inopinata</i>		+	-	+	+	+	-	+ ^f		KL			KL		PL

Lyse der Phagen: RTD – routine test dilution, Tb – Tbilisi, Wb – Weybridge, Bk₂ – Berkeley, Fi – Firenze, R/C – raue Stämme, Tb x 10⁴ = RTD x 10⁴, L – konfluente Lyse, PL – partielle Lyse, KL – keine Lyse, α – bei den meisten Stämmen keine Lyse, β – Lyse bei den meisten Stämmen, (+) – die meisten Stämme sind positiv, (-) – die meisten Stämme sind negativ.

^a Konzentration 1/50.000 w/v

^b Stamm ist negativ, aber die meisten Feldstämme sind positiv

^c Für eine bessere Differenzierung von Biovar 3 und 6 wird zusätzlich eine Thionin-Verdünnung von 1/25.000 (w/v) verwendet. Biovar 3 = +, Biovar 6 = -.

^d Einige Stämme dieses Biotyps werden durch Fuchsin inhibiert.

^e Einige Stämme können resistent gegenüber Fuchsin sein.

^f Schwache Agglutination

1.3.1.2 Molekularbiologischer Nachweis

DNA-Extraktion

Für einen sensitiven Nachweis von DNA in Lebensmitteln mittels PCR und Real-Time PCR ist die DNA-Extraktion ein entscheidender Schritt. Fette, Enzyme, Polysaccharide, Proteine sowie hohe Kalzium-Konzentrationen sind Inhibitoren der PCR (Wilson, 1997). Kann bei der Extraktion die DNA nicht effizient separiert werden, so kann es zur sterischen Inhibition der DNA-Polymerase selbst kommen: Fette können durch Einschluss von DNA in Micellen die Amplifikation verhindern bzw. durch ihre im Gegensatz zu Wasser höhere Viskosität diese

erschweren. In Zellen enthaltene Enzyme wie die DNase zerschneiden den DNA-Strang und eventuell das in der PCR nachzuweisende Zielgen, wodurch die Sensitivität des Nachweises vermindert wird. Proteine und die zweifach positiv geladenen Kalzium-Ionen können eine Bindung mit dem negativ geladenen Zuckerphosphat-Rückgrad der DNA eingehen und somit ebenfalls sterisch die Amplifikation der DNA durch die Polymerase inhibieren. Somit ist eine effiziente DNA-Extraktion bei Lebensmittelproben zur Unterdrückung von Inhibitoren in der biologischen Matrix und zur Verminderung von Sensitivitätsverlusten in der PCR unverzichtbar.

Auch beim Extraktionssystem selbst können DNA-Verluste auftreten: So kann ein Teil der DNA an Silica-Säulen gebunden bleiben und im finalen Extraktionsschritt nicht eluiert werden. Bei der Phenol-Chloroform-Extraktion darf nur die wässrige, DNA enthaltende Phase abpipettiert werden. Um zu verhindern, dass auch Teile der organischen Phase transferiert werden, kann nicht die vollständige wässrige Phase überführt werden. Dies führt zu Verlusten bei der Extraktion.

DNA-Extraktionsprotokolle für verschiedene Erreger und Matrizes

Psifidi et al. (2010) verglichen sechs Methoden zur Isolation von Schafsmilch-DNA:

- Nucleospin Blood (Macherey-Nagel)
- Nucleospin Tissue (Macherey-Nagel)
- Nucleospin Blood (Macherey-Nagel) mit anfänglicher Behandlung mit Tris und EDTA für 45 min und finaler Chloroform-Extraktion
- Nucleospin Tissue (Macherey-Nagel) mit anfänglicher Behandlung mit Tris und EDTA für 45 min und finaler Chloroform-Extraktion
- Lyse mit Tris, EDTA, NaCl und SDS sowie mit Proteinase K über Nacht, anschließend Phenol-Chloroform-Extraktion
- Behandlung mit 8 M Guanidiniumhydrochlorid und Chloroform mit Extraktion der DNA durch eine Silica-Säule

Schafsmilch ist fettreicher als Kuhmilch, was die Extraktion von DNA anspruchsvoller macht. Um die Qualität der extrahierten DNA beurteilen zu können, wurde mittels Fotometer die Ratio OD₂₆₀/280 zur Bestimmung der Proteinkontamination sowie die OD₂₆₀/230 zur Bestimmung der Salzkontamination gemessen. Zusätzlich wurde die relative Menge extrahierter DNA bestimmt, ihre Intaktheit mittels Agarose-Gelelektrophorese beurteilt und das *ovine prion protein gene* in einer Real-Time PCR amplifiziert. Die höchste DNA-

Konzentration mit der reinsten DNA ergab die Extraktion mit dem modifizierten Nucleospin Blood Kit. Die Phenol-Chloroform-Extraktion lag nur auf Rang fünf.

In einem Vergleich zweier DNA-Extraktionsmethoden untersuchten McKillip et al. (2000) die Detektion von 10^8 bis 10^1 KbE/ml *Escherichia coli* O157:H7 in Magermilch, Milchpulver, Cheddar, Brie und Molkepulver:

- Behandlung der Matrices mit Natriumcitrat-Lösung, mit Petrol-Ether und Ethanol sowie später mit Ammoniumhydroxid, Inkubation des abzentrifugierten Pellets in einem Puffer aus Saccharose, EDTA, Triton X-100 und Tris-HCl sowie Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
- Behandlung der Matrices mit Natriumcitrat-Lösung, Zentrifugation und Aufnahme des Pellets in steriler physiologischer Kochsalzlösung (0,9 %); Vermischung mit Titanhydroxid 1:1 zum Immobilisieren der Bakterien, Inkubation in Guanidinium-Isothiocyanat, Dithiothreitol und Triton X-100 sowie Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol.

Bei der folgenden klassischen PCR (*slt-II*-Gen) zeigte sich, dass die erste Methode sensitiver war. Hiermit konnten 10^1 KbE/ml *E. coli* O157:H7 in Magermilch, Brie und Cheddar und 10^2 KbE/ml in Milchpulver nachgewiesen werden. In Molkepulver war dagegen mit dieser Methode keine Amplifikation erfolgt, während mit dem zweiten DNA-Extraktionsansatz 10^4 KbE/ml detektiert werden konnten. Dies zeigt, wie unterschiedlich die Sensitivität derselben Methode bei unterschiedlichen Matrices ausfallen kann.

DNA-Extraktionsprotokolle für Brucellen in verschiedenen Matrices

Der kulturelle Nachweis von *Brucella* ist langwierig und nicht sehr sensitiv. Ein Nachweis der DNA könnte dagegen innerhalb eines Tages die Frage beantworten, ob ein Lebensmittel mit Brucellen kontaminiert ist. Im Rahmen dieser Studie sollte eine DNA-Extraktionsmethode ausgewählt werden, die möglichst für verschiedene Lebensmittel-Matrices eine hocheffiziente Isolation von DNA ermöglicht.

In der Literatur wurden speziell für Brucellen bereits mehrere Verfahren untersucht. Marianelli et al. (2008) verglichen z. B. fünf verschiedene DNA-Extraktionsmethoden für die Isolierung der DNA von *Brucella abortus* RB51 aus Büffelmilch:

- QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)
- Phenol-Chloroform-Extraktion nach Romero und Lopez-Goni (1999)
- Phenol-Chloroform-Extraktion nach Leal-Klevezas et al., 1995

- Phenol-Chloroform-Extraktion nach Cremonesi et al., 2006
- Zentrifugation von Milch, Aufnahme des Pellets in physiologischer Kochsalzlösung, Phenol-Chloroform-Extraktion

Die von Romero und Lopez-Goni (1999) entwickelte Phenol-Chloroform-Extraktion erwies sich am sensitivsten und wies im Zusammenhang mit der klassischen *bcp31*-PCR (Primer B4/B5) (Baily et al., 1992) als geringste Konzentration 4×10^3 KbE/ml nach. Dagegen war der Nachweis mittels kommerzieller Kits (Qiagen) mit 4×10^5 KbE/ml am wenigsten sensitiv. Romero und Lopez-Goni (1999) untersuchten ebenfalls drei verschiedene Methoden:

- Phenol-Chloroform-Extraktion (die genannte Veröffentlichung)
- Instagene (Bio-Rad)
- Prep-A-Gene system (Bio-Rad)

Dabei hatte nach der Extraktion von 2×10^5 KbE *B. abortus* 2308 pro ml und anschließendem Nachweis mittels klassischer 16S rRNA-PCR (Primer F4/R2) die Phenol-Chloroform-Extraktion im Agarosegel die intensivste Bande. Bei der Untersuchung von Verdünnungsreihen wurde mit dieser Methode eine minimale Dosis von 50 KbE/ml Kuhmilch ermittelt.

Tomaso und Kollegen untersuchten fünf Extraktionskits zum Nachweis von *B. melitensis* in mittels FastPrep-24-Instrument zerkleinertem Gewebe von infizierten Dromedaren (Leber, Milz, Lunge, Pankreas) (Tomaso et al., 2010). Hierbei wurden die folgenden Kits verwandt:

- UltraClean Tissue and Cells DNA Isolation Kit (MoBio)
- PeqGold Tissue DNA Mini Kit (PeqLab)
- QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)
- DNA Isolation Kit for Cells and Tissues (Roche)
- NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel)

Anschließend wurde die DNA durch eine neu entwickelte *IS711*-Real-Time PCR (LightCycler, Roche) nachgewiesen. Hierbei erwies sich in der Hälfte der Proben der Kit von Qiagen als am sensitivsten. Der Kit von Roche war am zweitbesten und bei der Analyse größerer Mengen Gewebe (400 mg) von Vorteil.

Aus humanem Serum wurde die DNA von *B. melitensis* von Queipo-Ortuno et al. (2008) mit sieben verschiedenen Kits vergleichend extrahiert:

- UltraClean DNA BloodSpin Kit (MoBio)
- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche)
- NucleoSpin Tissue Kit (Macherey Nagel)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen)

- Puregene DNA Purification System (Gentra)
- Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega)
- GFS Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham)

Nach der Amplifikation der DNA mittels SYBR Green Real-Time PCR (Primer B4/B5, LightCycler) wies der QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) zusammen mit dem UltraClean DNA BloodSpin Kit (MoBio) die niedrigste Nachweisgrenze auf (100 fg).

Diagnostik mittels PCR und Real-Time PCR

Die Molekulardiagnostik ist lange Zeit schwierig gewesen, insbesondere die Differenzierung der *Brucella*-Spezies. Erst durch die Sequenzierung vollständiger *Brucella*-Genome (DeVecchio et al., 2002; Halling et al., 2005; Paulsen et al., 2002) konnten DNA-Sequenzen *in silico* verglichen werden, was die Identifizierung von spezifischen Gen-Abschnitten ermöglicht hat (Foster et al., 2009; Halling et al., 2005; Rajashekara et al., 2004).

Für die klinische Diagnostik ist die Unterscheidung von Spezies nicht notwendig, da bereits die Identifikation der Gattung *Brucella* eine geeignete Antibiotika-Therapie nach sich ziehen muss. Für die Genus-spezifische Diagnostik existieren einige klassische PCR-Assays, z. B. auf Basis der 16S rRNA (Romero et al., 1995), der internen transkribierten Spacer-Region 16S-23S (Rijpens et al., 1996) oder des *omp2*-Gens, das für ein äußeres Membranprotein vor *Brucella* codiert (Leal-Klevezas et al., 1995). Am häufigsten wird die *bcs31*-PCR (Baily et al., 1992) verwendet. Das für ein Zell-Oberflächen-Protein codierende *bcs31*-Gen kommt nur einmal in jedem *Brucella*-Genom vor und erlaubt eine hochspezifische Detektion der Gattung.

Die Ergebnisse aus der klassischen PCR lassen sich auf die moderne Real-Time PCR übertragen. Diese hat gegenüber der klassischen PCR einige Vorteile: Zum einen ist sie zeitsparend, weil der Nachweis während der PCR verfolgt werden kann und keine weitere Methode für die Detektion des Amplifikats notwendig ist (Agarosegel, Sequenzierung, Southern Blot). Des Weiteren ist sie sehr spezifisch und hochsensitiv. Gängig sind die TaqMan- und die SYBR Green I-Techniken (Al Dahouk et al., 2004).

Bei der TaqMan Real-Time PCR wird zusätzlich zu *forward*- und *reverse*-Primern eine Sonde dem PCR-Mastermix beigelegt. Dies ist ein Oligonukleotid, das zwischen den beiden Primern spezifisch an die Ziel-DNA hybridisiert. Es enthält an einem Ende ein Donor-Fluorochrom (Reporter), das bei Anregung Energie einer bestimmten Wellenlänge emittiert, und am anderen Ende ein Akzeptor-Fluorochrom (*quencher*), das durch Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) die Energie des Donors aufnimmt. Verlängert eine

Polymerase mit 5'-3'-Exonuklease-Aktivität bei der Elongation den Primer, hydrolysiert sie die Sonde. Dadurch werden Donor und Akzeptor voneinander getrennt. Der Donor fungiert nun als Reporter, da er die aufgenommene Energie als detektierbare Fluoreszenz emittiert. Der Anstieg der Fluoreszenz ist proportional zu der Menge an Ziel-DNA.

Für das TaqMan-System wurde eine Real-Time-Multiplex-PCR entwickelt, welche sowohl die Gattung *Brucella* als auch *B. melitensis* und *B. abortus* nachweist. Zum hochspezifischen Nachweis der Gattung *Brucella* wurden Primer und eine Sonde mit dem *bcs31*-Gen als Zielsequenz entwickelt (Probert et al., 2004). Für den Nachweis von *B. abortus* bzw. *B. melitensis* wurden Sonden entwickelt, die an das *alkB*- bzw. an das BMEI1162-Gen hybridisieren. Die Primer hybridisieren einerseits an die genannten Gene und liegen downstream jeweils in der Insertionssequenz *IS711*, so dass für den *reverse*-Primer nur ein Oligonukleotid verwendet werden muss (Probert et al., 2004).

Kürzlich wurde auf Basis der Insertionssequenz *IS711* eine hocheffiziente Real-Time PCR entwickelt (Tomaso et al., 2010). Diese Sequenz findet sich in *Brucella* in mehreren Kopien: In *B. melitensis* 7-10mal, in *B. abortus* 6-8mal, in *B. suis* 7-13mal, in *B. neotomae* 5K33 8mal, in *B. canis* RM6/66 6mal, in *B. ovis* 63/290 38mal, in *B. microti* CCM 4915 13mal und in *B. pinnipedialis* und *B. ceti* jeweils 25-31mal (Audic et al., 2009; Audic et al., 2011; Bounaadja et al., 2009; Bricker et al., 2000; Ouahrani et al., 1993). Daher ist die Wahrscheinlichkeit, mittels der neu entwickelten *IS711*-PCR *Brucella* zu detektieren, deutlich höher. Im Gegensatz zur *bcs31*-PCR ist die *IS711*-PCR noch nicht ausreichend klinisch erprobt.

Bei der SYBR Green I-Methode interkaliert der Cyanin-Farbstoff (SYBR Green I) unspezifisch in die DNA und emittiert in diesem Komplex nach Anregung grünes Licht. Je mehr DNA vorliegt, umso stärker ist das Signal (Schneeberger et al., 1995). Eine *bcs31*-PCR auf Basis der SYBR Green-I-Technik wurde von Al Dahouk et al. veröffentlicht (Al Dahouk et al., 2007). Der dort vorgestellte Assay beinhaltet einen Gen-Abschnitt aus dem Bakteriophagen Lambda, der als interne Amplifikationskontrolle fungiert. Durch diese Amplifikationskontrolle gelten *Brucella*-negative Proben bei gleichzeitigem Nachweis der Lambda-DNA als gesichert negativ. Die Einwirkung von PCR-Inhibitoren kann somit ausgeschlossen werden.

Für eine maßnahmenbezogene Überwachung von Erkrankungen (Surveillance) ist die Unterscheidung von Spezies nötig. Hierfür eignen sich die AMOS-PCR und die *Brucella*-Multiplex-PCR. Bei der AMOS-PCR wird ein Primermix verwendet, der jeweils ein

Oligonukleotid für *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* und *B. suis* enthält sowie einen *antisense*-Primer, der in der Insertionssequenz IS711 *upstream* bindet. Durch unterschiedlich große Amplifikate können die vier Spezies unterschieden werden. Erkannt werden hierbei *B. abortus* Biovar 1, 2 und 4, *B. melitensis* Biovar 1-3, *B. ovis* und *B. suis* Biovar 1 (Bricker und Halling, 1994).

Bei der sogenannten Bruce-Ladder (Lopez-Goni et al., 2008) handelt es sich um eine Multiplex-PCR, bei der durch Verwendung von neun Primer-Paaren alle zehn bislang bekannten *Brucella*-Spezies unterscheidbar sind (siehe Abbildung 1-5). Zusätzlich können auch die Impfstämme *B. melitensis* Rev1 sowie *B. abortus* RB51 und S19 unterschieden werden (Garcia-Yoldi et al., 2006; Mayer-Scholl et al., 2010). Dies ist in der Veterinärdiagnostik von Vorteil, da somit zwischen geimpften und natürlich infizierten Tieren differenziert werden kann.

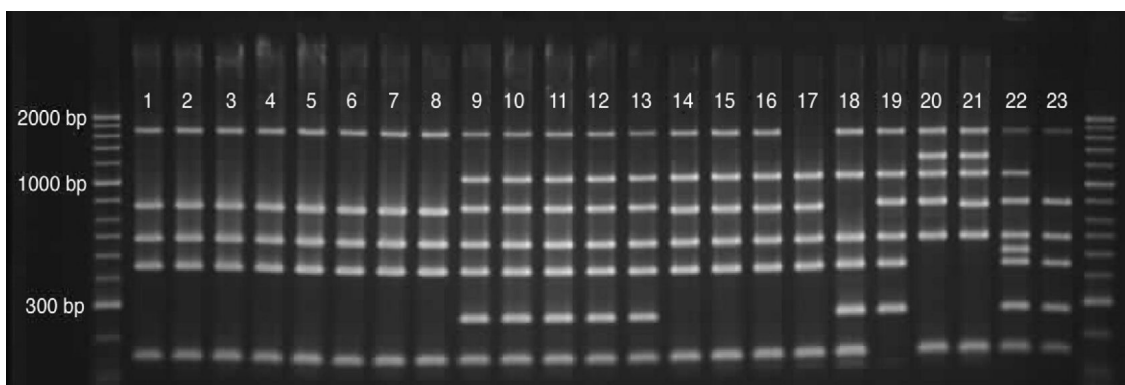


Abbildung 1-5: Identifikation und Differenzierung aller bekannten *Brucella*-Spezies und -Biovare mittels Multiplex-PCR; Spuren 1-8: *B. abortus*-Biovare 1-7 und 9; Spuren 9-13: *B. suis*-Biovare 1-5; Spuren 14-16: *B. melitensis*-Biovare 1-3; Spur 17: *B. ovis*; Spur 18: *B. canis*; Spur 19: *B. neotomae*; Spur 20: *B. pinnipedialis*; Spur 21: *B. ceti*; Spur 22: *B. microti*; Spur 23: *B. inopinata* (Mayer-Scholl et al., 2010).

Für epidemiologische Studien, bei denen eine Infektion auf ihren Ursprung und ihre Ausbreitung hin untersucht werden soll, ist nicht nur die *Brucella*-Spezies interessant, sondern auch welcher Stamm zur Infektion geführt hat. Auch hierfür sind eine Reihe unterschiedlicher PCR-Ansätze entwickelt worden, wie z. B. *amplified fragment length polymorphism* (AFLP) (Whatmore et al., 2005), *single nucleotide polymorphism* (SNP) (Scott et al., 2007) und *multi locus sequence typing* (MLST) (Whatmore et al., 2007). Durch niedrige Reproduzierbarkeitsraten, eine begrenzte Fähigkeit, *Brucella*-Stämme zu differenzieren, und/oder eine schlechte Eignung für die Routine-Diagnostik konnten sich diese Methoden jedoch nicht durchsetzen (Al Dahouk et al., 2010a).

Die genannten Kriterien kann allerdings die *multiple locus variable number of tandem repeats analysis* (MLVA) erfüllen. Hierbei wird an verschiedenen Loci im Genom die Zahl von hintereinander liegenden, sich je nach *Brucella*-Stamm unterschiedlich oft wiederholenden konservierten Genfragmenten bestimmt (*variable number of tandem repeats*, VNTRs). Die Auswahl mehrerer Loci ermöglicht die Erstellung eines genetischen Fingerabdrucks und somit die Unterscheidung von Spezies und Stämmen der Gattung *Brucella* (Le Fleche et al., 2006). Bewährt hat sich die Auswahl von 16 Loci, die in *panels* eingeteilt werden: *Panel 1* mit acht Mini-Satelliten-Markern sowie *panel 2a* mit drei und *panel 2b* mit fünf Mikro-Satelliten-Markern (MLVA-16). Während die Mini-Satelliten-Marker aus hunderten von Basenpaaren bestehen, in denen die identischen Genfragmente mindestens 9 bp lang sind, ist die Länge der Mikro-Satelliten-Marker im zweistelligen Nukleotidbereich, wobei hier die Genfragmente nur maximal 8 bp lang sind (Al Dahouk et al., 2007). Trotz einer hohen DNA-Homologie von über 90 % (Verger et al., 1985), identischer 16S rRNA (Gee et al., 2004) und der Tatsache, dass über 90 % aller Gene zu mehr als 98 % identisch sind (Halling et al., 2005), kann mittels MLVA zwischen einzelnen Stämmen unterschieden werden, weil hier der Fokus auf den variablen Sequenzen im Genom liegt.

1.3.1.3 Immunomagnetische Separation

Die immunomagnetische Separation (IMS) wurde Anfang der 1980er Jahre von Mattingly für die Isolation von *Salmonella* aus Lebensmitteln und Fäzes eingesetzt (Mattingly, 1984). Seitdem sind eine Reihe von Anwendungen entwickelt worden, zu denen die Aufkonzentrierung von Zellen des Immunsystems, von Bakterien und Viren sowie die Isolation von Proteinen und DNA gehören (Olsvik et al., 1994; Ugelstad et al., 1993).

Bei einigen Lebensmitteln kann der Nachweis von Bakterien durch DNA-Extraktion und anschließender PCR problematisch sein, da z. B. eine hohe Viskosität, ein hoher Fett- und Proteingehalt sowie Kalzium und andere PCR-Inhibitoren hohe Anforderungen an die Methoden zur Gewinnung von reiner DNA stellen (Wilson, 1997). Als Vorstufe zur DNA-Extraktion kann hier die IMS dienen, bei der mittels spezifischer Antikörper auf magnetischen Partikeln die Bakterien immobilisiert werden. Durch Waschschrte kann dann ein Großteil der Flüssigkeit (z. B. Kulturmedien oder Lebensmittel wie Milch) inklusive Inhibitoren bzw. Begleitflora ausgewaschen werden, wodurch die Anforderungen an die DNA-Extraktionsmethode sinken. Zudem können die Partikel in einem kleineren Volumen Extraktionspuffer aufgenommen werden, wodurch eine Aufkonzentrierung des Ziel-Bakteriums erfolgt.

1.3.1.3.1 Herstellung, Eigenschaften und Verwendung magnetischer Partikel

Die verwendeten Partikel sollten super-paramagnetisch sein. Diese werden durch ein magnetisches Feld angezogen. Während Partikel aus winzigen Dauermagneten nach dem Entfernen des magnetischen Feldes weiterhin zusammenhalten, verteilen sich super-paramagnetische Partikel durch einfaches Schütteln nun wieder homogen in der Lösung (Safarik et al., 1995). Durch die größere Oberfläche und die homogene Verteilung werden die Partikel bei der Bindung von Zellen effizienter genutzt bzw. im Waschschrift gründlicher gewaschen.

Magnetische Partikel werden von mehreren Herstellern (z. B. Invitrogen, Metachem Diagnostics Ltd., Miltenyi Biotec, R&D Systems) in Größen von 50 nm bis 5 μm Durchmesser angeboten und haben eine Oberfläche von 3-100 m^2/g . Für Bakterien empfiehlt sich ein Durchmesser von 2-5 μm (Kretzer et al., 2007; Öngör et al., 2006; Skjerve et al., 1990; Skjerve und Olsvik, 1991; Uyttendaele et al., 2000).

Bei der Herstellung der Partikel werden magnetische Oxide, insbesondere Eisenoxid, mit porösen Polymer-Partikeln vermischt und anschließend mit einer äußeren Polymerschicht versiegelt (Olsvik et al., 1994; Ugelstad et al., 1993). Die äußere Schicht ist für die Bindung von Antikörpern entscheidend. Epoxy-Gruppen können Proteine beispielsweise direkt binden. Eine Beschichtung mit funktionellen Gruppen (z. B. Carboxyl-, Hydroxyl-, oder Tosyl- bzw. Pentafluorbenzol-sulfonyl-Gruppen) dient der Aktivierung von magnetischen Partikeln (Olsvik et al., 1994).

Die Tosylgruppe ist zum Beispiel eine gute Abgangsgruppe, da die negative Ladung durch den mesomeren Effekt stabilisiert wird. Am elektrophilen Zentrum kann eine Aminogruppe, z. B. die eines Antikörpers, einen nukleophilen Angriff ansetzen (siehe Abbildung 1-6), wonach eine Aminogruppe des Antikörpers die Tosylgruppe substituiert. Auf diese Weise wird der entsprechende Antikörper direkt an das magnetische Partikel gebunden (siehe Abbildung 1-7 A).

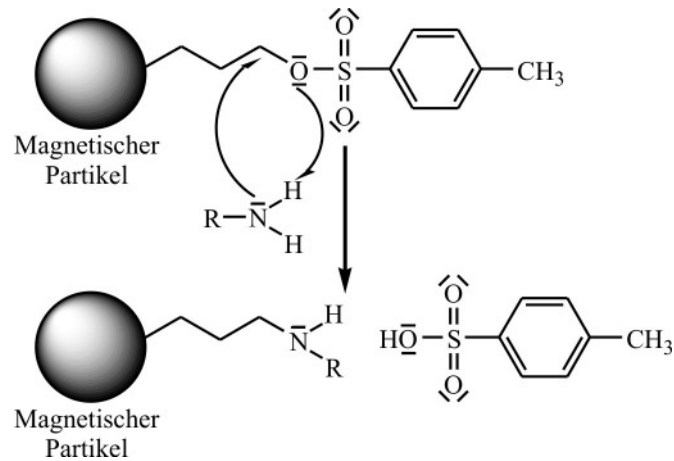


Abbildung 1-6: Nukleophiler Angriff der Aminogruppe auf den Tosyl-Rest am magnetischen Partikel.

Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von magnetischen Partikeln, die bereits vom Hersteller mit einem Sekundärantikörper beschichtet wurden (z. B. mit anti-Maus-Antikörpern vom Schaf). Dabei können einerseits die mit dem Sekundärantikörper beschichteten Partikel mit dem Primärantikörper inkubiert werden. Nach dessen Bindung erfolgt dann die IMS mit dem zu isolierenden Bakterium (siehe Abbildung 1-7 B). Andererseits besteht auch die Möglichkeit, Bakterien mit dem Primärantikörper zu beschichten und diesen Komplex dann mit magnetischen Partikeln und Sekundärantikörper aufzureinigen (siehe Abbildung 1-7 C). Es können sowohl polyklonale als auch monoklonale Antikörper verwendet werden (Olsvik et al., 1994). Die Bakterien binden an die Antikörper durch reversible, nicht kovalente Interaktionen. Hierzu gehören elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen und van der Waals-Kräfte (Benoit und Donahue, 2003).

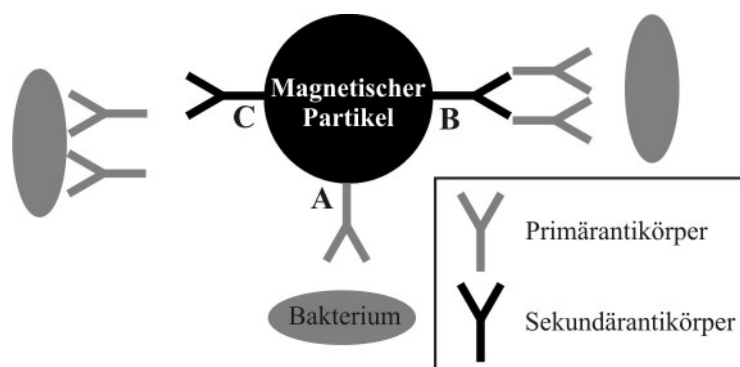


Abbildung 1-7: IMS von Mikroorganismen. Bindung der Antikörper direkt an magnetische Partikel (A) bzw. an Spezies-spezifische Sekundärantikörper (B); Bindung spezifischer Antikörper an Bakterien mit anschließender Bindung an die mit Sekundärantikörpern beschichteten magnetischen Partikel (C) (nach Olsvik et al., 1994).

1.3.1.3.2 Nachweis von immobilisierten Mikroorganismen

Im Anschluss an die Immobilisierung der Mikroorganismen erfolgt deren Nachweis, zum Beispiel durch die Färbung der Bakterien mit anschließender visueller Kontrolle im Fluoreszenzmikroskop (Lund et al., 1988). Des Weiteren können die magnetischen Partikel mit den daran gebundenen Bakterien direkt auf Nähragar zur Bestimmung der Zellzahl ausplattiert (Uyttendaele et al., 2000) oder zuvor zur Anreicherung in flüssigem Kulturmedium inkubiert werden (Olsvik et al., 1994). Außerdem kann IMS in Kombination mit ELISA, PCR bzw. Real-Time PCR und weiteren Methoden angewandt werden. Die IMS wird bereits für viele Pathogene in unterschiedlichen Lebensmitteln eingesetzt (Safarik et al., 1995), und im Folgenden werden einige Anwendungsbeispiele genannt:

Yazdankhah et al. (1998) konzentrierten *Staphylococcus aureus* aus Milch mittels magnetischer Partikel und monoklonalem, in Mäusen hergestelltem Antikörper auf. Im Anschluss daran wurden die immobilisierten Bakterien in einer Mikrotiterplatte zusammen mit einem Konjugat aus *horseradish peroxidase* und einem anti-Maus-Antikörper vom Schaf inkubiert. Nach dem Waschen und einer Zugabe von Nitrophenylphosphat-Diethanolamin zeigte ein Farbumschlag die Anwesenheit von Staphylokokken an. Der gesamte Nachweis dauerte drei Stunden und hatte ein Detektionslimit von 10^4 bis 10^5 KbE/ml.

Eine weitere schnelle Nachweismethode ist die Kombination aus IMS und PCR bzw. Real-Time PCR. Hierzu wird zunächst die DNA extrahiert. Durch die Möglichkeit, immobilisierte Mikroorganismen ohne nennenswerten Verlust waschen zu können, werden diese von Nährbouillon oder Lebensmittelbestandteilen befreit. Damit ist eine einfachere und schnellere DNA-Extraktion als bei der direkten Extraktion bakterieller DNA aus diesen Matrices möglich. Besonders durch die Verwendung der Real-Time PCR kann die Zeit für den Nachweis im Vergleich zur Anreicherungstechnik sehr verkürzt werden.

Aprodu et al. (2011) isolierten *Staphylococcus aureus* aus Milch mittels IMS, isolierten die DNA mittels NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel, Düren, D) und wiesen diese über eine Real-Time PCR nach. Dabei lag das Detektionslimit bei 10^4 KbE/ml. Khare et al. (2004) konnten noch 10 KbE *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in 2 ml Milch nachweisen. Hierzu wurde die Milch zentrifugiert, das Pellet in PBS resuspendiert und zusammen mit magnetischen Partikeln inkubiert. Anschließend wurden die Mykobakterien mittels *bead beating* lysiert und die DNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert. Der Nachweis erfolgte sowohl über eine klassische PCR und Agarosegelelektrophorese als auch über Real-Time PCR und lieferte identische Ergebnisse.

Den Nachweis von *Bacillus anthracis*-Sporen testeten Fisher et al. (2009) mit einer Kombination aus IMS und Immunochromatografie an Sporenkonzentrationen zwischen 10^5 und 10^7 Sporen pro ml Trinkwasser bzw. Milch. Hierbei konnten mittels IMS 85-93 % bzw. 90-95 % der Sporen nach einer Test-Dauer von nur 30 Minuten immobilisiert werden. Nach der Trennung von Sporen und magnetischen Partikeln wurden innerhalb von weiteren 10 min die Sporen mittels *lateral flow assay* nachgewiesen. Die Autoren hatten als Schwerpunkt einen möglichst raschen Nachweis und weniger eine hohe analytische Sensitivität.

Bei dem Versuch, *Listeria monocytogenes* in verschiedenen Käsesorten (z. B. Camembert und Ziegenkäse) nachzuweisen, konnten Uyttendaele et al. (2000) 40-50 KBE pro Gramm mittels IMS isolieren. Der Nachweis erfolgte durch das Ausplattieren auf Nährmedien und war daher erst nach zwei Tagen ablesbar. Öngör et al. (2006) untersuchten die Isolation von *B. abortus* S99 und *B. melitensis* 16M in Weichkäsen aus Kuh- und Schafsmilch. Die Käse wurden hierzu 1:10 mit Natriumcitratpuffer verdünnt, homogenisiert und mit Ether, Ethanol sowie Ammoniumhydroxid behandelt. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in PBS resuspendiert und mit anti-*Brucella*-Antiserum aus Kaninchen inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit magnetischen Partikeln, die mit anti-Kaninchen-IgG vom Schaf beschichtet waren. Im Gegensatz zu allen bisher genannten Anwendungen der IMS wurde hier also nicht die direkte IMS angewandt sondern die indirekte IMS (siehe Abbildung 1-7). Die Nachweismethode bestand aus einer DNA-Extraktion mit Phenol und Natriumacetat und anschließender PCR und zeigte eine Sensitivität des gesamten Protokolls von 3×10^3 KBE/g Käse. Die Publikation von Öngör et al. ist bisher die einzige, bei der die Verwendung der IMS zur Aufkonzentrierung von Brucellen untersucht wurde.

1.3.2 Indirekter Nachweis

Der Nachweis von Immunglobulinen ist im Gegensatz zur bakteriologischen Diagnostik sensitiver. Auf das S-LPS der Brucellen bildet der Körper bei einer akuten Brucellose zunächst IgM-Antikörper. Nach der zweiten Woche werden außerdem IgG und IgA gebildet. Innerhalb der ersten sechs Monate liegt der IgM-Titer in der Regel über dem IgG-Titer. Anschließend fällt der IgM-Titer unter den IgG- und IgA-Titer. Bei einem chronischen Verlauf sind IgG und IgA nachweisbar, wobei die Titer nicht so hoch wie bei der akuten Brucellose ausfallen.

Durch Bestimmung der IgG- und IgM-Titer kann somit eine akute Brucellose von der chronischen unterschieden werden. Wird die Brucellose unzureichend behandelt, können Rezidive auftreten, was sich an einem erneut ansteigendem IgG- und IgA-Titer zeigt.

Dadurch, dass akute und chronische Brucellose fließend ineinander übergehen, ist für die Stadienbeurteilung die Bestimmung sowohl von IgG als auch von IgM zweckmäßig (Al Dahouk et al., 2003).

Tabelle 1-3: Anstieg der *Brucella*-spezifischen Immunglobuline in verschiedenen Brucellose-Stadien (Al Dahouk et al., 2003).

Brucellose-Stadium	IgM	IgG	IgA
Akut	↑↑↑↑	↑↑↑ (IgG1 und IgG3)	↑
Chronisch	-	↑↑ (IgG1 und IgG4)	↑↑
Rezidiv	-	↑↑	↑

Für die Diagnostik der Brucellose wurde eine Vielzahl serologischer Tests entwickelt: Zu den gängigen Methoden gehören die Serum-Langsamagglutination (SLA), der Rose Bengal-Test (RBT), der Coombs-Test (CT), die Komplementbindungsreaktion (KBR) und der ELISA. Allen gemein ist, dass sie überwiegend anti-*Brucella*-LPS-Antikörper detektieren.

Die Lipopolysaccharid-Schicht des Bakteriums besteht aus Lipid A, dem Core-Polysaccharid und dem O-Polysaccharid. Dabei ist das Lipid A in der bakteriellen Membran verankert und über 2-Keto-3-deoxyoctulosonsäure (KDO) an das Core-Polysaccharid gebunden, das aus D-Glucose, D-Mannose und 6-Amino-6-deoxyglucose (Quinovosamin) besteht (Corbel und Banai, 2005). Raue *Brucella*-Stämme haben entweder kein oder ein stark verkürztes O-Polysaccharid (Schurig et al., 2002), weshalb deren Epitop aus den zuletzt genannten Sacchariden besteht. Dagegen ist das Epitop der glatten (*smooth*) Stämme von dem O-Polysaccharid geprägt, das an das Core-Polysaccharid gebunden ist und aus N-formyl-D-perosamin besteht. Dabei kann es entweder aus alpha-1,2-glykosidisch verknüpften Glucoseeinheiten mit wenigen alpha-1,3-glykosidischen Bindungen (A-Typ) oder aus ausschließlich alpha-1,3-glykosidisch verknüpften Glucosemolekülen bestehen (M-Typ) (Corbel und Banai, 2005). In Abhängigkeit der Zusammensetzung der charakteristischen Moleküle werden A-, M- und AM-dominante Epitope unterschieden. Das alpha-1,2-verknüpfte N-formyl-D-perosamin kommt ebenfalls bei *Escherichia coli* O157, *Escherichia hermannii*, *Salmonella* der Serogruppe O:30, *Stenotrophomonas maltophilia* 555, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* O:9 und *Francisella tularensis* vor (Al Dahouk et al., 2006; Corbel, 1975; Corbel und Thomas, 1985), was zu Kreuzreaktionen in den serologischen Methoden führt (Corbel und Banai, 2005).

Für die Surveillance ist der ELISA die am besten geeignete Methode und für die Stadienbeurteilung, insbesondere für den Nachweis einer chronischen Brucellose mit Organmanifestationen, sehr gut geeignet, da sowohl die Gesamtheit der Immunglobuline ermittelt werden kann als auch die Mengen an IgG, IgM und IgA. Dabei ist der indirekte ELISA (iELISA) hochsensitiv, spezifisch und mit vier bis sechs Stunden relativ schnell. In 96well-Mikrotiterplatten mit vorgelegtem *Brucella*-Antigen (meist von *B. abortus* 1119-3) wird Serum pipettiert, inkubiert und gewaschen, wonach das Enzym-Vollzellantigen-Konjugat zum Nachweis von spezifischem IgG, IgM oder IgA hinzugegeben wird. Nach Zugabe des Substrates kann der Farbumschlag automatisiert erfasst werden und erlaubt im Abgleich mit Positiv- und Negativkontrollen die Einordnung in seropositive und -negative Reaktionen.

Der kompetitive ELISA (cELISA) basiert auf monoklonalen Antikörpern gegen das O-Polysaccharid, die mit unspezifischen Antikörpern um das Antigen konkurrieren. Hierdurch wird die Spezifität gegenüber dem iELISA erhöht. Außerdem können Antikörper nach einer *Brucella*-Impfung (bei Säugetieren) von denen nach einer natürlichen Infektion unterschieden werden (Lucero et al., 1999; Nielsen et al., 1995; Nielsen et al., 1996).

Die Serum-Langsamagglutination (SLA) zeigt die Gesamtheit der Antikörper gegen *Brucella* an (vornehmlich IgM, zu geringerem Anteil auch IgG und IgA). Dazu wird zu einer Phenol-inaktivierten Zellsuspension von *Brucella abortus* 1119-3 (USDA) Serum in einer Verdünnungsreihe 1:20 bis 1:1.280 hinzugegeben. Anschließend wird im Wasserbad für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Von den agglutinierten Proben entspricht die höchste Serum-Verdünnungsstufe mit über 50 %iger Agglutination dem Antikörpertiter (Araj, 2010).

Antikörpertiter von über 1:160 gelten in Nicht-Endemiegebieten als Zeichen für eine Brucellose, und bei einem Titer von 1:80 besteht wegen hinreichenden Verdachts Anlass zu weiterer Beobachtung. In Endemiegebieten müssen höhere diagnostische Titer angenommen werden ($\geq 1:320$). Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass infizierte Patienten serologisch negativ sind. Nicht agglutinierende Antikörper können hier die Ursache sein. Auch bei hohen Antikörper-Titern kann durch einen Überschuss von Antikörpern auf den Bakterien oder durch Serumfaktoren eine Agglutination verhindert werden, die bei stärkerer Verdünnung dann doch zu erkennen ist (Prozoneneffekt). Ebenfalls negativ kann der Befund sein, wenn die Blutprobe des Patienten im frühen Stadium der Infektion vor dem Eintritt der Serokonversion entnommen wurde, weshalb bei hinreichendem Verdacht eine Kontrolle nach 14-21 Tagen empfohlen wird (Al Dahouk et al., 2003).

Der Coombs Test (CT) eignet sich besonders für den Nachweis chronischer Brucellosefälle in Ergänzung zu SLA und KBR. Mit dem CT werden nicht agglutinierende IgGs erkannt. In der SLA identifizierte negative Proben, die Zell-Antigen enthalten, werden hierzu mit PBS gewaschen, mit anti-human Gammaglobulin versetzt und weitere 24 h inkubiert. Anschließend wird die Agglutination bewertet (Araj, 2010).

Die Komplementbindungsreaktion (KBR) basiert auf der Aktivierung des Komplementsystems nach einer Antigen-Antikörperreaktion. Mit der KBR wird vornehmlich IgG nachgewiesen, weshalb dieser Test spezifischer als die SLA ist und daher in der Diagnostik als Bestätigungstest verwendet wird. Während zu Beginn der Inkubationszeit bei chronischer Brucellose oder nach einer Impfung die SLA keine sichere Aussage zulässt oder negativ ist, kann mittels KBR die Infektion meist doch nachgewiesen werden. Steigt der Titer in der KBR und sinkt er in der SLA, ist dies ein Zeichen für eine chronische Brucellose. Die Auswertung der KBR erfolgt nach dem jeweiligen Grad der Hämolysehemmung unter Berücksichtigung der Reaktivität eines positiven Standardserums (Al Dahouk et al., 2003).

Der Rose Bengal Test (RBT) wurde als Schnelltest für die serologische Untersuchung von Rindern auf *Brucella*-Antikörper entwickelt. Mit Rose Bengal Farbstoff eingefärbte Zellen von *B. abortus* werden in Suspension auf pH 3,65 gebracht und anschließend die Agglutination mit dem zu testenden Serum bewertet. Durch den niedrigen pH-Wert werden unspezifische Agglutinationen verhindert. Mit einer Testdauer von nur 5-10 min und einer einfachen Handhabung lässt sich die Methode sehr gut im klinischen Alltag bzw. im Feld verwenden. Allerdings ist der RBT ausschließlich für die akute Brucellose zu empfehlen, da er bei chronischem Verlauf falsch positive Ergebnisse erzeugt.

1.4 Tenazität von *Brucella* in Lebensmitteln

Für Brucellen lassen sich einige allgemeingültige Bedingungen festhalten, die sie zum Überleben benötigen: Sie wachsen bei 20-40 °C, wobei die optimale Wachstumstemperatur bei 37 °C liegt (Burrows und Freeman, 1985). Brucellen sind nicht sehr hitzebeständig und können durch Pasteurisation bei 72 °C für 15 s inaktiviert werden (Davies und Casey, 1973). Der optimale pH-Wert liegt bei 6,6-7,4 mit einem Minimum von pH 5,8 und einem Maximum von pH 8,4 (Zobell und Meyer, 1932). Lerche und Entel (1959) haben dagegen ein Minimum

von pH 4,1-4,5 gemessen. Es hängt jedoch stark von der verwendeten Säure sowie von dem Medium ab, bei welchem pH-Wert Brucellen noch überleben. Zum Beispiel überlebte *B. abortus* bei pH 4,65 in Milchsäure vier Stunden und in Salzsäure 2 Tage (Kästli und Binz, 1948). In einem Fall überlebte *B. abortus* in Joghurt mit einem pH-Wert von 3,6 einen Tag lang (Kästli und Binz, 1948) und in Citrat-/Phosphat-Puffer 54 Stunden bei 5 °C und pH 3,0 (Davies und Casey, 1973). Besonders lang kann die neue Spezies *Brucella microti* bei saurem pH-Wert überleben: Bei pH 4,5 lebten nach siebenstündiger Inkubation noch ein Viertel der eingesetzten Zellen, wohingegen nur 0,9 % von *B. suis* 1330 überlebten (Jimenez de Bagües et al., 2010). Je niedriger die Temperatur des Mediums ist, umso eher tolerieren Brucellen niedrige pH-Werte (ICMSF, 1996; Kästli und Binz, 1948).

Aus Untersuchungen der Tenazität von *Brucella* in Käsen verschiedener Fettstufen lässt sich ableiten, dass Brucellen möglicherweise umso länger überleben, je höher der Fettgehalt ist (Salem et al., 1977). Diese Hypothese unterstützen Untersuchungen, bei denen Brucellen 13 Monate lang in Butter (Fulton, 1941) bzw. 94-102 Tage in Sahne kulturell nachweisbar waren (Nour, 1982).

Hohe Salzgehalte reduzieren im Allgemeinen die Überlebenszeit von Brucellen, führen aber nicht zwingend zum Absterben der Zellen: In Schafskäse mit 27 % Salzgehalt überlebte *B. melitensis* 45 Tage lang (ICMSF, 1996).

Der Vergleich von Tenazitätsdaten ist nicht immer einfach, weil die unterschiedlichen Versuchsbedingungen zu stark abweichenden Ergebnissen führen können. Zum Beispiel hat die Wahl des *Brucella*-Stammes einen entscheidenden Einfluss auf die beobachtete Tenazität. Hinzu kommen unterschiedliche Inokulationsdosen, Temperaturen und pH-Werte. In Publikationen aus der ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts wurde häufig statt definierter Koloniezahlen die Inokulationsdosis als Kultur-Aliquot mit bestimmter Inkubationsdauer angegeben, was nur ungefähr auf die sich in der Matrix befindende Zellzahl hinweist. Im Folgenden werden bisher bekannte Überlebensraten von Brucellen in Wasser, Milch, Joghurt und Käse zusammengefasst.

1.4.1 Wasser

In Wasser überleben Brucellen trotz Nährstoffmangel recht lange, wobei diese Zeit mit der Höhe der Umgebungstemperatur abnimmt. Während $8,8 \times 10^9$ KbE von *B. abortus* 2308 bei pH 6,5-7,6 und 37 °C 10-16 Tage überlebten, verlängerte sich die Tenazität bei 25 °C auf 23-42 Tage. Bei 8 °C liegt die Überlebenszeit bereits bei 57 Tagen und bei -40 °C konnte *Brucella* noch nach über 800 Tagen kultiviert werden (Kuzdas und Morse, 1954). In

Leitungswasser überlebten Brucellen bei 20 °C zweieinhalb Monate (Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, 2001).

1.4.2 Milch

Die Tenazitäts-Untersuchungen lassen sich in Untersuchungen mit Rohmilch und mit sterilisierter Milch unterteilen. Rohmilch enthält im Unterschied zu pasteurisierter Milch native Proteine und eine Bakterienflora, die unter Umständen Einfluss auf das Wachstum von Brucellen haben könnte.

Kuzdas und Morse (1954) ermittelten bei einer Anfangskonzentration von 8×10^9 KbE/ml von *B. abortus* 2308 in Rohmilch bei 8 °C bzw. bei 25 °C eine Tenazität von 2-4 bzw. von 1-2 Tagen. In einer anderen Studie wurden 2 ml einer 48 h-Kultur von *B. abortus* in 250 ml Rohmilch gegeben und bei 8-10 °C inkubiert. Die Tenazität lag hier bei 21-28 Tagen (Drescher und Hopfengärtner, 1930).

In sterilisierter Milch überlebte *B. abortus* bei Raumtemperatur 4-5 Tage (Lerche, 1931). Bei 8 °C und einem pH-Wert von 5,0-5,8 waren nach 34 Tagen noch lebende Zellen nachweisbar (Lerche, 1931). Wurde dagegen bei 38 °C und einem pH-Wert von <5 inkubiert, überlebten Brucellen weniger als 24 Stunden (Kästli und Binz, 1948).

1.4.3 Joghurt

Über die Tenazität von Brucellen in Joghurt sind sehr unterschiedliche Daten veröffentlicht worden: Nour et al. (1975) untersuchten Stämme von *B. abortus*, *B. melitensis* und *B. suis*, die in Büffelmilch-Joghurt bei einer Anfangskonzentration von 2×10^3 KbE/ml und 7-10 °C über 100 Tage überlebten. Ghoniem (1972) inokulierte ebenfalls diese drei *Brucella*-Spezies in Büffelmilch-Joghurt bei pH 4,5-6 und 4 °C. Dabei überlebte *B. abortus* 30 Tage, *B. melitensis* 20 Tage und *B. suis* 26 Tage. Die Tenazität war also deutlich geringer, und es traten Spezies-spezifische Unterschiede auf.

In Joghurt aus Kuhmilch konnten bei 4-5 °C nach acht Tagen noch lebende Zellen von *B. abortus* nachgewiesen werden, nicht jedoch nach 11 Tagen (Drescher und Hopfengärtner, 1930). Eine Abhängigkeit der Tenazität von der Inokulationsdosis wurde von Zuniga gezeigt, bei dem bei 4 °C und einem pH-Wert von 3,8-4,0 1×10^5 KbE *B. abortus* 544 pro Milliliter neun Tage und 1×10^8 KbE/ml 22 Tage überlebten (Zuniga et al., 2005). Die geringste Tenazität von *B. abortus* in Joghurt aus Kuhmilch lag temperaturunabhängig bei unter einem Tag jeweils bei 3 °C und pH 3,95, bei 20 °C und pH 3,6 und bei 38 °C und pH 3,43 (Kästli und Binz, 1948).

Die aufgetretenen Unterschiede könnten verschiedene Ursachen haben, wie Inokulations-Zeitpunkt (Kontamination der Milch mit anschließender Fermentation oder Kontamination des fertigen Joghurts), Art der Starter-Kulturen oder auch Wahl des *Brucella*-Stammes.

1.4.4 Käse

Mit Blick auf den Verbraucherschutz ist bei Käse der Zeitraum bis zur Vermarktung ein wichtiges Kriterium bei der Beurteilung der Gefährdung des Konsumenten durch eine Kontamination mit Brucellen. Natürlich sollten Milchprodukte generell frei von Brucellen sein. Für den Fall, dass das Produkt kontaminiert ist, besteht jedoch die Möglichkeit, dass dessen Verzehr dennoch keine Gefahr für den Verbraucher darstellt, wenn die Reifezeit länger ist als die Tenazität von *Brucella* sp. in diesem Käse. Emmentaler hat z. B. eine Reifezeit von mindestens drei Monaten (Käseverordnung, 2010), wobei *B. abortus* nur acht Tage darin lebensfähig ist (Kästli und Hausch, 1957). Im Gegensatz dazu überlebt *B. abortus* in Cheddar sechs Monate lang, was deutlich länger als die Reifezeit des Käses (ca. 2-3 Monate) ist.

Die meisten Erkrankungen beim Menschen gehen jedoch auf die selbst hergestellten Frisch- und Weichkäse zurück (Castell et al., 2009). In Domiati, einem ägyptischen Weichkäse, (11 % NaCl) können 3×10^6 KbE *B. abortus* bei 2-4 °C 24 Tage und bei 18-22 °C 12 Tage überleben, in Tallaga (ägyptischer Weichkäse mit 6 % NaCl) bei 2-4 °C sogar 32 Tage (Salem et al., 1977). In Ziegenkäse lag die Tenazität von Brucellen sogar bei 40-100 Tagen (Stiles, 1945).

1.4.5 Andere Lebensmittel

Die Tenazität lag bei *B. abortus* in Fleisch bei 3-5 °C bei 15 Tagen (Krüger, 1932) und in Wurst bei 175 Tagen (Pagnini, 1962). In Bier überlebte *B. abortus* drei Tage lang (Serpa Santos et al., 1939) und in Butter bei 4-5 °C 35 Tage (Drescher und Hopfengärtner, 1930). Auch Eiscreme wurde untersucht: Die aus natürlich kontaminierter Milch hergestellte Süßspeise wurde bei -1 °C gelagert und zeigte nach über 11 Tagen noch lebensfähige Brucellen (Thompson, 1933).

2 Zielsetzung

Alle bisherigen Szenarien zur Beurteilung der bioterroristischen Relevanz von Brucellen haben die Übertragung des Erregers durch die Luft im Fokus (Davis, 2004; Kaufmann et al., 1980; Neubauer, 2010). Es muss jedoch auch mit der Kontamination von Lebensmitteln gerechnet werden. Bei einem absichtlichen Eintrag von Brucellen in die Lebensmittelkette kann ein erheblicher ökonomischer Schaden verursacht werden. Derartige bioterroristische Handlungen hätten dabei in solchen Gebieten die höchste Wirkung, wo der Erreger nicht endemisch ist, wie zum Beispiel in westlichen Industrienationen.

Für einen solchen Fall werden Daten über die Tenazität von Brucellen in verschiedenen Lebensmitteln benötigt, um eine Risikobewertung vornehmen und Maßnahmen zur Erhaltung oder Wiederherstellung der Lebensmittelsicherheit ergreifen zu können. Des Weiteren ist ein zuverlässiger und schneller Nachweis nötig, um den Verbraucher vor der schwerwiegenden Infektion schützen zu können. Aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Matrices mit Inhibitoren (z. B. Proteine, Proteasen, Nukleasen, Kalzium) bedarf es einer sorgfältigen Evaluation der bisher bekannten Extraktions- und Nachweismethoden in Lebensmitteln.

Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb zunächst die Tenazität von Brucellen in relevanten Lebensmitteln zu untersuchen. Diese sollten kommerziell erhältlich sein und nach der Kontamination mit Brucellen unter den herkömmlichen Lagerbedingungen aufbewahrt werden. Aufgrund dieser Tenazitätsuntersuchungen sollte das Gefährdungspotenzial von Brucellen in verschiedenen Lebensmitteln unter dem Blickwinkel denkbarer bioterroristischer Handlungen beurteilt werden.

Im Falle eines Eintrags von Brucellen in die Lebensmittelkette ist die schnellstmögliche Identifizierung des vermeintlichen Erregers nötig, um geeignete Maßnahmen treffen zu können. Aus diesem Grund wurde nach einer Methode zum schnellen Nachweis von Brucellen in Lebensmitteln gesucht. Gängige kulturelle Nachweismethoden dauern mehrere Tage und serologische Methoden lassen sich auf Lebensmittel nicht anwenden. Daher sollten für relevante Lebensmittel geeignete Aufbereitungsmethoden geprüft und Protokolle auf Basis molekularbiologischer Untersuchungen entwickelt werden, durch die ein Ergebnis innerhalb weniger Stunden vorliegen kann.

Eine Möglichkeit, die Wiederfindungsrate von Erregern in Lebensmitteln zu erhöhen, ist die immunomagnetische Separation, durch welche die Mikroorganismen vom Medium bzw. Lebensmittel getrennt und somit inhibitorische Effekte auf DNA-Extraktion und PCR minimiert werden können. Für mehrere Bakterien wie zum Beispiel *E. coli* und Listerien gibt es bereits kommerziell erhältliche Lösungen. Mit der vorgelegten Arbeit sollte ein Beitrag zur

Etablierung eines Systems für die immunologische Separation von Brucellen geleistet und die Ergebnisse mit denen anderer Systeme zur Extraktion von Brucellen-DNA aus Lebensmitteln verglichen werden.

3 Material

3.1 Chemikalien und Puffer

Chemikalien	Firma
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt, D
<i>Brucella</i> -Agar	Merck KGaA, Darmstadt, D
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethanol absolut	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA)	Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Polyadenylsäure-Kalium-Salz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Rinderserumalbumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck KGaA, Darmstadt, D
UltraPure Agarose	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Wasser für die Molekularbiologie	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

Agarosegel-Ladepuffer

Ficoll-400-Lösung (15 %), sterilfiltriert

Bromphenolblau-Lösung (5 %)

Beide Lösungen im Verhältnis 40:1 mischen

NET-Puffer, Lysepuffer (pH 7,6)

NaCl 50 mM

EDTA 125 mM

Tris-HCl 50 mM

Puffer A, Natriumphosphatpuffer (pH 7,4)

Natriumdihydrogenphosphat 19 mM

Dinatriumhydrogenphosphat 81 mM

Puffer B, Boratpuffer (pH 9,5)

Borsäure 100 mM

Puffer C, PBS/BSA/Natriumphosphatpuffer (pH 7,4)

NaCl	15 mM
BSA	0,1 %

In 10%igem Natriumphosphatpuffer (Puffer A) lösen

Puffer D, Tris/BSA (pH 8,5)

Tris	200 mM
BSA	0,1 %

Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) (pH 8,3)

Tris	90 mM
Borsäure	90 mM
EDTA	2,5 mM

3.2 Enzyme, Seren und Antikörper

Enzym	Firma
Proteinase K	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
RNase A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

Serum	Firma
Brucellose-Kontrollserum, Vollserum, positiv, vom Rind, SLA: 841 I.E./ml, KBR: 250 sens. E./ml	Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, D

Antikörper	Firma
Anti- <i>Brucella abortus</i> -Antikörper IgG1, monoklonal	Antibodies-online GmbH, Aachen, D

3.3 Primer, Sonden und Marker

Alle Primer und Sonden wurden bei der Firma Metabion (Metabion International AG, Martinsried, D) bestellt.

Name	Primer / Sonde	Amplifikat	Nachweis von
<u>Gattungsspezifische <i>Brucella</i>-PCR, Nachweis von <i>bcs</i>31</u>			
B4 (fw)	TGGCTCGGTTGCCAATATCAA	224 bp	<i>Brucella</i> spp.
B5 (rev)	CGCGCTTGCCTTTCAGGTCTG		
<u>Gattungsspezifische <i>Brucella</i>-Real-Time PCR, Nachweis von <i>bcs</i>31</u>			
<i>B. spp</i> fw	GCTCGGTTGCCAATATCAATGC	151 bp	<i>Brucella</i> spp.
<i>B. spp</i> rev	GGGTAAAGCGTCGCCAGAAG		
<i>B. spp</i> Taq	6FAM-AAATCTTCCACCTTGCC- CTTGCCATCA-BHQ1		
<u>Lambda-Real-Time PCR</u>			
Lambda-fw	ATGCCACGTAAGCGAAACA	278 bp	Lambda-DNA
Lambda-rev	GCATAAACGAAGCAGTCGAGT		
Lambda Taq	YY-ACCTTACCGAAATCGGTAC- GGATACCGC-BHQ1		

Marker	Firma
HyperLadder IV*	Bioline GmbH, Luckenwalde, D

*) Ein Bild zum Marker ist in Abschnitt 9.4 zu finden.

3.4 Bakterienstämme

Spezies	Biovar	Stamm	Stammsammlung/ Herkunft ^{a)}
<i>Brucella abortus</i>	1	1119-3	USDA
<i>Brucella melitensis</i>	1	16M	NCTC 10094
<i>Brucella suis</i>	1	1330	NCTC 10316
<i>Brucella neotomae</i>		5K33	NCTC 10084
<i>Brucella canis</i>		RM6/66	NCTC 10854
<i>Brucella microti</i>		CCM 4915T	CAPM 6436
<i>Brucella inopinata</i>		BO1	CAPM 6436
<i>Brucella pinnipedialis</i>		B2/94	NCTC 12890
<i>Brucella ceti</i>		B1/94	NCTC 12891
<i>Brucella ovis</i>		63/290	NCTC 10512
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9		383	NCTC 11174

^{a)} USDA – U.S. Department of Agriculture, USA; NCTC – National Collection of Type Cultures, GB; CAPM – Collection of Animal Pathogenic Microorganisms, CZ.

3.5 Nährmedien

***Brucella*-Bouillon (pH 7,0)**

28,0 g	<i>Brucella</i> Broth (Difco)
	<i>Brucella</i> Broth enthält:
10,0 g	Trypton
10,0 g	Peptamin
1,0 g	Dextrose
2,0 g	Hefeextrakt
5,0 g	Natriumchlorid
0,1 g	Natriumbisulfit
ad 1.000 ml	VE-Wasser
	autoklavieren

***Brucella*-Agar (pH 7,0)**

41,0 g	<i>Brucella</i> -Agar (Merck)
	<i>Brucella</i> -Agar enthält:
10,0 g	Pepton aus Fleisch
10,0 g	Pepton aus Casein
1,0 g	Dextrose
2,0 g	Hefeextrakt
5,0 g	Natriumchlorid
13,0 g	Agar
ad 1.000 ml	VE-Wasser
	autoklavieren

***Brucella*-Selektiv-Agar (pH 7,5)**

2 Fl.	<i>Brucella</i> -Selektiv-Supplement (Oxoid)
	2 Fläschchen enthalten:
5.000 I.E.	Polymyxin B
25.000 I.E.	Bacitracin
100 mg	Cycloheximid
5 mg	Nalidixinsäure
100.000 I.E.	Nystatin
20 mg	Vancomycin
10 ml	Methanol
10 ml	Aqua bidest.
	Steril lösen und 10 min bei 37 °C inkubieren
	Supplement mit <i>Brucella</i> -Agar (≤ 50 °C) vermischen

3.6 Verbrauchsmaterialien, Kits und Geräte

Material	Firma
5 Prime MasterMix	5 Prime GmbH, Hamburg, D
BagPage Stomacherbeutel	Interscience, Saint Nom la Bretèche, F
Biopur Combitips plus	Eppendorf AG, Hamburg, D
Chirurgische Einmalskalpelle	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Dynabeads M-280 Tosylactivated	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Lambda DNA	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
Reaktionsgefäße 1 ml und 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, D
Reaktionsgefäße 15 ml und 50 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Sterile Pipetten, 5 ml und 10 ml	Greiner Bio-One GmbH, Solingen, D
Taq PCR Master Mix	Qiagen GmbH, Hilden, D
TaqMan Universal PCR Master Mix No AmpErase UNG	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, D

Kit	Firma
InstaGene Matrix	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Invitek MSB Spin PCRapace	Invitek GmbH, Berlin, D
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
StarPrep One Kit	Biotecon Diagnostics GmbH, Potsdam, D
SureFood PREP Bacteria I	Congen Biotechnologie GmbH, Berlin, D
ZR Fecal DNA Kit	Zymo Research, Freiburg, D

Gerät	Firma
2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, D
7500 Real-Time PCR System	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, D
Accu-jet pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, D
Agarose-Gelelektrophorese-System Sub-Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
BagMixer 400, Modell VW	Interscience, Saint Nom la Bretèche, F
Brutschrank Heraeus B 5090 E	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
Brutschrank KB 400	Binder GmbH, Tuttlingen, D
Densimat	bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen, D
Digital pH-Meter 646	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, D
Eppendorf Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg, D
Gene Genius Bio Imaging System	Syngene Europe, Cambridge, UK
Koloniezählgerät	Gallenkamp
Magnetrührer RCT basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D
Magnetständer Dynal MPC-S	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Milko-Scan 133D	Foss Electric, DK
MS2 Minishaker	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D
Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Netzteil PowerPac Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
pH-Messkette SE 106	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, D
DNA-Workstation DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-M-AR	G. Kisker GbR, Steinfurt, D
Sterilbank: HERAsafe KSP 12	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg, D
Überkopf-Schüttler Reax 2	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D
Zentrifuge 5424	Eppendorf AG, Hamburg, D

3.7 Software

Software	Firma
7500 Software, Version 2.0.1 for 7500 and 7500 Fast Real-Time PCR Systems	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, D
Reference Manager Professional Network Edition, Version 12.0.1, 2009	Thomson Reuters, London, UK

4 Methoden

4.1 Mikrobiologische Methoden

4.1.1 Tenazität von Brucellen in Lebensmitteln

Die Tenazität der Brucellen wurde am Modell von *Brucella abortus* 1119-3, Biovar 1 (USDA) untersucht. Zusätzlich wurde in H-Milch auch *Brucella melitensis* 16M, Biovar 1 (ATCC 23456) eingesetzt, um die Ergebnisse für Brucellen in dieser Matrix besser verallgemeinern zu können. Alle Arbeiten an lebenden Bakterien wurden in einem Labor der Sicherheitsstufe 3 durchgeführt.

4.1.1.1 Untersuchte Lebensmittel

Die Tenazität von Brucellen wurde in H-Milch, Rohmilch, Vorzugsmilch, drei verschiedenen Joghurtsorten und stillem Mineralwasser untersucht. Fettgehalt und Haltbarkeitsdauer der Lebensmittel sind Tabelle 4-1 zu entnehmen.

Tabelle 4-1: Fettgehalt und Haltbarkeitsdauer der in den Tenazitätsversuchen untersuchten Lebensmittel.

Lebensmittel	Fettgehalt*	Haltbarkeitsdauer
H-Milch	3,5 %	3 Monate
Rohmilch	3,2 %	2 Tage
Vorzugsmilch	3,5 %	4 Tage
Joghurt 1	1,5 %	30 Tage
Joghurt 2	3,5 %	30 Tage
Joghurt 3	10,0 %	30 Tage
Stilles Mineralwasser	0,0 %	12 Monate

* Der Fettgehalt der Rohmilch wurde mittels MilkoScan 133D bestimmt. Alle übrigen Fettgehalte entsprechen den Herstellerangaben.

H-Milch wird Temperaturen von über 135 °C und hohem Druck ausgesetzt (Anon, 2004), weshalb das Produkt steril ist. Im Gegensatz hierzu werden Roh- und Vorzugsmilch nicht hitzebehandelt. Vorzugsmilch darf nur durch Betriebe mit besonderer Lizenz verkauft werden und muss im Gegensatz zur Rohmilch striktere Reinheitskriterien erfüllen (siehe Tabelle 4-2).

Tabelle 4-2: Unterschiede in den Qualitätsanforderungen von Roh- und Vorzugsmilch nach der Milchverordnung (Anon, 2004).

	Rohmilch	Vorzugsmilch
Gesamtkeimzahl bei 30 °C	≤ 100.000 KbE/ml	≤ 30.000 KbE/ml
Somatische Zellen	≤ 400.000 /ml	≤ 300.000 /ml
Salmonellen	0 KbE/25 ml	0 KbE/25 ml

Die verwendete Rohmilch stammt aus dem Versuchsgut des Bundesinstituts für Risikobewertung. Sie wurde auf Brucellen untersucht und war *Brucella*-negativ. Sie enthielt $3,4 \times 10^3$ Bakterien/ml, von denen $2,4 \times 10^1$ KbE/ml coliforme Bakterien waren. *Escherichia coli* befand sich nicht in der Rohmilch. Alle übrigen Milchprodukte wurden in Supermärkten eingekauft und entsprachen somit den in Deutschland üblichen Qualitätsanforderungen. Alle Milchprodukte wurden aus Kuhmilch hergestellt.

Die Inhaltsstoffe für das untersuchte Mineralwasser laut Herstellerangaben sind in Tabelle 4-3 dargestellt.

Tabelle 4-3: Mineraliengehalt im untersuchten stillen Mineralwasser (Anon, 2009).

Ionen	Konzentration [mg/l]
<i>Kationen</i>	
Lithium (Li ⁺)	0,013
Natrium (Na ⁺)	11,500
Kalium (K ⁺)	3,000
Ammonium (NH ₄ ⁺)	0,040
Magnesium (Mg ²⁺)	49,000
Kalzium (Ca ²⁺)	140,000
Strontium (Sr ²⁺)	0,490
<i>Summe</i>	<i>204,043</i>
<i>Anionen</i>	
Fluorid (F ⁻)	0,18
Chlorid (Cl ⁻)	8,90
Nitrat (NO ₃ ⁻)	7,90
Sulfat (SO ₄ ²⁻)	20,00
Hydrogenkarbonat (HCO ₃ ⁻)	652,00
<i>Summe</i>	<i>688,98</i>

4.1.1.2 Kultivierung der *Brucella*-Stämme

Die *Brucella*-Stämme wurden auf sterilem *Brucella*-Agar bei 37 °C und 90 % relativer Luftfeuchte drei Tage lang kultiviert. Der Bakterienrasen wurde mit 10 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) abgeschwemmt. Diese Suspension wurde mittels Densimat auf einen McFarland-Wert von 4,5 eingestellt, der nach einer mit *B. abortus* 1119-3 durchgeführten Voruntersuchung durch Ausplattieren von Verdünnungsreihen auf *Brucella*-Agar einer Konzentration von 5×10^9 KbE/ml entsprach.

In einem weiteren Versuch mit *B. abortus* 1119-3 und *B. melitensis* 16M wurde die Brucellen-Abschwemmung auf einen McFarland-Wert von 1,0 eingestellt und 100.000fach verdünnt, was nach Koloniezählungen einer Konzentration von 5×10^3 KbE/ml entsprach.

4.1.1.3 Spiken der Lebensmittelproben mit Brucellen

Die Lebensmittelproben wurden 1:100 mit der Zell-Suspension in je einer Glasflasche inokuliert. Somit lag das Inokulum von *B. abortus* 1119-3 in einer Ausgangskonzentration von 5×10^7 KbE/ml vor. Als Positivkontrolle diente *Brucella*-Bouillon, die als Anzuchtmedium für Flüssigkulturen ebenfalls 1:100 beimpft wurde. Als Negativkontrolle wurden die Lebensmittel 1:100 mit steriler physiologischer Kochsalzlösung inokuliert.

Zur Untersuchung des Wachstums von *B. abortus* 1119-3 in H Milch mit einem geringeren Inokulum von 5×10^3 KbE/ml wurde parallel auch *B. melitensis* 16M eingesetzt. Dies diente der Überprüfung, ob die für *B. abortus* erhaltenen Ergebnisse auch für eine andere Brucellen-Art reproduziert werden können.

Um sicherzustellen, dass die Bakterien innerhalb der angegebenen Zeit homogen im Lebensmittel verteilt sind, wurden in einem Vortest 100 µl 0,5 %ige Safranin-Lösung in die einzelnen Lebensmittel gegeben und die Zeit bis zur vollständigen Verteilung visuell ermittelt. Dies betrug ein bis zwei Minuten. Zur Sicherheit wurden die Lebensmittel und Kontrollen jeweils zehn Minuten mittels Magnetprüher durchmischt.

Für jeden Probenstag wurden jeweils drei 15 ml-Falcon-Röhrchen mit 10 ml des kontaminierten Lebensmittels befüllt. Aufgrund der geplanten Versuchsdauer von drei Monaten bei der H-Milch und einem Jahr beim Wasser mussten insgesamt 500-700 ml mit Brucellen inokuliert werden. Um eine gleich verteilte Brucellendosis in allen Falcon-Röhrchen gewährleisten zu können, erfolgte auch während der Abfüllung eine Durchmischung mittels Magnetprüher. Positiv- und Negativkontrollen wurden für jeden Probenstag einfach angesetzt. In Anlehnung an die empfohlenen Lagerungsbedingungen wurden H-Milch und stilles Mineralwasser in einem kühlbaren Brutschrank bei 20 °C und Joghurt, Roh- und Vorzugsmilch im Kühlschrank bei 5 °C gelagert. Die Proben wurden nicht geschüttelt.

4.1.1.4 Bestimmung der Zellzahl in kontaminierten Lebensmittelproben

Die Tenazität von Brucellen sollte bis zum Ende der Haltbarkeit der ausgewählten Lebensmittel erfolgen. Da der Einzelhandel Produkte mit abgelaufenem Mindesthaltbarkeitsdatum entsorgt, stellen auch kontaminierte Lebensmittel kein Risiko mehr für den Verbraucher dar. Joghurt, Rohmilch und Vorzugsmilch haben nur eine kurze Haltbarkeit von 2-30 Tagen und wurden täglich analysiert. Zur Verminderung des Probenaufkommens bei den sehr haltbaren Produkten H-Milch und stilles Mineralwasser (siehe Tabelle 4-1) wurden diese Lebensmittel in den ersten zwei Wochen dreimal, in der

dritten und vierten Woche zweimal und ab der fünften Woche bis zum Ende des Versuchs einmal wöchentlich untersucht.

Dazu wurden die Falcon-Röhrchen gevortext und mit 0,9 % NaCl in 10er-Verdünnungsreihen verdünnt. 100 µl jeder Verdünnungsstufe wurden auf *Brucella*-Agar-Platten (H-Milch, Mineralwasser und Positivkontrollen) bzw. auf *Brucella*-Selektivagar-Platten (Joghurt, Roh- und Vorzugsmilch) ausgestrichen. Von den Negativkontrollen wurden 100 µl unverdünnt ausplattiert. Alle Verdünnungsstufen wurden im Doppelansatz ausgestrichen und vier Tage lang in feuchter Atmosphäre bei 37 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach § 64 des Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuches (LFGB; Anon 2012). Demzufolge wurden die Doppelansätze zweier aufeinander folgender Verdünnungsstufen ausgezählt, und zwar solche mit über zehn und unter 300 Kolonien. Anschließend wurde die Keimzahl folgendermaßen berechnet:

$$\bar{c} = \log_{10} \left(\frac{\sum c}{n_1 \cdot 1 + n_2 \cdot 0,1} \cdot d \cdot 10 \right)$$

\bar{c}	–	Dekadischer Logarithmus der Anzahl der koloniebildenden Einheiten pro ml [log ₁₀ (KbE/ml)]
$\sum c$	–	Summe der Kolonien aller Petrischalen
n_1	–	Anzahl der Petrischalen der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe
n_2	–	Anzahl der Petrischalen der nächsthöheren Verdünnungsstufe
d	–	Faktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe; hierbei handelt es sich um die auf n_1 bezogene Verdünnungsstufe.
10	–	Die Zahl der in 100 µl enthaltenen Kolonien wurde auf 1 ml hochgerechnet.

Aus den Dreifachansätzen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Im Anschluss an die Entnahme eines Aliquots für die Zellzahlbestimmung wurde in jedem Falcon-Röhrchen der pH-Wert gemessen.

4.1.1.5 Bestimmung der Wachstums- und Reduktionsraten

Unter Berücksichtigung der verschiedenen Kombinationen aus Lebensmittel und *Brucella*-Stamm wurden mit Hilfe des Online-Programms DMFit (Anon, 2010) auf Basis der Baranyi- und Roberts-Modelle (Baranyi und Roberts, 1994) die Wachstums- und Reduktionsraten berechnet (Modell „no lag“). In zwei Fällen konnte mit diesem prädiktiven mikrobiologischen Modell keine Kurve in die Messpunkte aus der Tenazitätsuntersuchung modelliert werden,

weshalb für *B. abortus* 1119-3 in Mineralwasser das „complete model“ und für *B. abortus* 1119-3 in *Brucella*-Bouillon bei 5 °C das Modell „no asymptote“ angewandt wurde.

Mit den verwendeten Modellen war mit Ausnahme von zwei Fällen entweder die Bestimmung des bakteriellen Wachstums oder der Reduktion der Zellzahl möglich. Auf das Wachstum von *B. melitensis* 16M in H-Milch folgte eine Reduktion der Zellzahl, weshalb die Tenazitätsdaten in zwei Phasen eingeteilt wurden. Für diese konnten dann separat Modelle berechnet werden (Wachstum, Tag 0-11; Reduktion, Tag 11-87). Zur besseren Vergleichbarkeit mit der Positivkontrolle (*B. melitensis* in *Brucella*-Bouillon) erfolgte auch hier eine Auswertung in zwei Phasen (Wachstum, Tag 0-9; Konstante Zellzahl, Tag 14-87). Auf Basis der von DMFit berechneten Standardfehler wurden die 95 %-Konfidenzintervalle errechnet.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Extraktion der *Brucella*-DNA aus den Lebensmittelproben

4.2.1.1 DNA-Extraktion aus flüssigen Matrices

Zur Ermittlung einer geeigneten Methode für die Extraktion von *Brucella*-DNA aus Rohmilch (Fettgehalt: 3,2 %), Joghurt (Fettgehalt: 10,0 %), stillem Mineralwasser und physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) wurden verschiedene Kits und eine Phenol-Chloroform-Extraktion untersucht (siehe Tabelle 4-4).

Tabelle 4-4: Übersicht zu den verwendeten DNA-Extraktionsmethoden und eingesetzten Probenvolumina.

Kit/Methode	Probenvolumen*
InstaGene Matrix (Bio-Rad)	200 µl
Phenol-Chloroform-Extraktion (Romero und Lopez-Goni, 1999)	500 µl
QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)	1.000 µl
StarPrep One Kit (Bioteccon)	50 µl
SureFood PREP Bacteria I (Congen)	1.000 µl
ZR Fecal DNA Kit (Zymo)	150 µl

*) Die eingesetzten Probenvolumina entsprachen den Vorgaben des jeweiligen Kit-Herstellers.

Physiologische Kochsalzlösung ist zwar kein Lebensmittel, wurde in die DNA-Extraktion jedoch mit einbezogen, da Brucellen üblicherweise hiermit vom Nähragar abgeschwemmt werden und NaCl somit stets auch in die zu kontaminierenden Lebensmittel mit eingeführt wird. Zudem ist dieses Medium wässrig und enthält weder Fett noch Proteine oder Kohlenhydrate, so dass es sich zur Primärevaluation der DNA-Extraktionsprotokolle gut eignet.

Zur Kontamination von Lebensmitteln wurde *Brucella abortus* 1119-3 auf *Brucella*-Agar angezüchtet, mit physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt und mittels Densimat auf 5×10^9 KbE/ml eingestellt (siehe Abschnitt 4.1). Anschließend wurden die Zellen durch eine zweistündige Inkubation bei 80 °C inaktiviert.

Die Matrices wurden 1:10 mit den inaktivierten Bakterien vermischt und anschließend durch 1:10-Verdünnungen auf 5×10^7 , 5×10^4 und 5×10^1 KbE *B. abortus* 1119-3 pro ml Lebensmittel gebracht (Versuchsansatz 1, siehe Abbildung 4-1 A). Als Negativ-Probe wurden ungespikete Lebensmittel eingesetzt. Damit Joghurt pipettierfähig wurde, ist dieser vor der Herstellung von *Brucella*-Verdünnungsreihen 1:1 mit destilliertem Wasser verdünnt worden. Im Anschluss erfolgte die DNA-Extraktion.

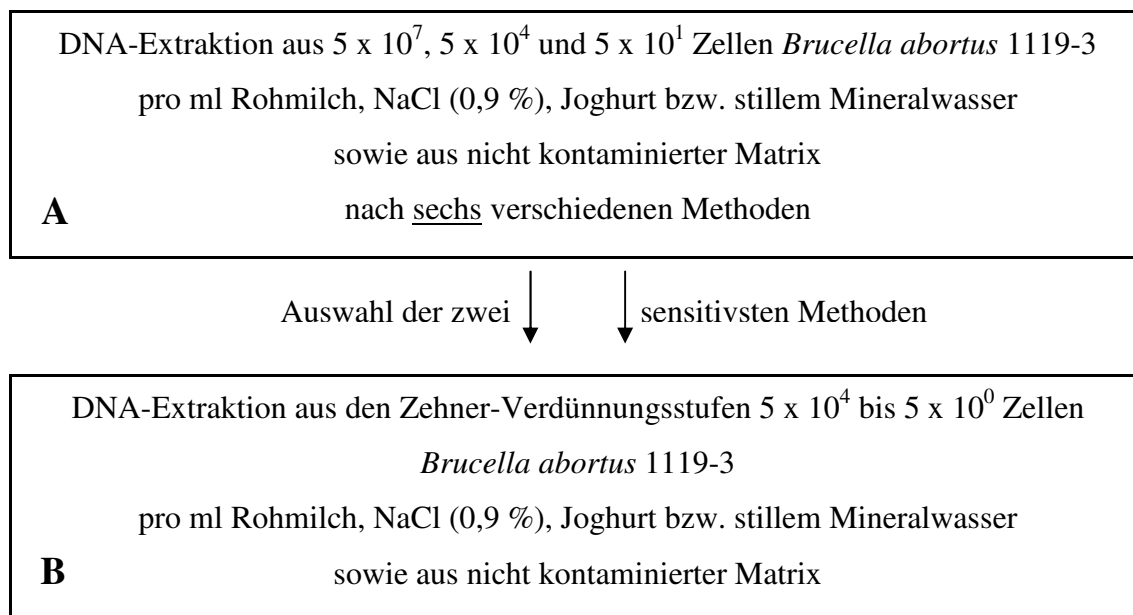


Abbildung 4-1: Zweistufiger Untersuchungsansatz zur Auswahl der geeignetsten DNA-Extraktionsmethode.

Die DNA-Extraktion erfolgte in Doppelansätzen und wurde für jede Matrix und mit jeder Methode dreimal durchgeführt. Die Konzentration der erhaltenen DNA-Lösung wurde mittels Nanodrop-Spektrofotometer bestimmt. Anschließend wurde die DNA entweder direkt mittels *bcs31*-PCR und Agarosegelelektrophorese bzw. mittels Real-Time PCR analysiert oder bei -20 °C eingefroren und später amplifiziert.

Die zwei Methoden, die sich für die wässrigen Medien NaCl und stilles Mineralwasser sowie für die Milch(-produkte) Rohmilch und Joghurt am besten eigneten, wurden zur Ermittlung der kleinsten noch nachweisbaren Brucellen-Konzentration weiter mit den Zehner-Verdünnungsstufen 5×10^4 bis 5×10^0 Zellen *Brucella abortus* 1119-3 pro ml untersucht (Versuchsansatz 2, siehe Abbildung 4-1 B). Das für Milchprodukte am besten geeignete

Verfahren wurde anschließend auch zur DNA-Extraktion aus Käse verwendet (siehe Abschnitt 4.2.1.2)

4.2.1.2 DNA-Extraktion aus festen Matrices

Zur Vorbereitung von Käseproben wurden 9,9 g Camembert (45 % Fett i. Tr., Haltbarkeitsdauer: 9 Tage) bzw. Ziegenfrischkäse (50 % Fett i. Tr., 15,5 % Fett absolut, Haltbarkeitsdauer: 5 Wochen) eingewogen, mit 100 µl dH₂O bzw. inaktivierter Brucellenverdünnung beimpft und zusammen mit 40 ml dH₂O in einen Stomacherbeutel gegeben. Der Käse wurde für 1 min (Ziegenfrischkäse) bzw. 2 min (Camembert) bei maximaler Geschwindigkeit durchmischt und die DNA aus der erhaltenen Käse-Suspension mittels Phenol-Chloroform-Extraktion gewonnen (siehe Abschnitt 4.2.1.3).

Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen wurde bei der Analyse von Verdünnungsreihen mit der Vorbereitung der Negativkontrolle (dH₂O) begonnen und anschließend von der am stärksten verdünnten Brucellensuspension bis zur höchsten Konzentration vorgegangen.

4.2.1.3 Protokolle zu den eingesetzten Methoden der DNA-Extraktion

Alle Protokolle wurden nach Angaben des Herstellers bzw. des Autors durchgeführt.

4.2.1.3.1 DNA-Extraktion mittels Lysepuffer

InstaGene Matrix (Bio-Rad)

1.000 µl Lebensmittel-Probe wurden für eine Minute bei 13.000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Zugabe von 200 µl InstaGene Matrix zu dem Pellet wurde die Suspension 30 min bei 56 °C inkubiert, für 10 s gevortext und anschließend für 8 min bei 99 °C inkubiert. Wiederum wurde 10 s gevortext und 2,5 min bei 13.000 g zentrifugiert. Der Überstand enthielt die extrahierte DNA. Sofern diese nicht sofort mittels PCR analysiert wurde, wurde das Aliquot bei -20 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde 10 s gevortext, wie angegeben zentrifugiert und die DNA dem Überstand entnommen.

Phenol-Chloroform-Extraktion

Der klassischen Phenol-Chloroform-Extraktion nach Sambrook und Russel (2001) ist eine speziell für Brucellen erarbeitete Aufbereitung vorgeschaltet (Romero und Lopez-Goni, 1999): Zu 500 µl Lebensmittelprobe wurden 100 µl NET-Puffer sowie 100 µl SDS-Lösung pipettiert, 10 min bei 80 °C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Zur Vermeidung von

Kreuzkontaminationen durch Übertragung von Tropfen aus dem Deckel des Reaktionsgefäßes auf andere Proben wurde kurz zentrifugiert. Nach der Zugabe von 50 µl RNase A (entsprechend 56,25 µg RNase A, Endkonzentration: 75 µg/ml) wurde gevortext und 2 h bei 50 °C inkubiert. Das Reaktionsgefäß wurde kurz zentrifugiert. 50 µl Proteinase K (entsprechend 260 µg Proteinase K, Endkonzentration: 325 µg/ml) wurden hinzupipettiert, kurz gevortext und 1,5 h bei 50 °C inkubiert. Nach einem weiteren kurzen Zentrifugationsschritt wurden 800 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol hinzugegeben. Diese Suspension wurde 20 s bei 2.400 rpm gevortext, 5 min bei 18.000 g zentrifugiert und die wässrige obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Bei Ziegenfrischkäse wurde dieser Extraktionsschritt dreimal durchgeführt, bis die wässrige Phase klar wurde. Die organische Phase wurde verworfen. Zu der wässrigen Phase wurden 0,7-0,8 Volumen Isopropanol gegeben. Wiederum wurde 20 s bei 2.400 rpm gevortext und 5 min bei 18.000 g zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 70 %igen Ethanol gewaschen. Anschließend wurde 2 min bei 13.000 g zentrifugiert, das Ethanol abpipettiert und das DNA-Pellet bei 40 °C getrocknet. Schließlich wurden 25 µl destilliertes Wasser hinzugegeben und durch Erhitzen auf 68 °C für 10 min die DNA in Lösung gebracht.

StarPrep One Kit (Bioteccon)

Zu 200 µl Lysis-Puffer wurden 50 µl Lebensmittel-Probe gegeben und bei 2.400 rpm gevortext. Die Suspension wurde 10 min bei 99 °C inkubiert, 2 s gevortext und anschließend 2 min bei 13.000 g zentrifugiert. Die DNA befand sich nun im Überstand. Dieser wurde jedoch nicht vom Sediment getrennt, da das Granulat der DNA-Extraktions-Flüssigkeit DNA-stabilisierende Eigenschaften hat. Somit musste nach dem Auftauen eingefrorener DNA stets zentrifugiert werden, so dass die Granulat-freie DNA dem Überstand entnommen werden konnte.

4.2.1.3.2 DNA-Extraktion mittels Lysepuffer und mechanischen Aufschlusses

ZR Fecal DNA Kit (Zymo)

150 µl Lebensmittel-Probe wurden in ein *ZR BashingBead Lysis Tube* pipettiert und 750 µl Lysis-Puffer hinzugefügt. Anschließend wurde für 5 min bei 2.400 rpm gevortext und für 1 min bei 10.000 g zentrifugiert. 400 µl Überstand wurden anschließend auf einen *Zymo-Spin IV Spin Filter* pipettiert und bei 7.000 g eine Minute zentrifugiert. Zu dem Filtrat wurden 1.200 µl *Fecal DNA Binding Buffer* hinzupipettiert und 780 µl dieser Mischung in einer

Zymo-Spin IIC Column bei 10.000 g für 1 min zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und der Schritt mit den noch vorhandenen 800 µl Mischung wiederholt. Auf die Säule wurden anschließend 200 µl *DNA Pre-Wash Buffer* pipettiert und 1 min bei 10.000 g zentrifugiert. Daraufhin wurde die *Zymo-Spin IIC Column* mit 500 µl *Fecal DNA Wash Buffer* gewaschen und in ein sauberes Reaktionsgefäß gestellt. 100 µl *DNA Elution Buffer* wurden direkt auf die Säulenmatrix pipettiert. Durch Zentrifugation bei 10.000 g für 30 s wurde die DNA eluiert. Zur weiteren Erhöhung der Reinheit wurde das Eluat in einen *Zymo-Spin IV-HRC Spin Filter* überführt und für 1 min bei 8.000 g zentrifugiert.

4.2.1.3.3 DNA-Extraktion mittels Lysepuffer und DNA-bindender Säulen

QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)

Zur Extraktion von *Brucella*-DNA aus Lebensmitteln wurden 1.000 µl Probe 10 min bei 5.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 30 µl abpipettiert. Anschließend wurden 180 µl ATL-Puffer sowie 20 µl Proteinase K zugegeben, 15 s gevortext und 1,5 h bei 56 °C und 350 rpm im Thermomixer schüttelnd inkubiert. Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen durch Übertragung von Tropfen aus dem Deckel des Reaktionsgefäßes auf andere Proben wurden die Reaktionsgefäße kurz (ca. 5 s) zentrifugiert. Nach Zugabe von 200 µl Puffer AL wurde 15 s gevortext und 10 min bei 70 °C und 350 rpm inkubiert. Wiederum wurde kurz zentrifugiert. In das Reaktionsgefäß wurden 200 µl 96 %iges Ethanol gegeben und 15 s gevortext. Nach kurzem Zentrifugieren wurde die Mischung auf eine QIAamp Spinsäule gegeben und 1 min bei 6.000 g zentrifugiert. Die Spin-Säule wurde in ein sauberes 2 ml-Reaktionsgefäß gestellt und das Filtrat verworfen. Anschließend wurden 500 µl Puffer AW1 hinzupipettiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 6.000 g wurde die Spin-Säule wieder in ein sauberes 2 ml-Reaktionsgefäß gesetzt und das Filtrat verworfen. Es folgte eine Zugabe von 500 µl Puffer AW2, worauf die Spinsäule 3 min bei 20.000 g zentrifugiert und anschließend in ein sauberes 1,5 ml-Reaktionsgefäß gestellt wurde. 50 µl Puffer AE wurden auf das Filtermaterial pipettiert, 5 min inkubiert und 1 min bei 6.000 g zentrifugiert. Wiederum wurden 50 µl Puffer AE auf das Filtermaterial pipettiert, 3 min gewartet und schließlich 1 min bei 6.000 g zentrifugiert.

SureFood PREP Bacteria I (Congen)

Ein Milliliter der zu untersuchenden Lebensmittelprobe wurde für 5 min bei 13.500 g zentrifugiert. Nach dem Abpipettieren des Überstandes (ca. 900 µl) wurden in das

Reaktionsgefäß 400 µl Puffer L hinzugegeben und 10 s gevortext. Anschließend wurde für 10 min bei 99 °C und 1.000 rpm schüttelnd inkubiert. Die Lysate wurden 1 min auf Eis abgekühlt und 2 min bei 13.500 g zentrifugiert.

Der Überstand wurde zusammen mit 200 µl *Binding Buffer* in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert, das 10 s gevortext wurde. Das Lysat wurde auf einen *Spin Filter* pipettiert und nach einer einminütigen Einwirkzeit 2 min bei 13.500 g zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. Anschließend wurden 550 µl *Wash Buffer* auf den *Spin Filter* pipettiert, 1 min bei 13.500 g zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Dieser Waschschrift wurde wiederholt. Zum Trocknen des *Spin Filters* wurde dieser ohne Zugabe von Puffer 2 min bei 13.500 g zentrifugiert. Es folgte eine dreiminütige Inkubation des Filters mit 100 µl des auf 55 °C erwärmten *Elution Buffers*, wonach für 2 min bei 9.400 g zentrifugiert wurde. Die DNA befand sich im Filtrat.

4.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Der Nachweis der *Brucella*-DNA basierte auf dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis et al., 1986). Zu diesem Zweck wurde die für Brucellen gattungsspezifische *bcbp31*-PCR nach Baily et al. (1992) durchgeführt. Hierbei wurde ein 224 bp langer Abschnitt aus dem Gen für das *Brucella cell surface protein* (31 kDa) (Mayfield et al., 1988) vervielfältigt, das für alle *Brucella*-Spezies charakteristisch ist (siehe Tabelle 4-5).

Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen wurde der Mastermix in einer DNA-freien „DNA-Workstation“ pipettiert und aliquotiert. In einem separaten Raum wurde in einer anderen „DNA-Workstation“ das Template hinzugegeben. Als Positivkontrolle diente mittels QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) extrahierte DNA aus 5×10^7 KbE *Brucella abortus* 1119-3. Im Anschluss an die PCR wurden die Amplifikate über die Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (siehe Abschnitt 4.2.3).

Tabelle 4-5: Mastermix und Temperatur-Zeitschema für die gattungsspezifische *Brucella*-PCR.

Reagenzien	Firma	Menge			
Taq PCR Master Mix 2x	Qiagen	12,5 µl	94 °C	10 min	1 x
Primer B4 (10 µM)	Metabion	2,5 µl	94 °C	30 s	
Primer B5 (10 µM)	Metabion	2,5 µl	60 °C	30 s	30 x
Nukleasefreies Wasser	Sigma	2,5 µl	72 °C	30 s	
Template		5,0 µl	72 °C	5 min	1 x

Die Sequenzen der Primer sind in Abschnitt 3.3 zu finden.

4.2.3 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von PCR-Produkten wurden 8 µl DNA mit 2 µl Ladepuffer vermischt und auf ein 1,5 %iges TBE-Agarosegel aufgetragen. Als Längenstandard wurden 4 µl eines 100-1.000 bp-Markers (Bioline) aufgetragen. Das Gel wurde 35 min bei 85 V gefahren. Die DNA wurde für 20 min in einem Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml) gefärbt. Anschließend wurde das Agarosegel für 10 min in dH₂O gewaschen und unter UV-Licht fotografiert.

4.2.4 Real-Time PCR

Die aus Lebensmittelproben extrahierte DNA wurde zum Vergleich mit der klassischen PCR auch mittels gattungsspezifischer *Brucella*-Real-Time PCR untersucht. Dabei wurde ein 151 bp langer Abschnitt des Gens *bcs p31* nachgewiesen (siehe auch Abschnitt 4.2.2). Als interne Amplifikationskontrolle (IAC) diente ein 278 bp langer Abschnitt aus der DNA des Lambda-Phagen (GeneBank/EMBL accession number J02459). Hierbei wurde eine Konzentration von 100 fg/µl eingesetzt.

Tabelle 4-6: Mastermix und Temperatur-Zeitschema für die gattungsspezifische *Brucella*-Real-Time PCR.

Reagenzien	Firma	Menge			
TaqMan Universal PCR Master Mix 2x	Applied Biosystems	12,50 µl			
<i>B. spp</i> fw	Metabion	0,75 µl			
<i>B. spp</i> rev	Metabion	0,75 µl	95 °C	10 min	1 x
<i>B. spp</i> Taq	Metabion	0,50 µl	95 °C	15 s	35 x
Lambda-fw	Metabion	0,75 µl	57 °C	60 s	
Lambda-rev	Metabion	0,75 µl			
Lambda Taq	Metabion	0,50 µl			
Nukleasefreies Wasser	Sigma	1,50 µl			
Interne Amplifikationskontrolle	Fermentas	2,00 µl			
Template		5,00 µl			

Die Sequenzen der Primer sind in Abschnitt 3.3 zu finden.

In jeder Real-Time PCR wurde eine Verdünnungsreihe aus *B. abortus*-DNA (Faktor 1:10) mit bekannter Menge (10 ng bis 10 fg) amplifiziert. Zur Berechnung der Genomäquivalente wurde das Gewicht der in den einzelnen Proben nachweisbaren *B. abortus*-DNA durch das durchschnittliche Genomgewicht von *B. abortus* dividiert. Hierzu wurden die für verschiedene *Brucella*-Spezies publizierte Genomgrößen (Anzahl der Nukleotide) mit dem Online-Rechner (<http://www.changbioscience.com/genetics/mw.html>, Option: „double stranded DNA 5'-NH₂...OH-3'“) in Dalton und anschließend in fg umgerechnet (1 Da = 1,66054 x 10⁻²⁷ kg).

4.3 Immunomagnetische Separation von Brucellen

4.3.1 Beschichtung der magnetischen Partikel

In dieser Arbeit wurden tosylaktivierte super-paramagnetische Partikel mit einem Durchmesser von 2,8 μm (Dynabeads M-280, Invitrogen) verwendet. 750 μg (ca. 5×10^7 Partikel) wurden mit Brucellose-Kontrollserum beschichtet. Es handelte sich um ein lyophilisiertes Vollserum aus einem mit *Brucella abortus* infizierten Rind. Die darin enthaltenen anti-*Brucella*-Antikörper hatten laut Angaben des Herstellers einen Titer von 841 I.E./ml in der Serum-Langsamagglutination. Zur Ermittlung der zur Beschichtung der magnetischen Partikel benötigten Menge wurde das Lyophilisat in 1 ml sterilem dH_2O aufgelöst und anschließend 1:10, 1:100 und 1:1.000 mit Puffer B verdünnt. 100 μl Serumverdünnung und magnetische Partikel in 100 μl Puffer B wurden vermischt und 24h bei 37 °C und 18 U/min inkubiert. Anschließend wurde zweimal 5 min mit Puffer C bei 4 °C gewaschen und für 24h in Puffer D bei 20 °C und 18 U/min inkubiert (blocken der noch freien Protein-Bindungsstellen auf den magnetischen Partikeln). Nach einem weiteren Waschschrift mit Puffer C für 5 min bei 4 °C wurde der Puffer entfernt. Die beschichteten Partikel wurden mit 500 μl inaktivierten Zellen von *Brucella abortus* 1119-3 (siehe Abschnitt 4.2.1.1) in Puffer C bei Konzentrationen von 5×10^6 , 5×10^3 bzw. 5×10^0 Kbe/Ansatz für 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde 3x mit 500 μl Puffer C gewaschen und die DNA mittels StarPrep One Kit (Bioteccon) aufgereinigt. Eventuell in der Probe enthaltene *Brucella*-DNA wurde mittels *bcs31*-PCR und Agarosegel nachgewiesen. Die verwendeten Puffer wurden nach Angaben des Herstellers der magnetischen Partikel angesetzt. Die genannten Inkubationstemperaturen und -zeiten wurden gemäß der Anleitung des Herstellers (Invitrogen) verwendet.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden $6,7 \times 10^7$ magnetische tosylaktivierte Partikel mit 2,04 μg , 20,4 μg bzw. 54,4 μg eines kommerziellen monoklonalen anti-*Brucella*-Antikörpers (Antibodies-online) inkubiert, der durch Immunisierung von Mäusen mit *Brucella abortus* hergestellt worden war. Laut Hersteller reagiert dieser Antikörper spezifisch mit intakten Brucellen, nicht jedoch mit *Brucella*-LPS. Die oben genannten Bedingungen wurden übernommen, allerdings mit folgenden Änderungen: Geblockt wurde für 4 h, dafür wurde die Inkubationszeit mit inaktivierten Brucellen auf 1,5 h verlängert. Die Brucellen-Konzentrationen betragen 5×10^7 , 5×10^4 bzw. 5×10^1 Kbe pro 500- μl -Ansatz.

4.3.2 Sensitivität der immunomagnetischen Separation

Die Sensitivität wurde sowohl mit dem Brucellose-Kontrollserum als auch mit dem monoklonalen anti-*Brucella*-Antikörper durch Inkubation der beschichteten magnetischen Partikel mit 1:10-Verdünnungen von 5×10^4 bis 5×10^0 KbE pro 500- μ l-Ansatz ermittelt. Für das verwendete Brucellose-Kontrollserum erfolgte die Sensitivitäts-Prüfung für Probenvolumina von 500 μ l und 1.000 μ l. Zur Ermittlung der optimalen Zeit vom Beschichten der Partikel bis zum Nachweis der Brucellen wurde das Blocken für 24 h bei 20 °C mit anschließender Inkubation mit Brucellen für 1 h mit dem Blocken für 4 h bei 37 °C und anschließender Inkubation mit Brucellen für 1,5 h verglichen. Des Weiteren wurde der Einfluss verschiedener Inkubationstemperaturen (37 °C, 20 °C und 4 °C) auf die Bindung von *B. abortus* 1119-3 an die beschichteten magnetischen Partikel sowie der Einfluss zweier DNA-Extraktionskits (StarPrep One Kit, Bioteccon und QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) auf die Nachweissensitivität untersucht.

4.3.3 Protokoll zur immunomagnetischen Separation

Die Dynabeads M-280 wurden durch leichtes Vortexen bei 1.300 rpm für eine Minute gleichmäßig in dem Originalgefäß verteilt. Die für den Versuch benötigten magnetischen Partikel wurden sofort nach dem Mischen – bevor die Partikel auf den Boden der Vorratsflasche absinken konnten – in ein Reaktionsgefäß überführt. Während einer einminütigen Inkubation im Magnetic Particle Concentrator zog der darin befindliche Dauermagnet (siehe Abbildung 4-2) die paramagnetischen Partikel an eine Seite des Reaktionsgefäßes, so dass die Flüssigkeit entfernt werden konnte. Die Dynabeads wurden zum Waschen mit 100 μ l Puffer B pro Probe vereint in einem Reaktionsgefäß 30 s bei 1.300 rpm gevortext. Die im Folgenden erwähnten Durchmischungsschritte erfolgten ebenfalls für 30 s bei 1.300 rpm auf einem Vortexer. Anschließend wurden die magnetischen Partikel mittels Magneten immobilisiert, der Puffer durch frischen Puffer B ersetzt (100 μ l pro Probe) und der Ansatz gevortext.

Zum Beschichten der Dynabeads wurde das Brucellose-Kontrollserum (841 I.E./ml) 1:100 in Puffer B verdünnt. Die Serumverdünnung wurde 1:1 mit den vorbereiteten Dynabeads (25 μ l = ca. 5×10^7 magnetische Partikel pro Probe) vermischt und für 24 h bei 37 °C und 18 U/min im Überkopfschüttler inkubiert.

Für die Versuche mit monoklonalen anti-*Brucella*-Antikörpern wurden $6,7 \times 10^7$ magnetische tosylaktivierte Partikel mit 20,4 μ g des Antikörpers auf gleiche Weise vermischt und

inkubiert. Zum Entfernen der überschüssigen Antikörper wurden die Partikel zweimal mit Puffer C gewaschen. Hierzu wurde der Beschichtungs-Ansatz durchmischt, die Flüssigkeit entfernt und ein Volumen von 100 µl 4 °C kaltem Puffer C hinzupipettiert. Wiederum wurde gemischt und dann für 5 min bei 4 °C inkubiert. Nach dem zweiten Waschschrift wurden die vorbereiteten magnetischen Partikel zu je 100 µl pro Probe auf 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt und der Puffer entfernt.

Anschließend wurden 500 µl der zu untersuchenden Lebensmittelprobe hinzupipettiert und nach dem Durchmischen für 90 min bei 4 °C und 18 U/min inkubiert. Danach wurde jedes Reaktionsgefäß gevortext, die Flüssigkeit entfernt, 500 µl Puffer C hinzugegeben und durchmischt. Dieser Waschschrift wurde insgesamt dreimal durchgeführt und diente der Entfernung von nicht immobilisierten Brucellen aus dem Ansatz. Schließlich wurde der Puffer C nach Inkubation im Magnetic Particle Concentrator abpipettiert.

Zu den „trockenen“ Brucellen-Dynabeads wurden 200 µl Lysepuffer des StarPrep One Kits (Bioteccon) hinzugegeben, worauf der Nachweis der Brucellen über DNA-Extraktion und PCR folgte (siehe Abschnitte 4.2.1.3.1 und 4.2.2).

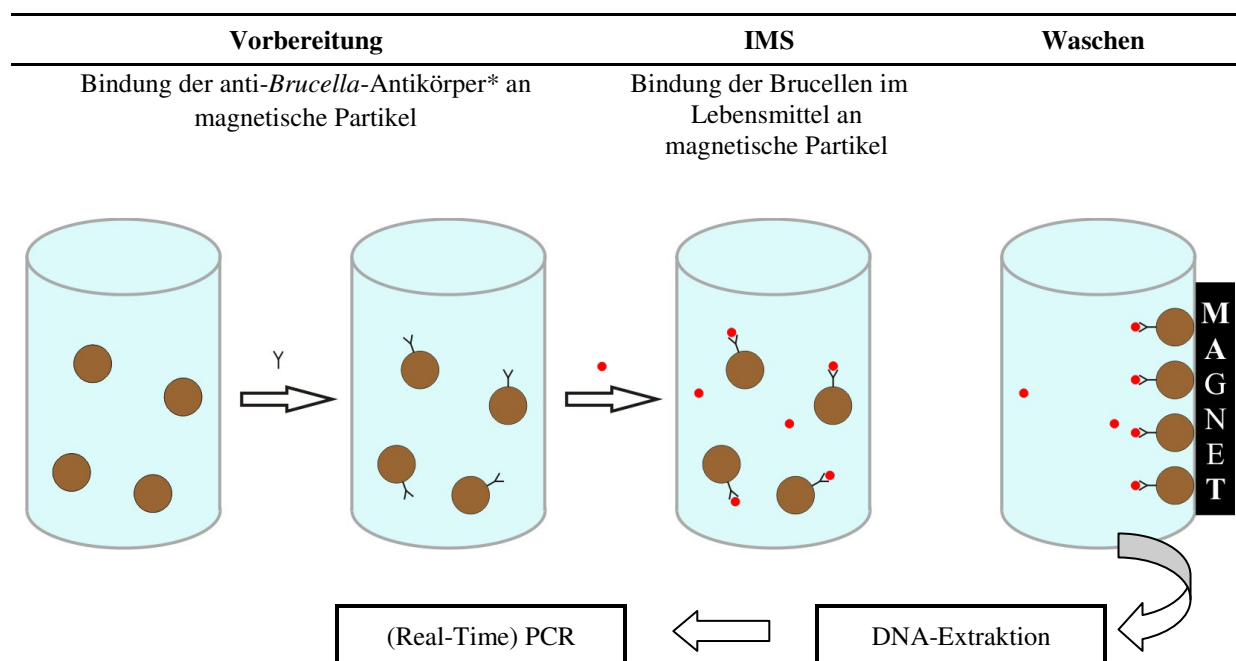


Abbildung 4-2: Funktionsweise der IMS mit anschließendem molekulargenetischem Nachweis am Beispiel *Brucella*; * – anti-*Brucella*-Antikörper im Brucellose-Kontrollserum bzw. monoklonale anti-*Brucella*-Antikörper.

4.3.4 Wiederfindungsrate und Spezifität

Die Ermittlung der Wiederfindungsrate für die immunomagnetischen Partikel erfolgte exemplarisch mit lebenden Zellen von *B. abortus* 1119-3 im Labor der biologischen Sicherheitsstufe 3. Hierzu wurden die magnetischen Partikel wie im Protokoll angegeben mit Brucellose-Kontrollserum bzw. mit monoklonalem anti-*Brucella*-Antikörper beschichtet. *B. abortus* 1119-3 wurde wie in Abschnitt 4.1.1.2 beschrieben kultiviert und auf einen McFarland-Wert von 4,5 eingestellt (dies entspricht laut eigener Vorversuche ca. 5×10^9 KbE/ml). Jeweils 500 µl der 1:10-Verdünnungen von 5×10^9 bis 5×10^1 KbE/ml wurden mittels IMS immobilisiert. Anschließend wurden jeweils 100 µl sowohl des Überstands als auch der Partikel im Doppelansatz auf *Brucella*-Agar ausgestrichen und vier Tage lang in feuchter Atmosphäre bei 37 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach §64 des Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuches (LFGB) (siehe Abschnitt 4.1.1.4). Die Zellzahlen wurden als KbE/ml \pm Standardabweichung angegeben. Die Wiederfindungsrate wird als Anteil der immobilisierten Bakterien an der Gesamtzahl der auf Nähragar nachgewiesenen Bakterien (immobilisierte plus freie Bakterien im Überstand) angegeben.

Die Immobilisierung von Referenzstämmen aller zehn bekannten *Brucella*-Spezies (siehe Abschnitt 3.4) wurde für das Brucellose-Kontrollserum und den monoklonalen Antikörper mit inaktivierten Zellen einer Konzentration von 5×10^7 KbE/ml untersucht. Zur weiteren Überprüfung der Spezifität wurde *O. intermedium* eingesetzt und in den Ansätzen mit monoklonalem anti-*Brucella*-Antikörper zusätzlich *Y. enterocolitica* O:9.

4.3.5 Nachweis von Brucellen in Lebensmittelproben

Zur Untersuchung des Nachweises von Brucellen in Lebensmittelproben (Rohmilch, Mineralwasser, Camembert, Ziegenfrischkäse, Joghurt) mittels IMS wurden 500-µl-Aliquots von Rohmilch und stillem Mineralwasser mit Zehner-Verdünnungsstufen zwischen 5×10^4 und 5×10^0 KbE *B. abortus* 1119-3 versetzt. Camembert und Ziegenfrischkäse wurden vorher 1:5 und Joghurt 1:8 mit dH₂O verdünnt. Damit wurde die Viskosität der Matrices soweit verringert, dass die immunomagnetischen Partikel mit Hilfe des Magneten die Matrices passieren konnten. Die Käseproben wurden wie in Abschnitt 4.2.1.2 beschrieben homogenisiert und anschließend mit *B. abortus* 1119-3 inokuliert. Bei Milchprodukten wurden die magnetischen Partikel nach den drei Waschschritten mit dem Waschpuffer (Puffer C) in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Für eine Vergleichbarkeit mit Ergebnissen aus den Versuchen zur DNA-Extraktion wurde die Verdünnung wieder herausgerechnet und auf einen Milliliter hochgerechnet, um die durch IMS minimal nachweisbare *Brucella*-Zellzahl pro Milliliter für die jeweilige Matrix zu erhalten.

5 Ergebnisse

5.1 Tenazität von Brucellen in Lebensmitteln

Zur Überprüfung der Sicherheit von Lebensmitteln im Falle eines absichtlichen Eintrags von Brucellen in die Lebensmittelkette wurde die Überlebenszeit von *Brucella abortus* 1119-3 in insgesamt sieben verschiedenen Lebensmitteln untersucht (H-Milch, Rohmilch, Vorzugsmilch, Joghurt mit 1,5 %, 3,5 % und 10,0 % Fett sowie stilles Mineralwasser). Dies wurde – mit Ausnahme der Rohmilch – an kommerziell erhältlichen Produkten getestet. Die gewählten Temperaturen entsprachen den im Supermarkt üblichen Lagerungsbedingungen. Daher wurden H-Milch und Mineralwasser bei 20 °C und Joghurt, Vorzugsmilch und Rohmilch bei 5 °C gelagert.

5.1.1 Tenazität von Brucellen in Milch

Bei der Kontamination von H-Milch mit *B. abortus* 1119-3 vermehrten sich die Bakterien bei 20 °C innerhalb von zwei Tagen von der anfänglichen Konzentration von 5×10^7 KbE/ml auf $1,5 \times 10^8$ KbE/ml und bis Tag 46 auf $7,2 \times 10^8$ KbE/ml (siehe Abbildung 5-1). Anschließend verringerte sich die Zahl leicht auf $6,7 \times 10^8$ KbE/ml und blieb bis zum Ende des Haltbarkeitsdatums (Tag 87) konstant. Die Standardabweichung war sehr gering und ist bei der aus Gründen der Übersichtlichkeit gewählten Skalierung der Grafik nicht mehr erkennbar. Für die Wachstumskurve der Positivkontrolle (*B. abortus* in *Brucella*-Bouillon) wurden vergleichbare Ergebnisse wie in der H-Milch beobachtet.

Bei Verwendung eines geringeren Inokulums von *B. abortus* 1119-3 mit 5×10^3 KbE/ml waren innerhalb der ersten neun Tage mit 0,47 Log-Stufen pro Tag die Wachstumsraten deutlich größer als bei der höheren Konzentration (siehe Abbildung 5-1 und Abbildung 5-2). An Versuchstag 21 war die Zellzahl bei *B. abortus* 1119-3 auf $4,2 \times 10^8$ KbE/ml angestiegen und hatte damit dieselbe Konzentration erreicht wie im Versuch mit dem Anfangs-Inokulum von 5×10^7 KbE/ml. Diese Konzentration blieb bis zum Ende des 12 Wochen dauernden Versuches konstant. Insgesamt waren sowohl die Tenazitätskurven als auch die Zellkonzentrationen von *B. abortus* 1119-3 bei den beiden unterschiedlichen Anfangskonzentrationen zwischen Tag 21 und 87 sehr ähnlich.

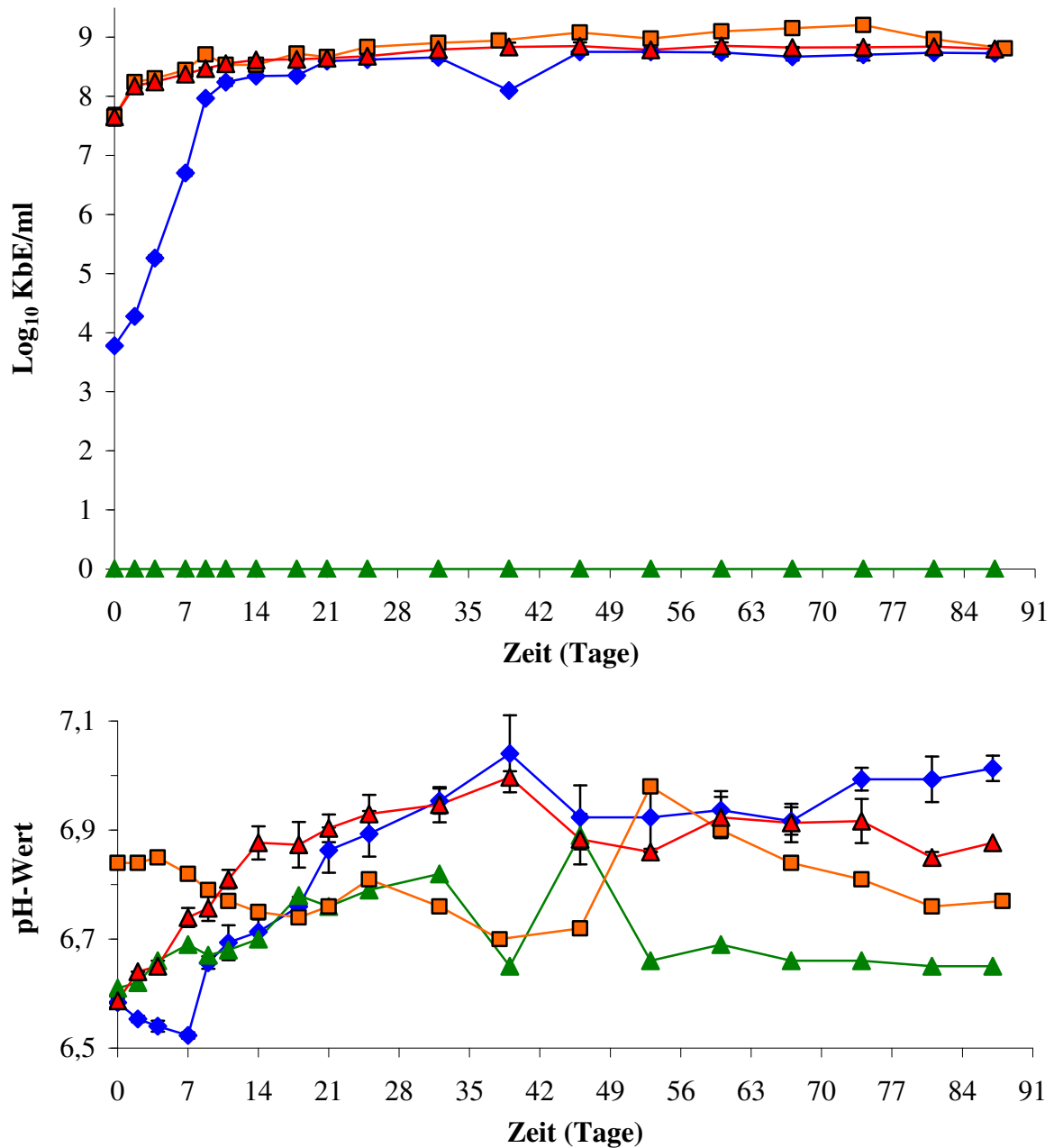


Abbildung 5-1: Vergleich der Tenazität von *Brucella abortus* 1119-3 in H-Milch bei 20 °C und einer Anfangskonzentration von 5×10^7 KbE/ml (▲), 5×10^3 KbE/ml (◆) bzw. 0 KbE/ml (Negativkontrolle, ▲). Das Wachstum in *Brucella*-Bouillon (Positivkontrolle, ■) ist ausgehend von einer Anfangskonzentration von 5×10^7 KbE/ml. Angegeben sind Tenazität (oben) und pH-Werte (unten) als Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Der pH-Wert der H-Milch stieg in beiden Brucellen-Konzentrationen in den ersten 39 Tagen leicht von 6,6 auf 7,0 an und blieb bis Versuchsende bei pH 6,9 bis 7,0. Im Vergleich dazu blieb der pH-Wert der nicht kontaminierten H-Milch auf einem etwas niedrigeren Niveau: Er stieg bis Tag 32 von pH 6,6 auf 6,8, schwankte in den folgenden drei Wochen zwischen 6,7 und 6,9 und wieder zurück und blieb dann bis Tag 87 bei pH 6,7. Die beimpfte *Brucella*-Bouillon hatte mit pH 6,8 einen etwas höheren Ausgangswert. Dieser fiel bis Tag 38 auf 6,7 ab, stieg innerhalb einer Woche auf 7,0 und sank dann bis zum Versuchsende auf 6,8 (siehe Abbildung 5-1).

Um die Ergebnisse mit *B. abortus* 1119-3 mit anderen Brucellen vergleichen zu können, wurde ebenfalls 5×10^3 KbE/ml *B. melitensis* 16M in H-Milch inokuliert. Innerhalb der ersten neun Tage lag die maximale Wachstumsrate bei 0,49 Log-Stufen pro Tag und somit minimal höher als bei *B. abortus* 1119-3 mit 0,47 Log-Stufen pro Tag (siehe Abbildung 5-2). Ähnlich wie bei *B. abortus* 1119-3 stieg anfangs auch die Zahl der Zellen von *B. melitensis* 16M auf $6,8 \times 10^7$ KbE/ml an (siehe Abbildung 5-3). Nach Versuchstag 18 verringerte sich die Zellzahl jedoch langsam mit 0,018 Log-Einheiten pro Tag und lag am Ende des Versuchs bei $5,8 \times 10^6$ KbE/ml. Somit war die finale Konzentration in H-Milch 2,07 Log-Stufen geringer als bei *B. abortus* 1119-3. In Abbildung 5-3 ist die Wachstumskurve von *B. abortus* 1119-3 (in blau) im Vergleich zu der von *B. melitensis* 16M (rot) dargestellt.

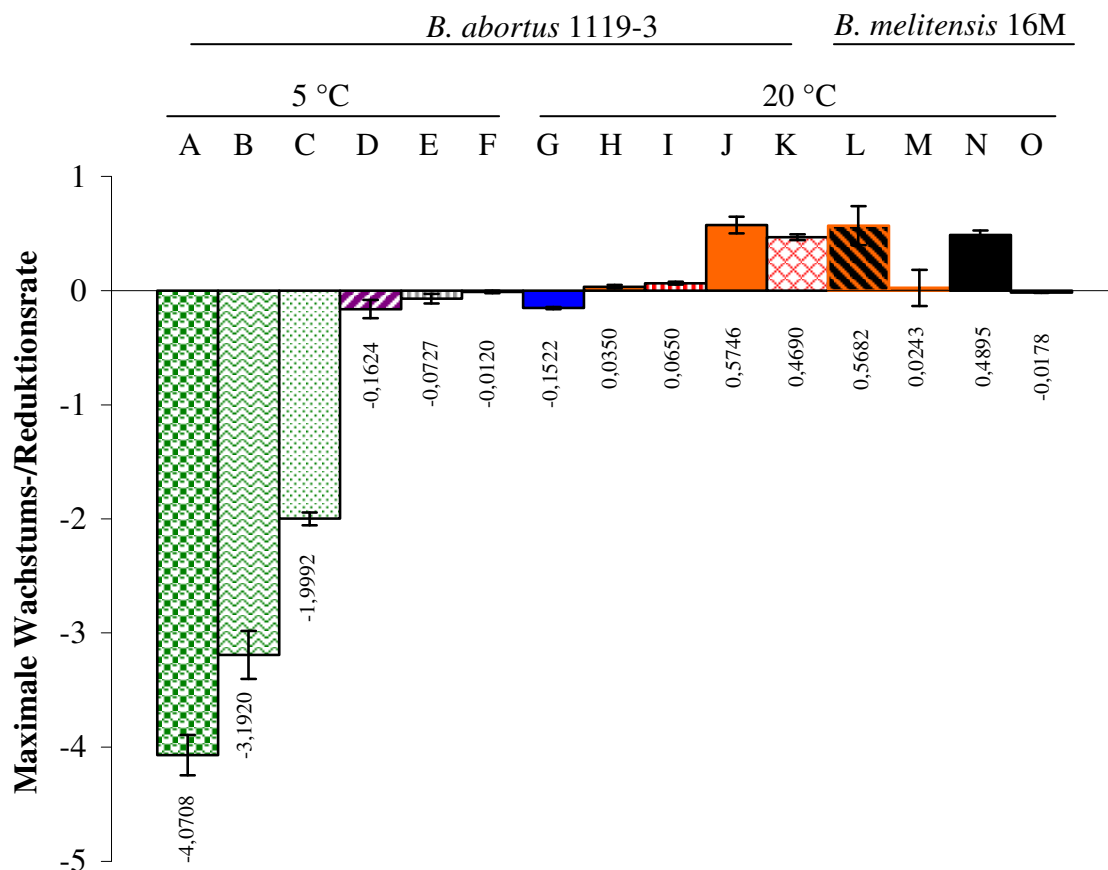


Abbildung 5-2: Wachstums-/Reduktionsraten für *B. abortus* 1119-3 (abgekürzt: 1119-3) und *B. melitensis* 16M (abgekürzt: 16M) in verschiedenen Lebensmitteln (A-O) wurden mit DMFit berechnet (Anon, 2010).

- (A) 5×10^7 KbE/ml 1119-3 in Joghurt mit 10,0 % Fett bei 5 °C,
 (B) 5×10^7 KbE/ml 1119-3 in Joghurt mit 1,5 % Fett bei 5 °C,
 (C) 5×10^7 KbE/ml 1119-3 in Joghurt mit 3,5 % Fett bei 5 °C,
 (D) $3,1 \times 10^7$ KbE/ml 1119-3 in Vorzugsmilch bei 5 °C,
 (E) $4,6 \times 10^7$ KbE/ml 1119-3 in Rohmilch bei 5 °C,
 (F) $6,3 \times 10^7$ KbE/ml 1119-3 in *Brucella*-Bouillon bei 5 °C,
 (G) 5×10^7 KbE/ml 1119-3 in stillem Mineralwasser bei 20 °C,
 (H) 5×10^7 KbE/ml 1119-3 in *Brucella*-Bouillon bei 20 °C,
 (I) 5×10^7 KbE/ml 1119-3 in H-Milch bei 20 °C,
 (J) 5×10^3 KbE/ml 1119-3 in *Brucella*-Bouillon bei 20 °C.
 (K) 5×10^3 KbE/ml 1119-3 in H-Milch bei 20 °C,
 (L) 5×10^3 KbE/ml 16M in *Brucella*-Bouillon bei 20 °C, Wachstum, Tag 0-9,
 (M) 5×10^3 KbE/ml 16M in *Brucella*-Bouillon bei 20 °C, konstante Zellzahl, Tag 14-87,
 (N) 5×10^3 KbE/ml 16M in H-Milch bei 20 °C, Wachstum, Tag 0-11,
 (O) 5×10^3 KbE/ml 16M in H-Milch bei 20 °C, Reduktion, Tag 11-87.

Die berechneten Wachstums-/Reduktionsraten sind angegeben als Mittelwerte \pm Standard-Fehler*1,96.

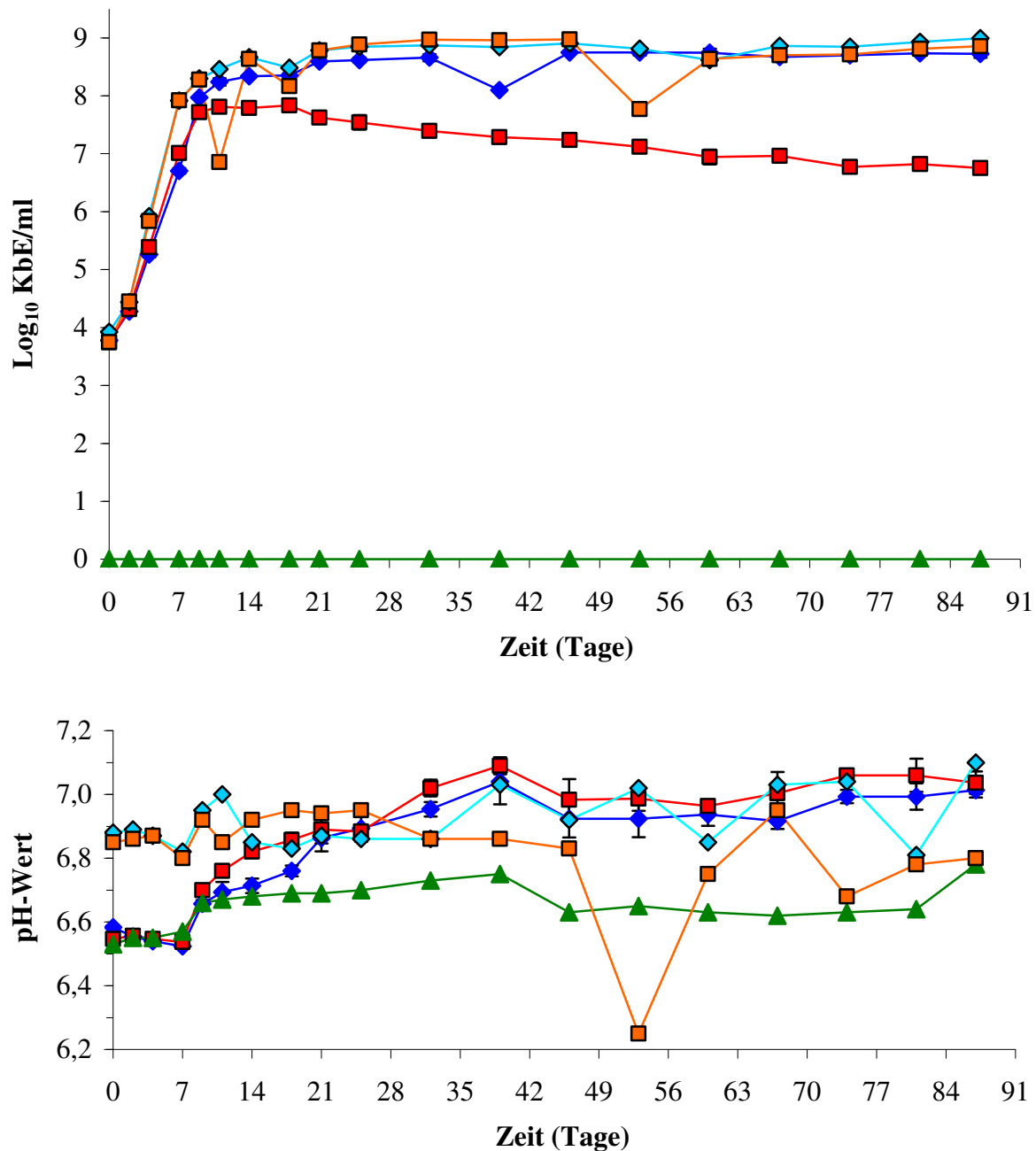


Abbildung 5-3: Vergleich der Tenazität von *B. abortus* 1119-3 (◆) und *B. melitensis* 16M (■) in H-Milch bei 20 °C und einer Anfangskonzentration von 5×10^3 KbE/ml bzw. 0 KbE/ml (Negativkontrolle, ▲). Als Positivkontrolle diente das Wachstum von *B. abortus* 1119-3 (◇) und *B. melitensis* 16M (□) in *Brucella*-Bouillon. Angegeben sind Tenazität (oben) und pH-Werte (unten) als Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Der pH-Wert der mit *B. melitensis* 16M inokulierten H-Milch stieg parallel zu dem für *B. abortus* 1119-3 beschriebenen Verlauf von 6,6 auf 7,1 an und blieb bis Versuchsende zwischen 7,0 und 7,1. Wie im zuvor gezeigten Versuch blieb der pH-Wert in der unkontaminierten Milch auch hier niedriger: Er stieg bis Tag 39 von pH 6,5 auf 6,8 und fiel dann innerhalb einer Woche auf 6,6 ab. Bei diesem Wert blieb er bis Tag 81, von wo er in der letzten Versuchswoche auf pH 6,8 anstieg. Die pH-Werte der Positivkontrollen lagen

zwischen pH 6,8 und 7,1 (*B. abortus* 1119-3) bzw. zwischen 6,8 und 7,0 (*B. melitensis* 16M), wobei die Werte immer um 0,1 schwankten. Bei *B. melitensis* 16M kam es an Tag 53 zu einem kurzfristigen pH-Abfall auf pH 6,3. Dies machte sich auch in der Keimzahlbestimmung bemerkbar: Die Konzentration sank von $9,5 \times 10^8$ KbE/ml (Tag 46) um 1,2 Log-Stufen, stieg aber bei der nächsten Probennahme wieder auf $4,3 \times 10^8$ KbE/ml an.

Zusammenfassend ist aus den Untersuchungen mit H-Milch ersichtlich, dass sich Brucellen bei einer relativ niedrigen Inokulationsdosis in diesem Lebensmittel stark vermehrten. Die hohen Zellzahlen konnten bis zum Ende der Mindesthaltbarkeit des Produktes von drei Monaten nachgewiesen werden.

Da Roh- und Vorzugsmilch unterschiedliche Reinheitsgrade haben (siehe Tabelle 4-2) und sich dies auf das Wachstum von Brucellen auswirken könnte, wurde die Überlebensfähigkeit von *B. abortus* 1119-3 in beiden Milchsorten bei 5 °C bis zum Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums untersucht.

Hier verringerte sich die Zellzahl innerhalb von vier Tagen leicht von $4,6 \times 10^7$ KbE/ml auf $2,5 \times 10^7$ KbE/ml (Rohmilch) bzw. von $3,1 \times 10^7$ auf $2,0 \times 10^7$ KbE/ml (Vorzugsmilch) (siehe Abbildung 5-4), wobei sich die maximalen Reduktionsraten von -0,073 bzw. -0,126 Log-Stufen pro Tag nur geringfügig voneinander unterschieden (siehe Abbildung 5-2). Auch die Konzentration von *B. abortus* 1119-3 in *Brucella*-Bouillon (Positivkontrolle) ging innerhalb der vier Tage zurück: Hier fiel die Zellzahl von $6,3 \times 10^7$ KbE/ml auf $3,3 \times 10^7$ KbE/ml ab. Die pH-Werte blieben in *Brucella*-Bouillon und in Vorzugsmilch konstant bei 6,85 bzw. 6,75. Im Falle der Rohmilch schwankten sie minimal zwischen 6,63 und 6,74. Zur besseren Erkennbarkeit der Unterschiede zwischen der Tenazität von Brucellen in Roh- und Vorzugsmilch wurde auf die Darstellung der Negativkontrolle verzichtet.

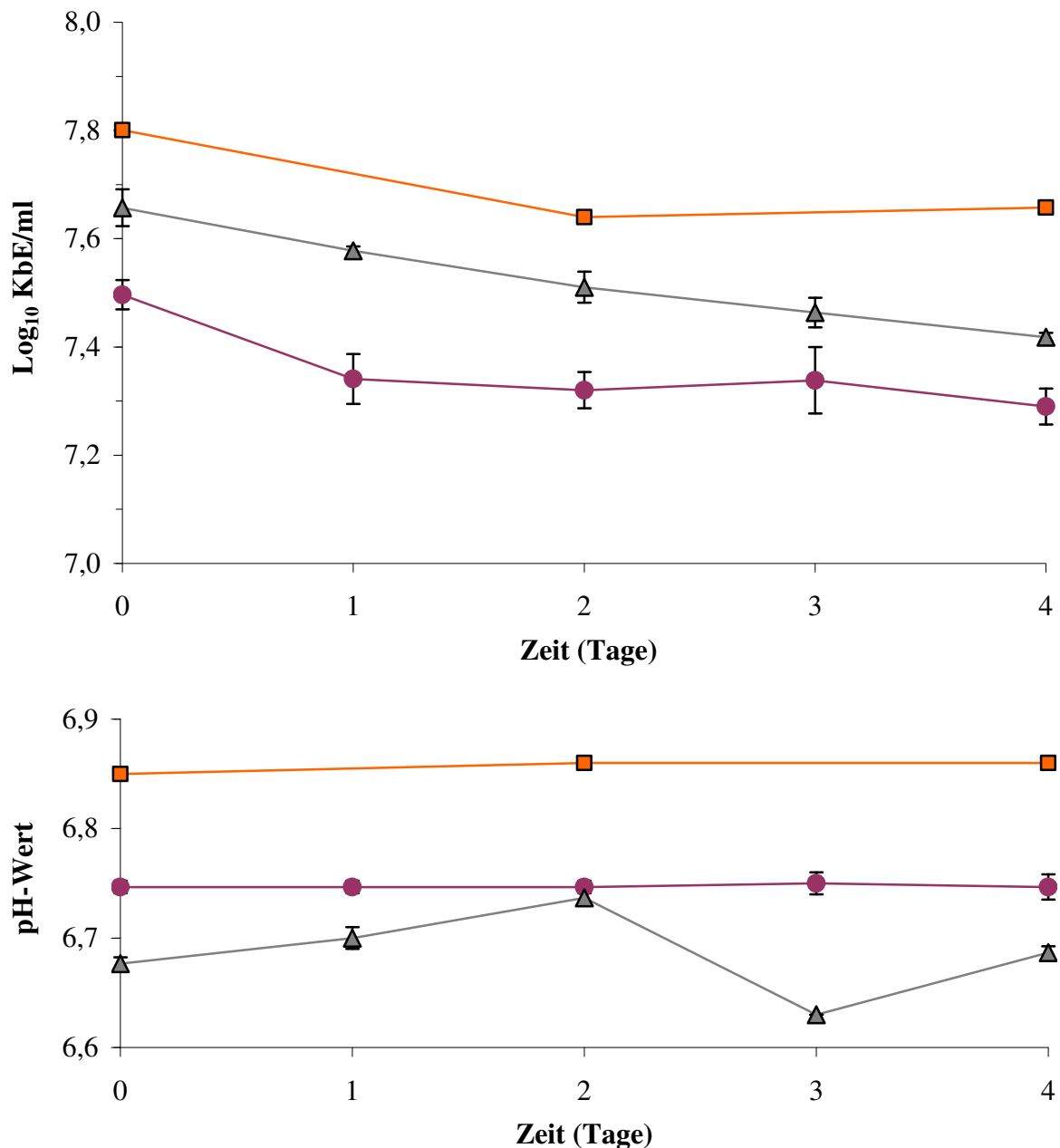


Abbildung 5-4: Tenazität von *B. abortus* 1119-3 in Rohmilch (▲), Vorzugsmilch (●) und *Brucella*-Bouillon (■). Angegeben sind Tenazität (oben) und pH-Werte (unten) als Mittelwerte \pm Standardabweichung.

5.1.2 Tenazität von Brucellen in Joghurt

Es wurden drei Naturjoghurts mit unterschiedlichen Fettstufen (1,5 %, 3,5 % bzw. 10,0 %) untersucht. Bereits nach zwei Tagen (10,0 % Fett) bzw. nach drei Tagen (1,5 % Fett) konnten keine lebenden Bakterien mehr nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5-5). In Joghurt mit 3,5 % Fett überlebten die Brucellen am längsten und waren erst nach fünf Tagen nicht mehr nachweisbar. Die Reduktionsraten lagen bei 4,1 (10,0 % Fett), 3,2 (1,5 % Fett) bzw. 2,0

(3,5 % Fett) Log-Stufen pro Tag (siehe Abbildung 5-2). Der pH-Wert stieg während der sieben Versuchstage sehr geringfügig um 0,03-0,04 an und lag zum Versuchsende bei 4,3 (1,5 % Fett), 4,2 (3,5 % Fett) bzw. bei 4,1 (10,0 % Fett). Die kontaminierte *Brucella*-Bouillon (Positivkontrolle) hatte einen konstanten pH-Wert von 6,8.

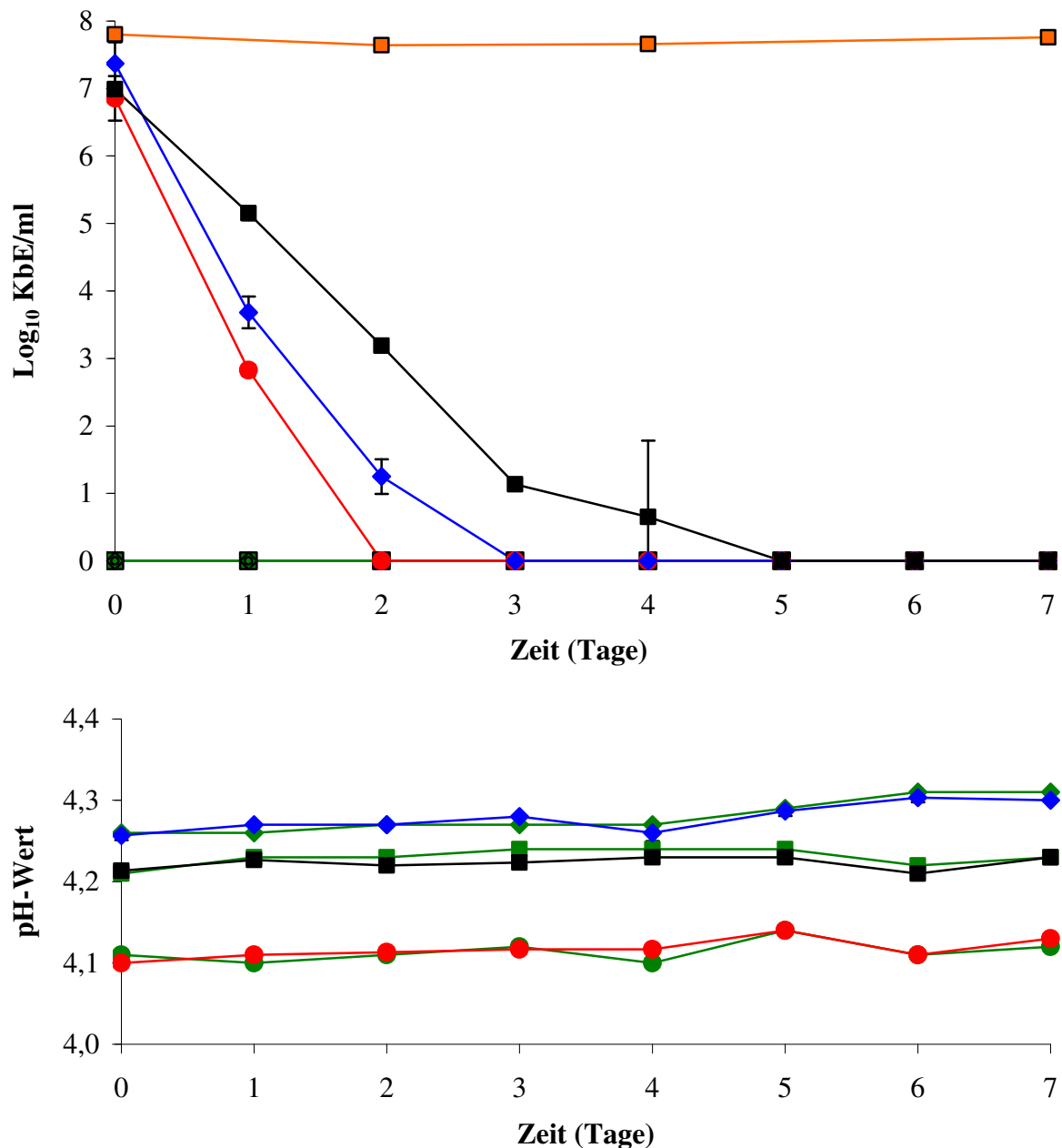


Abbildung 5-5: Tenazität von *B. abortus* 1119-3 in Joghurt mit 1,5 % (♦), 3,5 % (■) und 10,0 % (●) Fett sowie in *Brucella*-Bouillon (■). Die jeweiligen Negativkontrollen sind mit denselben Symbolen in grün dargestellt (◆, ■, ●). Angegeben sind Tenazität (oben) und pH-Werte (unten) als Mittelwerte ± Standardabweichung.

5.1.3 Tenazität von Brucellen in stillem Mineralwasser

In stillem Mineralwasser verringerte sich innerhalb von 53 Tagen die Brucellen-Konzentration allmählich von 5×10^7 bis auf 10^0 KbE/ml (siehe Abbildung 5-6). Nach 63 Tagen konnten keine Kolonien mehr nachgewiesen werden.

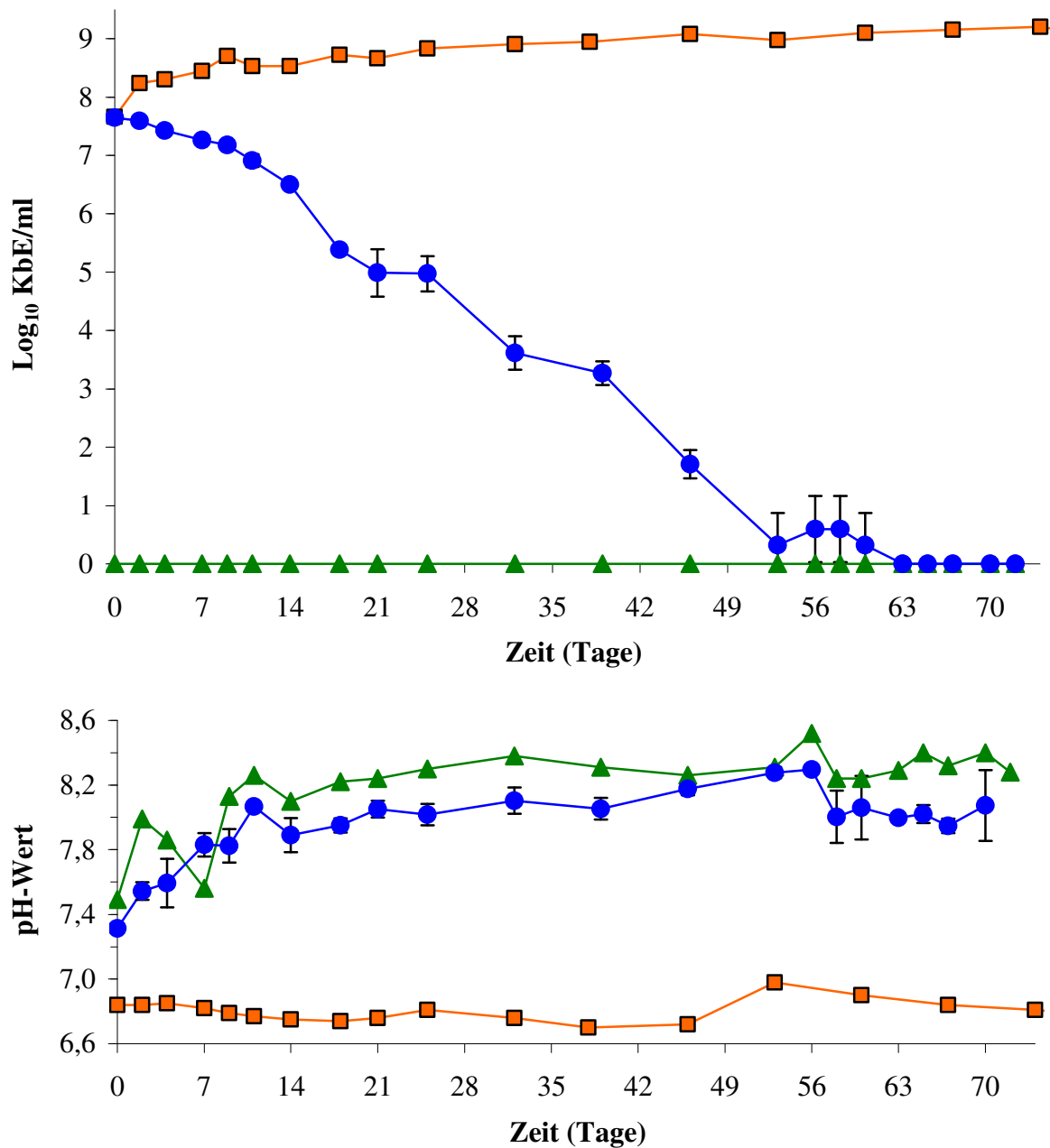


Abbildung 5-6: Tenazität von *B. abortus* 1119-3 in stillem Mineralwasser (●) und *Brucella*-Bouillon (■) bei 20 °C; Negativkontrolle (▲). Angegeben sind Tenazität (oben) und pH-Werte (unten) als Mittelwerte ± Standardabweichung.

Der pH-Wert stieg innerhalb der ersten zwei Monate von 7,3 auf 8,3 und pendelte sich dann zwischen Tag 58 und 72 bei pH 8,0 ein. Dabei war der Verlauf des pH-Wertes von kontaminiertem Mineralwasser vergleichbar mit dem der Negativkontrolle, der ca. 0,2 pH-Stufen höher parallel dazu verlief. In der Positivkontrolle (*Brucella*-Bouillon) waren die Brucellen auf gleichbleibend hohem Niveau über die gesamte Zeit der Untersuchung nachweisbar.

Die Tenazitätsuntersuchungen zeigten, dass *Brucella abortus* 1119-3 sowohl in H-Milch als auch in Roh- und Vorzugsmilch über das Mindesthaltbarkeitsdatum hinaus in der Matrix überleben. In H-Milch konnten sich sowohl *B. abortus* 1119-3 als auch *B. melitensis* 16M deutlich bis auf eine Zellzahl von über 10^8 KbE/ml vermehren. In Mineralwasser war *B. abortus* 1119-3 60 Tage lang nachweisbar, während dieser Stamm in Joghurt nur ein bis vier Tage überlebte.

5.2 Extraktion von *Brucella*-DNA aus Lebensmitteln

5.2.1 Vergleich von Tests zur Extraktion von *Brucella*-DNA aus Rohmilch, Joghurt, stillem Mineralwasser und physiologischer Kochsalzlösung

Zur Auswahl einer geeigneten Methode für die Extraktion von *Brucella*-DNA wurden Rohmilch (Fettgehalt: 3,2 %), Joghurt (Fettgehalt: 10,0 %), stilles Mineralwasser und physiologische Kochsalzlösung mit 5×10^7 , 5×10^4 und 5×10^1 KbE *Brucella abortus* 1119-3 pro Milliliter inokuliert (Versuchsansatz 1). Beispielhaft sind in Abbildung 5-7 Ergebnisse zur Extraktion aus physiologischer Kochsalzlösung und Rohmilch dargestellt. Insgesamt wurden sechs verschiedene Protokolle überprüft (siehe Tabelle 5-1).

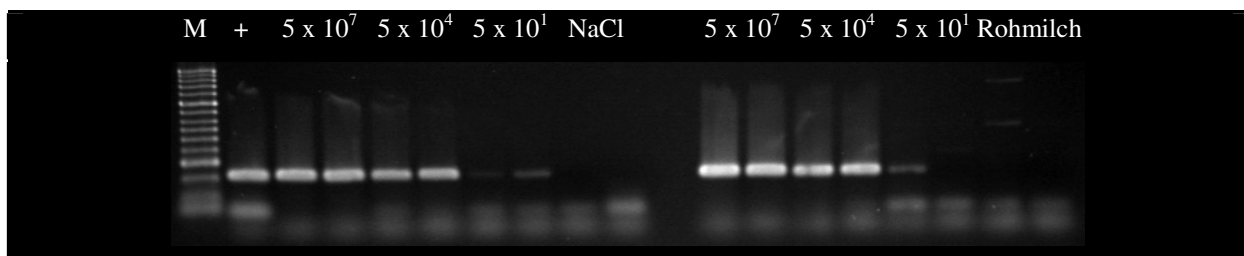


Abbildung 5-7: *Bcsp31*-Amplifikat nach Extraktion von *Brucella*-DNA aus physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) und Rohmilch mittels QIAamp DNA Mini Kit; M – Marker (100-1.000 bp); + – Positivkontrolle.

Die Reinheit der extrahierten DNA wurde durch Bestimmung der $OD_{260/280}$ mittels Spektrofotometer ermittelt. Optimale Werte für DNA-Lösung ohne Proteinkontamination liegen bei 1,8 bis 2,0. Gemessen wurden Werte zwischen 0,8 und 7,6. Der ZR Fecal DNA Kit (Zymo) zeigte bei allen vier Matrices die niedrigsten Werte, die zwischen 0,8 und 1,2 lagen. Auffällig bei den Kits von Bio-Rad und Congen war, dass die Werte bei der Extraktion aus Rohmilch und Joghurt deutlich unter 1,8 (0,7-0,9 bzw. 0,7 und 1,2) jedoch bei Wasser und NaCl über 2,0 lagen (2,1 und 3,3 bzw. 4,0 und 3,0). Beide Kits waren auf die Präparation von DNA aus Bakterienkulturen ausgelegt, wobei der Name „SureFood PREP Bacteria I“ darauf hindeutet, dass der Kit sich für Lebensmittel eignen sollte. Das Spektrofotometer zeigte für den reinen Lysepuffer des StarPrepI-Kit (Bioteccon) 1.400 ng/ μ l an. Daher konnten aus den Proben keine Werte zur DNA-Konzentration oder Proteinkontamination bestimmt werden. Die mittels QIAamp DNA Mini Kit extrahierte DNA hatte eine $OD_{260/280}$ von 1,1 bis 3,7, wobei die Mittelwerte zwischen 1,7 und 2,0 lagen. Bei der Phenol-Chloroform-Extraktion lagen die bei einzelnen Proben gemessenen Quotienten zwischen 1,2 bis 2,3 und die Mittelwerte der Quotienten aus OD_{260} zu OD_{280} bei allen verwendeten Matrices zwischen 1,4 und 1,6.

Tabelle 5-1: Ergebnisse der DNA-Extraktion aus 5×10^7 , 5×10^4 und 5×10^1 KbE *B. abortus* 1119-3 pro ml.

DNA-Extraktionsmethode	Brucella-Konzentration [KbE/ml] ^{a)}			ng/μl ^{b)}	OD _{260/280} ^{c)}	Matrixbezogene Bemerkungen	
	5×10^7	5×10^4	5×10^1				
ROHMILCH	InstaGene Matrix (Bio-Rad)	6/6	2/6	0/6	317,8-991,7 (630,7)	0,6-1,0 (0,7)	Fettschicht auf DNA-Lösung
	Phenol-Chloroform-Extraktion	6/6	6/6	1/6	9,0-28,9 (17,5)	1,2-2,1 (1,5)	Gute Fettabtrennung
	QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)	6/6	6/6	2/6	1,7-9,6 (4,8)	1,1-3,7 (1,7)	Rahm entfernt -> fettfreie DNA
	StarPrep One Kit (Bioteccon)	6/6	4/6	1/6	*	*	Fettschicht auf DNA-Lösung
	SureFood PREP Bacteria I (Congen)	6/6	4/6	1/6	12,8-73,7 (32,9)	0,7-2,7 (1,2)	Rahm entfernt -> fettfreie DNA
	ZR Fecal DNA Kit (Zymo)	6/6	1/6	0/6	23,1-35,2 (27,4)	0,8-1,0 (0,9)	
STILLES MINERALWASSER	InstaGene Matrix (Bio-Rad)	6/6	6/6	4/6	2,0-3,6 (2,7)	1,0-3,4 (2,1)	
	Phenol-Chloroform-Extraktion	6/6	3/6	1/6	4,3-14,5 (7,6)	1,3-1,7 (1,4)	
	QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)	6/6	6/6	6/6	1,6-4,8 (2,8)	1,2-3,2 (1,9)	
	StarPrep One Kit (Bioteccon)	6/6	6/6	1/6	*	*	
	SureFood PREP Bacteria I (Congen)	6/6	5/6	2/6	1,4-16,8 (7,8)	1,2-7,6 (4,0)	
	ZR Fecal DNA Kit (Zymo)	6/6	4/6	2/6	22,3-37,4 (27,1)	0,8-1,1 (1,0)	
PHYSIOLOGISCHE KOCHSALZLÖSUNG	InstaGene Matrix (Bio-Rad)	6/6	6/6	2/6	1,9-3,2 (2,4)	1,8-6,1 (3,3)	
	Phenol-Chloroform-Extraktion	6/6	4/6	2/6	6,6-17,8 (10,7)	1,3-2,2 (1,5)	
	QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)	6/6	6/6	5/6	0,8-5,1 (2,7)	1,0-2,8 (1,7)	
	StarPrep One Kit (Bioteccon)	6/6	6/6	1/6	*	*	
	SureFood PREP Bacteria I (Congen)	6/6	5/6	1/6	10,5-20,8 (12,3)	2,1-4,6 (3,0)	
	ZR Fecal DNA Kit (Zymo)	6/6	2/6	0/6	20,7-36,3 (28,1)	0,8-1,0 (0,9)	
JOGHURT †		1×10^8	1×10^5	1×10^2			
	InstaGene Matrix (Bio-Rad)	6/6	2/6	1/6	52,7-106,8 (73,6)	0,9-1,0 (0,9)	Fettschicht auf DNA; 200μl Pellet!
	Phenol-Chloroform-Extraktion	6/6	5/6	5/6	56,4-118,0 (89,9)	1,5-1,9 (1,6)	Gute Fettabtrennung
	QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)	6/6	6/6	3/6	7,3-13,9 (9,2)	1,6-2,5 (2,0)	Rahm entfernt -> fettfreie DNA
	StarPrep One Kit (Bioteccon)	6/6	4/6	1/6	*	*	Fettschicht auf DNA-Lösung
	SureFood PREP Bacteria I (Congen)	6/6	6/6	0/6	37,9-66,2 (50,3)	0,6-0,9 (0,7)	DNA-Lsg. durch Rahm abpipetiert
	ZR Fecal DNA Kit (Zymo)	6/6	3/6	0/6	18,4-32,0 (26,0)	0,9-1,2 (1,0)	Dünne Fettschicht nach <i>bashing</i>

^{a)} Anzahl der Proben, in denen DNA von *B. abortus* 1119-3 aus der angegebenen Zellzahl pro ml extrahiert wurde, detektiert mittels *bcs31*-PCR und Agarosegel; ^{b)} mittels Nanodrop-Spektrofotometer gemessener Wertebereich (Durchschnitt) für die Konzentration des Gemisches aus Brucellen- und Lebensmittel-DNA sowie ^{c)} für dessen Freiheit von Proteinen (OD_{260/280} > 1,8); † – Joghurt wurde 1:1 verdünnt, so dass sich hierfür doppelt so hohe Nachweisraten ergeben; * – Keine auswertbaren Messungen: Der DNA-freie Lysepuffer absorbiert bei ca. 1.400 ng/μl.

5.2.1.1 Rohmilch

Die höchste eingesetzte Brucellen-Konzentration (5×10^7 KbE/ml) konnte in Rohmilch mittels PCR nach Verwendung aller getesteten DNA-Extraktionsmethoden nachgewiesen werden (siehe auch Abbildung 5-7). Bereits bei der niedrigeren Konzentration von 5×10^4 KbE/ml war die Nachweisrate in Abhängigkeit vom verwendeten Kit unterschiedlich: Während die Kits von Zymo und Bio-Rad nur in 1/6 bzw. in 2/6 Ansätzen *Brucella*-DNA in nachweisbaren Mengen extrahierten, lagen der StarPrep One Kit und Sure Food PREP Bacteria I mit 4/6 PCR-positiven *Brucella*-Proben im Mittelfeld (siehe Tabelle 5-1). Am besten schnitten hier die Phenol-Chloroform-Extraktion und der QIAamp DNA Mini Kit ab, die beide jeweils nachweisbare DNA aus 6/6 Ansätzen extrahierten. Dabei ist die letztere Methode mit 2/6 PCR-positiven Ansätzen bei der Konzentration von 5×10^1 KbE/ml noch etwas sensitiver.

Das Fett der Rohmilch musste bei den Kits von Congen, Qiagen, Bioteccon und Bio-Rad nach dem ersten Zentrifugationsschritt mittels Pipettenspitze entfernt werden, da es sich oberhalb der DNA-enthaltenden Lösung abgesetzt hatte. Die Phenol-Chloroform-Extraktion war die einzige Methode, bei der dies nicht nötig war.

5.2.1.2 Joghurt

Aus Joghurt (Fettgehalt: 10 %) wurde DNA der Brucellen-Konzentration 5×10^4 KbE/ml in 6/6 Fällen durch die Kits von Qiagen und Congen extrahiert; die Phenol-Chloroform-Extraktion lag mit 5/6 positiven Proben knapp dahinter, während die Kits von Bioteccon (4/6), Zymo (3/6) und Bio-Rad (2/6) in weniger Fällen mit der PCR nachweisbare Brucellen-DNA extrahieren konnten. DNA von 50 Zellen von *B. abortus* 1119-3 je Milliliter isolierte die Phenol-Chloroform-Extraktion mit 5/6 positiven Proben am zuverlässigsten, gefolgt vom QIAamp DNA Mini Kit mit 3/6 positiven Proben (siehe Tabelle 5-1).

Das im Joghurt enthaltene Fett setzte sich – wie auch schon für Rohmilch beschrieben – nach der Zentrifugation bei den Kits von Qiagen, Congen, Bioteccon und Bio-Rad an der Oberfläche ab und musste entfernt werden.

5.2.1.3 Stilles Mineralwasser

Die DNA von 5×10^4 KbE *B. abortus* 1119-3 pro ml wurde mit der PCR in 6/6 Proben sowohl nach Verwendung des QIAamp DNA Mini Kit als auch der auf Lysepuffern basierenden Kits von Bio-Rad und Bioteccon nachgewiesen. Congen lag mit positiven 5/6

Proben knapp dahinter, während die Phenol-Chloroform-Extraktion und der ZR Fecal DNA Kit mit 3/6 bzw. 4/6 positiven Proben weniger sensitiv waren. Die geringste Brucellen-Konzentration (5×10^1 KbE/ml) konnte mittels QIAamp DNA Mini Kit aus 6/6 Proben nachgewiesen werden. Mit InstaGene Matrix wurde in 4/6 Proben *Brucella*-DNA mit der PCR detektiert (siehe Tabelle 5-1).

5.2.1.4 Physiologische Kochsalzlösung

Bei der physiologischen Kochsalzlösung war im Vergleich zur Matrix Mineralwasser durch die fünf getesteten Kits extrahierte Brucellen-DNA in weniger Proben nachweisbar. Auch bei dieser Matrix konnte DNA mit der geringsten Brucellen-Konzentration von 5×10^1 KbE/ml in 5/6 Proben am häufigsten nach Extraktion mittels QIAamp DNA Mini Kit nachgewiesen werden (siehe Tabelle 5-1 und Abbildung 5-7).

Zusammenfassend wurde die größte Sensitivität bei der Extraktion von *Brucella*-DNA mit dem QIAamp DNA Mini Kit von Qiagen bei stillem Mineralwasser, physiologischer Kochsalzlösung und Rohmilch erreicht. Die Phenol-Chloroform-Extraktion nach Romero und Lopez-Goni (1999) zeigte sich bei Rohmilch und Joghurt am sensitivsten.

Die bisher untersuchten Matrices sowie Camembert und Ziegenfrischkäse wurden anschließend mit *B. abortus* 1119-3 inokuliert, woraus 10er-Verdünnungsstufen von 5×10^4 bis 5×10^0 KbE *B. abortus* 1119-3 pro ml erstellt wurden. Die beiden genannten DNA-Extraktionsmethoden wurden auf diese Proben angewandt, um die Nachweisgrenze von *Brucella*-DNA zu ermitteln.

5.2.2 Nachweisgrenzen der ausgewählten Tests zur Extraktion von DNA aus Brucellen in Rohmilch, Joghurt, stillem Mineralwasser, physiologischer Kochsalzlösung sowie in Camembert und Ziegenfrischkäse

In den weiteren Untersuchungen wurde *Brucella*-DNA nur noch mittels Phenol-Chloroform-Extraktion bzw. mittels QIAamp DNA Mini Kit extrahiert. Aufgrund unterschiedlicher Viskosität mussten einige Matrices verdünnt werden. Beim Zurückrechnen auf die effektive Zellzahl pro Milliliter bzw. pro Gramm entstanden daher unterschiedliche *Brucella*-Konzentrationen (siehe Tabelle 5-2). DNA aus 5×10^4 KbE/ml wurde in allen Fällen komplett extrahiert, wohingegen bei 5×10^3 KbE/ml in Mineralwasser und physiologischer Kochsalzlösung im Falle der Phenol-Chloroform-Extraktion der Anteil bei 5/6 lag.

Tabelle 5-2: Ergebnisse der *bcs31*-PCR nach DNA-Extraktion mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und QIAamp DNA Mini Kit aus den 10er-Verdünnungsstufen 5×10^4 bis 5×10^0 bzw. 5×10^5 bis 5×10^1 KbE *B. abortus* 1119-3 pro ml.

		<i>Brucella</i> -Konzentration [KbE/ml] ^{a)}				
DNA-Extraktion nach		5×10^4	5×10^3	5×10^2	5×10^1	5×10^0
ROHMILCH	Phenol-Chloroform-Extraktion	6/6	6/6	6/6	5/6	1/6
	QIAamp DNA Mini Kit	6/6	6/6	5/6	4/6	0/6
STILLES	Phenol-Chloroform-Extraktion	6/6	5/6	3/6	0/6	0/6
MINERALWASSER	QIAamp DNA Mini Kit	6/6	6/6	5/6	5/6	3/6
PHYSIOLOGISCHE	Phenol-Chloroform-Extraktion	6/6	5/6	0/6	0/6	0/6
KOCHSALZLÖSUNG	QIAamp DNA Mini Kit	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6
		1×10^5	1×10^4	1×10^3	1×10^2	1×10^1
JOGHURT [†]	Phenol-Chloroform-Extraktion	6/6	6/6	6/6	6/6	3/6
	QIAamp DNA Mini Kit	6/6	6/6	4/6	1/6	0/6

^{a)} Anzahl der Proben, in denen DNA von *B. abortus* 1119-3 aus der angegebenen Zellzahl pro ml extrahiert werden konnte, detektiert mittels *bcs31*-PCR und Agarosegel; [†] – Joghurt wurde 1:1 verdünnt, so dass sich hierfür doppelt so hohe Nachweisraten ergeben.

In Rohmilch erwies sich die Methode nach Romero und Lopez-Goni (1999) als geringfügig sensitiver, da hier mit der PCR nachweisbare DNA von 5×10^1 KbE/ml in 5/6 Proben (Qiagen: 4/6) und von 5×10^0 KbE/ml in 1/6 Proben (Qiagen: 0/6) extrahiert wurde. Eine etwas höhere Sensitivität wurde bei der Phenol-Chloroform-Extraktion in Joghurt erreicht, wo DNA von 1×10^2 KbE/ml in 6/6 Proben und von 1×10^1 KbE/ml in 3/6 Proben nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 5-8). Die Ergebnisse für den QIAamp DNA Mini Kit lagen mit 4/6, 1/6 bzw. 0/6 Proben darunter (siehe Tabelle 5-2).

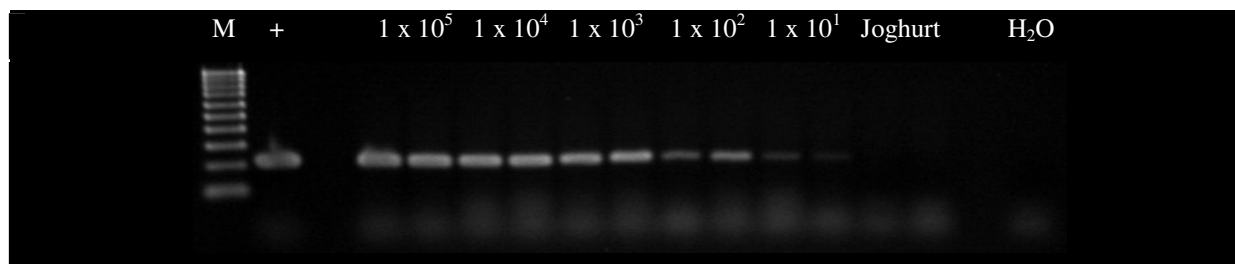


Abbildung 5-8: *Bcs31*-Amplifikat nach Extraktion von *Brucella*-DNA aus Joghurt mittels Phenol-Chloroform-Extraktion; M – Marker (100-1.000 bp); + – Positivkontrolle, H₂O – PCR-Negativkontrolle.

Umgekehrt verhielt es sich mit den wässrigen Medien. In stillem Mineralwasser wurde die DNA von 5×10^2 KbE/ml mittels Phenol-Chloroform-Extraktion in 3/6 und in physiologischer Kochsalzlösung in 0/6 Proben nachgewiesen. Der von der Firma Qiagen verwendete Kit konnte die DNA in Mineralwasser sowohl von 5×10^2 KbE/ml als auch von 5×10^1 KbE/ml in 5/6 Fällen extrahieren und zeigte bei der geringsten Konzentration mit 5 Brucellen in 3/6 Proben eine positive PCR. In physiologischer Kochsalzlösung wurde durch diesen Kit *Brucella*-DNA bis zu einer Konzentration von 5×10^1 KbE/ml in 6/6 Proben nachgewiesen (siehe Tabelle 5-2).

Wie die Ergebnisse zeigen, wurde *Brucella*-DNA in wässrigen Medien (stilles Mineralwasser und physiologische Kochsalzlösung) am sensitivsten mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kits (Qiagen) extrahiert, wohingegen die Phenol-Chloroform-Extraktion für den Nachweis in Joghurt und Rohmilch am besten geeignet war.

Aufgrund der Eignung der Extraktion nach Romero und Lopez-Goni (1999) für Milchprodukte wurde diese Methode ebenfalls für die Extraktion von *Brucella*-DNA aus Camembert und Ziegenfrischkäse verwendet. Der Vorteil ist, dass keine Säule benötigt wird, die durch Partikel aus der Matrix verstopft werden könnte. Allerdings war es erforderlich, die kontaminierten Käse 1:5 mit dH₂O zu verdünnen. Der Nachweis von Brucellen in Camembert gelang in 6/6 Fällen bei einer Konzentration von 5×10^3 KbE/g und in 5/6 Fällen bei der nächstniedrigeren Verdünnungsstufe (siehe Tabelle 5-3). In der Hälfte der durchgeführten Extraktionen konnte die DNA von 5×10^1 KbE *B. abortus* 1119-3 pro Gramm extrahiert werden. In Ziegenfrischkäse war die Nachweisrate geringer. Hier konnte *Brucella*-DNA in 5/6 Fällen von 5×10^3 KbE/g und in 4/6 Fällen von 5×10^2 KbE/g detektiert werden.

Tabelle 5-3: Ergebnisse der *bcs31*-PCR nach DNA-Extraktion mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aus den 10er-Verdünnungsstufen 5×10^3 bis 5×10^0 KbE *B. abortus* 1119-3 pro g Käse.

DNA-Extraktion nach		<i>Brucella</i> -Konzentration [KbE/g] ^{a)}			
		5×10^3	5×10^2	5×10^1	5×10^0
Camembert	Phenol-Chloroform-Extraktion	6/6	5/6	3/6	1/6
Ziegenfrischkäse	Phenol-Chloroform-Extraktion	5/6	4/6	0/6	0/6

^{a)} Anzahl der Proben, in denen DNA von *B. abortus* 1119-3 aus der angegebenen Zellzahl pro g extrahiert und mittels *bcs31*-PCR sowie Agarosegel detektiert wurde.

5.3 Nachweis von *Brucella*-DNA mittels Real-Time PCR

Die in den DNA-Extraktionsversuchen extrahierte DNA wurde nicht nur mittels klassischer *bcs31*-PCR sondern auch mittels *bcs31*-Real-Time PCR nachgewiesen. Diese hat neben der Zeitersparnis, die durch den Wegfall des Nachweises mittels Agarosegel entsteht, den Vorteil, dass sich über eine Standard-Verdünnungsreihe aus *Brucella*-DNA (siehe Abbildung 5-9) die Zahl der *Brucella*-Genomkopien in den Lebensmittel-Extrakten quantifizieren lässt.

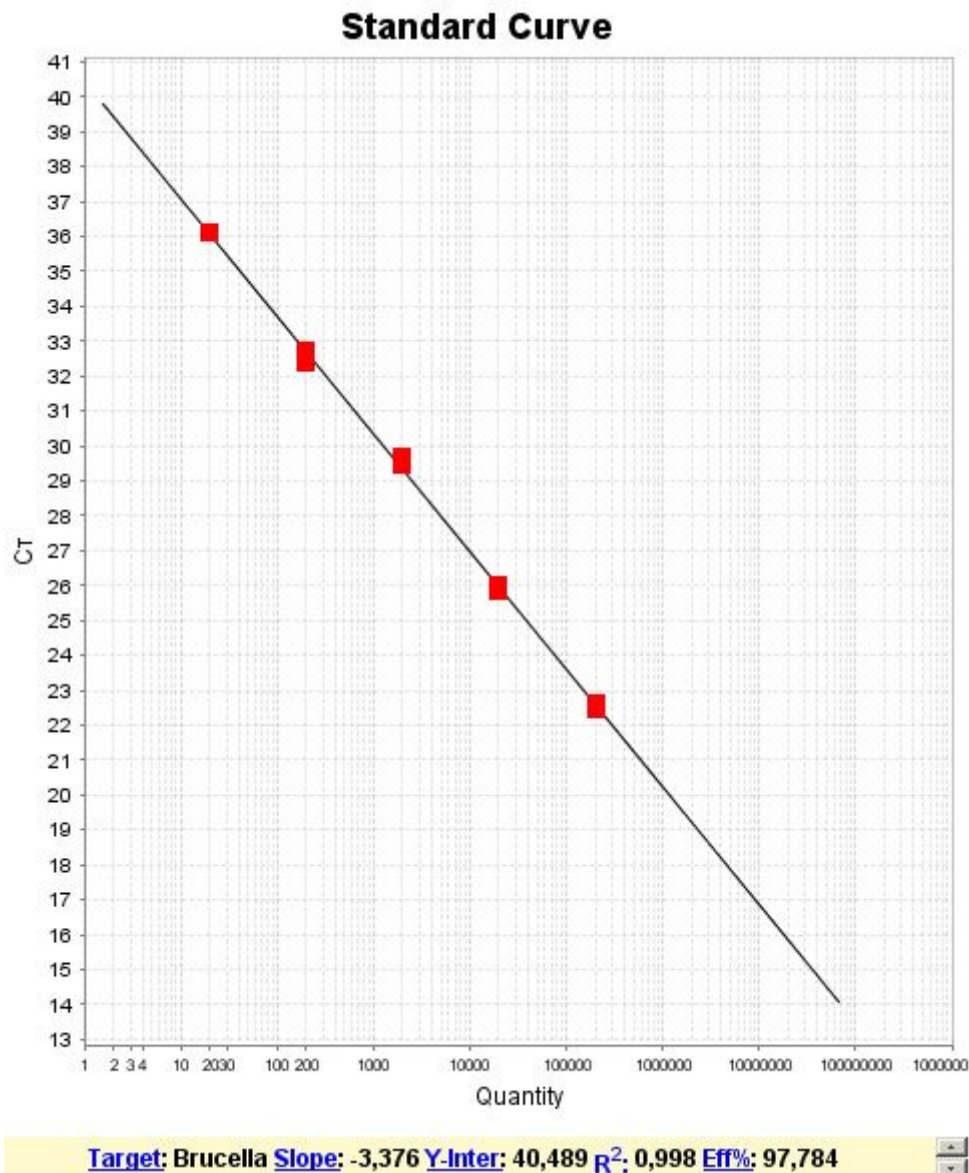


Abbildung 5-9: Standardkurve aus 1:10-Verdünnungen von *Brucella*-DNA nach der Untersuchung mittels *bcs31*-Real-Time PCR.

Anhand des Standards, der eine bekannte Menge *Brucella*-DNA enthielt, wurde mittels Regressionsgerade (siehe Abbildung 5-9) anhand der C_T-Werte der Joghurtproben die darin

enthaltene DNA-Menge in Femtogramm berechnet. Zur Berechnung der Genomäquivalente wurde zunächst das Gewicht eines *Brucella*-Genoms bestimmt (siehe Tabelle 5-4).

Tabelle 5-4: Berechnung des Genomgewichtes von Brucellen

Locus ¹⁾	Spezies	Genomgröße ²⁾	Genomgewicht ³⁾
NC 010742, NC 010740	<i>B. abortus</i> S19	3283936 nt	3,37 fg
NC 007618, NC 007624	<i>B. abortus</i> 2308	3278309 nt	3,36 fg
NC 006932, NC 006933	<i>B. abortus</i> 9-941	3286445 nt	3,37 fg
NC 003317, NC 003318	<i>B. melitensis</i> 16M	3294931 nt	3,38 fg
NC 010169, NC 010167	<i>B. suis</i> ATCC 23445	3324607 nt	3,41 fg
NC 004310, NC 004311	<i>B. suis</i> 1330	3315173 nt	3,40 fg
NZ ACBK00000000	<i>B. suis</i> 513	3286636 nt	3,37 fg
NZ ACBL00000000	<i>B. suis</i> 686	3267342 nt	3,35 fg
NC 013119, NC 013118	<i>B. microti</i> CCM 4915	3337369 nt	3,42 fg
Mittelwert der Genomgewichte aller <i>Brucella</i>-Spezies			3,38 fg
Mittelwert der Genomgewichte von <i>B. abortus</i>			3,37 fg

¹⁾ NCBI-Locus-Nummer; ²⁾ Summe der Nukleotide beider *Brucella*-Chromosome; ³⁾ Berechnung des Gewichts anhand der Nukleotide mit einem Online-Rechner (<http://www.changbioscience.com/genetics/mw.html>) unter Angabe der Sequenzlänge (Option: „double stranded DNA 5'-NH₂...OH-3'“) mit anschließender Umrechnung von Dalton in fg.

Laut dieser Übersicht über einige *Brucella*-Genome haben diese gattungsübergreifend ein Gewicht von 3,38 fg. Da die Versuche zur DNA-Extraktion mit *B. abortus* durchgeführt wurden, ist das mittlere Genomgewicht dieser Spezies (3,37 fg) als Berechnungsgrundlage der Genomäquivalente verwendet worden. Anhand der Extrapolation des eingesetzten DNA-Volumens (5 µl pro Real-Time PCR-Probe) auf das gesamte Elutionsvolumen der DNA-Extraktion wurde die Menge an Genomäquivalenten nach der DNA-Extraktion berechnet.

Die Ergebnisse des Vergleiches von klassischer und Real-Time PCR zum Nachweis von *Brucella*-DNA aus Mineralwasser, Kochsalzlösung, Rohmilch und Joghurt wurden im Folgenden am Beispiel Joghurt dargestellt (siehe Abbildung 5-10).

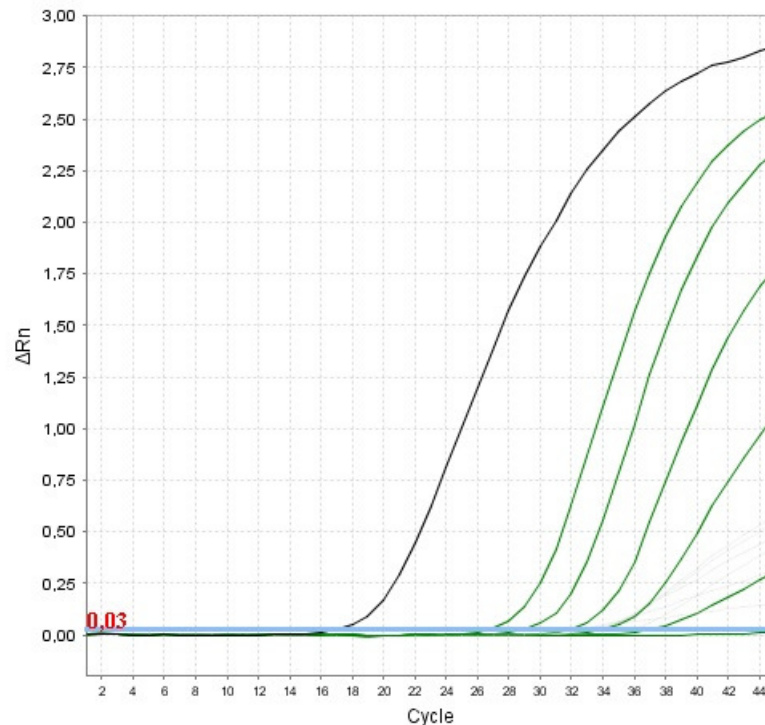


Abbildung 5-10: Amplifikation von *Brucella*-DNA nach Extraktion aus Brucellen in Joghurt (grün) bzw. in Wasser (schwarz; Positivkontrolle mit 5×10^7 KbE/ml); Threshold: 0,03.

Wie aus Tabelle 5-5 ersichtlich ist, überstieg das Signal der internen Kontrolle (Lambda-DNA) zwischen Zyklus 31,0 und 32,8 den Schwellenwert. Bei der *Brucella*-DNA variierten die C_T -Werte je nach Probe zwischen 17,6 beim Einsatz von 10 ng Standard-DNA und 36,2 bei Joghurt-Proben, die nur fünf Brucellen enthalten hatten (siehe Tabelle 5-5). Auffällig ist, dass Negativ-Proben, die in der klassischen PCR negativ gewesen waren, in der Real-Time PCR positiv waren – wenn auch nur mit C_T -Werten oberhalb von 37,0.

Vergleicht man die errechneten Genomäquivalente mit den eingesetzten Inokula (siehe Tabelle 5-5, Spalte 1), fällt auf, dass die Zahlen bis zu einer Konzentration von 1×10^2 KbE/ml gut übereinstimmen. Für darunter liegende Konzentrationen wurden mittels Real-Time PCR mehr Genomäquivalente ermittelt als tatsächlich Bakterien eingesetzt worden waren bzw. wurde in der Matrix-Negativkontrolle keine *Brucella*-DNA erwartet. Dies war im Falle der Real-Time PCR bei den Matrices Rohmilch, stilles Mineralwasser, Joghurt und Camembert der Fall. Mit der klassischen PCR kamen falsch-positive Proben zwar auch vor, jedoch nur in Ausnahmefällen.

Die Tabellen mit den Ergebnissen aus der Real-Time PCR zu den übrigen Matrices sind im Anhang zu finden (siehe Tabelle 9-1 bis Tabelle 9-9).

Tabelle 5-5: Ergebnisse der *bcs31*-Real-Time PCR im Anschluss an die Extraktion von *Brucella*-DNA aus Joghurt mittels Phenol-Chloroform-Extraktion.

Brucellen [KbE/ml] ¹⁾	C_T Lambda T: 0,0151 ²⁾	C_T <i>Brucella</i> T: 0,0119 ²⁾	<i>Brucella</i>- DNA [fg]	<i>Brucella</i>- GÄ ³⁾	GÄ in Elution ⁴⁾	qPCR ⁵⁾	PCR ⁶⁾
1 x 10 ⁵	31,03	26,25	50.567	15.005	7,50 x 10 ⁴	6/6	6/6
1 x 10 ⁴	31,74	29,35	7.600	2.255	1,13 x 10 ⁴	6/6	6/6
1 x 10 ³	32,26	32,28	1.269	377	1,88 x 10 ³	6/6	6/6
1 x 10 ²	32,11	34,91	249	74	3,70 x 10 ²	6/6	6/6
1 x 10 ¹	32,79	36,16	93	28	1,39 x 10 ²	6/6	3/6
0	32,45	37,46	69	21	1,04 x 10 ²	6/6	1/6
H ₂ O	32,09						
Standard		17,62	10.000.000				
Standard	27,95	21,71	1.000.000				
Standard	30,13	24,78	100.000				
Standard	31,36	28,81	10.000				
Standard	31,02	32,04	1.000				
Standard	32,10	36,20	100				

¹⁾ KbE *Brucella abortus* 1119-3 pro ml physiologischer Kochsalzlösung; ²⁾ Mittelwert aus n Proben (siehe Spalte „qPCR“); ³⁾ ein *Brucella abortus*-Genomäquivalent (GÄ) entspricht 3,37 fg; ⁴⁾ anhand des in der DNA-Extraktion eingesetzten Elutionsvolumens berechnete Menge an extrahierter *Brucella*-DNA; ⁵⁾ Anzahl der *Brucella*-positiven Proben beim Nachweis mittels *bcs31*-Real-Time PCR; ⁶⁾ Anzahl der *Brucella*-positiven Proben beim Nachweis mittels klassischer *bcs31*-PCR und Agarosegel.

Mittels *bcs31*-Real-Time PCR konnten für die drei höchsten Brucellen-Konzentrationen (das heißt 5 x 10⁴ bis 5 x 10² KbE/ml bei NaCl, Rohmilch und Mineralwasser, 1 x 10⁵ bis 1 x 10³ KbE/ml bei Joghurt und 5 x 10³ bis 5 x 10¹ KbE/ml bei Camembert) so viele *Brucella*-positive Proben detektiert werden wie mittels klassischer *bcs31*-PCR. Die Ergebnisse in waren für diese Bakterien-Konzentrationen vergleichbar. Die Real-Time PCR übertraf die klassische PCR bei den Phenol-Chloroform-Extraktionen aus physiologischer Kochsalzlösung und Camembert sowie bei den DNA-Extraktionen mittels QIAamp DNA Mini Kit aus Rohmilch und Joghurt.

Für Camembert war die Nachweisrate im Vergleich zum Ziegenfrischkäse besser. Aus letzterem konnte mittels klassischer PCR in 4/6 Fällen *Brucella*-DNA aus 5 x 10² KbE/ml nachgewiesen werden, wohingegen die Real-Time PCR aus der gleichen DNA-Probe ab dieser Bakterien-Konzentration keinen Nachweis mehr erbrachte (siehe Tabelle 5-6).

Tabelle 5-6: Übersicht über die Ergebnisse zur Detektion von *Brucella*-DNA aus Lebensmitteln mittels *bcs31*-Real-Time PCR bzw. klassischer *bcs31*-PCR in Abhängigkeit von der vorhergehenden DNA-Extraktionsmethode.

Matrix	<i>Brucella</i> -Konzentration [KbE/ml] bzw. [KbE/g] ¹⁾	Phenol-Chloroform-Extraktion		QIAamp DNA Mini Kit	
		qPCR ²⁾	PCR ³⁾	qPCR ²⁾	PCR ³⁾
Rohmilch	5×10^4	6/6	6/6	6/6	6/6
	5×10^3	6/6	6/6	6/6	6/6
	5×10^2	6/6	6/6	6/6	5/6
	5×10^1	4/6	5/6	6/6	4/6
	5×10^0	3/6	1/6	4/6	0/6
Stilles Mineralwasser	0	5/6	0/6	4/6	0/6
	5×10^4	6/6	6/6	6/6	6/6
	5×10^3	5/6	5/6	5/6	6/6
	5×10^2	3/6	3/6	6/6	5/6
	5×10^1	3/6	0/6	6/6	5/6
Joghurt	5×10^0	3/6	0/6	2/6	3/6
	0	4/6	0/6	3/6	0/6
	1×10^5	6/6	6/6	6/6	6/6
	1×10^4	6/6	6/6	6/6	6/6
	1×10^3	6/6	6/6	6/6	4/6
Camembert	1×10^2	6/6	6/6	5/6	1/6
	1×10^1	6/6	3/6	6/6	0/6
	0	6/6	1/6	3/6	0/6
	5×10^3	6/6	6/6	- ⁴⁾	-
	5×10^2	5/6	5/6	-	-
Ziegenfrischkäse	5×10^1	4/6	3/6	-	-
	5×10^0	6/6	1/6	-	-
	0	4/6	3/6	-	-
	5×10^3	3/6	5/6	- ⁴⁾	-
	5×10^2	0/6	4/6	-	-
Ziegenfrischkäse	5×10^1	0/6	0/6	-	-
	5×10^0	0/6	0/6	-	-
	0	0/6	0/6	-	-

¹⁾ KbE *Brucella abortus* 1119-3 pro ml bzw. pro g Matrix; ²⁾ Anzahl der *Brucella*-positiven Proben beim Nachweis mittels *bcs31*-Real-Time PCR; ³⁾ Anzahl der *Brucella*-positiven Proben beim Nachweis mittels klassischer *bcs31*-PCR und Agarosegel; ⁴⁾ aufgrund der in Camembert und Ziegenfrischkäse enthaltenen nicht löslichen Bestandteile konnte eine säulenbasierte DNA-Extraktionsmethode nicht verwendet werden, da der Filter in der Säule sofort verstopfen würde.

5.4 Immunomagnetische Separation

5.4.1 Bestimmung der Serum- bzw. der Antikörper-Verdünnung

Mit dem Ziel, die Nachweisgrenzen für *Brucella*-DNA im Vergleich zu den Ergebnissen aus den DNA-Extraktions-Versuchen zu optimieren, wurde die immunomagnetische Separation (IMS) für die Voranreicherung und Aufreinigung der DNA untersucht. Zur Ermittlung der für die Beschichtung der Partikel benötigten Menge an Brucellose-Kontrollserum wurden Verdünnungen von 1:10 bis 1:1.000 untersucht. Dabei konnten 5×10^3 KbE *B. abortus* 1119-3 pro 500- μ l-Ansatz bis zu einer Verdünnung des Serums auf 1:100 in allen Ansätzen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5-11).

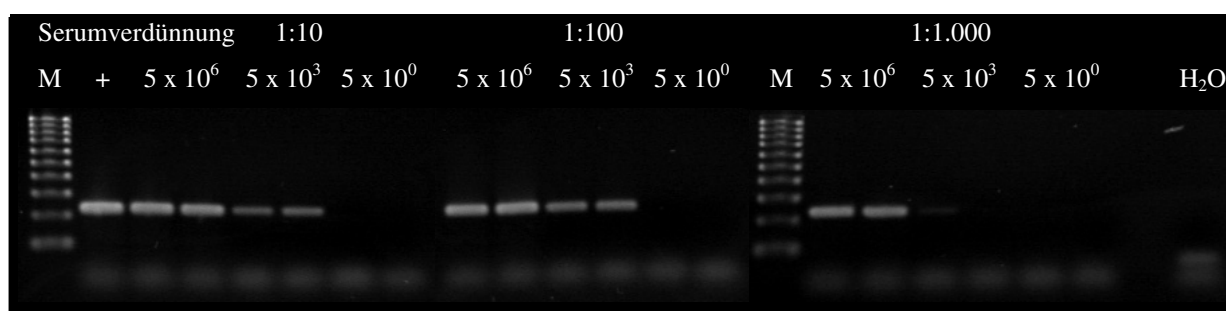


Abbildung 5-11: In der *bcs31*-PCR nachweisbare *Brucella*-Zellzahlen pro 500- μ l-Ansatz nach der IMS unter Verwendung unterschiedlicher Serumverdünnungen; M – Marker (100-1.000 bp), + – PCR-Positivkontrolle, H₂O – PCR-Negativkontrolle.

Vom monoklonalen anti-*Brucella*-Antikörper wurden 2,04 μ g, 20,4 μ g und 54,4 μ g pro Ansatz eingesetzt. Bei der mittleren Verdünnungsstufe (20,4 μ g) konnten dabei bis zu 5×10^1 KbE/Ansatz nachgewiesen werden, erkennbar an zwei schwachen Banden (siehe Abbildung 5-12).

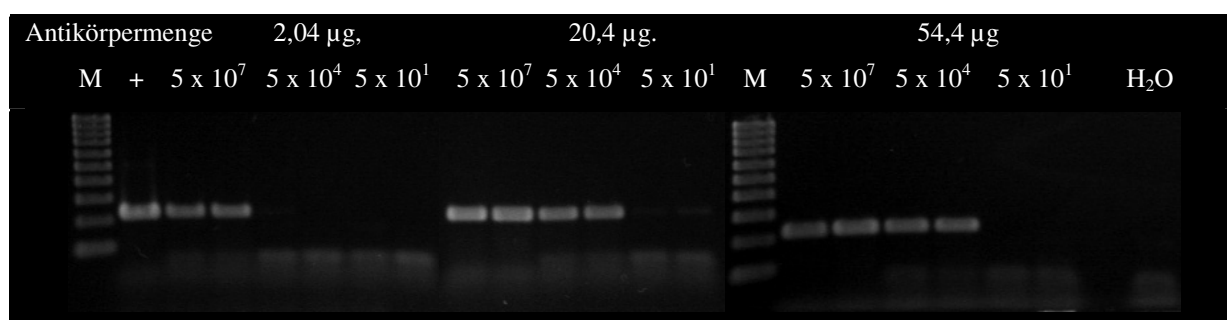


Abbildung 5-12: In der *bcs31*-PCR nachweisbare *Brucella*-Zellzahlen pro 500- μ l-Ansatz nach der IMS unter Verwendung unterschiedlicher Mengen des monoklonalen anti-*Brucella*-Antikörpers; M – Marker (100-1.000 bp), + – PCR-Positivkontrolle, H₂O – PCR-Negativkontrolle.

Die hier ermittelte optimale Serumverdünnung von 1:100 bzw. die Antikörperkonzentrationen von 20,4 μ g wurde für alle folgenden IMS eingesetzt.

5.4.2 Sensitivität der immunomagnetischen Separation

Die Nachweisraten von inaktivierten Brucellen lagen in drei unabhängigen Versuchen mit Doppelbestimmungen und bei Verdünnungsstufen zwischen 5×10^4 und 5×10^0 KbE/500 μ l für die mit Vollserum beschichteten magnetischen Partikel bei 5×10^2 KbE pro 500- μ l-Ansatz (siehe Abbildung 5-13).

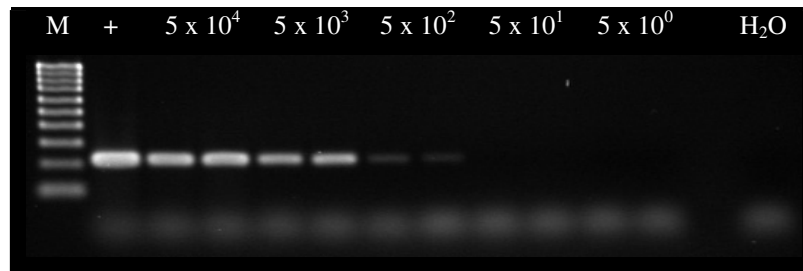


Abbildung 5-13: In der *bcs31*-PCR nachweisbare *Brucella*-Zellzahlen pro 500- μ l-Ansatz nach der IMS unter Verwendung von mit Vollserum beschichteten Partikeln; M – Marker (100-1.000 bp), + – PCR-Positivkontrolle, H₂O – PCR-Negativkontrolle.

Bei einer Verdopplung des Probenvolumens auf 1.000 μ l waren die *Brucella*-spezifischen Banden bei 5×10^2 KbE/Ansatz minimal schwächer (siehe Abbildung 5-14). Gelegentlich konnten bei einem Probenvolumen von 500 μ l auch 5×10^1 KbE/Ansatz nachgewiesen werden, was im 1.000 μ l-Ansatz nicht der Fall war.

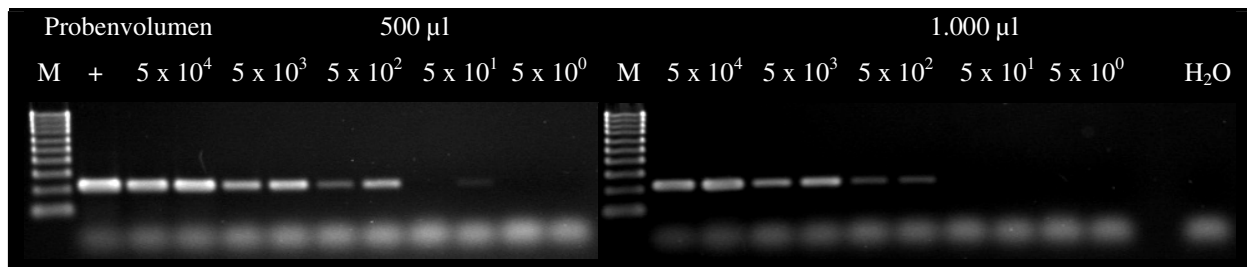


Abbildung 5-14: In der *bcs31*-PCR nachweisbare *Brucella*-Zellzahlen nach der IMS unter Verwendung von mit Vollserum beschichteten Partikeln bei 500 μ l und 1.000 μ l Probenvolumen; M – Marker (100-1.000 bp), + – PCR-Positivkontrolle, H₂O – PCR-Negativkontrolle.

Aufgrund der langen Inkubationszeit von jeweils 24 h – sowohl für das Beschichten der magnetischen Partikel mit Antikörpern als auch für das Blocken mittels Tris/BSA-Puffer (Puffer D) – wurde nach einer Möglichkeit zur Verkürzung der Zeit für die Vorbereitung der Partikel gesucht. Statt das Blocken über 24 h bei 20 °C durchzuführen, wurde die Sensitivität nach vierstündigem Blocken bei 37 °C untersucht. Wie Abbildung 5-15 zeigt, ist der Nachweis von 5×10^2 KbE pro 500- μ l-Ansatz bei der bisher durchgeführten einstündigen Inkubation mit Brucellen nur in einem der Ansätze erfolgt, wogegen nach anderthalb Stunden beide Banden bei dieser Verdünnungsstufe schwach sichtbar sind.

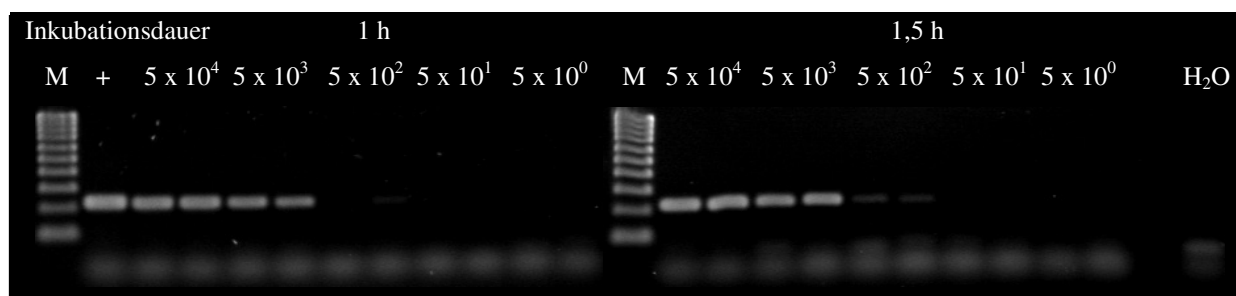


Abbildung 5-15: In der *bcs31*-PCR nachweisbare *Brucella*-Zellzahlen pro 500- μ l-Ansatz an mit Vollserum beschichteten Partikeln bei einer Inkubationsdauer von 1 h bzw. 1,5 h; M – Marker (100-1.000 bp), + – PCR-Positivkontrolle, H₂O – PCR-Negativkontrolle.

Aufgrund der höheren Sensitivität bei 500 μ l Probenvolumen und der kürzeren Präparationsdauer im Falle einer Inkubation für 1,5 h und dem 4stündigen Blocken bei 37 °C wurden diese Änderungen in das Protokoll zur IMS von Brucellen aus Lebensmitteln aufgenommen. Unter diesen Versuchsbedingungen lag die Sensitivität der immunomagnetischen Partikel, die mit monoklonalem anti-*Brucella*-Antikörper beschichtet wurden, ebenfalls bei 500 KbE pro 500- μ l-Ansatz (Gelbild nicht gezeigt).

Nachfolgend sollte ermittelt werden, ob durch eine Erhöhung der Inkubationstemperatur bei der Bindung von Brucellen an die beschichteten Partikel eine Verbesserung der Sensitivität erreicht werden kann (siehe Abbildung 5-16).

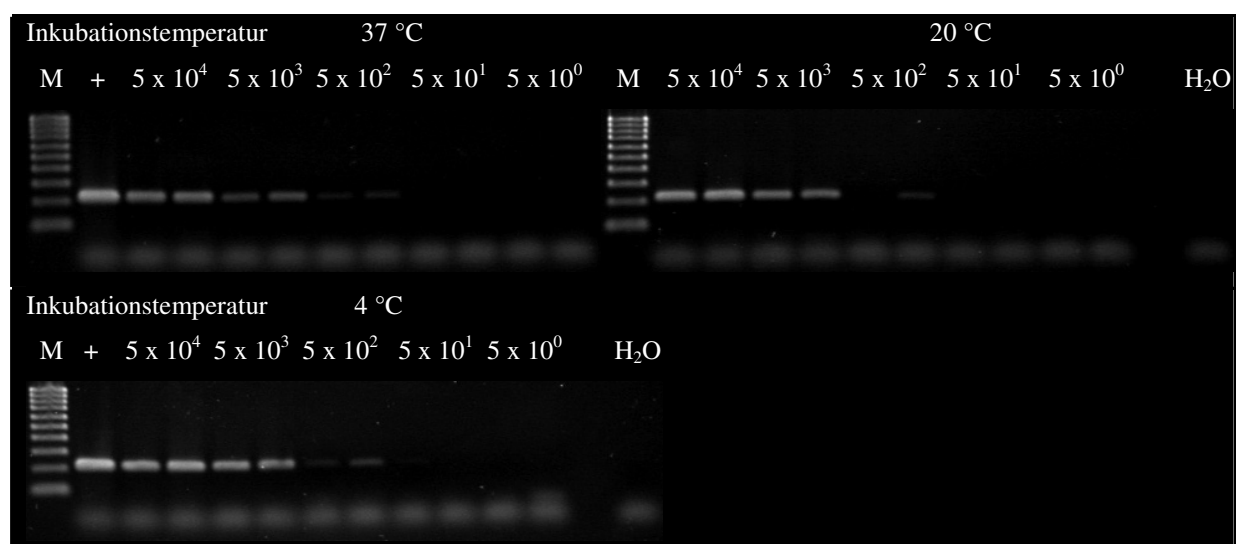


Abbildung 5-16: In der *bcs31*-PCR nachweisbare *Brucella*-Zellzahlen pro 500- μ l-Ansatz an mit Vollserum beschichteten Partikeln bei Inkubationstemperaturen von 37 °C, 20 °C bzw. 4 °C; M – Marker (100-1.000 bp), + – PCR-Positivkontrolle, H₂O – PCR-Negativkontrolle.

Zwar konnten auch bei 37 °C 5 x 10² KbE/Ansatz detektiert werden, jedoch trat hier die bei 4 °C vereinzelt auftretende schwache Bande bei 5 x 10¹ KbE/Ansatz nicht auf. Eine höhere

Inkubationstemperatur bewirkte demnach keine bessere Bindung der Bakterien an die magnetischen Partikel, weshalb weiterhin bei 4 °C inkubiert wurde.

Die dargestellten Gelbilder sind stets ein Kombinationsergebnis aus IMS, DNA-Extraktion, *bcs31*-PCR und Agarosegel. Daher wurde untersucht, ob eine Erhöhung der Sensitivität durch einen Wechsel der DNA-Extraktionsmethode erreicht werden kann. Unter Verwendung des QIAamp DNA Mini Kits (Qiagen) konnten zwar intensivere Banden als bei der Verwendung des StarPrep One Kits (Biotecon) gezeigt werden, jedoch keine höhere Sensitivität (siehe Abbildung 5-17). Aufgrund der viel kürzeren Bearbeitungszeit (StarPrep One Kit: 20 min, QIAamp DNA Mini Kit: 3 h) wurde entschieden, den StarPrep One Kit (Biotecon) zu verwenden.

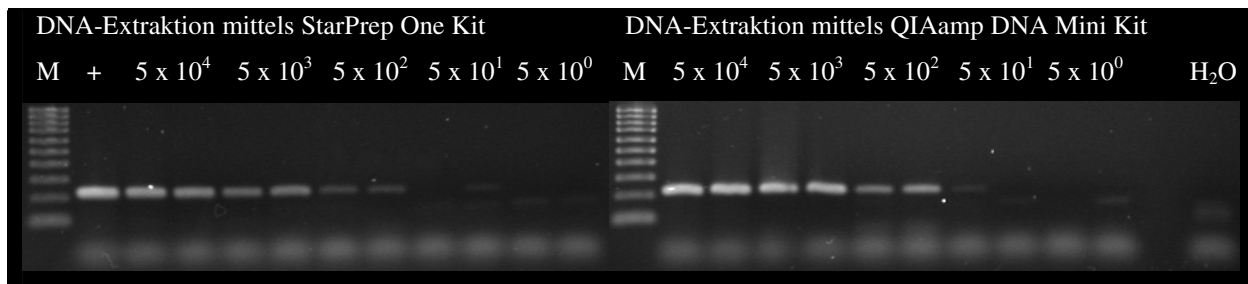


Abbildung 5-17: Einfluss der DNA-Extraktionsmethode im Anschluss an die IMS auf die Nachweisbarkeit von Brucellen in der *bcs31*-PCR; M – Marker (100-1.000 bp), + – PCR-Positivkontrolle, H₂O – PCR-Negativkontrolle.

Nach der Untersuchung der unterschiedlichen Variablen für die IMS wurden die Ergebnisse zu einem Protokoll zusammengefasst (siehe Abschnitt 4.3.3), aufgrund dessen die Spezifität und Wiederfindungsrate in Natriumphosphatpuffer (Puffer C) für die eingesetzten Brucellen-Konzentrationen mittels immunomagnetischer Partikel ermittelt wurden.

5.4.3 Wiederfindungsrate und Spezifität

Die Wiederfindungsrate wurde als Anteil der immobilisierten Bakterien an der Gesamtzahl der auf Nähragar nachgewiesenen Bakterien (immobilisierte plus freie Bakterien im Überstand) berechnet (Fisher et al., 2009) und ist ein Maß für die Zuverlässigkeit der IMS. Eine Wiederfindungsrate von 50 % bedeutet, dass die Hälfte der in der Matrix befindlichen Bakterien immobilisiert wurde.

Die Wiederfindungsraten von Bakterien in Natriumphosphatpuffer (Puffer C) nach der IMS mittels Brucellose-Kontrollserum bzw. mittels kommerziellen monoklonalen Antikörpers

unterschieden sich sowohl in der maximalen Rate als auch in der Verteilung der höchsten Werte über alle Verdünnungsstufen (siehe Tabelle 5-7 und Tabelle 5-8).

Bei Verwendung des Brucellose-Kontrollserums lag die höchste Wiederfindungsrate von Brucellen bei 81,9 %, wobei $2,02 \times 10^5$ KbE *B. abortus* 1119-3 im 500- μ l-Ansatz auf den immunomagnetischen Partikeln nachgewiesen wurden. Bei einem zehnfach höheren Inokulum war die Wiederfindungsrate mit 77,8 % ähnlich hoch. Ober- und unterhalb dieser Verdünnungsstufen nahmen die Wiederfindungsraten ab. Wurden unbehandelte magnetische Partikel verwendet, konnten diese $4,98 \times 10^4$ KbE *B. abortus* 1119-3 immobilisieren, was fünf Log-Stufen geringer als das Inokulum von $4,68 \times 10^9$ KbE pro 500- μ l-Ansatz war. Bei der Inkubation mit *O. intermedium* wurden durch die mit Brucellose-Kontrollserum vorbehandelten Partikel 1,4 % der eingesetzten Bakterien isoliert (siehe Tabelle 5-7).

Tabelle 5-7: Wiederfindungsraten von *B. abortus* 1119-3, *O. intermedium* und *Y. enterocolitica* O:9 auf immunomagnetischen, mit Brucellose-Kontrollserum beschichteten Partikeln.

Probe	Inokulum	Summe Bakterien auf imPs	Summe Bakterien im Überstand	Summe imPs + Überstände	Wieder- findungsrate ¹⁾
<i>B. abortus</i> 1119-3	$4,68 \times 10^9$	$1,34 \times 10^8$	$3,41 \times 10^9$	$3,54 \times 10^9$	3,8 %
	$4,68 \times 10^8$	$9,50 \times 10^7$	$1,93 \times 10^8$	$2,88 \times 10^8$	33,0 %
	$4,68 \times 10^7$	$1,35 \times 10^7$	$1,30 \times 10^7$	$2,65 \times 10^7$	50,9 %
	$4,68 \times 10^6$	$2,09 \times 10^6$	$5,98 \times 10^5$	$2,69 \times 10^6$	77,8 %
	$4,68 \times 10^5$	$2,02 \times 10^5$	$4,45 \times 10^4$	$2,47 \times 10^5$	81,9 %
	$4,68 \times 10^4$	$9,82 \times 10^3$	$9,66 \times 10^3$	$1,95 \times 10^4$	50,4 %
	$4,68 \times 10^3$	$1,25 \times 10^3$	$1,02 \times 10^3$	$2,27 \times 10^3$	55,0 %
	$4,68 \times 10^2$	$1,36 \times 10^1$	$1,59 \times 10^1$	$2,95 \times 10^1$	46,2 %
<i>B. abortus</i> 1119-3, unbeschichtete Partikel	$4,68 \times 10^9$	$4,98 \times 10^4$	$4,61 \times 10^9$	$4,61 \times 10^9$	0,0 %
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	$9,57 \times 10^8$	$1,30 \times 10^7$	$9,23 \times 10^8$	$9,36 \times 10^8$	1,4 %

imPs – immunomagnetische Partikel; Ü – Überstand; angegebene Zahlen sind KbE pro 500- μ l-Ansatz; ¹⁾ KbE auf imPs/(KbE auf imPs + KbE im Überstand).

Bei Verwendung des kommerziell erhältlichen monoklonalen anti-*Brucella*-Antikörpers waren die Ergebnisse für die besten Wiederfindungsraten von Brucellen auf den immunomagnetischen Partikeln breiter über die verschiedenen Testverdünnungen verteilt, wobei der höchste Wert bei 52,1 % lag. Zum Test der Bindung von Brucellen an unbeschichtete magnetische Partikel wurden in diesem Versuch $1,64 \times 10^6$ KbE pro 500- μ l-Ansatz eingesetzt, wobei weniger als fünf Zellen immobilisiert wurden und damit – wie im zuvor beschriebenen Versuch – wiederum eine Verringerung um fünf Log-Stufen auftrat. Die Wiederfindungsrate für *O. intermedium* und *Y. enterocolitica* O:9 lag bei nur rund 8 % (siehe Tabelle 5-8).

Tabelle 5-8: Wiederfindungsraten von *B. abortus* 1119-3, *O. intermedium* und *Y. enterocolitica* O:9 auf immunomagnetischen, mit monoklonalen Antikörpern beschichteten Partikeln.

Probe	Inokulum	Summe Bakterien auf imPs	Summe Bakterien im Überstand	Summe imPs + Überstände	Wieder- findungsrate ¹⁾
<i>B. abortus</i> 1119-3	1,95 x 10 ¹⁰	7,11 x 10 ⁸	1,28 x 10 ¹⁰	1,36 x 10 ¹⁰	5,2 %
	1,95 x 10 ⁹	1,89 x 10 ⁸	6,36 x 10 ⁸	8,25 x 10 ⁸	22,9 %
	1,95 x 10 ⁸	4,07 x 10 ⁷	4,27 x 10 ⁷	8,34 x 10 ⁷	48,8 %
	1,95 x 10 ⁷	4,48 x 10 ⁶	4,11 x 10 ⁶	8,59 x 10 ⁶	52,1 %
	1,95 x 10 ⁶	3,61 x 10 ⁵	5,02 x 10 ⁵	8,64 x 10 ⁵	41,8 %
	1,95 x 10 ⁵	3,57 x 10 ⁴	4,08 x 10 ⁴	7,65 x 10 ⁴	46,6 %
	1,95 x 10 ⁴	3,00 x 10 ³	2,82 x 10 ³	5,82 x 10 ³	51,6 %
	1,95 x 10 ³	2,75 x 10 ¹	4,25 x 10 ¹	7,00 x 10 ¹	39,3 %
	1,95 x 10 ²	0,00 x 10 ⁰	2,50 x 10 ⁰	2,50 x 10 ⁰	0,0 %
<i>B. abortus</i> 1119-3 unbeschichtete Partikel	1,64 x 10 ⁶	4,55 x 10 ⁰	1,89 x 10 ⁶	1,89 x 10 ⁶	0,0 %
<i>Ochrobactrum</i> <i>intermedium</i>	8,30 x 10 ⁹	5,42 x 10 ⁸	6,27 x 10 ⁹	6,81 x 10 ⁹	7,9 %
<i>Yersinia</i> <i>enterocolitica</i> O:9	6,75 x 10 ⁹	2,80 x 10 ⁸	3,16 x 10 ⁹	3,44 x 10 ⁹	8,1 %

imPs – immunomagnetische Partikel; Ü – Überstand; angegebene Zahlen sind KbE pro 500-µl-Ansatz; ¹⁾ KbE auf imPs/(KbE auf imPs + KbE im Überstand).

Auffällig ist, dass die auf den magnetischen Partikeln und im Überstand ermittelten koloniebildenden Einheiten in der Summe nicht dem Inokulum entsprachen. Bei einem Inokulum zwischen 10³ und 10⁸ KbE/Ansatz konnten nur 42-62 % der Brucellen auf den mit Serum behandelten Partikeln und im Überstand nachgewiesen werden. Bei Verwendung des monoklonalen Antikörpers waren es bei einem Inokulum zwischen 10⁴ und 10⁹ KbE/ml nur 35-53 %.

Zehn Referenzstämme aller bekannten *Brucella*-Spezies wurden zur Überprüfung der Eignung der beschichteten Partikel für eine IMS auf Gattungsebene untersucht. Wie aus Abbildung 5-18 hervorgeht, wurden beim Einsatz von 5 x 10⁷ KbE pro 500-µl-Ansatz alle Spezies immobilisiert. Das traf auch für die rauen Stämme *B. canis* und *B. ovis* zu.

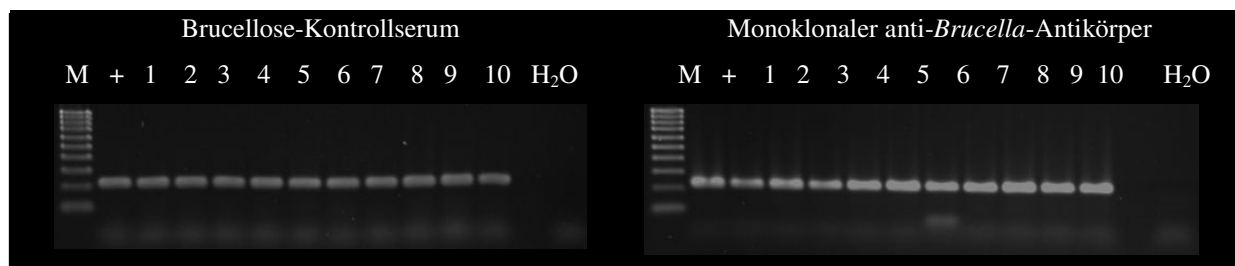


Abbildung 5-18: Nachweis aller bekannten *Brucella*-Spezies; 1 – *B. abortus* 1119-3; 2 – *B. melitensis* 16M; 3 – *B. suis* 1330; 4 – *B. neotomae* 5K33; 5 – *B. canis* RM6/66; 6 – *B. microti* 4915T; 7 – *B. inopinata* BO1; 8 – *B. pinnipedialis* 12890; 9 – *B. ceti* 12891; 10 – *B. ovis* 63/290; M – Marker (100-1.000 bp); + – PCR-Positivkontrolle; H₂O – PCR-Negativkontrolle.

5.4.4 Nachweis von Brucellen in Lebensmittelproben

Die Ergebnisse der Real-Time PCR sowie der klassischen PCR zum Nachweis von Brucellen in den verschiedenen Lebensmittelproben (Ziegenfrischkäse, Rohmilch, Camembert, Mineralwasser, Joghurt) im Anschluss an die IMS mittels Brucellose-Kontrollserum bzw. monoklonalem anti-*Brucella*-Antikörper sind in Tabelle 5-9 abgebildet. Details zu C_T-Werten können Tabelle 9-10 im Anhang entnommen werden. Nach Bereinigung der Ergebnisse von den Verdünnungsfaktoren sind die Nachweisraten in KbE/ml (Rohmilch, stilles Mineralwasser, Joghurt) bzw. in KbE/g (Ziegenfrischkäse, Camembert) für die IMS dargestellt:

Tabelle 5-9: Nachweisgrenzen von *Brucella* in Lebensmitteln mittels IMS [KbE/ml bzw. KbE/g].

Matrix	Brucellose-Kontrollserum		Monoklonaler Antikörper*	
	qPCR	PCR	qPCR	PCR
Ziegenfrischkäse	5 x 10 ³	5 x 10 ³	5 x 10 ³ †	5 x 10 ³
Rohmilch	1 x 10 ² †	1 x 10 ³	n.d.	1 x 10 ³ †
Camembert	5 x 10 ⁴	5 x 10 ⁴	5 x 10 ⁵	5 x 10 ⁵
Stilles Mineralwasser	1 x 10 ³	1 x 10 ³	1 x 10 ² †	1 x 10 ³
Joghurt	8 x 10 ⁴	8 x 10 ³	8 x 10 ⁴	8 x 10 ⁵

Dargestellt sind die sicher nachgewiesenen Verdünnungsstufen; † Nachweisgrenzen, die jedoch nur in einem der Duplikate nachgewiesen wurden; * – monoklonaler anti-*Brucella*-Antikörper; n.d. – nicht detektiert.

Die höchste Sensitivität wurde bei der Aufkonzentrierung von Brucellen in Rohmilch und stillem Mineralwasser erreicht (1 x 10² KbE/ml). Bei Ziegenfrischkäse lag die Nachweisrate bei 5 x 10³ KbE/ml, bei Camembert bei 5 x 10⁴ KbE/ml und bei Joghurt bei 8 x 10³ KbE/ml. Dabei war die IMS mittels Brucellose-Kontrollserum bei Ziegenfrischkäse, Camembert, Rohmilch und Joghurt um etwa eine Log-Stufe sensitiver als mit dem kommerziellen monoklonalen anti-*Brucella*-Antikörper (siehe Tabelle 5-9). Hinsichtlich einer höheren Nachweisbarkeit durch klassische PCR mit Agarose-Gelelektrophorese oder durch Real-Time

PCR lässt sich ein leichter Sensitivitätszuwachs durch Verwendung der Real-Time PCR ablesen (siehe Tabelle 9-10). Die Ausnahme bildete der Nachweis von Brucellen in Rohmilch: Im Anschluss an die IMS und die DNA-Extraktion war ein Nachweis mittels Real-Time PCR nicht möglich, während mittels klassischer PCR und Agarose-Gelelektrophorese 1×10^2 bis 1×10^3 KBE/ml nachgewiesen werden konnten.

6 Diskussion

6.1 Tenazität von Brucellen in Lebensmitteln

6.1.1 Begründung der gewählten Versuchs-Parameter

Zur Bewertung der Exposition des Verbrauchers im Falle eines absichtlichen Eintrags von Brucellen in die Lebensmittelkette wurde am Modell von *Brucella abortus* 1119-3 das Überleben in sieben verschiedenen Lebensmitteln untersucht. Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen, in denen die häusliche Herstellung von Lebensmitteln aus *Brucella*-kontaminierten Rohstoffen im Fokus stand (Castell et al., 1996; Ramos et al., 2008a), lag der Schwerpunkt in dieser Untersuchung auf dem Überleben von Brucellen in kommerziell erhältlichen Produkten.

Die genaue Infektionsdosis bei oraler Aufnahme ist für den Menschen nicht bekannt. Sie ist jedoch deutlich höher als die aerogene Infektionsdosis, die für Brucellen auf 10-100 KbE geschätzt wird (Franz et al., 1997). Bei oraler Aufnahme müssen die Brucellen die Magenpassage mit einem pH-Wert zwischen 1,0 (leerer Magen) und pH 2-4 (voller Magen) überleben (Müller und Frings, 2009). Die Bakterien sind aber nachweislich für über vier Stunden resistent gegen einen pH-Wert von 4,2-4,5 (Porte et al., 1999). Burrows und Renner (1999) verweisen auf ein Literaturzitat von Jensen et al. (Jensen et al., 1996), demzufolge die orale Effektivdosis (ED_{50}), also die Dosis, bei der die Hälfte der Personen nach oraler Aufnahme der Brucellen erkranken, bei 10^6 KbE liegt. Eine weitere Referenz deutet auf eine orale Dosis von 10^6 bis 10^7 KbE *B. abortus* hin (Kaufmann et al., 1980). Diese relativ hohe Konzentration wird leicht erreicht, wenn man davon ausgeht, dass Trinkwasser oder H-Milch auch in größeren Mengen (100 bis 400 Milliliter) auf einmal konsumiert wird. Daher kann eine Kontamination dieser Lebensmittel mit Brucellen – sei sie natürlich oder absichtlich – eine Gesundheitsgefahr für den Menschen darstellen.

Trinkwasser, Milch und Joghurt sind Lebensmittel, die täglich in jeder sozialen Schicht verzehrt werden, was sie zu einem optimalen Ziel für eine absichtliche Ausbringung mit Pathogenen macht. Im Gegensatz zu festen oder halbfesten Matrices wie z. B. Käse können Flüssigkeiten leicht und in großen Mengen kontaminiert werden. Denkbar wäre z. B. eine Einbringung von Brucellen in Wasserspender mit größeren Fassungsvermögen (zwischen fünf und 20 Litern), die in vielen Arztpraxen und Kaufhäusern stehen, in Milch zwischen der Pasteurisierung und Verpackung sowie in Joghurtbehälter bei großen Buffets, wie sie bei Volksfesten üblich sind.

Bei der Planung der Tenazitätsversuche wurde berücksichtigt, dass kommerziell erhältliche Lebensmittel nach Ablauf der Mindesthaltbarkeit durch den Einzelhandel entsorgt werden. Somit würden im Fall einer absichtlichen Ausbringung von Brucellen die kontaminierten, aber in der Haltbarkeit abgelaufenen Lebensmittel keine Gefahr mehr für den Verbraucher darstellen. Daher wurde die Dauer des Versuches an der Haltbarkeit des Lebensmittels ausgerichtet (z. B. vier Tage bei Vorzugsmilch oder drei Monate bei H-Milch). Da die Produkte im Handel unbewegt im Regal stehen, wurden die in den hier beschriebenen Versuchen untersuchten Proben ebenfalls stehend und nicht schüttelnd inkubiert. Ebenso wurde die für den Versuch gewählte Temperatur an die in Supermärkten bzw. Haushalten herrschenden Temperaturen wie folgt angepasst: Joghurt, Rohmilch und Vorzugsmilch bei 4 °C und ungekühlte Produkte wie H-Milch und Mineralwasser bei 20 °C. Bei der Simulation der Einbringung von Brucellen in die Lebensmittel (siehe Abschnitt 4.1.1.3) kann es zu schwankenden Zellzahlen im Inokulum kommen. Deshalb wurden jeweils drei Probenröhrchen pro Versuchstag und Lebensmittel angesetzt.

Brucellen zählen zu den für den Menschen hochpathogenen Erregern. Für die eigenen Untersuchungen wurde als Modell-Organismus *Brucella abortus* 1119-3 ausgewählt, da es ein bekannter Stamm für Laborversuche ist und er eine geringe Humanpathogenität aufweist (Alton et al., 1988a). Alle notwendigen experimentellen Arbeiten mit diesem Erreger wurden in einem Labor der Sicherheitsstufe 3 durchgeführt. Da dieser Stamm in H-Milch drei Monate überlebte und sich sogar vermehrte, wurde der Versuch auch mit dem hochpathogenen Stamm *Brucella melitensis* 16M in demselben Lebensmittel wiederholt, um zu prüfen, ob die für den Modellstamm erhaltenen Ergebnisse auch mit einer anderen *Brucella*-Spezies reproduzierbar sind.

6.1.2 Tenazität in Milch

Wie die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen zeigen, stieg in H-Milch die Zellzahl von *B. abortus* 1119-3 von 5×10^7 KbE/ml auf bis zu $7,2 \times 10^8$ KbE/ml (Tag 46) an und verringerte sich dann bis Tag 87 nur geringfügig auf $6,4 \times 10^8$ KbE/ml. Dass sogar eine noch längere Überlebenszeit in Milch möglich ist, wurde bereits von Fulton (1941) gezeigt, der eine Tenazität von *B. abortus* von zehn Monaten in sterilisierter Milch bei Raumtemperatur ermittelte. Das Wachstum von *B. abortus* 1119-3 im Standard-Wachstumsmedium *Brucella*-Bouillon war dabei nahezu identisch (siehe Abbildung 5-1) und macht damit deutlich, dass H-Milch für diesen *Brucella*-Stamm ein geeignetes Nährmedium ist.

Die Wachstumsraten am Anfang des Versuchs waren mit 0,1 Log-Stufen pro Tag vergleichsweise gering (siehe Abbildung 5-2). Dies könnte eine Folge der hohen Dichte der am Boden des Reaktionsgefäßes abgesetzten Bakterien sein. Werden Brucellen dagegen bei der Inkubation geschüttelt, können sie auf eine Konzentration von bis zu 10^{11} KbE/ml anwachsen (Van Drimmelen, 1955). Die Lebensmittelproben wurden jedoch nicht geschüttelt, um die für sie typische Lagerung in Supermärkten zu simulieren.

Unter Berücksichtigung der langen Haltbarkeit von H-Milch wurde auch untersucht, ob und inwieweit das Inokulum die Eigenschaften der H-Milch beeinflusst und ob es zu einer schnelleren Verderbnis führen kann: Wie in Abschnitt 4.1.1.3 beschrieben, wurde die gesamte für den Versuch benötigte Milch in einem Behälter mit Brucellen inokuliert und anschließend auf einzelne Reaktionsgefäße verteilt, wobei die zuletzt untersuchten Milchproben insgesamt 87 Tage bei 20 °C lagerten. Die Milch war auch nach dieser langen Lagerzeit wie zu Beginn des Versuches homogen weiß und wies keine Flocken auf. Der pH-Wert war von pH 6,6 auf 6,9 leicht angestiegen. Daher wird angenommen, dass das Inokulum keinen nennenswerten Einfluss auf die Beschaffenheit der H-Milch hatte.

Wurde H-Milch nur mit 5×10^3 KbE *B. abortus* 1119-3 pro ml inokuliert, waren die Wachstumsraten fast fünfmal höher (0,47 Log-Stufen/Tag). Zuniga et al. (2005) zeigten für *B. abortus* 544, dass sich dieser Stamm in H-Milch von anfänglich 10^5 KbE/ml innerhalb von zwei Tagen auf 10^6 KbE/ml vermehrte. Anschließend blieb die Zellzahl jedoch konstant. Ein Grund für höhere Wachstumsraten bei geringen Zellkonzentrationen ist im Gegensatz zu hohen Zellkonzentrationen die erhöhte Verfügbarkeit von Nährstoffen und Sauerstoff pro Zelle, so dass die Wachstumsbedingungen besser sind.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Zellzahl von *B. abortus* 1119-3 stieg innerhalb von drei Wochen auf $4,2 \times 10^8$ KbE/ml an, womit die gleiche Konzentration wie bei Inokulation mit $4,7 \times 10^7$ KbE/ml erreicht worden war. Anschließend blieb die Zellzahl in beiden

Versuchsansätzen auf gleichem Niveau. Somit wurde gezeigt, dass der Stamm *B. abortus* 1119-3 bei Raumtemperatur und einer Lagerung ohne Schütteln in der beschriebenen H-Milch nach drei Wochen seine maximale Konzentration im Bereich von 4 bis 6×10^8 KbE/ml erreicht. Analoge Ergebnisse für *B. abortus* wurden von Zuniga et al. (2005) beschrieben: Sie inokulierten 10^8 KbE *B. abortus* 544 in Milch, wobei sich die Konzentration innerhalb von 12 Tagen auf ca. 5×10^8 KbE/ml nur leicht erhöhte und bis zum Versuchsende (Tag 25) konstant blieb. Offensichtlich befinden sich unter diesen Bedingungen die Brucellen in der stationären Phase, wobei das Fehlen essenzieller Nährstoffe und die Akkumulation von Stoffwechselprodukten das Zellwachstum hemmen. Zu einer konstanten Zellzahl kann es dabei zum einen dadurch kommen, dass die Bakterien weiterhin Biosynthese betreiben, sich jedoch nicht teilen. Außerdem kann die Zahl der absterbenden Zellen gleich der sich teilenden Bakterien sein, so dass trotz Zellvermehrung kein Anstieg der Zellzahl messbar ist („kryptisches Wachstum“) (Anon, 2001).

Auch wenn *B. melitensis* 16M mit 5×10^3 KbE/ml in H-Milch eingebracht wurde, stieg die Zellzahl mit 0,49 Log-Stufen pro Tag auf 6×10^7 KbE/ml an Tag neun deutlich an. Im Gegensatz zum Wachstum von *B. abortus* 1119-3 konnte jedoch bis Versuchstag 18 nur noch ein geringfügiges Wachstum auf $6,8 \times 10^7$ KbE/ml festgestellt werden, das mit 0,018 Log-Stufen pro Tag kleiner wurde. Daher waren nach drei Monaten nur noch $5,8 \times 10^6$ KbE/ml vorhanden. Die rückläufige Zellzahl in dem hier beschriebenen Versuch in H-Milch deutet auf eine möglicherweise speziesspezifische kürzere Überlebensdauer von *B. melitensis* 16M in H-Milch hin.

Die bevorzugten Wirte von *B. melitensis* sind Schafe und Ziegen (siehe Tabelle 1-1). Möglicherweise hat die unterschiedliche Zusammensetzung von Milchsorten einen Einfluss auf die Tenazität. Zwar enthält die Milch von Schafen und Ziegen mit 11 bzw. 10 mg/100 ml weniger Cholesterin als Kuhmilch (14 mg/100 ml). Auf der anderen Seite sind Protein-, Fett-, Kohlenhydrat- und Lactosegehalte bei Ziegenmilch geringer, aber bei Schafsmilch höher. Zur Aufklärung müsste die Tenazität von *B. melitensis* in verschiedenen Milchsorten parallel überprüft werden.

Die Ergebnisse aus Untersuchungen mit anderen Lebensmittelmatrizes zeigen für *B. abortus* und *B. melitensis* unterschiedliche Überlebenszeiten. Wenn 10^5 KbE/ml *B. abortus* oder *B. melitensis* in Sahne bei 4°C eingebracht wurden, überlebten die verwendeten Stämme sechs Wochen bzw. vier Wochen lang (Guerra, 1957). Die Zellzahlen wurden hier nach einer, zwei, vier, sechs und acht Wochen ermittelt. Da die Bedingungen für beide Spezies gleich waren, ist zu vermuten, dass die speziesspezifischen Erregereigenschaften zu den

Unterschieden in der Tenazität geführt haben. In einer anderen Studie wurden die *B. abortus*-Stämme 5 und 68 sowie die *B. melitensis*-Stämme 63/9 und 185 in Sahne (Fettgehalt unbekannt) bei einer Temperatur von 20-25 °C inokuliert. Mittels Ausplattieren konnten Überlebenszeiten von 73 Tagen für die drei erstgenannten Stämme und von 91 Tagen für Stamm 185 nachgewiesen werden (Nour, 1982). In Büffelmilch-Joghurt mit 7,5% Fett überlebte *B. abortus* bei 4 °C insgesamt 30 Tage, während *B. melitensis* nur 20 Tage lang überlebte (Ghoniem, 1972). Bei gleicher Matrix, aber bei einer höheren Temperatur von 30-32 °C war dagegen für beide *Brucella*-Spezies die Tenazität mit 14 Tagen identisch.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen also, dass sich beide untersuchten Brucellen-Stämme bei einer relativ niedrigen Inokulationsdosis in H-Milch vermehren können und mit einer hohen Konzentration bis zum Ende der Mindesthaltbarkeit des Lebensmittels überleben. Im Falle einer absichtlichen Ausbringung von Brucellen in H-Milch muss aufgrund der Vermehrungsfähigkeit der Bakterien und der langen Überlebenszeit innerhalb der vorgegebenen Mindesthaltbarkeit dieses Lebensmittels von einem hohen Infektionsrisiko für den Verbraucher ausgegangen werden.

Rohmilch und Vorzugsmilch weisen mit zwei bzw. vier Tagen eine kurze Haltbarkeitsdauer auf. Aufgrund der kurzen Haltbarkeit der beiden Lebensmittel wurde das Wachstum von *B. abortus* 1119-3 in beiden Matrices vier Tage lang bei 4 °C untersucht. Für die Interpretation der Ergebnisse zur Tenazität der Brucellen sind die natürlicherweise in der Roh- und Vorzugsmilch vorhandenen Keime (z. B. Lactobazillen) von Bedeutung. Die tolerierbare Gesamtkeimzahl liegt dabei für Rohmilch bei 100.000 KbE/ml und für Vorzugsmilch bei 30.000 KbE/ml (Anon, 2004). Nach den Ergebnissen verschiedener Untersuchungen kann sich die Gesamtkeimzahl in der Milch in Abhängigkeit von der Lagertemperatur ändern. Während sich die Keimzahl bei Rohmilch mit 10^4 KbE/ml bei 4 °C innerhalb von vier Tagen lediglich um 0,2 Log-Stufen erhöhte, konnte bei einer Temperatur von 10 °C innerhalb von vier Tagen ein deutlicher Anstieg von 10^4 auf 10^7 KbE/ml beobachtet werden (Cempirkova und Mikulova, 2009). In einer Studie von Kuzdas und Morse (1954) konnte *B. abortus* 2308 in einem Inokulum von $8,8 \times 10^9$ KbE bei 8 °C weniger als vier Tage in unpasteurisierter Milch nachgewiesen werden. Wie nun die eigenen Ergebnisse zeigen, hatten die in der Roh- und Vorzugsmilch natürlicherweise vorkommenden Keimzahlen bei einer Temperatur von 4 °C über einen Zeitraum von vier Tagen keine inhibitorische Wirkung auf die Tenazität der Brucellen. Bei Rohmilch verringerte sich die

Zellzahl von *B. abortus* 1119-3 bei einem pH-Wert von 6,7 nur minimal von $4,6 \times 10^7$ KbE/ml auf $2,5 \times 10^7$ KbE/ml und bei Vorzugsmilch von $3,1 \times 10^7$ auf $2,0 \times 10^7$ KbE/ml.

Im Fall der absichtlichen Kontamination von Roh- oder Vorzugsmilch mit Brucellen können diese in der Matrix gut überleben, wobei unter Berücksichtigung von pH-Wert, Lagertemperatur und -zeit (pH > 6,5, 4 °C, max. 4 Tage) allerdings keine nennenswerte Vermehrung stattfindet. In Abhängigkeit des Inokulums bzw. der aufgenommenen Dosis kann es aber dennoch über Roh- oder Vorzugsmilch zu einer Gefährdung für den Verbraucher kommen.

6.1.3 Tenazität in Joghurt

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Fettstufen auf das Überleben von *B. abortus* 1119-3 wurden drei verschiedene Joghurts untersucht. Dabei konnten bereits nach zwei (10 % Fett), drei (1,5 % Fett) bzw. nach fünf Tagen (3,5 % Fett) keine lebenden Zellen mehr nachgewiesen werden. Obwohl in der vorliegenden Arbeit der pH-Wert mit 4,1 bis 4,3 in allen Joghurts ähnlich niedrig war, überlebte *B. abortus* 1119-3 am längsten im Joghurt mit 3,5 % Fett (vier Tage), während der Stamm in Joghurt mit 10,0 % Fett nur bis Tag 1 nachgewiesen werden konnte. Das ist überraschend, da angenommen wurde, dass Brucellen bei höherem Fettgehalt länger unter extremen pH-Bedingungen überleben können. Zum Beispiel überlebte *B. abortus* in Joghurt aus aufgekochter Büffelmilch mit 7,5 % Fett bei 4 °C 30 Tage lang (Ghoniem, 1972). Auch Experimente mit Käsen verschiedener Fettstufen deuten an, dass ein höherer Fettgehalt zu einer höheren Tenazität von *Brucella* spp. führt (Salem et al., 1977). Dies konnte in den eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden.

Die eigenen Ergebnisse zeigen, dass der pH-Wert einen starken Einfluss auf das Überleben von Brucellen hat, denn der optimale pH-Wert bei 37 °C liegt bei 6,6-7,4 (ICMSF, 1996), wobei die Spezies bei maximal pH 8,4 (Zobell und Meyer, 1932) und bei minimal 4,1-4,5 (Lerche und Entel, 1959) überlebt. In anderen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass *B. abortus* (Stamm unbekannt) in Joghurt mit einem pH-Wert von 3,6 bei 3 °C nur einen Tag überlebt (Kästli und Binz, 1948). In einem Test mit *B. abortus* 544 wurde Joghurt aus künstlich kontaminierter Milch durch das Hinzufügen einer Starterkultur aus *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* und *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* mit einer Anfangskonzentration von 10^5 bzw. 10^8 KbE *B. abortus*/ml hergestellt (Zuniga et al., 2005). Bei 4 °C konnten bis Tag 9 bzw. bis Tag 22 Brucellen nachgewiesen werden, während sie in der eigenen Untersuchung lediglich maximal vier Tage überlebten. Die bei der

Joghurtherstellung übliche anfängliche Inkubationstemperatur von 42 °C in den ersten acht Stunden könnte bei Zuniga und Kollegen zu einem Anstieg in der Brucellen-Konzentration geführt haben. In einer anderen Studie ohne zeitweilige Inkubation bei 42 °C konnten $2,4 \times 10^7$ KbE *B. abortus* 544 pro ml bis Tag 8 in Joghurt mit pH 4 bei 5 °C überleben (Davies und Casey, 1973). Möglicherweise weisen die beiden *B. abortus*-Stämme 544 und 1119-3 eine unterschiedliche Säuretoleranz auf.

Im Fall einer absichtlichen Kontamination von Joghurt mit Brucellen ist die Tenazität des Erregers aufgrund des geringen pH-Wertes in diesem Lebensmittel deutlich herabgesetzt. Somit ist die Wahrscheinlichkeit einer Infektion des Verbrauchers im Vergleich zu Milch wesentlich geringer.

6.1.4 Tenazität in stillem Mineralwasser

In stillem Mineralwasser verringerte sich die Zellzahl von *B. abortus* 1119-3 innerhalb von 53 Tagen kontinuierlich von 5×10^7 auf 10^0 KbE/ml. Nach 63 Tagen konnten keine *Brucella*-Kolonien mehr nachgewiesen werden. Der Mangel an Nährstoffen könnte eine Erklärung für die Abnahme der Zellzahl sein. Die hier festgestellte Überlebenszeit ist vergleichbar mit bereits veröffentlichten Ergebnissen, in denen *Brucella*-Stämme in Wasser bei 20 °C bis zu 2,5 Monate überlebten (Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, 2001).

Eine weitere Erklärung wäre das in der Literatur beschriebene Phänomen der „*viable but non-culturable* (VBNC) *bacteria*“, welche bei einigen Bakterienarten dadurch gekennzeichnet ist, dass diese mittels Ausplattierung auf Nährmedien nicht mehr nachweisbar sind, obwohl sie noch leben. Zum Beispiel führen Temperaturen unter 10 °C bei *Vibrio vulnificus* zur Induktion von VBNCs. Dabei schrumpfen die Zellen und der Zellmetabolismus ändert sich insofern, als der Nährstofftransport verringert wird. Biosynthese und Genexpression finden jedoch weiterhin statt. Es wird vermutet, dass ein hohes Nährstoffangebot wie im Nährmedium möglicherweise toxisch für VBNCs ist. Durch eine Erhöhung der Umgebungstemperatur auf Raumtemperatur lässt sich *V. vulnificus* innerhalb von acht Stunden wieder aus dem VBNC-Stadium „wiederbeleben“, so dass die Zellen wieder kultivierbar werden (Oliver, 2005).

Die Lebensfähigkeit von *B. abortus* 1119-3 in stillem Mineralwasser ist ausschließlich durch Ausplattieren auf Nähragar nachgewiesen worden. Prinzipiell wäre also denkbar, dass ein Übergang des Bakteriums in ein VBNC-Stadium der Grund für die Abnahme der Zellzahl ist. Jedoch ist das Phänomen für Brucellen in der Literatur bisher nicht beschrieben worden.

Wahrscheinlicher ist, dass die Abwesenheit von Nährstoffen zum Absterben der Zellen geführt hat. Denn im Unterschied zur H-Milch sind im Wasser keinerlei Fette, Kohlenhydrate oder Proteine enthalten, von denen sich die Zellen ernähren könnten.

Neben Mineralwasser in Flaschen gibt es auch Wasserspender mit Behältern zwischen fünf und 20 Litern, die in vielen Arztpraxen und Kaufhäusern zur Erfrischung bereit stehen. Allein aus hygienischen Gründen wird der Austausch dieser Wasserbehälter in einem Rhythmus von zwei Wochen empfohlen (BfR, 2005). In der vorliegenden Arbeit stellte sich heraus, dass trotz des Rückgangs der Zellzahl nach der Inokulation mit 5×10^7 KbE *B. abortus* 1119-3 pro ml nach zwei Wochen noch über 10^6 KbE/ml lebten. Hier handelt es sich um einen Wert, der im Fall der Aufnahme des kontaminierten Wassers mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Infektion des Menschen führen würde. Unter der Annahme, dass das absichtlich mit Brucellen kontaminierte Mineralwasser innerhalb von zwei Wochen getrunken wird, ist also das Risiko der Infektion des Menschen im Szenario „Wasserspender“ als relativ hoch anzusehen.

6.2 Extraktion von *Brucella*-DNA aus Lebensmitteln und Nachweis mittels PCR

Um einen zuverlässigen Nachweis von DNA aus der Lebensmittelmatrix führen zu können, lag ein weiterer Schwerpunkt auf der Wahl von geeigneten Extraktionsmethoden. Für einen Nachweis von Brucellen in Rohmilch, Joghurt, stillem Mineralwasser und physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) wurden sechs verschiedene DNA-Extraktionsmethoden auf ihre Eignung untersucht (Versuchsansatz 1). Da im Rahmen eines bioterroristischen Szenarios ein möglichst schneller Nachweis von Brucellen in Lebensmitteln erforderlich ist, sind zusätzlich InstaGene Matrix (Bio-Rad) und StarPrep One Kit (Biotecon) untersucht worden. Diese haben mit 15-25 min eine sehr kurze Präparationszeit, da hier nur die DNA mit Lysepuffer aufgeköcht und anschließend abzentrifugiert wird. Die von Qiagen angebotenen Kits hatten sich bereits bei der Extraktion von *Brucella*-DNA bewährt. Für diese Arbeit wurde deshalb unter anderem der QIAamp DNA Mini Kit ausgewählt. Auch das SureFood PREP Bacteria I (Congen) wurde bereits bei Extraktion von Erreger-DNA in unserem Labor erfolgreich eingesetzt (Guenther et al., 2008) und wurde daher in die Tests mit einbezogen. Der ZR Fecal DNA Kit (Zymo Research) hatte sich in Vortests in der Extraktion von *Brucella*-DNA aus Rohmilch bewiesen und war bei Stauffer et al. (2008) bei der Detektion von *Tritrichomonas foetus* in Stuhlproben von Katzen die beste von vier DNA-Extraktionsmethoden. Auch wenn die Inhibitoren in Milch (z. B. Fette, Enzyme, Kalzium (Wilson, 1997) nicht vergleichbar sind mit Inhibitoren in Faeces (z. B. komplexe Polysaccharide, Gallensalze, Tannine (McOrist et al., 2002) wurde der Kit mit aufgenommen, da es sich in beiden Fällen um eine komplexe Matrix handelt, die zahlreiche potenzielle Inhibitoren enthält. Als weitere Methode wurde die genannte Phenol-Chloroform-Extraktion nach Romero und Lopez-Goni (1999) eingesetzt, mit der bis zu 50 Brucellen pro Milliliter Rohmilch nachgewiesen werden konnten.

6.2.1 Begründung der gewählten Zelldichten

Vor Durchführung der Untersuchungen wurden zunächst diejenigen Verdünnungsstufen festgelegt, bei denen die Effizienz der Extraktion von *Brucella*-DNA für die jeweiligen zu untersuchenden Lebensmittel ermittelt werden kann. Die für Rohmilch aus infizierten Tieren publizierten *Brucella*-Konzentrationen schwanken zwischen wenigen bis zu 21.000 KbE/ml. Schwerdtfeger fand „wenige bis 15.000 KbE/ml“ (Schwerdtfeger, 1963), während Gilman et al. (1946) nur 500 bzw. 700-800 KbE/ml aus der Milch von infizierten Kühen isolierten. Huddleson fand 260 KbE *B. abortus* pro ml Vollmilch, entdeckte aber, dass sich nach der

24stündigen Lagerung bei 5 °C in dem abgesetzten Rahm 2.190 KbE/ml befanden, während die Milch am Boden des Gefäßes nur 30 KbE/ml enthielt (Huddleson et al., 1927). Für einen aus natürlich kontaminierter Milch hergestellten Joghurt sind keine *Brucella*-Konzentrationen bekannt. Patir und Dincoglu (2001) untersuchten zwei Käse, die sie auf einem türkischen Markt gekauft hatten. Sie fanden in Tulum 460 KbE *B. melitensis* pro Gramm und in Weichkäse $3,4 \times 10^5$ KbE *B. abortus* pro Gramm. Die Zellzahlen in natürlich infizierter Milch und in Milchprodukten schwanken also zwischen einigen wenigen und bis zu 10^5 KbE/ml. Um den kompletten Konzentrationsbereich von recht geringen Zellzahlen in Milch und Käse zu der andererseits hohen geschätzten oralen Infektionsdosis abzudecken, wurde die DNA-Extraktion an Lebensmitteln durchgeführt, die vorher mit 5×10^0 bis 5×10^7 KbE/ml *B. abortus* 1119-3 pro ml inokuliert worden waren. Für die Untersuchung von sechs DNA-Extraktionsmethoden wurden keine kontinuierlichen 10er-Verdünnungsreihen verwendet, sondern Intervalle (5×10^7 , 5×10^4 und 5×10^1 KbE/ml). Hiermit sollte eine grobe Einschätzung der Sensitivität der Methoden ermöglicht werden, aufgrund derer dann die Gesamtzahl der Methoden reduziert werden konnte. Mit kontinuierlichen 10er-Verdünnungsschritten von 5×10^4 bis 5×10^0 konnte anschließend die Sensitivität noch exakter bestimmt werden.

Durch die Verwendung von Wasser als Vergleichswert können laborübergreifend DNA-Extraktionsmethoden für dieselbe Spezies miteinander verglichen werden. Wasser stellt aufgrund des Fehlens von Proteinen, Fetten und Kohlenhydraten geringere Anforderungen an die DNA-Extraktion. Einzig die Zusammensetzung der Mineralien ändert sich je nach Art des verwendeten Wassers. Die Bakterienzellen müssen daher nur lysiert und die bakterieneigenen Zellbestandteile von der DNA getrennt werden. Milch und Milchprodukte unterliegen dagegen vielen Einflussfaktoren (Futter der Kühe, Kuhrasse, Verarbeitungsprozesse bei der Haltbarmachung und Verpackung, unterschiedliche Lab-/Starterkulturen).

6.2.2 Wahl der PCR

Für einen zuverlässigen Nachweis von DNA mit einer möglichst hohen Sensitivität ist eine an die Matrix angepasste Extraktionsmethode nötig. Bei ausreichend hoher DNA-Konzentration kann diese mittels PCR und Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen und bei Bedarf weiter differenziert werden. Für Brucellen sind sowohl verschiedene klassische PCRs als auch Real-Time PCRs entwickelt worden (siehe Abschnitt 1.3.1.2).

Nach erfolgter Extraktion der *Brucella*-DNA aus dem Lebensmittel wurde für die weitere Untersuchung die klassische *bcs*31-PCR nach Baily et al. (1992) gewählt. Aufgrund ihrer

hohen Sensitivität und Spezifität (Baily et al., 1992; Matar et al., 1996; Probert et al., 2004) ist die *bcs31*-PCR die derzeit am häufigsten in der *Brucella*-Diagnostik eingesetzte PCR (Al Dahouk et al., 2010a). Die PCR stellte sich in der Untersuchung von kontaminierter Büffelmilch außerdem als sensitiver heraus als die auf Basis der 16S rRNA-Sequenz von *Brucella* entwickelte PCR (Marianelli et al., 2008; Romero et al., 1995). Bei der Untersuchung von 50 Brucellen in Rohmilch war trotz Anwesenheit von bis zu 8.000mal mehr Kopien boviner DNA der *Brucella*-Nachweis möglich. Für bestimmte Primer, die das *Brucella cell surface protein* als Target haben, wurde die Amplifikation in *Ochrobactrum anthropi* beschrieben (Da Costa et al., 1996). Allerdings kommt die mittels Primerpaar B4/B5 amplifizierte DNA-Sequenz von BCSP31 ausschließlich bei der Gattung *Brucella* vor und ermöglicht daher einen hochspezifischen Nachweis (Imaoka et al., 2007). Auch die in dieser Dissertation untersuchten Negativkontrollen zeigen, dass bovine DNA nicht nachgewiesen wird und die eingesetzte PCR spezifisch für *Brucella* ist (siehe Abbildung 5-7 und Abbildung 5-8). Als klassische PCR hätte auch eine Spezies-spezifische PCR wie die Bruce-Ladder-PCR eingesetzt werden können (Garcia-Yoldi et al., 2006; Lopez-Goni et al., 2008; Mayer-Scholl et al., 2010), was den Vorteil gehabt hätte, dass alle bekannten *Brucella*-Arten unterschieden werden könnten. Allerdings ist diese Multiplex-PCR aufgrund der verwendeten neun Primerpaare technisch aufwendiger und nicht so sensitiv.

Die verwendeten sechs DNA-Extraktionsmethoden zeigten im ersten Versuchsansatz erwartungsgemäß Unterschiede bei der Sensitivität der isolierten *Brucella*-DNA aus Rohmilch, Joghurt, Mineralwasser und physiologischer Kochsalzlösung. Für Joghurt und Rohmilch war die Phenol-Chloroform-Extraktion nach Romero und Lopez-Goni (1999) die sensitivste Methode und für stilles Mineralwasser der QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) gefolgt von der InstaGene Matrix (Bio-Rad). Mit diesem Kit konnte die *Brucella*-DNA (4/6 Proben mit 5×10^1 KBE/ml gespikte Mineralwasser-Proben) innerhalb von 40 Minuten isoliert werden, was die beste Relation von Zeitaufwand und Sensitivität darstellt. Da der Kit jedoch etwas schlechter als das Qiagen-Kit abschnitt und es bei den anderen Matrices keine hohe Sensitivität zeigte, wurde der QIAamp DNA Mini Kit für die Extraktion aus Wasser bevorzugt. Der sensitivste Nachweis von Brucellen-DNA in physiologischer Kochsalzlösung gelang mit Hilfe des Kits von Qiagen, gefolgt von InstaGene Matrix (Bio-Rad), StarPrepI-Kit (Bioteccon) und SureFood PREP Bacteria I-Kit (Congen).

Durch das in Rohmilch und Joghurt enthaltene Fett war für einige Kits das Protokoll zu modifizieren. Bei den Kits von Congen, Qiagen, Bioteccon und Bio-Rad musste das Fett nach

dem ersten Zentrifugationsschritt mechanisch entfernt werden, da es sich oberhalb der Lösung, welche die DNA enthält, abgesetzt hatte. Während bei den beiden säulenbasierten Kits von Qiagen und Congen durch Waschschriffe die Fett-Reste entfernt werden konnten und daher letztendlich eine fettfreie DNA-Lösung erhalten wurde, blieben bei den nur auf Lysepuffern basierenden Methoden von Bio-Rad und Bioteccon kleine Fettschichten auf der Oberfläche der DNA-Lösung bestehen. Zur Probenentnahme konnte diese Schicht mit der Pipettenspitze durchstoßen werden, um an die DNA zu gelangen. Wurde die Probe allerdings eingefroren und anschließend geschüttelt, so zerfiel die Fettschicht in kleine nicht lösliche Bestandteile, die auch nach mehrmaligem Zentrifugieren nicht mehr zu einer Fettschicht aggregierten und somit die Probe für die PCR nicht mehr zu gebrauchen war. Als am besten, wenn auch als am zeitaufwendigsten, erwies sich die Phenol-Chloroform-Extraktion nach Romero und Lopez-Goni (1999), da hier das Fett sowie die Proteine in der organischen Phase verblieben und daher eine reine DNA-Lösung erhalten wurde. Die Phenol-Chloroform-Extraktion und der Kit von Zymo waren die einzigen Methoden, bei denen es nicht nötig war, den Rahm nach der Zentrifugation zu entfernen.

Bei den Untersuchungen zeigte sich außerdem, dass der 1:2 verdünnte Joghurt deutlich mehr Feststoffe als Milch, enthielt. So entstand bei der InstaGene Matrix (Bio-Rad) ein größeres Pellet mit nur einem flachen Spiegel klarer DNA-Lösung. Dies macht die Probenentnahme technisch schwieriger. Bei Mineralwasser (pH 7,1) handelt es sich dagegen um eine fett- und proteinfreie Lösung, welche die DNA-Extraktionsmethoden vor keine matrixabhängigen Herausforderungen stellt. Hier sind einzig das Aufbrechen der bakteriellen Zellwand und die Trennung der DNA von den Zelltrümmern für die erfolgreiche DNA-Extraktion entscheidend. Dementsprechend konnte im ersten Versuchsansatz (Verdünnungsstufen 5×10^7 , 5×10^4 und 5×10^1 KbE/ml) im Gegensatz zu Rohmilch und Joghurt in deutlich mehr gespikten Proben *Brucella*-DNA nachgewiesen werden (Tabelle 5-1). Physiologische Kochsalzlösung enthält im Vergleich zu Mineralwasser mehr Salzanteile, die offenbar die Ursache dafür sind, dass eine geringfügig niedrigere Zahl an Proben mit extrahierter Brucellen-DNA bei fünf Kits positiv getestet worden ist.

Bei der fotometrischen Messung der extrahierten DNA ($OD_{260/280}$) ist grundsätzlich zu beachten, dass die in der DNA-Lösung verbliebenen Proteine (z. B. bei Verwendung des InstaGene Matrix Kits für Rohmilch) zu vermeintlich höheren Werten führen können. Für alle Matrizes insgesamt gesehen lag der Mittelwert der gemessenen $OD_{260/280}$ beim Testkit von Qiagen mit Werten von 1,7, 2,0, 1,9 und 1,7 dem Optimum von 1,8-2,2 am nächsten. Gleich

dahinter rangiert die Phenol-Chloroform-Extraktion mit relativ hohen DNA-Ausbeuten. Bei den anderen verwendeten Kits lagen die Ergebnisse für die extrahierte DNA zum Teil sehr niedrig (Zymo) oder es lag eine breite Schwankung der Werte mit 1,2 bis zu 7,6 vor (Congen bei Mineralwasser). Eine Messung der Konzentration der mittels StarPrepI-Kit extrahierten DNA war fotometrisch nicht möglich, da bereits für den Lysepuffer ohne DNA eine Konzentration von 1.400 ng/ μ l angezeigt wurde.

Wenn man die Handhabung der verwendeten Kits beurteilt, so gestaltete sich die Arbeit bei den einzig auf Lysepuffern basierenden Kits von Bioteccon und Bio-Rad am einfachsten und wegen der kurzen Präparationszeit von 20 bzw. 40 Minuten auch am schnellsten. Das Handling des Qiagen-Kits wurde dadurch vereinfacht, dass die gewaschenen Säulchen einfach auf die im Kit enthaltenen leeren Reaktionsgefäße gestellt werden konnten. Hierdurch wurde ein Abdekantieren des Durchflusses überflüssig. Letzteres war bei den Kits von Zymo und Congen vorgesehen und birgt die Gefahr der Kreuzkontamination, da am Rand des Reaktionsgefäßes hängende Probentröpfchen manuell oder beim Zentrifugieren auf andere Proben übertragen werden können. Bei der DNA-Extraktion mittels Sure Food PREP Bacteria I trat zwischen den Waschschritten gelegentlich Schaum aus den Reaktionsgefäßen, was ebenfalls zur Kreuzkontamination zwischen den Proben führen kann und demzufolge bei der Extraktion beachtet werden muss, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden. Technisch am anspruchsvollsten war das ZR Fecal DNA Kit: Hier mussten sehr viele Reaktionsgefäße pro Probe eingesetzt und beschriftet werden. Die ebenfalls in demselben Kit enthaltenen Reaktionsgefäße mit Schnappdeckeln waren zudem nicht dicht, so dass öfters die Handschuhe mit Probe kontaminiert wurden und gewechselt werden mussten.

Nach den Ergebnissen des ersten Ansatzes wurden das QIAamp DNA Mini Kit und die Phenol-Chloroform-Extraktion für den zweiten Versuchsansatz ausgewählt, um die Sensitivität der Extraktion von *Brucella*-DNA noch genauer zu untersuchen. In Ergänzung zu den zuvor untersuchten Lebensmittelmatrizes wurden zusätzlich zwei Käsesorten (Camembert und Ziegenkäse) in die Studie mit einbezogen. Bei Verwendung der 10er-Verdünnungsstufen von 5×10^4 bis 5×10^0 KbE/ml wurde für die Untersuchung der wässrigen Lebensmittelmatrizes mit dem QIAamp DNA Mini Kit die höchste Sensitivität erreicht. So wurde die DNA von 50 Zellen *Brucella abortus* 1119-3 je Milliliter Mineralwasser in 5/6 Proben nachgewiesen und 5 Zellen/ml wurden noch in 3/6 Proben erkannt. In NaCl wurden in 6/6 Proben 50 KbE/ml nachgewiesen. Der Kit von Qiagen zeigte bei Rohmilch ebenfalls eine

hohe Sensitivität mit 50 KbE/ml in 4/6 Proben. Somit konnten die Ergebnisse anderer Studien bestätigt werden, wonach die Kits von Qiagen für die Extraktion von DNA aus verschiedenen Matrizes bei vergleichenden Untersuchungen oft zu den besten Methoden gehörten (Queipo-Ortuno et al., 2008; Tomaso et al., 2010; Van Tongeren et al., 2011). Die verwendeten Säulen sind in den Qiagen-Kits generell dieselben. Die Unterschiede in der Funktionsweise der Kits liegen hauptsächlich in der Vorbehandlung durch matrixoptimierte Lysepuffer (Fa. Qiagen, persönliche Mitteilung). In diesem Zusammenhang wäre zu testen, ob der neu erschienene *mericon* DNA Bacteria Kit von Qiagen für die DNA-Extraktion aus Käse und Joghurt besser geeignet ist als die Phenol-Chloroform-Extraktion.

Im Vergleich zum QIAamp DNA Mini Kit war die Phenol-Chloroform-Extraktion (Romero und Lopez-Goni, 1999) mit 5/6 positiven Rohmilch-Proben noch sensitiver, zumal hiermit 1/6 Proben mit 5 Brucellen/ml erkannt wurde. Diese Methode war auch bei der Extraktion von Brucellen-DNA in Joghurt deutlich effizienter. Aus dieser Matrix wurde DNA von *B. abortus* 1119-3 in 6/6 Fällen aus 50 KbE/ml und in 3/6 Fällen aus 5 KbE/ml extrahiert. Die bessere Eignung der Phenol-Chloroform-Extraktion für Joghurt ergibt sich aus mehreren Gründen: Hier werden die 500 µl der mit sterilem dH₂O 1:2 verdünnten Joghurt-Probe direkt mit Proteinase K und RNase A sowie mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol behandelt. Im Gegensatz hierzu wurde beim QIAamp DNA Mini Kit die Probe zu Anfang herunterzentrifugiert. Anschließend wurde der Rahm abgeschöpft und der flüssige Überstand entfernt, wonach dann das Pellet mit Proteinase K und Lysepuffer behandelt wurde. Da sich Brucellen im Fett anreichern, gehen hier bereits einige Bakterien für die DNA-Extraktion verloren. Huddleson et al., (1927) stellten fest, dass in Kuhmilch, die 24 h gestanden hatte, die Zahl der Brucellen im Rahm deutlich größer war als in der homogenen Vollmilch. Kommerziell erhältlicher Joghurt enthält zudem circa 13-17 % Trockenmasse (Tamime und Robinson, 1999), die bei unvollständiger Lyse die Poren des Qiagen-Säulchens verstopft und somit zu einer geringeren DNA-Ausbeute führen könnte. Die Phenol-Chloroform-Extraktion wurde speziell für den Nachweis von Brucellen in Kuhmilch entwickelt (Romero und Lopez-Goni, 1999) und später auch an Milch von Wasserbüffeln getestet. Im Vergleich mit fünf anderen DNA-Extraktions-Ansätzen war diese Methode ebenfalls am besten (Marianelli et al., 2008), wobei die Nachweisgrenze mit 4×10^3 KbE/ml deutlich höher als in der vorliegenden Arbeit lag. Die für Büffelmilch typischen höheren Gehalte an Fett (7,5 %) und Protein könnten hierfür eine Erklärung sein. Cremonesi et al. (2006) konnten durch 1:2-Verdünnung von Rohmilch von Kühen und Ziegen mit physiologischer Kochsalzlösung und Behandlung mit Guanidiniumthiocyanat und Dithiothreitol bis zu 10 KbE/ml der Mastitis-Erreger

Staphylococcus aureus und *Streptococcus* sp. isolieren. Möglicherweise könnte diese 90 Minuten dauernde Methode auch bei gramnegativen Brucellen die Nachweisrate erhöhen. Andererseits konnten McKillip et al. (McKillip et al., 2000) beim Nachweis von *E. coli* O157:H7 in Magermilch mit Phenol-Chloroform-Extraktion und Behandlung mit Ammoniumhydroxid bessere Ergebnisse erzielen als durch Behandlung mit Guanidiniumthiocyanat.

Bei der Phenol-Chloroform-Extraktion von *Brucella*-DNA aus Camembert konnten 5×10^2 KbE/g in 5/6 Proben und 5×10^1 KbE in 3/6 Proben nachgewiesen werden. Dagegen war eine Konzentration von 5×10^2 KbE/g aus Ziegenkäse mit 4/6 positiven Proben die untere Nachweisgrenze. Im Gegensatz zum Camembert, der als nahezu homogene Suspension in Wasser vorlag, konnte beim Ziegenfrischkäse nach dem Stomachern das Absetzen von festen Partikeln beobachtet werden. Diese schienen nicht hydrophob, sondern hydrophil zu sein, da sie in der anschließenden Phenol-Chloroform-Extraktion in der DNA enthaltenden wässrigen Phase wiedergefunden wurden. Wurde die Phenol-Chloroform-Extraktion zwei- bis dreimal durchgeführt, konnte eine klare wässrige Phase abpipettiert werden. Da aber jede weitere Behandlung mit Phenol-Chloroform ein Verlust an DNA bedeutet, kam es bei der Untersuchung des Ziegenfrischkäses zu einer geringeren Nachweissensitivität. Auch in anderen Studien wurden vergleichbare Nachweisraten von 1×10^2 KbE/ml erreicht. Die Autoren verdünnten den Weichkäse im Verhältnis 1:3 und nutzten den Stomacher zum Homogenisieren (Tantillo et al., 2003). Anschließend wurde Aceton zur Inaktivierung der lebenden Brucellen verwendet, wobei dieses Lösungsmittel aufgrund seiner hydrophilen Carbonylgruppe und der zwei lipophilen Methylgruppen auch das Fett des Käses emulgierte. Schließlich wurden sowohl Lysozym als auch $400 \mu\text{g}$ Proteinase K pro Probe verwendet und die DNA anschließend mittels Kit von Qiagen extrahiert. Im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen, in denen $260 \mu\text{g}$ Proteinase K pro Probe eingesetzt wurden, verwendeten die Autoren also eine um 50 % größere Menge. Da der Proteingehalt in dem verwendeten Ziegenfrischkäse (12,6 g) nahezu viermal höher war als in der Rohmilch (3,2 g), könnte die Erhöhung der Sensitivität auf die Verwendung einer höheren Konzentration von Proteinase K zurückzuführen sein. Öngör et al. (2006) berichten über eine Nachweisgrenze für Brucellen in Weichkäse mit 3×10^4 KbE/g. Bei dieser Methode wurde der Käse 1:10 in Natriumcitrat verdünnt und homogenisiert. Anschließend wurde die Suspension mit Ether, Ethanol und Ammoniumhydroxid behandelt. Das Käsepellet wurde einer klassischen DNA-Extraktion mit Phenol unterzogen und schließlich mit Natriumacetat und 95 %igem Ethanol versetzt. Diese Methode ist jedoch nicht nur wegen der geringeren Sensitivität, sondern auch wegen der

langen Inkubation über Nacht nicht von Interesse, da in der vorliegenden Arbeit ein Schnelltest in Hinblick auf ein bioterroristisches Szenario angestrebt wurde.

Die Inkubation mit RNase A und Proteinase K verlängert die DNA-Extraktion um dreieinhalb Stunden. Somit könnte man frühestens nach einem vollständigen Arbeitstag eine Aussage darüber treffen, ob die Probe *Brucella*-DNA enthält oder nicht. Da nach einem schnellen Nachweis gesucht wurde, stellt sich die Frage, ob möglicherweise einzelne Schritte weggelassen oder verkürzt werden könnten, wie zum Beispiel der Verzicht auf eine RNase-Behandlung (Leal-Klevezas et al., 1995). Romero und Lopez-Goni (1999) beschreiben allerdings, dass nach einer zweistündigen RNase A-Behandlung ein stärkeres Amplifikations-Signal in der PCR erhalten wurde, das zudem noch reproduzierbarer sei. Daher wurde in dieser Studie zu Gunsten der höheren analytischen Sensitivität das Protokoll nicht verkürzt.

Vergleicht man die Ergebnisse aus den Versuchen mit sechs verschiedenen DNA-Extraktions-Kits (Versuchsansatz 1, siehe Tabelle 5-1) mit den detaillierteren Untersuchungen der engeren Auswahl (Versuchsansatz 2, siehe Tabelle 5-2), so fällt auf, dass es Unterschiede bei der Extraktion von DNA aus 5×10^1 Brucellen/ml Lebensmittel gab. So ist die Nachweisrate in Rohmilch zum Beispiel bei Versuchsansatz 2 besser gewesen. In Versuchsansatz 1 wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion in 1/6 bzw. mittels QIAamp DNA Mini Kit in 2/6 Fällen aus Rohmilch DNA von 5×10^1 KbE/ml extrahiert, während in Versuchsansatz 2 5/6 bzw. 4/6 Proben *Brucella*-DNA enthielten. Gründe für die Inter-Assay-Variabilität könnten neben einer präziseren Arbeitsweise (Minimierung des „systematischen Fehlers“) auch Unterschiede in den verwendeten Chargen sein.

Abgesehen von der analytischen Seite muss die Methode auf ihr Aufwand-Nutzen-Verhältnis hin betrachtet werden. So benötigt man für die DNA-Isolation mittels Phenol-Chloroform-Extraktion sechs Stunden, während mit dem Kit von Qiagen nur dreieinhalb Stunden benötigt werden. Bei der Phenol-Chloroform-Extraktion wurde zwei Stunden lang mit RNase A inkubiert und nach anschließender Zugabe von Proteinase K noch einmal anderthalb Stunden inkubiert. Bei dem Kit von Qiagen wurde anderthalb Stunden mit Proteinase K inkubiert. So gesehen liegt der reine Arbeitszeitaufwand bei ersterer Methode bei zweieinhalb und bei Qiagen bei zwei Stunden. Für die Diagnostik ist in Bezug auf die DNA-Extraktion aus Rohmilch das QIAamp DNA Mini Kit vorzuziehen, da es durch die industriell hergestellten Puffer, die kürzere Gesamtdauer und die Abwesenheit von Phenol, das gesondert entsorgt

werden müsste, zuverlässiger und einfacher in der Handhabung ist. Vom Preis her ist es zwar kostenintensiver (2,55 € pro Probe beim Kit mit 250 Reaktionen, Stand: Juni 2011), bietet aber dafür die genannte Produktstabilität.

6.2.3 Vergleich der Sensitivität der *bcs31*-Real-Time PCR mit der *bcs31*-PCR

Das zusätzlich in den eigenen Untersuchungen eingesetzte TaqMan Real-Time PCR-System (Probert et al., 2004) hat den Vorteil, dass sich durch die darin enthaltene *Brucella*-Sonde die Nachweissensitivität erhöht und durch die Verwendung eines dritten Oligonukleotids im Mastermix (der TaqMan-Sonde) die Spezifität verbessert werden kann. Durch die sofortige Messung der Amplifikationsprodukte ergibt sich außerdem ein Zeitersparnis, da ein zusätzlicher Arbeitsschritt (Agarosegel) entfällt. Außerdem wurde in der hier verwendeten Real-Time PCR zusätzlich eine interne Amplifikationskontrolle in Form der stark verdünnten Lambda-DNA verwendet. Ist die PCR *Brucella*-negativ, bedeutet eine gleichzeitig fehlende Amplifikation der internen Kontrolle eine Inhibition der PCR, während bei Amplifikation der internen Kontrolle die Probe tatsächlich negativ ist. Die Idee, Lambda-DNA als interne Amplifikationskontrolle zu verwenden, wurde der LightCycler Real-Time PCR von Al Dahouk et al. (2007) entlehnt. Durch Austesten einer Verdünnungsreihe der Lambda-DNA wurde diejenige Konzentration ermittelt, für welche der Schwellenwert in der Amplifikation von *Brucella*-DNA in Wasser bei Zyklus 30 liegt ($2 \mu\text{l}$ à $100 \text{ fg}/\mu\text{l}$). Wie die Ergebnisse zeigen, überstieg das Signal der internen Kontrolle (200 fg Lambda-DNA pro Probe) den Schwellenwert bei einem durchschnittlichen C_T -Wert von 31 bis 33. Wurde die interne Kontrolle nicht detektiert, bedeutet das zunächst, dass die Real-Time PCR nicht funktioniert hat. Bei vorhandener *bcs31*-Amplifikation könnte die fehlende Amplifikation der internen Kontrolle die Ursache darin haben, dass möglicherweise sehr viel andere DNA (Nicht-Lambda-DNA) in dieser Probe enthalten war. Dieses war beispielsweise bei der *Brucella*-Standard-DNA (10 ng, siehe Tabelle 5-5) der Fall. Aufgrund der sehr hohen Kopienzahl an *Brucella*-DNA war die Wahrscheinlichkeit dafür, dass *Brucella*-Primer und -Sonden auf *Brucella*-DNA trafen und dann mittels Polymerase amplifiziert wurden, höher als bei Lambda-DNA. Wichtig ist jedoch, dass die interne Kontrolle positiv ist, wenn kein *Brucella*-Signal detektiert wurde, um bei der Interpretation des Ergebnisses ein falsch-negatives Ergebnis zu vermeiden. Bei dem Nachweis von *Brucella* in Camembert (siehe Tabelle 5-6) wurde nach der Extraktion aus 5×10^2 KBE/ml Käsesuspension kein *Brucella*-Signal detektiert, Lambda-Phagen-DNA jedoch schon. Die Real-Time PCR hat demnach

funktioniert. Aus dem hohen C_T -Wert von 35,7 kann man jedoch schließen, dass eine Inhibition stattgefunden haben muss.

In der Real-Time PCR wurde als DNA-Standardreihe zusätzlich eine Verdünnungsreihe von *Brucella*-DNA amplifiziert, um anhand einer Regressionsgeraden durch die C_T -Werte die DNA-Menge ermitteln zu können. Daraus sollte anschließend die Zahl der aus den Lebensmitteln extrahierten Genomkopien berechnet werden. Allerdings wurden in der Literatur die unterschiedlichsten Genomgewichte für Brucellen gefunden. Die angegebenen Werte reichten von 3,08 fg (Navarro et al., 2002) über 3,33 fg (Gopaul et al., 2008), 3,57 fg (Ohtsuki et al., 2008) und 3,8 fg (Tomaso et al., 2010) bis zu 5 fg (Da Costa et al., 1996) und sogar 10-15 fg (Navarro et al., 2006). Da die Genomgewichte sich stark unterschieden und sich die Autoren zum Teil selbst widersprachen, wurden eigene Berechnungen durchgeführt. Durch die Sequenzierung mehrerer *Brucella*-Spezies (Crasta et al., 2008; DelVecchio et al., 2002; Halling et al., 2005; Paulsen et al., 2002) sind bereits einige Genomgrößen bekannt. Die eigenen Berechnungen ergaben ein Genomgewicht von 3,38 fg für *Brucella* sp. bzw. 3,37 fg für *B. abortus*.

In dieser Arbeit wurden die Extraktionsproben sowohl mittels klassischer *bcs31*-PCR als auch mittels *bcs31*-Real-Time PCR nachgewiesen. Dabei zeigte sich zum einen, dass in den drei höchsten eingesetzten Brucellen-Konzentrationen die Nachweisraten überwiegend gleich waren. In Kombination mit der Phenol-Chloroform-Extraktion konnte in physiologischer Kochsalzlösung und Camembert eine um den Faktor 10 höhere Sensitivität ermittelt werden. Letzteres war in Kombination mit dem QIAamp DNA Mini Kit in Rohmilch und Joghurt ebenfalls möglich. Diese Ergebnisse decken sich in der Tendenz mit bereits publizierten Beobachtungen: Bounaadja et al. (2009) zeigten, dass die *bcs31*-Real-Time PCR 50-500mal sensitiver als die klassische *bcs31*-PCR ist. Für die kleineren Inokula sind die Ergebnisse aus der Real-Time PCR nicht eindeutig. Während bei der klassischen PCR klar zu erkennen ist, dass mit sinkender Brucellen-Konzentration *bcs31* in einem geringeren Anteil der Proben nachweisbar ist, wurden bei der Real-Time PCR einzig bei Ziegenfrischkäse auch 0/6 Proben *Brucella*-positiv getestet. Anhand der berechneten Genomäquivalente (siehe Tabelle 5-5 und Anhang) ist ersichtlich, dass laut Real-Time PCR und dem Größenstandard in den geringsten drei Brucellen-Konzentrationen gleich viele Genomäquivalente (ca. 10^2 GÄ) enthalten sein sollen. Unabhängig davon ist die Detektion von z. B. 10 Zellen *B. abortus* 1119-3 in Joghurt rein rechnerisch nicht möglich, auch wenn mittels Real-Time PCR dies in 6/6 Proben der Fall gewesen sein soll (siehe Tabelle 5-6). Von einem Milliliter mit 10 Brucellen wurden 500 μ l in der Phenol-Chloroform-Extraktion eingesetzt (also 5 Bakterien). Selbst wenn man 100 % der

DNA extrahieren könnte, so würden im PCR-Ansatz laut Protokoll 5 µl und somit ein Fünftel zur Amplifikation verfügbar sein. Das Genom einer Brucelle könnte also im PCR-Ansatz vorliegen. Da die *bcs31*-Real-Time PCR aber zur erfolgreichen Detektion mindestens 18 fg DNA von *B. abortus* (entsprechend 5-6 *B. abortus*-Genomen) benötigt (Bogdanovich et al., 2004), ist die Detektion also nicht in 6/6 sondern statistisch gesehen nur in 1/6 Proben bei maximaler Sensitivität möglich.

Eine Begründung für die gleiche Zahl an Genomäquivalenten in den Proben mit geringen Brucellen-Konzentrationen könnten falsch-positive Ergebnisse sein. Die in der Diagnostik erforderlichen Kontrollen (Malorny et al., 2003) wie die interne Amplifikationskontrolle (Lambda-DNA), eine Negativ- (H₂O) und eine Positivkontrolle (*Brucella*-DNA) wurden mitgeführt und das Pipettieren des Mastermixes wurde in einem sowohl von bakteriellen Kulturen als auch vom Real-Time Cycler getrennten Raum durchgeführt. Primer und Sonden wurden aliquotiert verwendet, um die Verschleppung einer eventuellen Kontamination zu vermeiden. Eine Kreuzkontamination während des Pipettierens der Real-Time PCR wurde somit erschwert. Möglich wäre eine Verschleppung von *Brucella*-Zellen bzw. -DNA bereits während der DNA-Extraktion. Dies wurde in 1/6 Fällen für die Joghurt- und in 3/6 Fällen für die Camembert-Negativkontrolle mittels klassischer *bcs31*-PCR ermittelt (siehe Tabelle 5-6). Im Gegensatz zur *bcs31*-Real-Time PCR wurden in der klassischen *bcs31*-PCR sehr wenige falsch-positive Proben detektiert. Eine theoretisch denkbare Begründung für diese falsch-positiven Proben wäre die Tatsache, dass für deren Primer B4/B5 auch die Amplifikation von *Ochrobactrum intermedium* publiziert wurde. Allerdings gelang dort keine Bestätigung mittels Nested-PCR (Bounaadja et al., 2009). Dass im Vergleich zur klassischen *bcs31*-PCR die Hälfte oder mehr Negativkontrollen in der *bcs31*-Real-Time PCR positiv waren, deutet auf eine Kontamination hin, die jedoch trotz der oben beschriebenen Vorsichts- und Kontrollmaßnahmen nicht verhindert werden konnte. Sollte die Real-Time PCR wie bei Bounaadja et al. (2009) beschrieben auch nach dem in dieser Arbeit durchgeführten Protokoll (mit Lambda-DNA als interne Amplifikationskontrolle) sensitiver sein, so wäre theoretisch begründbar, dass die gezeigten falsch-positiven Proben in der klassischen PCR negativ waren. Unabhängig von solchen theoretischen Überlegungen zeigen die vorliegenden Ergebnisse der klassischen *bcs31*-PCR ein eindeutigeres Bild der Sensitivität als die der *bcs31*-Real-Time PCR. Theoretisch hätte die Real-Time PCR mit ihrer höheren Sensitivität (Bounaadja et al., 2009), und dem geringeren Zeit- und Arbeitsaufwand (Agarosegele werden zum Nachweis nicht benötigt) Vorteile gegenüber der klassischen PCR. Hinzu kommt, dass die amplifizierte Kopienzahl anhand von DNA-Standards mittels gemessener Fluoreszenz-Intensität präziser zu

ermitteln ist als dies über die klassische PCR und Mengenstandards im Agarosegel möglich ist (Gryson et al., 2010).

Der Nachweis in Ziegenfrischkäse-Proben gelang mit beiden PCR-Systemen nur in den höchsten Konzentrationen. Bei der DNA-Extraktion musste dieser Matrix dreimal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol behandelt werden, wohingegen alle anderen Matrices nur einmal extrahiert werden mussten. Da auf keinen Fall ein Teil der organischen Phase mit in die wässrige DNA-Lösung überführt werden sollte, wurde stets weniger von der wässrigen Phase abpipettiert als vorhanden war. Des Weiteren könnten auch in der DNA-Lösung verbliebene Lebensmittelbestandteile wie Kalzium, Proteine und Fette die PCR inhibiert haben (Wilson, 1997) und somit die Zahl der Zyklen bis zum Übersteigen des Schwellenwertes erhöht haben. Im Unterschied zu den anderen Matrices war bei Ziegenfrischkäse die klassische *bcs31*-PCR um den Faktor 10 sensitiver. Hier könnte zu Tragen kommen, dass diese im Gegensatz zur Real-Time PCR keine Sonde beinhaltet und somit weniger Hybridisierungen pro Amplifikation (nur zwei Primer statt zwei Primer plus Sonde) für eine erfolgreiche Detektion zustande kommen müssen.

Nach der Extraktion von *Brucella*-DNA aus Joghurt nach Romero und Lopez-Goni bzw. aus physiologischer Kochsalzlösung, Rohmilch und stillem Mineralwasser mittels QIAamp DNA Mini Kit wurden dagegen mehr Genomäquivalente (0,5-1 Log-Stufen) gefunden als im Inokulum eingesetzt worden waren. Dies könnte – theoretisch – durch *Brucella*-DNA-Standards unterschiedlicher Konzentration zustande kommen. Allerdings wurde die Standard-DNA einmal angesetzt und anschließend für alle PCRs verwendet. Die Standards wurden in Aliquots eingefroren, so dass einer Beschädigung der DNA durch wiederholtes Gefrieren und Auftauen vorgebeugt wurde. Und schließlich wurden die verwendeten Pipetten regelmäßig kalibriert, so dass höchst mögliche Präzision beim Pipettieren möglich war. Aprodu et al. (2011) bestimmten gegenüber dem Nachweis durch Kultivierung auf Nähragar mittels Real-Time PCR eine bis zu 22fach höhere Anzahl an Genomäquivalenten. Die Autoren postulierten, dass mehrere Zellen von *S. aureus* Cluster bilden und somit auf dem Agar nahe beieinander wachsen. Diese seien später als nur eine Kolonie erkennbar, wodurch der kulturelle Nachweis die tatsächliche Zahl der Bakterien unterschätze. Da die in der vorliegenden Arbeit das Inokulum ebenfalls kulturell bestimmt wurde, könnte diese Erklärung auch hier zutreffen.

Bei Joghurt stimmten tatsächliche und berechnete Werte für die ersten drei Verdünnungsstufen gut überein. Bei 50 und 5 KBE/ml waren rechnerisch doppelt so viele

Zellen enthalten als eingesetzt wurden. Diese Schwankung ist jedoch im Gegensatz zu ein bis zwei Potenzen bei den anderen Matrizes gering und kann methodische Gründe haben.

6.3 Immunomagnetische Separation

6.3.1 Wahl der magnetischen Partikel, der für die Beschichtung verwendeten Antikörper sowie der Antikörperverdünnungen

Die IMS wird bereits für den Nachweis von Erregern in Lebensmitteln eingesetzt (Safarik et al., 1995), da sie zur Verkürzung der Gesamt-Testdauer beiträgt und in einigen Fällen die Sensitivität gegenüber dem kulturellen Nachweis erhöht. Die Empfehlung der USDA, die IMS im Nachweis von *E. coli* O157:H7 in Fleisch zu verwenden, zeigt die Akzeptanz dieser Methode durch eine internationale Behörde (USDA-FSIS, 2010).

Bei der Entscheidung über die Eigenschaften der verwendeten magnetischen Partikel sind sowohl Größe, als auch die Menge sowie die Oberflächenbeschichtung von Bedeutung. In vielen Versuchen wurden bereits Partikel mit einem Durchmesser von 2,7-2,8 µm zur Aufkonzentrierung von Bakterien verwendet (Kretzer et al., 2007; Öngör et al., 2006; Skjerve et al., 1990; Skjerve und Olsvik, 1991; Uyttendaele et al., 2000), weshalb diese Größe auch in der vorliegenden Arbeit gewählt wurde. Im Gegensatz zu größeren Partikeln von z. B. 4,5 µm Durchmesser haben 2,8 µm-Partikel im Verhältnis zum Volumen eine größere Oberfläche und bieten somit mehr Bindungsstellen für Antikörper. Gleichzeitig sedimentieren sie nicht so schnell, werden aber dennoch zügig durch flüssige Matrices hindurch am Magneten aufkonzentriert.

Die Anzahl der eingesetzten magnetischen Partikel dieser Größe lag bei den oben genannten Autoren recht einheitlich bei 1×10^7 bis 7×10^7 KBE/ml. Skjerve et al. (1990) testeten 1×10^6 sowie 1×10^7 Partikel pro ml und stellten eine Erhöhung der Wiederfindungsrate von 12 % auf 33 % fest. Im Gegensatz hierzu empfahlen Safarik et al. (1995) ein Verhältnis von Partikeln zu der Zahl der Zielorganismen von 3:1 bis 20:1. Die Zahl der für die eigenen Untersuchungen verwendeten magnetischen Partikel orientierte sich an den Empfehlungen des Herstellers Invitrogen, der für die tosylaktivierte Dynabeads 0,5-1,0 mg in Probenvolumina zwischen 100 und 500 µl empfiehlt, was $3,3-6,7 \times 10^7$ Partikeln entspricht. Die verwendeten 5×10^7 Partikel pro 500-µl-Probe für die Versuche mit dem Brucellose-Kontrollserum lagen somit in Bezug auf die Empfehlung im oberen Bereich. Mit dem Ziel der Erhöhung der Sensitivität wurde für die Versuche mit dem monoklonalen Antikörper mit $6,7 \times 10^7$ Partikeln die maximal von Invitrogen empfohlene bzw. von anderen Autoren verwendete Menge eingesetzt.

Die Stärke und Spezifität der Bindung von Antikörpern an magnetische Partikel wird durch die Oberflächeneigenschaften der Partikel bestimmt. Für Seren bieten sich zum Beispiel

Partikel an, die bereits mit Sekundär-Antikörpern beschichtet sind. Das in dieser Arbeit verwendete Serum (841 IE) wurde aus einem mit *Brucella abortus* experimentell infizierten Rind gewonnen. Da gegen dessen Immunglobuline keine beschichteten Partikel kommerziell erhältlich sind, fiel die Wahl auf tosylaktivierte magnetische Partikel. Der Tosyl-Rest wird durch Aminogruppen – z. B. von Antikörpern – in einer nukleophilen Substitution ersetzt und somit erfolgt die Bindung der Antikörper an die Partikel. Aminogruppen befinden sich natürlich auch in Serumproteinen, die ebenfalls an die magnetischen Partikel binden können und dadurch die Sensitivität der IMS senken oder zu unspezifischen Bindungen führen. Ushijima et al. (1990) reinigten daher vor dem Beschichten der Partikel Immunglobuline aus Humanseren durch Behandlung mit 50 %igem Ammoniumsulfat und anschließender Dialyse in PBS auf. Skibeli et al. (2001) nutzten eine andere Methode und präzipitierten die Immunglobuline mit 12,5 %igem Polyethylenglykol 6.000. Die Aufreinigung geht jedoch immer mit einem gewissen Verlust an Material einher (Rosa et al., 2009). Da in dieser Arbeit nur eine begrenzte Menge Vollserum zur Verfügung stand und es nicht neu beschafft werden konnte, wurde es nicht weiter behandelt. Wiederfindungsraten von bis zu 81,9 % zeigen, dass trotzdem eine gute Bindung von Brucellen an die beschichteten immunomagnetischen Partikel erfolgte. Die Sensitivität und die Wiederfindungsraten werden in den Abschnitten 6.3.2 und 6.3.3 ausführlich diskutiert.

Der kommerzielle monoklonale anti-*Brucella*-Antikörper hatte eine Reinheit von über 95 % und wurde ebenfalls direkt mit den den tosylaktivierten magnetischen Partikeln inkubiert. Ein Aufreinigungsschritt war hier nicht nötig.

Für eine optimale IMS muss die für die Beschichtung eingesetzte Menge an Antikörpern der Beschaffenheit und Zahl der verwendeten magnetischen Partikel angepasst werden. Bei einem Überschuss an Antikörpern können diese (und die Partikel) aggregieren (Kretzer et al., 2007; Skjerve et al., 1990), was zu einer verminderten Sensitivität führt. Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Verdünnungsreihen sollte deshalb das optimale Mengenverhältnis zwischen magnetischen Partikeln und Antikörpern ermittelt werden. Dieses Verhältnis lag bei Verwendung von 5×10^7 magnetischen Partikeln pro Probe bei einer Serumverdünnung von 1:100 in Puffer B, da hier beim Nachweis von 5×10^3 KbE *B. abortus* 1119-3 pro 500- μ l-Ansatz die Sensitivität gleich der nächsthöheren Serumkonzentration war und gleichzeitig höher als bei der stärksten Serumverdünnung (siehe Abbildung 5-11). Koujitani et al. (2006) verwendeten zur IMS von *Yersinia enterocolitica* O:8 ein Serum mit einem Titer von 1.026 I.E. und beschichteten damit magnetische Partikel, die mit Schaf-anti-Kaninchen-

Immunglobulinen vorbehandelt waren. Öngör et al. (2006) setzten ihr in Kaninchen hergestelltes Serum (640 I.E.) in einer Verdünnung von 1:32 pro Probe ein. Insofern verwendeten sie einen etwa dreimal höheren Antikörpertiter pro Probe. Im Unterschied zu den eigenen Untersuchungen inkubierten Öngör et al. jedoch die Serumverdünnung nicht zum Beschichten der magnetischen Partikel, sondern direkt mit einem vorbehandelten Käsepellet, um im Anschluss mit Sekundärantikörper beschichtete magnetische Partikel hinzuzugeben (siehe Abbildung 1-7 C). Ein Vergleich ist aufgrund der methodischen Unterschiede der IMS sowie der Käse-Aufbereitung schwierig, soll hier aber verdeutlichen, dass Seren mit Titern der gleichen Größenordnung auch von anderen Autoren für sinnvoll erachtet wurden.

Im zweiten Ansatz mit dem monoklonalen anti-*Brucella*-Antikörper wurde sich an der Empfehlung des Herstellers der magnetischen Partikel (Invitrogen) orientiert, der 3 µg Antikörper pro 10^7 magnetischer Partikel als optimale Antikörpermenge bzw. maximal 8 µg Antikörper empfiehlt. Dementsprechend wurden für $6,7 \times 10^7$ magnetische Partikel drei verschiedene Antikörpermengen (2,04, 20,4 und 54,4 µg) eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass die mittlere Menge von 20,4 µg bei der verwendeten Anzahl an magnetischen Partikeln die höchste Sensitivität aufwies und 5×10^1 KbE *B. abortus* 1119-3 pro 500-µl-Ansatz nachweisen konnte (siehe Abbildung 5-12). Skjerve et al. hatten bereits 1990 gezeigt, dass bei Verwendung von über 0,5 µg monoklonalem Antikörper pro 1×10^6 magnetischer Partikel (das entspräche 33,5 µg bei $6,7 \times 10^7$ Partikeln) aufgrund des Proteinüberschusses Vernetzungsmöglichkeiten (sterische Effekte) ergeben, die zur Verringerung der Oberfläche der Gesamtheit aller magnetischen Partikel führen können. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass die höchste Antikörpermenge (54,4 µg) eine geringere Sensitivität bei der Separation von *B. abortus* 1119-3 aufwies.

6.3.2 Sensitivität der immunomagnetischen Separation

Bei der Verwendung von Brucellose-Kontrollserum zum Beschichten der magnetischen Partikel wurde eine Sensitivität von 5×10^2 KbE *B. abortus* pro 500-µl-Ansatz (entspricht 1×10^3 KbE/ml) in Puffer C (PBS mit 0,1 % BSA) ermittelt (siehe Abbildung 5-13). Verglichen mit den Ergebnissen anderer Autoren, die zum Nachweis von Bakterien mit Antikörpern beschichtete magnetische Partikel verwendeten, liegt die Sensitivität im mittleren Bereich. So konnten Skjerve et al. (1990) sowie Uyttendaele et al. (2000) jeweils 1×10^2 KbE *Listeria monocytogenes* pro ml nachweisen. Koujitani et al. (2006) isolierten von *Y. enterocolitica* O:9 mittels IMS 100 KbE/ml Flusswasser in 5/5 Proben und 10 KbE/ml in 3/5

Proben. Für *Staphylococcus aureus* dagegen lag die Sensitivität bei 1×10^4 bis 1×10^5 KbE/ml PBS (Yazdankhah et al., 1998).

Zur Steigerung der Sensitivität wurden verschiedene Versuchsbedingungen variiert. Zum einen wurden Probenvolumen von 500 μ l und 1.000 μ l untersucht. Dabei konnten in dem kleineren Volumen bis zu 5×10^1 KbE *B. abortus* 1119-3 nachgewiesen werden, weshalb für die anschließenden Untersuchungen nur noch 500- μ l-Proben verwendet wurden. Für eine Separation mit gleicher Sensitivität bei größerem Probenvolumen hätte möglicherweise die Zahl der immunomagnetischen Partikel erhöht werden müssen. Skjerve und Olsvik (1991) wiesen bis zu 60 KbE *Salmonella enterica* Saint Paul pro ml 1:10 verdünntem Milchpulver nach und konnten diese Nachweisrate durch Erhöhung der Partikelzahl auf 2×10^7 /ml aufrechterhalten.

Die Inkubationsdauer und die Inkubationstemperatur haben einen entscheidenden Einfluss auf die Sensitivität. Zunächst erfolgte eine 24stündige Beschichtung der magnetischen Partikel mit Brucellose-Kontrollserum bei 37 °C mit anschließendem 24stündigem Blocken mittels Tris/BSA-Puffer bei 20 °C. Für die darauf folgende Inkubation der Partikel mit dem Serum erwies sich eine Temperatur von 4°C gegenüber höheren Temperaturen von 20°C bzw. 37°C aufgrund einer besseren Sensitivität als günstigster. Zur Verkürzung der notwendigen Gesamtzeit wurde das Blocken auf 4 h bei 37 °C verkürzt. Die anschließend festgestellte Verringerung der Nachweisbarkeit um 50 % mit 5×10^2 KbE pro 500- μ l-Ansatz wurde durch eine Verlängerung der Inkubationszeit der Partikel mit *B. abortus* 1119-3 von 60 auf 90 Minuten ausgeglichen (siehe Abbildung 5-15). Skjerve et al. (1990) beobachteten ebenfalls eine Steigerung der Sensitivität bei einer Verlängerung der Inkubationszeit. Allerdings wiesen sie darauf hin, dass durch diese Verlängerung die Wahrscheinlichkeit für unspezifische Bindungen erhöht werde.

Als weitere Einflussgröße auf die Sensitivität wurde die Temperatur während der IMS von Brucellen aus Puffer C untersucht. Im Vergleich zu einer Temperatur von 4 °C waren bei 37 °C die *Brucella*-spezifischen Banden nach der *bcs31*-PCR im Agarosegel leicht schwächer, wohingegen bei 20 °C nur noch in einer von zwei Proben 5×10^2 KbE pro 500- μ l-Ansatz nachzuweisen waren (siehe Abbildung 5-16). Im Gegensatz zu diesen Sensitivitätsunterschieden konnten Yazdankhah et al. (1998) bei der IMS von *S. aureus* bei Raumtemperatur bzw. bei 37 °C keinen Unterschied feststellen. Aufgrund der eigenen Ergebnisse wurde für die folgenden Versuche die Temperatur von 4 °C beibehalten.

Nachfolgend auf die IMS erfolgt der Nachweis der separierten Bakterien zumeist durch Ausplattieren der an die magnetischen Partikel gebundenen Zellen auf Agar (Koujitani et al.,

2006; Skjerve et al., 1990; Uyttendaele et al., 2000). Da die Kultivierung von *Brucella* sp. in Reinkultur drei bis vier Tage und in der klinischen Diagnostik bis zu zwei Wochen dauern kann, kam dieses Nachweissystem für die eigenen Untersuchungen nicht in Betracht. Deutlich schneller ist der Nachweis mittels DNA-Extraktion und anschließender PCR bzw. Real-Time PCR. Durch die Trennung der bakteriellen Zellen vom Kulturmedium bzw. von Lebensmittelbestandteilen und durch nachfolgende Waschschrte werden PCR-Inhibitoren wie Fette, Proteine und Kalzium-Ionen (Wilson, 1997) entfernt, weshalb an die nachfolgende DNA-Extraktion nur geringe Anforderungen gestellt werden. Daher wurde ein Lysepuffer verwendet (StarPrep One Kit, Biotecon), der durch Aufkochen und Zentrifugation die DNA von den übrigen bakteriellen Zellbestandteilen innerhalb von 15-20 Minuten trennt. Im Vergleich hierzu könnte mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kits (Qiagen) mehr DNA bei gleichbleibender Sensitivität extrahiert werden (5×10^2 KbE pro 500- μ l-Ansatz, erkennbar an den intensiveren Banden, siehe Abbildung 5-17). Aufgrund der Präparationszeit von über drei Stunden fiel jedoch die Wahl auf den Lysepuffer von Biotecon. Die *Brucella*-DNA wurde anschließend mittels klassischer *bcs31*-PCR und Agarosegel bzw. mittels *bcs31*-Real-Time PCR nachgewiesen. Nach der Vorbereitung der magnetischen Partikel durch Beschichten mit Brucellose-Kontrollserum und anschließendem Blocken konnten somit die Brucellen innerhalb von vier bis viereinhalb Stunden nachgewiesen werden (2 h IMS, 15-20 min DNA-Extraktion, 1,5-2 h Real-Time PCR).

Zur Erhöhung der Sensitivität wurde in einem weiteren Versuchsansatz ein kommerziell erhältlicher monoklonaler anti-*Brucella abortus*-Antikörper IgG1 (Antibodies-online) zur Beschichtung der tosylaktivierten magnetischen Partikel eingesetzt. Aufgrund der Reinheit von 95 % und der Abwesenheit von Serumproteinen wurden deutlich mehr Bindestellen für *B. abortus* pro magnetischem Partikel und damit eine erhöhte Sensitivität erwartet. Nach den Ergebnissen konnte jedoch die Sensitivität mit 5×10^2 KbE pro 500- μ l-Ansatz nicht erhöht werden. Eine Ursache dafür könnte sein, dass sich während der Inkubation die Antikörper gegenseitig durch sterische Effekte behinderten und somit effektiv weniger Bindestellen verfügbar waren. Durch die Austestung von verschiedenen Antikörperverdünnungen wurde jedoch die optimale Konzentration von 20,4 μ g pro 500- μ l-Ansatz und $6,7 \times 10^7$ magnetischen Partikeln ermittelt (siehe Abbildung 5-12). Durch den Nachweis von 1-2 KbE *Salmonella enterica* Saint Paul pro ml zeigten Skjerve und Olsvik (1991), dass die Kombination von tosylaktivierten magnetischen Partikeln mit 2,8 μ m Durchmesser zumindest für aufgereinigte anti-*Salmonella*-Antikörper sehr gut funktioniert. Daher sollten weder die magnetischen Partikel noch die eingesetzte Antikörper-Menge ein Grund für ein Ausbleiben

der Sensitivitäts-Erhöhung sein. Möglich wäre auch, dass der verwendete Antikörper nur gegen ein bestimmtes Epitop von *B. abortus*, welches nicht häufig auf der Zelloberfläche vorkommt, gerichtet ist und es somit zu Sensitivitätsverlusten kommt. Eine weitere Erklärung könnte auch die Zusammensetzung des Block-Puffers (Puffer D) sein. Dieser enthielt im eigenen Versuch 0,1 % BSA sowie 0,2 M Tris. In Abhängigkeit des verwendeten Block-Puffers wurden bei der Verwendung magnetischer Partikel deutliche Unterschiede in der Wiederfindungsrate für *L. monocytogenes* festgestellt werden (Kretzer et al., 2007). Bei Verwendung von 0,1 % BSA und 1×10^7 beschichteten magnetischen Partikeln lag die Wiederfindungsrate bei 57 % und steigerte sich bei Verdoppelung bzw. Vervierfachung der Partikel-Anzahl auf 79 % bzw. 91 %. Bei Verwendung von 1 M Tris zum Blocken lag die Wiederfindungsrate bei 94-99 %. Diese Beobachtung erklären die Autoren damit, dass das große BSA-Molekül die Bindung von Bakterien sterisch behindern könnte.

In Ergänzung zu den Untersuchungen zur Sensitivität war zusätzlich von Interesse, welchen Mehrwert die Beschichtung magnetischer Partikel gegenüber unbehandelten Partikeln hat. Letztere können nur unspezifische Proteinbindungen mit der tosylaktivierten Partikel-Oberfläche eingehen. Bei Inokula von $4,68 \times 10^9$ KbE bzw. $1,64 \times 10^6$ KbE *B. abortus* 1119-3 pro 500- μ l-Ansatz wurden durch unbehandelte Partikel jeweils Zellzahlen immobilisiert, die fünf Log-Stufen geringer waren. Dagegen waren die an beschichtete magnetische Partikel gebundenen Brucellen nur etwa 0,4 bis 1,5 Log-Stufen (Brucellose-Kontrollserum) bzw. 0,6 bis 1,9 Log-Stufen (monoklonaler Antikörper) niedriger als das jeweilige Inokulum. Diese Ergebnisse zeigen einerseits, dass durchaus eine Bindung von Brucellen an nicht beschichtete magnetische Partikel erfolgt. Gleichzeitig sind die Unterschiede im Anteil an gebundenen Bakterien im Vergleich zu beschichteten magnetischen Partikeln so groß, dass die Beschichtung sowohl mit dem Brucellose-Kontrollserum als auch mit dem monoklonalen Antikörper eindeutig eine deutliche Steigerung der Sensitivität bedeutet.

6.3.3 Wiederfindungsrate und Spezifität

Die Wiederfindungsrate beschreibt den Anteil der immobilisierten Brucellen an der Summe aus immobilisierten und freien Brucellen nach einer Inkubation mit immunomagnetischen Partikeln und zeigt deshalb, wie effizient die IMS ist. Dabei spielen sowohl die Affinität des Antikörpers zum Erreger als auch das Verhältnis von beschichteten Partikeln zur Probenmenge und -art eine Rolle. Bei Verwendung des Brucellose-Kontrollserums wurden in der IMS beim Ansatz von 5×10^7 KbE/500- μ l 81,9 % der lebenden Zellen von *B. abortus* 1119-3 gebunden. Bei Ansätzen mit höheren bzw. niedrigeren Brucellen-Konzentrationen fiel

die Wiederfindungsrate deutlich ab (siehe Tabelle 5-7). Bei Verwendung der mit monoklonalen anti-*Brucella*-Antikörpern beschichteten magnetischen Partikel lagen die Wiederfindungsraten beim Ansatz von $7,00 \times 10^1$ bis $8,34 \times 10^7$ KbE/500 μ l lediglich zwischen 39,3 und 52,1 %, wobei eine eher gleichmäßige Verteilung ohne die beim Brucellose-Kontrollserum beobachteten Spitzenwerte vorlag (siehe Tabelle 5-8). Im Vergleich dazu ermittelten Uyttendaele et al. (2000) für die Bindung von *L. monocytogenes* an den magnetischen Partikeln mit einem Ansatz von $1,2 \times 10^5$ KbE/ml eine Wiederfindungsrate von 13 %. Fisher et al. (2009) konnten von 10^6 eingesetzten *Bacillus anthracis*-Sporen pro ml Wasser 90-95 % wiederfinden, wobei diese Rate bei Sporenkonzentrationen von über 10^7 KbE/ml auf 70 % zurückging.

Bei den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Zellzahlen im Bereich von 10^1 KbE pro 500- μ l-Ansatz ist zu beachten, dass diese geringen Zellzahlen keine Nachweisraten, sondern Wiederfindungsraten sind. Die Berechnung der Wiederfindungsrate erfolgt durch Bezug der an die magnetischen Partikel gebundenen Zellen zur Gesamtzahl der wiedergefundenen Zellen (Fisher et al., 2009). Demgegenüber bezieht sich die Nachweisrate auf das minimal nachweisbare Inokulum. Optimalerweise sollten sich das Inokulum und die Zahl der wiedergefundenen Zellen nicht unterscheiden. In dieser Arbeit sind jedoch von den im Inokulum eingesetzten lebenden Brucellen in den meisten Fällen nur zwischen 35 und 75 % auf Partikeln und in Überständen wiedergefunden worden. Aufgrund dieses Unterschiedes wurden im Versuch mit dem monoklonalen anti-*Brucella*-Antikörper alle eingesetzten Inokula in jeder Verdünnungsstufe ausplattiert. Tatsächlich war deutlich zu erkennen, dass die ausgezählten Zellzahlen von den rechnerisch erwarteten 1:10-Verdünnungen abwichen (siehe Tabelle 5-8). Allerdings war die Summe der auf Partikeln und im Überstand nachgewiesenen Brucellen erneut kleiner als das jeweilige Inokulum. Demzufolge müssen die fehlenden Brucellen im Laufe der drei Waschschriffe von den magnetischen Partikeln abgewaschen worden sein. Skjerve et al. (1990) stellten fest, dass nach sechs Waschschriffen 30 % der gebundenen Listerien weggeschiffen worden waren. Dagegen schreiben Benoit und Donahue (2003), dass sich die Wiederfindungsrate bei jedem Waschschriff um 50 % reduzierte. Bei Uyttendaele et al. (2000) wurden nur $3,72 \times 10^3$ KbE/ml (3,1 %) von eingesetzten $1,2 \times 10^5$ KbE *L. monocytogenes* pro ml im ersten Waschschriff weggeschiffen. Bei letzteren Autoren wurde dennoch etwa die Hälfte aller eingesetzten Listerien (49,2 %) nicht wiedergefunden. In diesen Fällen kann vermutet werden, dass die Affinität des Antikörpers für die Listerien gering war. Eventuell wurde ein Oberflächenprotein als Target ausgesucht, das von der LPS umgeben und somit schlecht zugänglich war. Neben einem Verlust durch Waschschriffe kann

ein weiterer Grund für geringe Wiederfindungsraten in der Nachweismethode selbst liegen. Olsvik et al. (1994) wiesen darauf hin, dass pro magnetischem Partikel ein bis sechs Bakterien immobilisiert werden können. Diese liegen auf so engem Raum (2,8 μm), dass sie hinterher als eine Kolonie auf dem Nähragar erscheinen. Dies würde einen Teil der nicht wiedergefundenen Zellen erklären. Trotz dieser Einschränkung ist der kulturelle Nachweis die Standard-Methode bei der Etablierung der IMS von Bakterien (Fisher et al., 2009; Kretzer et al., 2007; Safarik et al., 1995; Skjerve et al., 1990).

Mittels IMS konnten Referenzstämme aller derzeit bekannten *Brucella*-Spezies aufkonzentriert werden. Überraschenderweise wurden dabei auch die rauen Stämme *B. canis* RM6/66 und *B. ovis* 63/290 von den magnetischen Partikeln gebunden. Raue Stämme enthalten im Gegensatz zu glatten Stämmen kein O-Polysaccharid im LPS oder nur ein stark verkürztes (Schurig et al., 2002). Beim Brucellose-Kontrollserum handelte es sich allerdings um ein Vollserum, das ein breites Spektrum an anti-*Brucella*-Antikörpern enthielt. Diese waren mit hoher Wahrscheinlichkeit größtenteils gegen andere Epitope als das O-Polysaccharid der LPS-Schicht gerichtet. Für den monoklonalen Antikörper gab der Hersteller an, dass sich dieser gegen intakte Brucellen, nicht aber gegen *Brucella*-LPS richte. Daher könnte auch hier ein weiteres Oberflächenantigen für die Isolation mittels IMS verantwortlich sein. In Frage kommen äußere Membranproteine, wie z. B. Omp25 (Dubray und Bézard, 1980; de Wergifosse et al., 1995). Allerdings werden diese bei glatten (*smooth*) *Brucella*-Spezies aufgrund sterischer Hinderung durch die O-Polysaccharide der LPS von Antikörpern nur in geringem Maße gebunden (Cloekaert et al., 1990; Cloekaert et al., 2002), weshalb beim Nachweis nur eine schwache Bande im Agarosegel zu erwarten wäre. Dies war jedoch nicht der Fall.

5×10^7 KBE pro 500- μl -Ansatz sind eine große Menge an eingesetzten Bakterien, weshalb auch eine unspezifische Bindung der rauen Brucellen denkbar ist. Unspezifische Bindungen sind bei hohem Inokulum aus der Literatur bekannt (Skjerve et al., 1990; Uyttendaele et al., 2000) und wurden auch in dieser Arbeit beobachtet (siehe Abschnitt 6.3.2). Eine unspezifische Bindung war hier offensichtlich nicht der Hauptgrund, da die Banden im Agarosegel dieselbe Intensität aufwiesen wie die glatten Stämme (siehe Abbildung 5-18).

Die Spezifität der mit Brucellose-Kontrollserum beschichteten magnetischen Partikel wurde durch Inkubation mit *Ochrobactrum intermedium* ermittelt, einer den Brucellen genetisch sehr nahe verwandten Spezies (Velasco et al., 1998). Hier lag die Wiederfindungsrate bei 1,4 %. Bei einem vergleichbar hohen Inokulum mit *B. abortus* 1119-3 lag die

Wiederfindungsrate bei 33 % (siehe Tabelle 5-7), was zeigt, dass Brucellen bevorzugt durch das Brucellose-Kontrollserum gebunden wurden. Im Fall der mit dem monoklonalen Antikörper beschichteten magnetischen Partikel lag die Wiederfindungsrate für *O. intermedium* bei 7,9 % (siehe Tabelle 5-8) und somit höher als bei Verwendung des Brucellose-Kontrollserums. Zusätzlich wurde die Immobilisierung von *Yersinia enterocolitica* O:9 untersucht, da diese aufgrund der Ähnlichkeit der Struktur ihres O-Polysaccharides mit derjenigen von glatten (*smooth*) *Brucella*-Stämmen ebenfalls separiert werden könnte (siehe Abschnitt 1.3.2). Die Wiederfindungsrate von 8,1 % zeigt, dass auch diese Spezies in ähnlichen Größenordnungen immobilisiert wird. Im Vergleich zu den eigenen Untersuchungen testeten Fisher et al. (2009) die Spezifität der IMS für Sporen von *Bacillus anthracis*. Hierbei lag der Anteil der immobilisierten Sporen bei über 90 % und gleichzeitig der Anteil anderer *Bacillus*-Sporen (z. B. *B. subtilis*, *B. cereus*) bei unter 10 %. Im Gegensatz hierzu wurden in Versuchen von Koujitani et al. (2006) mit dem Ziel der IMS von *Yersinia enterocolitica* O:8 sogar nur 1 % der Serovare O:3, O:5,27 bzw. O:9 wiedergefunden. Diese hohe Spezifität wurde in den eigenen Versuchen mit dem Brucellose-Kontrollserum erreicht. Die Spezifität einer Nachweismethode hängt immer von allen Komponenten des Nachweissystems ab. In dieser Arbeit wurde zur möglichst schnellen Aufreinigung statt des drei bis vier Tage lang dauernden kulturellen Nachweises die Extraktion der DNA mit anschließender PCR verwendet. Da die *bcs31*-PCR mit dem Primerpaar B4/B5 hoch spezifisch für die Gattung *Brucella* ist (Imaoka et al., 2007; Matar et al., 1996; Probert et al., 2004), würden andere immobilisierte Bakterien (z.B. Begleitflora in Rohmilchprodukten) nicht falsch-positiv als *Brucella* nachgewiesen werden. Die Spezifität würde also durch die Begleitflora nicht verringert werden. Zwar besteht die Möglichkeit, dass durch eine unspezifische Bindung die Nachweisrate von Brucellen minimiert wird, da diese Positionen auf den magnetischen Partikeln dann bereits besetzt wären und nicht mehr den Brucellen zur Verfügung stehen würde. Besonders für das Brucellose-Kontrollserum konnte jedoch gezeigt werden, dass der Anteil an immobilisierten Brucellen deutlich höher ist als der an *O. intermedium* (siehe Tabelle 5-7) und damit genug DNA zum genetischen Nachweis vorhanden ist.

6.3.4 Nachweis von Brucellen aus Lebensmitteln

Der Nachweis von Brucellen mittels IMS gelang am besten aus Rohmilch, in der die niedrigsten Nachweisraten bei 1×10^2 bis 1×10^3 KBE/ml lagen. Im Vergleich dazu konnten Yazdankhah et al. (1998) mittels IMS Staphylokokken in Milch mit einer Nachweisrate von

10^4 bis 10^5 KbE/ml nachweisen. Skjerve und Olsvik (1991) wandten die IMS ebenfalls bei der Matrix Milch an und konnten bis zu 6×10^1 KbE *Salmonella enterica* St. Paul pro ml isolieren. Durch eine Kombination aus IMS mit anschließendem *bead beating* und DNA-Extraktion mittels Phenol/Chloroform/Isopropanol konnten bis zu 10 Zellen von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* mit der PCR nachgewiesen werden (Khare et al., 2004). Von der Aufkonzentrierung aus Joghurt mittels IMS rieten Skjerve und Olsvik (1991) ab, da die magnetischen Partikel schlecht durch die Matrix diffundierten und die Wiederfindung sehr gering war. Diese Erfahrung wurde auch hier gemacht, weshalb der Joghurt 1:8 verdünnt wurde. Dadurch konnte bei verlängerter Separationszeit (3 min am Magnet) der größte Teil der magnetischen Partikel von der Matrix getrennt werden. Mit der Verdünnung des Joghurts für die IMS wurde jedoch mit 8×10^3 KbE/ml Joghurt eine geringe Sensitivität erreicht. Gerade bei Joghurt gab es Unterschiede in den Ergebnissen, je nach Antikörper-Beschichtung (monoklonaler Antikörper bzw. Vollserum) und PCR um bis zu zwei Log-Stufen. Möglicherweise kann durch Verwendung von magnetischen Partikeln mit $4,5 \mu\text{m}$ Durchmesser eine bessere Separation erreicht werden. Durch die größere Masse müssten diese Partikel jedoch stärker vom Magneten angezogen und somit leichter durch den viskosen Joghurt hindurch bewegt werden. Dies könnte unter Umständen eine geringere Verdünnung möglich machen, die dann zu einer Erhöhung der Sensitivität führen würde. Unerlässlich ist bei dieser fettreichen Matrix (Joghurt mit 10 % Fett) der Wechsel der Reaktionsgefäße, da sich das Fett an den Wandungen festsetzt und somit auch nach mehrfachem Waschen keine fettfreie Suspension zu erreichen ist (Safarik et al., 1995).

In stillem Mineralwasser betrug die nachweisbare Brucellen-Konzentration bis zu 1×10^3 KbE/ml. Da Wasser weder Proteine noch Fette enthält, die mit den Antikörpern interagieren könnten und somit die Sensitivität senken könnten, wurde dieses Ergebnis erwartet. Demnach ist die Nachweisrate in Mineralwasser genau so hoch wie in Puffer C, der für die Sensitivitätsbestimmungen verwendet worden war (siehe Abbildung 5-13). Koujitani et al. (2006) konnten aus künstlich kontaminiertem Flusswasser 1×10^2 KbE *Y. enterocolitica* O:8 pro ml in 5/5 Fällen und 1×10^1 KbE/ml in 3/5 Fällen mittels IMS nachweisen. Dazu nutzten die Autoren magnetische Partikel, die bereits mit Schaf-anti-Kaninchen-Antikörpern beschichtet waren und inkubierten diese mit dem Serum eines mit hitzeinaktivierten *Yersinia*-Zellen immunisierten Kaninchens.

Mit Hilfe der IMS lag die Nachweisgrenze für Brucellen aus gespicktem Camembert bei 5×10^4 KbE/g. Der Nachweis von Brucellen aus Ziegenfrischkäse war mit 5×10^3 KbE/g sogar noch um eine Zehnerpotenz sensitiver. Hierzu musste der Käse 1:5 mit Wasser verdünnt

und gestomachert werden. Vergleichbare Ergebnisse wurden für den Nachweis von Brucellen mittels IMS aus Weichkäse mit 3×10^3 KbE/g durch Öngör et al. 2006 veröffentlicht. Dort wurde der Käse 1:10 verdünnt, homogenisiert und unter anderem mit Ether ausgeschüttelt. Diese Methode hat den Vorteil, dass das Fett emulgiert wird und sich der Rahm, in dem sich Brucellen bevorzugt anreichern (Huddleson, 1927), bei der Zentrifugation nicht mehr absetzt. Bei diesen Autoren wurde das Pellet zuerst mit einem aus Kaninchen gewonnenen anti-*Brucella melitensis* 16M-Serum behandelt und anschließend mit Schaf-anti-Kaninchen-Dynabeads inkubiert. Die Verdünnung von Käse zur Homogenisation mit anschließender Einengung des Volumens durch Zentrifugation ist eine oft angewandte Methode. Allerdings können die entstandenen Pellets aus Käse sehr viskos sein (Skjerve et al., 1991; Uyttendaele et al., 2000), was dann eine stärkere Verdünnung erfordert. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Käse direkt 1:5 verdünnt, was in Ziegenkäse zu einer vergleichbaren Sensitivität führte (5×10^3 KbE/ml). Sowohl in der vorliegenden Arbeit (siehe Tabelle 5-2) als auch in anderen Studien wurde jedoch festgestellt, dass eine reine DNA-Extraktion aus Käse ohne IMS um den Faktor 10 bis 100 sensitiver ist (Uyttendaele et al., 2000).

Als Fazit ist der Nachweis von Brucellen aus Lebensmitteln mittels IMS grundsätzlich denkbar, wobei die IMS mittels Brucellose-Kontrollserum beschichteter magnetischer Partikel sensitiver als mit dem in dieser Arbeit verwendeten monoklonalen anti-*Brucella*-Antikörper war. Die höchsten Nachweisraten konnten jedoch für alle Lebensmittel mit einer reinen DNA-Extraktionsmethode erzielt werden (siehe Abschnitt 5.2). Eine Verwendung von immunomagnetischen Partikeln zur Brucellen-Diagnostik ist nur dann sinnvoll, wenn eine Erhöhung der Sensitivität erreicht werden kann. Dazu sollten die in den Abschnitten 6.3.1 und 6.3.4 diskutierten möglichen Änderungen am Versuchsaufbau berücksichtigt werden.

7 Zusammenfassung

Zur Bewertung des Risikos im Fall einer absichtlichen Ausbringung von Brucellen in die Lebensmittelkette sind Kenntnisse zur Tenazität des Erregers in relevanten Lebensmittelmatrizes erforderlich. Daher wurde das Überleben von *Brucella abortus* 1119-3 in Rohmilch sowie in kommerziell erhältlichen Lebensmitteln wie H-Milch, Vorzugsmilch, Joghurt und stillem Mineralwasser bei handelsüblichen Lagerungstemperaturen untersucht. Besonders lange überlebten *B. abortus* 1119-3 und *B. melitensis* 16M in H-Milch, in der die Zellzahl anstieg und bis zum Ende des Versuchs nach 88 Tagen eine Konzentration von über 10^8 KbE/ml aufwies. In stillem Mineralwasser war *B. abortus* 1119-3 über einen Zeitraum von 60 Tagen kulturell nachweisbar, wobei die Zellzahl kontinuierlich abnahm. Bis zum Ende der Mindesthaltbarkeit des Produktes (jeweils vier Tage) überlebte der genannte Stamm in Vorzugsmilch und Rohmilch. In Joghurt konnten hingegen lebende Zellen nur zwei (1,5 % Fett), vier (3,5 % Fett) bzw. einen Tag (10 % Fett) nachgewiesen werden, wobei der schnelle Rückgang der Zellkonzentration wahrscheinlich durch den niedrigen pH-Wert von 4,2 verursacht wurde. Bei einer absichtlichen Kontamination würden Brucellen für zwei Wochen (stilles Mineralwasser) bzw. über Monate (H-Milch) in einer hohen Konzentration in den Lebensmitteln überleben und beim Verzehr mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Brucellose führen.

Für die Erkennung und Typisierung von Brucellen im Fall der absichtlichen Kontamination von Lebensmitteln müssen geeignete Schnellmethoden zur Verfügung stehen. Deshalb wurden sechs verschiedene Methoden in Kombination mit der PCR auf ihre Effizienz zur Extraktion und zum Nachweis von *Brucella*-DNA aus relevanten Lebensmittelmatrizes untersucht. Für stilles Mineralwasser und physiologische Kochsalzlösung erwies sich das QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) mit einer Nachweisgrenze von 5×10^1 KbE/ml am sensitivsten. Für Rohmilch eigneten sich sowohl der Kit von Qiagen als auch die Phenol-Chloroform-Extraktion, wobei letztere mit höherer Zuverlässigkeit bis zu 5×10^1 KbE/ml nachwies. Die Nachweisgrenze für Brucellen in Joghurt (10 % Fett) lag bei Anwendung der Phenol-Chloroform-Extraktion mit 1×10^2 KbE/ml niedriger als mit dem QIAamp DNA Mini Kit (1×10^4 KbE/ml). Mit der für Milchprodukte tauglichen Phenol-Chloroform-Extraktion wurden bis zu 5×10^2 KbE/g in Camembert und in Ziegenfrischkäse nachgewiesen. Die DNA-Extraktion aus Weichkäse erfordert eine Homogenisation nach Verdünnung mit Flüssigkeit und führt deshalb zu einer Abnahme der Sensitivität. Im Gegensatz zur mehrere Tage dauernden Kultivierung von Brucellen auf Nährmedien, für die ein Labor der Sicherheitsstufe 3 erforderlich ist, kann durch die Kombination aus DNA-Extraktion und

Real-Time PCR ein Nachweis innerhalb eines halben (QIAamp DNA Mini Kit) bzw. innerhalb eines Arbeitstages (Phenol-Chloroform-Extraktion) in einem Labor der Sicherheitsstufe 2 erfolgen. Eine Erhöhung der Sensitivität zum Nachweis der *Brucella*-DNA war allerdings mittels Real-Time PCR im Vergleich zur herkömmlichen PCR nicht möglich. Mit dem Ziel, die Nachweisgrenzen für *Brucella*-DNA insbesondere in Milchprodukten zu optimieren, wurde die immunomagnetische Separation (IMS) als spezielle Methode für die Voranreicherung und Aufreinigung der DNA untersucht. Zu diesem Zweck wurden tosylaktivierte immunomagnetische Partikel eingesetzt, die mit einem Brucellose-Vollserum bzw. einem monoklonalen anti-*Brucella*-Antikörper beschichtet waren. Trotz Optimierung der IMS in Abhängigkeit verschiedener Parameter, wie Probenvolumen, Inkubationszeit und -temperatur lag die Grenze zum Nachweis der *Brucella*-DNA bei 5×10^3 KbE/g für Ziegenfrischkäse, bei 1×10^3 KbE/ml für Rohmilch und stilles Mineralwasser, bei 8×10^4 KbE/ml für Joghurt und bei 5×10^4 KbE/g für Camembert und war deshalb weniger sensitiv als die vorgenannten Extraktionsmethoden.

8 Summary

In case of a deliberate contamination of the food chain with brucellae it is important to know the survival of the bacteria in relevant food matrices. Therefore, the survival of *Brucella abortus* 1119-3 was investigated in raw milk as well as in commercially available foods like UHT-milk, certified raw milk, yogurt and still mineral water at general storage conditions. *B. abortus* 1119-3 and *B. melitensis* 16M survived longest in UHT-milk in which the total cell count multiplied to more than 10^8 cfu/ml at the end of the product's shelf life after 88 days. In still mineral water viable cells of *B. abortus* 1119-3 could be detected for 60 days in culture. Until this day the total cell count declined continuously. In raw milk and certified raw milk this strain survived until the end of the product's shelf life (four days, respectively). In yogurt viable cells could be detected for two days (1.5 % fat), four days (3.5 % fat) or one day (10.0 % fat), most probably due to the low pH of 4.2. In case of a deliberate contamination brucellae would survive at a high concentration for two weeks (still mineral water) or for months (UHT-milk) so that ingestion of the food would most probably lead to brucellosis.

Suitable methods for the fast detection and typing of brucellae should be available in case of deliberate contamination of foods. Therefore, six different methods used in combination with PCR were examined regarding their efficiency to extract and detect *Brucella*-DNA from relevant food matrices. For extraction from still mineral water and physiological saline, the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) revealed the best detection limit of 5×10^1 cfu/ml. For raw milk both the kit and the phenol chloroform extraction were best suited of which the latter was more reliable at a detection limit of 5×10^1 cfu/ml. The detection limit for brucellae in yogurt (10 % fat) was better with phenol chloroform extraction (1×10^2 cfu/ml) than with QIAamp DNA Mini Kit (1×10^4 cfu/ml). By means of phenol chloroform extraction which is most suitable for milk products, the detection limit for *Brucella* DNA in camembert and goat cheese corresponded with 5×10^2 cfu/g. The extraction of DNA from soft cheese requires a homogenisation after dilution in a fluid which diminishes sensitivity. In contrast to cultivation of brucellae on nutrient agar for several days under biosafety level 3 conditions, the detection by using DNA extraction followed by real-time PCR can be achieved within half a working day (QIAamp DNA Mini Kit) or alternatively within one day (phenol chloroform extraction) under biosafety level 2 conditions. However, the limit for detection of *Brucella* DNA could not be improved by use of real-time PCR compared to the classical PCR.

In order to optimize the detection limits for *Brucella* DNA especially in milk products, the immunomagnetic separation (IMS) was tested as a pre-enrichment and purification procedure. For this purpose, tosyl activated immunomagnetic particles coated with brucellosis serum or

with a monoclonal anti-*Brucella* antibody were used. Despite the optimization of IMS considering different parameters such as sample volume, incubation time and temperature, the limit for the detection of *Brucella* DNA was 5×10^3 cfu/g for goat cheese, 1×10^3 cfu/ml for raw milk and still mineral water, 8×10^4 cfu/ml for yogurt and 5×10^4 cfu/g for camembert and was thus less sensitive than DNA extraction methods mentioned above.

9 Anhang

9.1 Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung von Prof. Dr. Bernd Appel in der Zeit von März 2008 bis Juni 2011 in der Fachgruppe für Diagnostik, Genetik und Erregercharakterisierung der Abteilung für Biologische Sicherheit des Bundesinstituts für Risikobewertung angefertigt.

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Tenazität von hochpathogenen Erregern in Lebensmitteln und Schnellmethoden zu deren Nachweis am Beispiel *Brucella*“ selbstständig und ohne Benutzung anderer als der zugelassenen Hilfsmittel angefertigt zu haben. Alle aufgeführten Zitate sind als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit wurde in keinem früheren Promotionsverfahren angenommen oder als ungenügend beurteilt.

9.2 Publikationen

Ein Teil dieser Dissertation wurde in folgender Publikation veröffentlicht:

Falenski, A., Mayer-Scholl, A., Filter, M., Göllner, C., Appel, B., Nöckler, K. (2011): „Survival of *Brucella* spp. in mineral water, milk and yogurt”. International Journal of Food Microbiology 145 (1), S. 326-330, Epub 27.11.2010.

Falenski, A.[†], Hammerl, J.A.[†], Mayer-Scholl, A., Al Dahouk, S., Göllner, C., Bahn, P., Appel, B., Nöckler, K.: Poster “Comparison of genomic DNA preparation methods for the detection of *Brucella* spp. in different food matrices”. 21.-23.09.2011, Brucellosis 2011 International Research Conference, Buenos Aires, Argentinien; [†] Beide Autoren trugen zu diesem Poster gleichermaßen bei.

9.3 Datentabellen

9.3.1 Tabellen mit Real-Time PCR-Ergebnissen zur DNA-Extraktion

Tabelle 9-1: Ergebnisse der *bcs31*-Real-Time PCR im Anschluss an die Extraktion von *Brucella*-DNA aus physiologischer Kochsalzlösung mittels Phenol-Chloroform-Extraktion.

Brucellen [KbE/ml] ¹⁾	C _T Lambda T: 0,0151 ²⁾	C _T <i>Brucella</i> T: 0,0119 ²⁾	<i>Brucella</i> -DNA [fg]	<i>Brucella</i> -GÄ ³⁾	GÄ in Elution ⁴⁾	qPCR ⁵⁾	PCR ⁶⁾
5 x 10 ⁴	31,53	34,15	1.012	300	1,50 x 10 ³	5/6	6/6
5 x 10 ³	31,68	37,38	49	14	7,23 x 10 ¹	4/6	5/6
5 x 10 ²	31,66	37,42	41	12	6,02 x 10 ¹	2/6	0/6
5 x 10 ¹	31,62	37,49	53	16	7,86 x 10 ¹	3/6	0/6
5 x 10 ⁰						0/6	0/6
H ₂ O	31,40						
Standard		17,45	10.000.000				
Standard	27,07	21,37	1.000.000				
Standard	30,46	25,19	100.000				
Standard	31,38	29,05	10.000				
Standard	31,86	32,10	1.000				

¹⁾ KbE *Brucella abortus* 1119-3 pro ml physiologischer Kochsalzlösung; ²⁾ Mittelwert aus n Proben (siehe Spalte „qPCR“); ³⁾ ein *Brucella abortus*-Genomäquivalent (GÄ) entspricht 3,37 fg; ⁴⁾ anhand des in der DNA-Extraktion eingesetzten Elutionsvolumens berechnete Menge an extrahierter *Brucella*-DNA; ⁵⁾ Anzahl der *Brucella*-positiven Proben beim Nachweis mittels *bcs31*-Real-Time PCR; ⁶⁾ Anzahl der *Brucella*-positiven Proben beim Nachweis mittels klassischer *bcs31*-PCR und Agarosegel.

Tabelle 9-2: Ergebnisse der *bcs31*-Real-Time PCR im Anschluss an die Extraktion von *Brucella*-DNA aus physiologischer Kochsalzlösung mittels QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen).

Brucellen [KbE/ml] ¹⁾	C _T Lambda T: 0,0151 ²⁾	C _T <i>Brucella</i> T: 0,0119 ²⁾	<i>Brucella</i> -DNA [fg]	<i>Brucella</i> -GÄ ³⁾	GÄ in Elution ⁴⁾	qPCR ⁵⁾	PCR ⁶⁾
5 x 10 ⁴	31,56	26,36	45.778	13.584	2,72 x 10 ⁵	6/6	6/6
5 x 10 ³	33,01	29,75	5.598	1.661	3,32 x 10 ⁴	6/6	6/6
5 x 10 ²	33,71	33,25	635	188	3,77 x 10 ³	6/6	6/6
5 x 10 ¹	33,40	35,85	137	41	8,14 x 10 ²	6/6	6/6
5 x 10 ⁰						0/6	0/6
H ₂ O	31,40						
Standard		17,45	10.000.000				
Standard	27,07	21,37	1.000.000				
Standard	30,46	25,19	100.000				
Standard	31,38	29,05	10.000				
Standard	31,86	32,10	1.000				

¹⁾ KbE *Brucella abortus* 1119-3 pro ml physiologischer Kochsalzlösung; ²⁾ Mittelwert aus n Proben (siehe Spalte „qPCR“); ³⁾ ein *Brucella abortus*-Genomäquivalent (GÄ) entspricht 3,37 fg; ⁴⁾ anhand des in der DNA-Extraktion eingesetzten Elutionsvolumens berechnete Menge an extrahierter *Brucella*-DNA; ⁵⁾ Anzahl der *Brucella*-positiven Proben beim Nachweis mittels *bcs31*-Real-Time PCR; ⁶⁾ Anzahl der *Brucella*-positiven Proben beim Nachweis mittels klassischer *bcs31*-PCR und Agarosegel.

Tabelle 9-3: Ergebnisse der *bcs31*-Real-Time PCR im Anschluss an die Extraktion von *Brucella*-DNA aus Rohmilch mittels Phenol-Chloroform-Extraktion.

Brucellen [KbE/ml] ¹⁾	C_T Lambda T: 0,0151 ²⁾	C_T <i>Brucella</i> T: 0,0119 ²⁾	<i>Brucella</i>- DNA [fg]	<i>Brucella</i>- GÄ ³⁾	GÄ in Elution ⁴⁾	qPCR ⁵⁾	PCR ⁶⁾
5 x 10 ⁴	30,87	30,84	12.245	3.633	1,82 x 10 ⁴	6/6	6/6
5 x 10 ³	30,94	32,39	2.034	604	3,02 x 10 ³	6/6	6/6
5 x 10 ²	31,25	35,08	281	83	4,17 x 10 ²	6/6	6/6
5 x 10 ¹	31,23	35,43	157	46	2,32 x 10 ²	4/6	5/6
5 x 10 ⁰	29,36	35,68	310	92	4,60 x 10 ²	3/6	1/6
0	29,62	35,30	161	48	2,38 x 10 ²	5/6	0/6
H ₂ O	31,40						
Standard		17,45	10.000.000				
Standard	27,07	21,37	1.000.000				
Standard	30,46	25,19	100.000				
Standard	31,38	29,05	10.000				
Standard	31,86	32,10	1.000				
Standard	31,57		100				

¹⁾ KbE *Brucella abortus* 1119-3 pro ml Rohmilch; ²⁾ Mittelwert aus n Proben (siehe Spalte „qPCR“); ³⁾ ein *Brucella abortus*-Genomäquivalent (GÄ) entspricht 3,37 fg; ⁴⁾ anhand des in der DNA-Extraktion eingesetzten Elutionsvolumens berechnete Menge an extrahierter *Brucella*-DNA; ⁵⁾ Anzahl der *Brucella*-positiven Proben beim Nachweis mittels *bcs31*-Real-Time PCR; ⁶⁾ Anzahl der *Brucella*-positiven Proben beim Nachweis mittels klassischer *bcs31*-PCR und Agarosegel.

Tabelle 9-4: Ergebnisse der *bcs31*-Real-Time PCR im Anschluss an die Extraktion von *Brucella*-DNA aus Rohmilch mittels QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen).

Brucellen [KbE/ml] ¹⁾	C_T Lambda T: 0,0208 ²⁾	C_T <i>Brucella</i> T: 0,0146 ²⁾	<i>Brucella</i>- DNA [fg]	<i>Brucella</i>- GÄ ³⁾	GÄ in Elution ⁴⁾	qPCR ⁵⁾	PCR ⁶⁾
5 x 10 ⁴	30,58	26,83	23.542	6.986	1,40 x 10 ⁵	6/6	6/6
5 x 10 ³	30,94	30,39	3.422	1.016	2,03 x 10 ⁴	6/6	6/6
5 x 10 ²	30,83	33,18	547	162	3,25 x 10 ³	6/6	5/6
5 x 10 ¹	31,22	35,04	184	55	1,09 x 10 ³	6/6	4/6
5 x 10 ⁰	31,14	33,02	516	153	3,06 x 10 ³	4/6	0/6
0	30,84	36,03	83	25	4,93 x 10 ²	4/6	0/6
H ₂ O	32,59						
Standard		16,06	10.000.000				
Standard	28,31	21,35	1.000.000				
Standard	30,36	24,42	100.000				
Standard	31,99	28,66	10.000				
Standard	31,87	31,96	1.000				
Standard	31,73	35,09	100				

¹⁾ KbE *Brucella abortus* 1119-3 pro ml Rohmilch; ²⁾ Mittelwert aus n Proben (siehe Spalte „qPCR“); ³⁾ ein *Brucella abortus*-Genomäquivalent (GÄ) entspricht 3,37 fg; ⁴⁾ anhand des in der DNA-Extraktion eingesetzten Elutionsvolumens berechnete Menge an extrahierter *Brucella*-DNA; ⁵⁾ Anzahl der *Brucella*-positiven Proben beim Nachweis mittels *bcs31*-Real-Time PCR; ⁶⁾ Anzahl der *Brucella*-positiven Proben beim Nachweis mittels klassischer *bcs31*-PCR und Agarosegel.

Tabelle 9-5: Ergebnisse der *bcs31*-Real-Time PCR im Anschluss an die Extraktion von *Brucella*-DNA aus stillem Mineralwasser mittels Phenol-Chloroform-Extraktion.

Brucellen [KbE/ml] ¹⁾	C_T Lambda T: 0,0208 ²⁾	C_T <i>Brucella</i> T: 0,0146 ²⁾	<i>Brucella</i>- DNA [fg]	<i>Brucella</i>- GÄ ³⁾	GÄ in Elution ⁴⁾	qPCR ⁵⁾	PCR ⁶⁾
5 x 10 ⁴	31,88	32,67	1.067	317	1,58 x 10 ³	6/6	6/6
5 x 10 ³	32,12	34,88	328	97	4,87 x 10 ²	5/6	5/6
5 x 10 ²	31,90	36,05	108	32	1,60 x 10 ²	3/6	3/6
5 x 10 ¹	31,96	33,91	1.483	440	2,20 x 10 ³	3/6	0/6
5 x 10 ⁰	32,17	37,30	33	10	4,90 x 10 ¹	3/6	0/6
0	32,08	34,66	107	32	1,59 x 10 ²	4/6	0/6
H ₂ O	32,59						
Standard		16,06	10.000.000				
Standard	28,31	21,35	1.000.000				
Standard	30,36	24,42	100.000				
Standard	31,99	28,66	10.000				
Standard	31,87	31,96	1.000				
Standard	31,73	35,09	100				

¹⁾ KbE *Brucella abortus* 1119-3 pro ml stilles Mineralwasser; ²⁾ Mittelwert aus n Proben (siehe Spalte „qPCR“); ³⁾ ein *Brucella abortus*-Genomäquivalent (GÄ) entspricht 3,37 fg; ⁴⁾ anhand des in der DNA-Extraktion eingesetzten Elutionsvolumens berechnete Menge an extrahierter *Brucella*-DNA; ⁵⁾ Anzahl der *Brucella*-positiven Proben beim Nachweis mittels *bcs31*-Real-Time PCR; ⁶⁾ Anzahl der *Brucella*-positiven Proben beim Nachweis mittels klassischer *bcs31*-PCR und Agarosegel.

Tabelle 9-6: Ergebnisse der *bcs31*-Real-Time PCR im Anschluss an die Extraktion von *Brucella*-DNA aus stillem Mineralwasser mittels QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen).

Brucellen [KbE/ml] ¹⁾	C_T Lambda T: 0,0186 ²⁾	C_T <i>Brucella</i> T: 0,0159 ²⁾	<i>Brucella</i>- DNA [fg]	<i>Brucella</i>- GÄ ³⁾	GÄ in Elution ⁴⁾	qPCR ⁵⁾	PCR ⁶⁾
5 x 10 ⁴	32,02	26,24	42.892	12.727	2,55 x 10 ⁵	6/6	6/6
5 x 10 ³	32,29	29,72	4.988	1.480	2,96 x 10 ⁴	5/6	6/6
5 x 10 ²	33,51	33,26	537	159	3,19 x 10 ³	6/6	5/6
5 x 10 ¹	33,38	36,38	98	29	5,79 x 10 ²	6/6	5/6
5 x 10 ⁰	33,30	37,02	46	14	2,73 x 10 ²	2/6	3/6
0	32,87	37,54	71	21	4,23 x 10 ²	3/6	0/6
H ₂ O	32,09						
Standard		17,62	10.000.000				
Standard	27,95	21,71	1.000.000				
Standard	30,13	24,78	100.000				
Standard	31,36	28,81	10.000				
Standard	31,02	32,04	1.000				
Standard	32,10	36,20	100				

¹⁾ KbE *Brucella abortus* 1119-3 pro ml stilles Mineralwasser; ²⁾ Mittelwert aus n Proben (siehe Spalte „qPCR“); ³⁾ ein *Brucella abortus*-Genomäquivalent (GÄ) entspricht 3,37 fg; ⁴⁾ anhand des in der DNA-Extraktion eingesetzten Elutionsvolumens berechnete Menge an extrahierter *Brucella*-DNA; ⁵⁾ Anzahl der *Brucella*-positiven Proben beim Nachweis mittels *bcs31*-Real-Time PCR; ⁶⁾ Anzahl der *Brucella*-positiven Proben beim Nachweis mittels klassischer *bcs31*-PCR und Agarosegel.

Tabelle 9-7: Ergebnisse der *bcs31*-Real-Time PCR im Anschluss an die Extraktion von *Brucella*-DNA aus Joghurt mittels QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen).

Brucellen [KbE/ml]¹⁾	C_T Lambda T: 0,0304²⁾	C_T <i>Brucella</i> T: 0,0082²⁾	<i>Brucella</i>- DNA [fg]	<i>Brucella</i>- GÄ³⁾	GÄ in Elution⁴⁾	qPCR⁵⁾	PCR⁶⁾
1 x 10 ⁵	31,50	30,67	2.963	879	1,76 x 10 ⁴	6/6	6/6
1 x 10 ⁴	31,02	33,02	714	212	4,24 x 10 ³	6/6	6/6
1 x 10 ³	31,02	35,83	134	40	7,97 x 10 ²	6/6	4/6
1 x 10 ²	31,21	36,61	94	28	5,61 x 10 ²	5/6	1/6
1 x 10 ¹	32,00	36,60	101	30	5,97 x 10 ²	6/6	0/6
0	31,39	36,79	94	28	5,59 x 10 ²	3/6	0/6
H ₂ O	32,75						
Standard	35,51	17,40	10.000.000				
Standard	28,92	21,29	1.000.000				
Standard	31,10	24,74	100.000				
Standard	32,64	28,20	10.000				
Standard	33,49	31,82	1.000				
Standard	33,30	36,69	100				

¹⁾ KbE *Brucella abortus* 1119-3 pro ml Joghurt; ²⁾ Mittelwert aus n Proben (siehe Spalte „qPCR“); ³⁾ ein *Brucella abortus*-Genomäquivalent (GÄ) entspricht 3,37 fg; ⁴⁾ anhand des in der DNA-Extraktion eingesetzten Elutionsvolumens berechnete Menge an extrahierter *Brucella*-DNA; ⁵⁾ Anzahl der *Brucella*-positiven Proben beim Nachweis mittels *bcs31*-Real-Time PCR; ⁶⁾ Anzahl der *Brucella*-positiven Proben beim Nachweis mittels klassischer *bcs31*-PCR und Agarosegel.

Tabelle 9-8: Ergebnisse der *bcs31*-Real-Time PCR im Anschluss an die Extraktion von *Brucella*-DNA aus Camembert mittels Phenol-Chloroform-Extraktion.

Brucellen [KbE/ml]¹⁾	C_T Lambda T: 0,0279²⁾	C_T <i>Brucella</i> T: 0,0182²⁾	<i>Brucella</i>- DNA [fg]	<i>Brucella</i>- GÄ³⁾	GÄ in Elution⁴⁾	qPCR⁵⁾	PCR⁶⁾
5 x 10 ³	32,94	30,95	3.962	1.176	5,88 x 10 ³	6/6	6/6
5 x 10 ²	34,16	34,48	384	114	5,69 x 10 ²	5/6	5/6
5 x 10 ¹	34,10	37,53	51	15	7,53 x 10 ¹	4/6	3/6
5 x 10 ⁰	34,15	36,39	141	42	2,09 x 10 ²	6/6	1/6
0	33,62	37,62	108	32	1,61 x 10 ²	4/6	3/6
H ₂ O	34,06						
Standard		22,54	1.000.000				
Standard		25,94	100.000				
Standard		29,58	10.000				
Standard		32,55	1.000				
Standard		36,13	100				

¹⁾ KbE *Brucella abortus* 1119-3 pro ml Camembert; ²⁾ Mittelwert aus n Proben (siehe Spalte „qPCR“); ³⁾ ein *Brucella abortus*-Genomäquivalent (GÄ) entspricht 3,37 fg; ⁴⁾ anhand des in der DNA-Extraktion eingesetzten Elutionsvolumens berechnete Menge an extrahierter *Brucella*-DNA; ⁵⁾ Anzahl der *Brucella*-positiven Proben beim Nachweis mittels *bcs31*-Real-Time PCR; ⁶⁾ Anzahl der *Brucella*-positiven Proben beim Nachweis mittels klassischer *bcs31*-PCR und Agarosegel.

Tabelle 9-9: Ergebnisse der *bcs31*-Real-Time PCR im Anschluss an die Extraktion von *Brucella*-DNA aus Ziegenfrischkäse mittels Phenol-Chloroform-Extraktion.

Brucellen [KbE/ml] ¹⁾	C_T Lambda T: 0,0288 ²⁾	C_T <i>Brucella</i> T: 0,0162 ²⁾	<i>Brucella</i>- DNA [fg]	<i>Brucella</i>- GÄ ³⁾	GÄ in Elution ⁴⁾	qPCR ⁵⁾	PCR ⁶⁾
5 x 10 ³		38,30	19	6	2,85 x 10 ¹	3/6	5/6
5 x 10 ²						0/6	4/6
5 x 10 ¹						0/6	0/6
5 x 10 ⁰						0/6	0/6
0						0/6	0/6
H ₂ O	33,43						
Standard		22,19	1.000.000				
Standard		25,85	100.000				
Standard		29,28	10.000				
Standard		32,21	1.000				
Standard		35,52	100				

¹⁾ KbE *Brucella abortus* 1119-3 pro ml Ziegenfrischkäse; ²⁾ Mittelwert aus n Proben (siehe Spalte „qPCR“); ³⁾ ein *Brucella abortus*-Genomäquivalent (GÄ) entspricht 3,37 fg; ⁴⁾ anhand des in der DNA-Extraktion eingesetzten Elutionsvolumens berechnete Menge an extrahierter *Brucella*-DNA; ⁵⁾ Anzahl der *Brucella*-positiven Proben beim Nachweis mittels *bcs31*-Real-Time PCR; ⁶⁾ Anzahl der *Brucella*-positiven Proben beim Nachweis mittels klassischer *bcs31*-PCR und Agarosegel.

9.3.2 Tabellen zur immunomagnetischen Separation

Die Ergebnisse der Real-Time PCR sowie der klassischen PCR zum Nachweis von Brucellen in den verschiedenen Lebensmittelproben (Ziegenfrischkäse, Rohmilch, Camembert, Mineralwasser, Joghurt) im Anschluss an die IMS mittels Brucellose-Kontrollserum bzw. monoklonalem anti-*Brucella*-Antikörper sind in Tabelle 9-10 abgebildet.

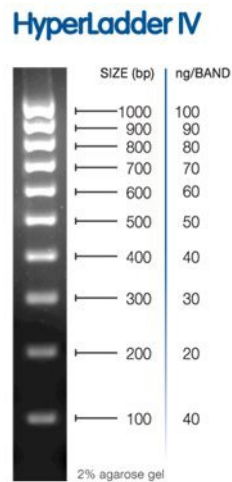
Tabelle 9-10: Aufkonzentrierung von Brucellen aus Lebensmitteln mittels IMS und anschließender Nachweis mittels *bcs31*-Real-Time PCR oder mittels klassischer *bcs31*-PCR.

Matrix	<i>Brucella</i> - Konzentration [KbE/ml] bzw. [KbE/g] ¹⁾	Brucellose-Kontrollserum			Monoklonaler Antikörper*		
		C _T -Wert ²⁾	qPCR ³⁾	PCR ⁴⁾	C _T -Wert ²⁾	qPCR ³⁾	PCR ⁴⁾
Camembert	5 x 10 ⁵	34,84	++	++	38,84	++	++
	5 x 10 ⁴	31,24	++	++		-	-
	5 x 10 ³		-	-		-	-
	5 x 10 ²		-	-		-	-
	5 x 10 ¹		-	-		-	-
	0		-	-		-	-
Joghurt	8 x 10 ⁵	32,56	++	++	32,53	++	++
	8 x 10 ⁴	36,65	++	++	37,10	++	-
	8 x 10 ³		-	++		-	-
	8 x 10 ²		-	-		-	-
	8 x 10 ¹		-	-		-	-
	0		-	-		-	-
Stilles Mineralwasser	1 x 10 ⁵	30,64	++	++	30,38	++	++
	1 x 10 ⁴	33,19	++	++	33,95	++	++
	1 x 10 ³	35,31	++	++	36,84	++	++
	1 x 10 ²		-	-	37,62	+	-
	1 x 10 ¹		-	-		-	-
	0		-	-		-	-
Rohmilch	1 x 10 ⁵	29,43	++	++		-	++
	1 x 10 ⁴	33,09	++	++		-	++
	1 x 10 ³	35,77	++	++		-	+
	1 x 10 ²	39,04	+	-		-	-
	1 x 10 ¹		-	-		-	-
	0		-	-		-	-
Ziegenfrischkäse	5 x 10 ⁵	32,60	++	++	34,57	++	++
	5 x 10 ⁴	36,64	++	++	38,18	++	+
	5 x 10 ³	37,18	++	++	37,41	+	++
	5 x 10 ²		-	-		-	-
	5 x 10 ¹		-	-		-	-
	0		-	-		-	-

¹⁾ 5 x 10^x KbE *Brucella abortus* 1119-3 in 500 µl Matrix wurden mit Dynabeads aufkonzentriert und anschließend wurde die DNA mittels Star Prep One Kit (Bioteccon) extrahiert; Camembert und Ziegenfrischkäse wurden vor der Inokulation 1:5 mit H₂O verdünnt, Joghurt 1:1; ²⁾ *bcs31*-Real-Time PCR, C_T-Werte sind Mittelwerte aus 2 Proben, deren DNA jeweils in Duplikaten amplifiziert wurde; ³⁾ Anzahl *Brucella*-positiver Proben beim Nachweis mittels *bcs31*-Real-Time PCR; ⁴⁾ Anzahl *Brucella*-positiver Proben beim Nachweis mittels klassischer *bcs31*-PCR und Agarosegel; * – monoklonaler anti-*Brucella*-Antikörper.

9.4 Marker für die Agarose-Gelelektrophorese

Bei dem in allen gezeigten Agarosegelen gezeigten Marker (in Gelbildern abgekürzt mit „M“) handelt es sich um die HyperLadder IV (Bioline) mit Banden von 100 bp bis 1.000 bp im Abstand von 100 bp.



- Higher intensity band: **1000bp**
- Supplied in a ready-to-use format
- Each lane (5µl) provides 580ng of DNA

9.5 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
AFLP	<i>Amplified fragment length polymorphism</i>	min	Minute(n)
AMOS-PCR	PCR zur Differenzierung zwischen <i>B. abortus</i> , <i>B. melitensis</i> , <i>B. ovis</i> und <i>B. suis</i>	ml	Milliliter
BCSP31	<i>Brucella cell-surface protein</i> (31 kDa)	M	In Gelbildern: Marker Im Text: Molar
BEV	Brucellen enthaltende Vakuole	MLST	<i>Multy locus sequence typing</i>
Bk ₂	Berkeley, ein <i>Brucella</i> -Phage	MLVA	<i>Multiple locus variable number of tandem repeats analysis</i>
BIP	Bruttoinlandsprodukt	NaCl	Natriumchlorid
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin	NCTC	National Collection of Type Cultures
bzw.	beziehungsweise	n.d.	nicht detektiert
ca.	circa	PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
CAPM	Collection of Animal Pathogenic Microorganisms	PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
cELISA	<i>Competitive enzyme-linked immunosorbent assay</i>	PFGE	<i>Pulsed field gel electrophoresis</i>
CT	Coombs Test	qPCR	Quantitative Real-Time PCR
C _T	<i>Cycle threshold</i>	RBT	Rose Bengal Test
dH ₂ O	Destilliertes Wasser	REM	Rasterelektronenmikroskop
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	rev	<i>reverse</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum	RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
Fi	Firenze, ein <i>Brucella</i> -Phage	rpm	<i>Rounds per minute</i> , seitliches Schütteln
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer	s	Sekunde(n)
fw	<i>forward</i>	SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung	SLA	Serum-Langsamagglutination
h	Stunde(n)	S-LPS	<i>Smooth lipopolysaccharide</i>
iELISA	<i>Indirect enzyme-linked immunosorbent assay</i>	SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
Ig	Immunglobulin	Tb	Tbilisi, ein <i>Brucella</i> -Phage
i. Tr.	in der Trockenmasse	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
imPs	Immunomagnetische Partikel	U/min	Umdrehungen pro Minute, über Kopf schütteln
IMS	Immunomagnetische Separation	USDA	United States Department of Agriculture
IS711	Insertionssequenz 711	VE-Wasser	Voll entsalztes Wasser
KbE	Koloniebildende Einheiten	VNTR	<i>Variable number of tandem repeats</i>
KBR	Komplementbindungsreaktion	w/v	<i>Weigth per volume</i>
KDO	2-Keto-3-deoxyoctulosonsäure	Wb	Weybridge, ein <i>Brucella</i> -Phage
LPS	Lipopolysaccharid	z. B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter		

Die Drei- und Einbuchstabencodes der Aminosäuren wurden nach den Empfehlungen der IUPAC-IUB-Kommission für biochemische Nomenklatur verwendet (JCBN, 1984).

9.6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1:	Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>Brucella abortus</i> ; diese Abbildung wurde mit freundlicher Genehmigung durch Dennis Kunkel Microscopy, Inc. (www.denniskunkel.com) zur Verfügung gestellt. Copyright: Dennis Kunkel Microscopy Inc.	1
Abbildung 1-2:	Kondensiertes Dendrogramm mit Clustern der MLVA-16-Genotypen.....	5
Abbildung 1-3:	Weltweite Inzidenz der humanen Brucellose	8
Abbildung 1-4:	Intrazelluläre Wanderung von Brucellen in Wirtszellen.....	9
Abbildung 1-5:	Identifikation und Differenzierung aller bekannten <i>Brucella</i> -Spezies und -Biovars mittels Multiplex-PCR.....	21
Abbildung 1-6:	Nukleophiler Angriff der Aminogruppe auf den Tosyl-Rest am magnetischen Partikel.....	24
Abbildung 1-7:	IMS von Mikroorganismen. Bindung der Antikörper direkt an magnetische Partikel (A) bzw. an Spezies-spezifische Sekundärantikörper (B); Bindung spezifischer Antikörper an Bakterien mit anschließender Bindung an die mit Sekundärantikörpern beschichteten magnetischen Partikel (C).	24
Abbildung 4-1:	Zweistufiger Untersuchungsansatz zur Auswahl der geeignetsten DNA-Extraktionsmethode.	46
Abbildung 4-2:	Funktionsweise der IMS mit anschließendem molekularbiologischem Nachweis am Beispiel <i>Brucella</i>	54
Abbildung 5-1:	Vergleich der Tenazität von <i>Brucella abortus</i> 1119-3 in H-Milch bei 20 °C und einer Anfangskonzentration von 5×10^7 KBE/ml, 5×10^3 KBE/ml bzw. 0 KBE/ml (Negativkontrolle).	58
Abbildung 5-2:	Wachstums-/Reduktionsraten für <i>B. abortus</i> 1119-3 und <i>B. melitensis</i> 16M in verschiedenen Lebensmitteln.....	60
Abbildung 5-3:	Vergleich der Tenazität von <i>B. abortus</i> 1119-3 und <i>B. melitensis</i> 16M in H-Milch bei 20 °C und einer Anfangskonzentration von 5×10^3 KBE/ml bzw. 0 KBE/ml (Negativkontrolle).	61
Abbildung 5-4:	Tenazität von <i>B. abortus</i> 1119-3 in Rohmilch, Vorzugsmilch und <i>Brucella</i> -Bouillon.....	63
Abbildung 5-5:	Tenazität von <i>B. abortus</i> 1119-3 in Joghurt mit 1,5 %, 3,5 % und 10,0 % Fett sowie in <i>Brucella</i> -Bouillon.....	64
Abbildung 5-6:	Tenazität von <i>B. abortus</i> 1119-3 in stillem Mineralwasser und <i>Brucella</i> -Bouillon bei 20 °C.....	65
Abbildung 5-7:	<i>Bcsp31</i> -Amplifikat nach Extraktion von <i>Brucella</i> -DNA aus physiologischer Kochsalzlösung und Rohmilch mittels QIAamp DNA Mini Kit	67
Abbildung 5-8:	<i>Bcsp31</i> -Amplifikat nach Extraktion von <i>Brucella</i> -DNA aus Joghurt mittels Phenol-Chloroform-Extraktion	71
Abbildung 5-9:	Standardkurve aus 1:10-Verdünnungen von <i>Brucella</i> -DNA nach der Untersuchung mittels <i>bcs31</i> -Real-Time PCR.	73
Abbildung 5-10:	Amplifikation von <i>Brucella</i> -DNA nach Extraktion aus Brucellen in Joghurt bzw. in Wasser	75
Abbildung 5-11:	In der <i>bcs31</i> -PCR nachweisbare <i>Brucella</i> -Zellzahlen pro 500- μ l-Ansatz nach der IMS unter Verwendung unterschiedlicher Serumverdünnungen.	78
Abbildung 5-12:	In der <i>bcs31</i> -PCR nachweisbare <i>Brucella</i> -Zellzahlen pro 500- μ l-Ansatz nach der IMS unter Verwendung unterschiedlicher Mengen des monoklonalen anti- <i>Brucella</i> -.....	78

Abbildung 5-13:	In der <i>bcp31</i> -PCR nachweisbare <i>Brucella</i> -Zellzahlen pro 500- μ l-Ansatz nach der IMS unter Verwendung von mit Vollserum beschichteten Partikeln.	79
Abbildung 5-14:	In der <i>bcp31</i> -PCR nachweisbare <i>Brucella</i> -Zellzahlen nach der IMS unter Verwendung von mit Vollserum beschichteten Partikeln bei 500 μ l und 1.000 μ l Probenvolumen.	79
Abbildung 5-15:	In der <i>bcp31</i> -PCR nachweisbare <i>Brucella</i> -Zellzahlen pro 500- μ l-Ansatz an mit Vollserum beschichteten Partikeln bei einer Inkubationsdauer von 1 h bzw. 1,5 h.....	80
Abbildung 5-16:	In der <i>bcp31</i> -PCR nachweisbare <i>Brucella</i> -Zellzahlen pro 500- μ l-Ansatz an mit Vollserum beschichteten Partikeln bei Inkubationstemperaturen von 37 °C, 20 °C bzw. 4 °C.	80
Abbildung 5-17:	Einfluss der DNA-Extraktionsmethode im Anschluss an die IMS auf die Nachweisbarkeit von Brucellen in der <i>bcp31</i> -PCR.....	81
Abbildung 5-18:	Nachweis aller bekannten <i>Brucella</i> -Spezies mittels IMS	84

9.7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1:	Spezies der Gattung <i>Brucella</i>	2
Tabelle 1-2:	Eigenschaften der <i>Brucella</i> -Spezies, die bei der klassischen Biotypisierung bestimmt werden.....	15
Tabelle 1-3:	Anstieg der <i>Brucella</i> -spezifischen Immunglobuline in verschiedenen Brucellose-Stadien.....	27
Tabelle 4-1:	Fettgehalt und Haltbarkeitsdauer der in den Tenazitätsversuchen untersuchten Lebensmittel.....	41
Tabelle 4-2:	Unterschiede in den Qualitätsanforderungen von Roh- und Vorzugsmilch nach der Milchverordnung.....	41
Tabelle 4-3:	Mineraliengehalt im untersuchten stillen Mineralwasser.....	42
Tabelle 4-4:	Übersicht zu den verwendeten DNA-Extraktionsmethoden und eingesetzten Probenvolumina.....	45
Tabelle 4-5:	Mastermix und Temperatur-Zeitschema für die gattungsspezifische <i>Brucella</i> -PCR.....	50
Tabelle 4-6:	Mastermix und Temperatur-Zeitschema für die gattungsspezifische <i>Brucella</i> -Real-Time PCR.....	51
Tabelle 5-1:	Ergebnisse der DNA-Extraktion aus 5×10^7 , 5×10^4 und 5×10^1 KbE <i>B. abortus</i> 1119-3 pro ml.....	68
Tabelle 5-2:	Ergebnisse der <i>bcs31</i> -PCR nach DNA-Extraktion mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und QIAamp DNA Mini Kit aus den 10er-Verdünnungsstufen 5×10^4 bis 5×10^0 bzw. 5×10^5 bis 5×10^1 KbE <i>B. abortus</i> 1119-3 pro ml.....	71
Tabelle 5-3:	Ergebnisse der <i>bcs31</i> -PCR nach DNA-Extraktion mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aus den 10er-Verdünnungsstufen 5×10^3 bis 5×10^0 KbE <i>B. abortus</i> 1119-3 pro g Käse.....	72
Tabelle 5-4:	Berechnung des Genomgewichtes von Brucellen.....	74
Tabelle 5-5:	Ergebnisse der <i>bcs31</i> -Real-Time PCR im Anschluss an die Extraktion von <i>Brucella</i> -DNA aus Joghurt mittels Phenol-Chloroform-Extraktion.....	76
Tabelle 5-6:	Übersicht über die Ergebnisse zur Detektion von <i>Brucella</i> -DNA aus Lebensmitteln mittels <i>bcs31</i> -Real-Time PCR bzw. klassischer <i>bcs31</i> -PCR in Abhängigkeit von der vorhergehenden DNA-Extraktionsmethode.....	77
Tabelle 5-7:	Wiederfindungsraten von <i>B. abortus</i> 1119-3, <i>O. intermedium</i> und <i>Y. enterocolitica</i> O:9 auf immunomagnetischen, mit Brucellose-Kontrollserum beschichteten Partikeln.....	82
Tabelle 5-8:	Wiederfindungsraten von <i>B. abortus</i> 1119-3, <i>O. intermedium</i> und <i>Y. enterocolitica</i> O:9 auf immunomagnetischen, mit monoklonalen Antikörpern beschichteten Partikeln.....	83
Tabelle 5-9:	Nachweisgrenzen von <i>Brucella</i> in Lebensmitteln mittels IMS [KbE/ml bzw. KbE/g].....	84
Tabelle 9-1:	Ergebnisse der <i>bcs31</i> -Real-Time PCR im Anschluss an die Extraktion von <i>Brucella</i> -DNA aus physiologischer Kochsalzlösung mittels Phenol-Chloroform-Extraktion.....	124
Tabelle 9-2:	Ergebnisse der <i>bcs31</i> -Real-Time PCR im Anschluss an die Extraktion von <i>Brucella</i> -DNA aus physiologischer Kochsalzlösung mittels QIAamp DNA Mini Kit.....	124
Tabelle 9-3:	Ergebnisse der <i>bcs31</i> -Real-Time PCR im Anschluss an die Extraktion von <i>Brucella</i> -DNA aus Rohmilch mittels Phenol-Chloroform-Extraktion.....	125
Tabelle 9-4:	Ergebnisse der <i>bcs31</i> -Real-Time PCR im Anschluss an die Extraktion von <i>Brucella</i> -DNA aus Rohmilch mittels QIAamp DNA Mini Kit.....	125

Tabelle 9-5:	Ergebnisse der <i>bcp31</i> -Real-Time PCR im Anschluss an die Extraktion von <i>Brucella</i> -DNA aus stillem Mineralwasser mittels Phenol-Chloroform-Extraktion.	126
Tabelle 9-6:	Ergebnisse der <i>bcp31</i> -Real-Time PCR im Anschluss an die Extraktion von <i>Brucella</i> -DNA aus stillem Mineralwasser mittels QIAamp DNA Mini Kit.	126
Tabelle 9-7:	Ergebnisse der <i>bcp31</i> -Real-Time PCR im Anschluss an die Extraktion von <i>Brucella</i> -DNA aus Joghurt mittels QIAamp DNA Mini Kit.	127
Tabelle 9-8:	Ergebnisse der <i>bcp31</i> -Real-Time PCR im Anschluss an die Extraktion von <i>Brucella</i> -DNA aus Camembert mittels Phenol-Chloroform-Extraktion.	127
Tabelle 9-9:	Ergebnisse der <i>bcp31</i> -Real-Time PCR im Anschluss an die Extraktion von <i>Brucella</i> -DNA aus Ziegenfrischkäse mittels Phenol-Chloroform-Extraktion.	128
Tabelle 9-10:	Aufkonzentrierung von Brucellen aus Lebensmitteln mittels IMS und anschließender Nachweis mittels <i>bcp31</i> -Real-Time PCR oder mittels klassischer <i>bcp31</i> -PCR.	129

10 Literaturverzeichnis

- Acar, A., Turhan, V., Diktas, H., Oncul, O., Cavuslu, S. (2009): „A case of brucellosis complicated with endocarditis, pyelonephritis, sacroileitis and thyroiditis“. *Mikrobiyoloji Bülteni* 43 (1), S. 141-145.
- Akdeniz, H., Irmak, H., Demiröz, A.P. (1998): “Evaluation of brucellosis cases in Van region of Eastern Anatolia: a 3-year experience”. *Nagoya Medical Journal* 42, S. 101-110.
- Al Dahouk, S., Tomaso, H., Nöckler, K., Neubauer, H., Frangoulidis, D. (2003): „Laboratory-based diagnosis of brucellosis--a review of the literature. Part II: serological tests for brucellosis“. *Clinical Laboratory* 49 (11-12), S. 577-589.
- Al Dahouk, S., Tomaso, H., Nöckler, K., Neubauer, H. (2004): „The detection of *Brucella* spp. using PCR-ELISA and real-time PCR assays“. *Clinical Laboratory* 50 (7-8), S. 387-394.
- Al Dahouk, S., Nöckler, K., Scholz, H.C., Tomaso, H., Bogumil, R., Neubauer, H. (2006): „Immunoproteomic characterization of *Brucella abortus* 1119-3 preparations used for the serodiagnosis of *Brucella* infections“. *Journal of Immunological Methods* 309 (1-2), S. 34-47.
- Al Dahouk, S., Nöckler, K., Scholz, C., Pfeffer, M., Neubauer, H., Tomaso, H. (2007): „Evaluation of genus-specific and species-specific real-time PCR assays for the identification of *Brucella* spp“. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 45 (11), S. 1464-1470.
- Al Dahouk, S., Nöckler, K., Tomaso, H. (2010a): „*Brucella*“. In: Liu, D. (Hrsg.), *Molecular Detection of Foodborne Pathogens*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, S. 317-330.
- Al Dahouk, S., Scholz, H.C., Tomaso, H., Bahn, P., Goellner, C., Karges, W., Appel, B., Hensel, A., Neubauer, H., Nöckler, K. (2010b): „Differential phenotyping of *Brucella* species using a newly developed semi-automated metabolic system“. *BMC Microbiology* 10 (1), S. 269.
- Al-Majali, A.M., Al-Qudah, K.M., Al-Tarazi, Y.H., Al-Rawashdeh, O.F. (2008): „Risk factors associated with camel brucellosis in Jordan“. *Tropical Animal Health and Production* 40 (3), S. 193-200.
- Alexander, B., Schnurrenberger, P.R., Brown, R.R. (1981): „Numbers of *Brucella abortus* in the placenta, umbilicus and fetal fluid of two naturally infected cows“. *Veterinary Record* 108 (23), S. 500.
- Alton, G.G., Jones, L.M., Angus, R.D., Verger, J.M. (1988a): „Techniques for the Brucellosis Laboratory“. *Institut National de la Recherche Agronomique, Paris*, S. 16.
- Alton, G.G., Jones, L.M., Angus, R.D., Verger, J.M. (1988b): „Techniques for the Brucellosis Laboratory“. *Institut National de la Recherche Agronomique, Paris*, S. 43f.
- Anon (2001): „Mikrobielles Wachstum“. In: Madigan, T.M., Martinko, J.M., Parker, J. (Hrsg.), *Brock Mikrobiologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, D, S. 157.

- Anon (2004): „Milchverordnung (Verordnung über Hygiene- und Qualitätsanforderungen an Milch und Erzeugnisse auf Milchbasis)“. http://212.87.35.103/gesetze/Gesetzestexte_pdf/MilchVO.pdf, aufgerufen am 12.02.2010.
- Anon (2009): „Ionenzusammensetzung des stillen Mineralwassers“. www.gerolsteiner.de, aufgerufen am 29.01.2009.
- Anon (2010): „DMFit“. <http://ifrsvwwwdev.ifrn.bbsrc.ac.uk/CombasePMP/DMFit>, aufgerufen am 10.02.2010.
- Anon (2012): Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB) (Januar 2012): Untersuchung von Lebensmitteln, Methode L 01.00-5: Bestimmung der Keimzahl in Milch und Milchprodukten.
- Aprodu, I., Walcher, G., Schelin, J., Hein, I., Norling, B., Rådström, P., Nicolau, A., Wagner, M. (2011): „Advanced sample preparation for the molecular quantification of *Staphylococcus aureus* in artificially and naturally contaminated milk”. International Journal of Food Microbiology 145, Suppl. 1, S. 61-65. Epub 25.09.2010.
- Araj, G.F. (2010): „Update on laboratory diagnosis of human brucellosis”. International Journal of Antimicrobial Agents 36 Suppl 1, S. S12-S17.
- Arellano-Reynoso, B., Lapaque, N., Salcedo, S., Briones, G., Ciocchini, A.E., Ugalde, R., Moreno, E., Moriyon, I., Gorvel, J.P. (2005): „Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival”. Nature Immunology 6 (6), S. 618-625.
- Audic, S., Lescot, M., Claverie, J.M., Scholz, H.C. (2009): „*Brucella microti*: the genome sequence of an emerging pathogen”. BMC Genomics 10 (1), S. 352.
- Audic, S., Lescot, M., Claverie, J.M., Cloeckert, A., Zygmunt, M.S. (2011): “The genome sequence of *Brucella pinnipedialis* B2/94 sheds light on the evolutionary history of the genus *Brucella*”. BMC Evolutionary Biology 11, S. 200.
- Aygen, B., Doganay, M., Sümerkan, B., Yildiz, O., Kayabas, Ü. (2002): “Clinical manifestations, complications and treatment of brucellosis: a retrospective evaluation of 480 patients”. Médecine et Maladies Infectieuses 32 (9), S. 485-493.
- Baily, G.G., Krahn, J.B., Drasar, B.S., Stoker, N.G. (1992): „Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification”. Journal of Tropical Medicine and Hygiene 95 (4), S. 271-275.
- Baranyi, J., Roberts, T.A. (1994): „A dynamic approach to predicting bacterial growth in food“. International Journal of Food Microbiology 23 (3-4), S. 277-294.
- Barham, W.B., Church, P., Brown, J.E., Paparello, S. (1993): „Misidentification of *Brucella* species with use of rapid bacterial identification systems“. Clinical Infectious Diseases 17 (6), S. 1068-1069.
- Beja-Pereira, A., Bricker, B., Chen, S., Almendra, C., White, P.J., Luikart, G. (2009): „DNA genotyping suggests that recent brucellosis outbreaks in the Greater Yellowstone Area originated from elk“. Journal of Wildlife Diseases 45 (4), S. 1174-1177.

- Benoit, P.W., Donahue, D.W. (2003): „Methods for rapid separation and concentration of bacteria in food that bypass time-consuming cultural enrichment“. *Journal of Food Protection* 66 (10), S. 1935-1948.
- BfR (2005): „Hygienemängel bei Wasserspendern“. Aktualisierte Gesundheitliche Bewertung Nr. 047/2005, S. 1-7.
- Bogdanovich, T., Skurnik, M., Lübeck, P.S., Ahrens, P., Hoorfar, J. (2004): “Validated 5' nuclease PCR assay for rapid identification of the genus *Brucella*“. *Journal of Clinical Microbiology* 42 (5), S. 2261-2263.
- Boschiroli, M.L., Ouahrani-Bettache, S., Foulongne, V., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Allardet-Servent, A., Cazevieille, C., Liautard, J.P., Ramuz, M., O'Callaghan, D. (2002): „The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (3), S. 1544-1549.
- Bosilkovski, M., Krteva, L., Dimzova, M., Kondova, I. (2007): „Brucellosis in 418 patients from the Balkan Peninsula: exposure-related differences in clinical manifestations, laboratory test results, and therapy outcome“. *International Journal of Infectious Diseases* 11 (4), S. 342-347.
- Bounaadja, L., Albert, D., Chénais, B., Hénault, S., Zygmunt, M.S., Poliak, S., Garin-Bastuji, B. (2009): “Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: a comparative study of IS711, *bcs*31 and *per* target genes“. *Veterinary Microbiology* 137 (1-2), S. 156-164.
- Bricker, B.J., Halling, S.M. (1994): „Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR“. *Journal of Clinical Microbiology* 32 (11), S. 2660-2666.
- Bricker, B.J., Ewalt, D.R., Macmillan, A.P., Foster, G., Brew, S. (2000): „Molecular characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals“. *Journal of Clinical Microbiology* 38 (3), S. 1258-1262.
- Buddle, M.B. (1956): „Studies on *Brucella ovis* (n.sp.), a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia“. *The Journal of Hygiene* 54 (3), S. 351-364.
- Burrows, W., Freeman, B.A. (1985): „*Brucella*: Undulant Fever; Contagious Abortion of Cattle“. *Burrows Textbook of Microbiology*. 22. Aufl., W.B. Saunders Co., Philadelphia, S. 505-512.
- Burrows, W.D., Renner, S.E. (1999): „Biological warfare agents as threats to potable water“. *Environmental Health Perspectives* 107 (12), S. 975-984.
- Buzgan, T., Karahocagil, M.K., Irmak, H., Baran, A.I., Karsen, H., Evirgen, O., Akdeniz, H. (2010): „Clinical manifestations and complications in 1028 cases of brucellosis: a retrospective evaluation and review of the literature“. *International Journal of Infectious Diseases* 14 (6), S. e469-e478.
- Carmichael, L.E., Bruner, D.W. (1968): „Characteristics of a newly-recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions“. *The Cornell Veterinarian* 48 (4), S. 579-592.

- Castell, M.J., Rullan, J.V., Peiro Callizo, E.F., Nieto-Sandoval, A.A. (1996): „Epidemic outbreak of 81 cases of brucellosis following the consumption of fresh cheese without pasteurization“. *Revista Española de Salud Pública* 70 (3), S. 303-311.
- Castell, M.J., Gutierrez, A.G., Ruiz Valdepenas, M.A. (2009): „Three outbreaks of brucellosis in a one-year period investigated by the occupational health service in Ciudad Real“. *Gaceta Sanitaria* 23 (6), S. 562-563.
- CDC (2011): „Bioterrorism Agents/Diseases“. <http://www.bt.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>, aufgerufen am 24.06.2011.
- Celli, J., de Chastellier, C., Franchini, D.M., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E., Gorvel, J.P. (2003): „*Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum“. *The Journal of Experimental Medicine* 198 (4), S. 545-556.
- Cempirkova, R., Mikulova, M. (2009): „Incidence of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's raw milk“. *Czech Journal of Animal Science* 54 (2), S. 65-73.
- Chang, M.H., Glynn, M.K., Groseclose, S.L. (2003): „Endemic, notifiable bioterrorism-related diseases, United States, 1992-1999“. *Emerging Infectious Diseases* 9 (5), S. 556-564.
- Cloekaert, A., de Wergifosse, P., Dubray, G., Limet, J.N. (1990): „Identification of seven surface-exposed *Brucella* outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies: immunogold labeling for electron microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay“. *Infection and Immunity* 58 (12), S. 3980-3987.
- Cloekaert, A., Verger, J.M., Grayon, M., Paquet, J.Y., Garin-Bastuji, B., Foster, G., Godfroid, J. (2001): „Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus“. *Microbes and Infection* 3 (9), S. 729-738.
- Cloekaert, A., Vizcaíno, N., Paquet, J.Y., Bowden, R.A., Elzer, P.H. (2002): „Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future“. *Veterinary Microbiology* 90 (1-4), S. 229-247.
- Colmenero, J.D., Reguera, J.M., Martos, F., Sanchez-De-Mora, D., Delgado, M., Causse, M., Martin-Farfan, A., Juarez, C. (1996): „Complications associated with *Brucella melitensis* infection: a study of 530 cases“. *Medicine (Baltimore)* 75 (4), S. 195-211.
- Corbel, M.J. (1975): „Serological Relationship between *Brucella* spp, *Yersinia enterocolitica* Serotype-9 and *Salmonella* Serotypes of Kauffmann-White Group-N“. *Journal of Hygiene* 75 (1), S. 151-171.
- Corbel, M.J., Thomas, E.L. (1985): „Use of phage for the identification of *Brucella canis* and *Brucella ovis* cultures“. *Research in Veterinary Science* 38 (1), S. 35-40.
- Corbel, M.J., Banai, M. (2005): „*Brucella* Meyer and Shaw 1920, 173AL“. In: Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (Hrsg.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2. Aufl., Band 2: The Proteobacteria, Part C: The Alpha, Beta, Delta and Epsilonproteobacteria. Springer Science + Business Media, Inc., New York, NY, USA, S. 370-386.

- Crasta, O.R., Folkerts, O., Fei, Z., Mane, S.P., Evans, C., Martino-Catt, S., Bricker, B., Yu, G., Du, L., Sobral, B.W. (2008): „Genome sequence of *Brucella abortus* vaccine strain S19 compared to virulent strains yields candidate virulence genes”. PLoS One 3 (5), S. e2193.
- Cremonesi, P., Castiglioni, B., Malferrari, G., Biunno, I., Vimercati, C., Moroni, P., Morandi, S., Luzzana, M. (2006): „Technical note: Improved method for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk“. Journal of Dairy Science 89 (1), S. 163-169.
- Cvetnic, Z., Spicic, S., Toncic, J., Majnaric, D., Benic, M., Albert, D., Thiebaud, M., Garin-Bastuji, B. (2009): „*Brucella suis* infection in domestic pigs and wild boar in Croatia“. Revue Scientifique et Technique 28 (3), S. 1057-1067.
- Da Costa, M., Guillou, J.P., Garin-Bastuji, B., Thiébaud, M., Dubray, G. (1996) „Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification”. The Journal of Applied Bacteriology 81 (3), S. 267-275.
- Davies, G., Casey, A. (1973): „The survival of *Brucella abortus* in milk and milk products“. The British Veterinary Journal 129 (4), S. 345-353.
- Davis, R.G. (2004): „The ABCs of bioterrorism for veterinarians, focusing on Category B and C agents“. Journal of the American Veterinary Medical Association 224 (7), S. 1096-1104.
- De, B.K., Stauffer, L., Koylass, M.S., Sharp, S.E., Gee, J.E., Hesel, L.O., Steigerwalt, A.G., Vega, R., Clark, T.A., Daneshvar, M.I., Wilkins, P.P., Whatmore, A.M. (2008): „Novel *Brucella strain* (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection“. Journal of Clinical Microbiology 46 (1), S. 43-49.
- DelVecchio, V.G., Wagner, M.A., Eschenbrenner, M., Horn, T.A., Kraycer, J.A., Estock, F., Elzer, P., Mujer, C.V. (2002): „*Brucella* proteomes--a review“. Veterinary Microbiology 90 (1-4), S. 593-603.
- Demiroglu, Y.Z., Turunc, T., Aliskan, H., Colakoglu, S., Arslan, H. (2007): „Brucellosis: retrospective evaluation of the clinical, laboratory and epidemiological features in 151 cases“. Mikrobiyoloji Bülteni 41 (4), S. 517-527.
- De Wergifosse, P., Lintermans, P., Limet, J.N., Cloeckert, A. (1995): „Cloning and nucleotide sequence of the gene coding for the major 25-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus*“. Journal of Bacteriology 177 (7), S. 1911-1914.
- Doyle, T.J., Bryan, R.T. (2000): „Infectious Disease Morbidity in the US Region Bordering Mexico, 1990-1998“. Journal of Infectious Diseases 182 (5), S. 1503-1510.
- Drescher, L., Hopfengärtner, M. (1930): „Die Haltbarkeit der Bangschen Abortusbazillen in Milch und Milchprodukten“. Münchener Tierärztliche Wochenschrift 81, S. 465-536.
- Dubray, G., Bézard, G. (1980): „Isolation of three *Brucella abortus* cell-wall antigens protective in murine experimental brucellosis“. Annales des Recherches Vétérinaires 11 (4), S. 367-373.
- Elsaghir, A.A.F., James, E.A. (2003): „Misidentification of *Brucella melitensis* as *Ochrobactrum anthropi* by API 20NE“. Journal of Medical Microbiology 52 (5), S. 441-442.

- Enright, F.M. (1990): „The Pathogenesis and Pathobiology of *Brucella* Infection in Domestic Animals“. In: Nielsen, K., Duncan, J.R. (Hrsg.), Animal Brucellosis. CRC Press Inc, Boca Raton, FL, USA, S. 301-320.
- Eriksen, N., Lemming, L., Hojlyng, N., Bruun, B. (2002): „Brucellosis in immigrants in Denmark“. Scandinavian Journal of Infectious Diseases 34 (7), S. 540-542.
- Farrell, I.D., Robertson, L. (1972): “A comparison of various selective media, including a new selective medium for the isolation of brucellae from milk”. Journal of Applied Bacteriology 35 (4), S. 625-630.
- Fisher, M., Atiya-Nasagi, Y., Simon, I., Gordin, M., Mechaly, A., Yitzhaki, S. (2009): „A combined immunomagnetic separation and lateral flow method for a sensitive on-site detection of *Bacillus anthracis* spores--assessment in water and dairy products“. Letters in Applied Microbiology 48 (4), S. 413-418.
- Forestier, C., Moreno, E., Pizarro-Cerda, J., Gorvel, J.P. (1999): „Lysosomal Accumulation and Recycling of Lipopolysaccharide to the Cell Surface of Murine Macrophages, an In Vitro and In Vivo Study“. The Journal of Immunology 162 (11), S. 6784-6791.
- Forestier, C., Deleuil, F., Lapaque, N., Moreno, E., Gorvel, J.P. (2000): „*Brucella abortus* lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down-regulator of T cell activation“. Journal of Immunology 165 (9), S. 5202-5210.
- Foster, G., Osterman, B.S., Godfroid, J., Jacques, I., Cloeckaert, A. (2007): „*Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts“. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57 (Pt 11), S. 2688-2693.
- Foster, J.T., Beckstrom-Sternberg, S.M., Pearson, T., Beckstrom-Sternberg, J.S., Chain, P.S., Roberto, F.F., Hnath, J., Brettin, T., Keim, P. (2009): „Whole-genome-based phylogeny and divergence of the genus *Brucella*“. Journal of Bacteriology 191 (8), S. 2864-2870.
- Franz, D.R., Jahrling, P.B., Friedlander, A.M., McClain, D.J., Hoover, D.L., Bryne, W.R., Pavlin, J.A., Christopher, G.W., Eitzen, E.M., Jr. (1997): „Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents“. The journal of the American Medical Association 278 (5), S. 399-411.
- Fulton, J.S. (1941): „Contagious abortion of cattle and undulant fever in man“. Canadian Public Health Journal 32, S. 194-198.
- Garcia-Yoldi, D., Marin, C.M., de Miguel, M.J., Munoz, P.M., Vizmanos, J.L., Lopez-Goni, I. (2006): „Multiplex PCR Assay for the Identification and Differentiation of all *Brucella* Species and the Vaccine Strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1“. Clinical Chemistry 52 (4), S. 779-781.
- Gee, J.E., De, B.K., Levett, P.N., Whitney, A.M., Novak, R.T., Popovic, T. (2004): „Use of 16S rRNA Gene Sequencing for Rapid Confirmatory Identification of *Brucella* Isolates“. Journal of Clinical Microbiology 42 (8), S. 3649-3654.
- Georghiou, P.R., Young, E.J. (1991): „Prolonged incubation in brucellosis“. Lancet 337 (8756), S. 1543.

- Ghoniem, N.A. (1972): „The Survival Period of *Brucella* Organisms in Relation to pH Value in Egyptian Yoghurt During Different Storage Temperatures“. *Milchwissenschaft* 27 (5), S. 305-308.
- Gilman, H.L., Dahlberg, A.C., Marquardt, J.C. (1946): „The Occurrence and Survival of *Brucella abortus* in Cheddar and Limburger Cheese“. *Journal of Dairy Science* 29 (2), S. 71-85.
- Glynn, M.K., Lynn, T.V. (2008): „Brucellosis“. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 233 (6), S. 900-908.
- Godfroid, J., Käsbohrer, A. (2002): „Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century“. *Veterinary Microbiology* 90 (1-4), S. 135-145.
- Gopaul, K.K., Koylass, M.S., Smith, C.J., Whatmore, A.M. (2008): „Rapid identification of *Brucella* isolates to the species level by real time PCR based single nucleotide polymorphism (SNP) analysis“. *BMC Microbiology* 8 (86).
- Gryson, N. (2010): „Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review“. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396 (6), S. 2003-2022.
- Gross, A., Terraza, A., Ouahrani-Bettache, S., Liautard, J.P., Dornand, J. (2000): „In vitro *Brucella suis* infection prevents the programmed cell death of human monocytic cells“. *Infection and Immunity* 68 (1), S. 342-351.
- Guenther, S., Nöckler, K., Nickisch-Rosenegk, M., Landgraf, M., Ewers, C., Wieler, L.H., Schierack, P. (2008): „Detection of *Trichinella spiralis*, *T. britovi* and *T. pseudospiralis* in muscle tissue with real-time PCR“. *Journal of Microbiological Methods* 75 (2), S. 287-292.
- Guerra, M. (1957): „Persistence of bacteriological and pathogenic properties of *Brucella* in cream“. *Bolletino della Societa Italiana di Biologia Sperimentale* 33, S. 52-53.
- Gupta, R.S. (2005): „Protein Signatures Distinctive of Alpha Proteobacteria and Its Subgroups and a Model for Alpha-Proteobacterial Evolution“. *Critical Reviews in Microbiology* 31 (2), S. 101-135.
- Gür, A., Geyik, M.F., Dikici, B., Nas, K., Cevik, R., Sarac, J., Hosoglu, S. (2003): „Complications of Brucellosis in Different Age Groups: A Study of 283 Cases in Southeastern Anatolia of Turkey“. *Yonsei Medical Journal* 44 (1), S. 33-44.
- Guzman-Verri, C., Manterola, L., Sola-Landa, A., Parra, A., Cloeckert, A., Garin, J., Gorvel, J.P., Moriyon, I., Moreno, E., Lopez-Goni, I. (2002): „The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae“. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (19), S. 12375-12380.
- Halling, S.M., Peterson-Burch, B.D., Bricker, B.J., Zuerner, R.L., Qing, Z., Li, L.L., Kapur, V., Alt, D.P., Olsen, S.C. (2005): „Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*“. *Journal of Bacteriology* 187 (8), S. 2715-2726.

- Hasanjani Roushan, M.R., Mohrez, M., Smailnejad Gangi, S.M., Soleimani Amiri, M.J., Hajiahmadi, M. (2004): „Epidemiological features and clinical manifestations in 469 adult patients with brucellosis in Babol, Northern Iran“. *Epidemiology and Infection* 132 (6), S. 1109-1114.
- Hoover, D.L., Borschel, R.H. (2005): „Medical protection against brucellosis“. In: Lindler, L.E., Lebeda, F.J., Korch, G.W. (Hrsg.), *Infectious Diseases: Biological Weapons Defense: Infectious Diseases and Counterterrorism*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA, S. 155-184.
- Hubalek, Z., Scholz, H.C., Sedlacek, I., Melzer, F., Sanogo, Y.O., Nesvadbova, J. (2007): „Brucellosis of the common vole (*Microtus arvalis*)“. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 7 (4), S. 679-687.
- Huddleson, I., Hasley, D., Torrey, J. (1927): „Further studies on the isolation and cultivation of *Bacterium abortus* (Bang)“. *Journal of Infectious Diseases* 40 (2), S. 352-368.
- Huddleson, I.F. (1929): „The differentiation of the species of the genus *Brucella*“. Michigan State College Agricultural Experimental Station Technical Bulletin 100, S. 1-16.
- Hughes, M.L. (1893): „The natural history of certain fevers occurring in the Mediterranean“. *Mediterranean Nature* 2, S. 325-327.
- ICMSF (1996): „*Brucella*“. In: Roberts, T.A., Baird-Parker, A.C., Tompkin, R.B. (Hrsg.), *Microorganisms in Foods 5: Characteristics of Microbial Pathogens*. Blackie Academic & Professional, London, GB, S. 36-44.
- Imaoka, K., Kimura, M., Suzuki, M., Kamiyama, T., Yamada, A. (2007): „Simultaneous detection of the genus *Brucella* by combinatorial PCR“. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 60 (2-3), S. 137-139.
- Iriarte, M., Gonzalez, D., Delrue, R.M., Monreal, D., Conde, R., Lopez-Goni, I., Letesson, J.J., Moriyon, I. (2004): „*Brucella* lipopolysaccharide: Structure, biosynthesis and genetics“. In: Lopez-Goni, I., Moriyon, I. (Hrsg.), *Brucella: Molecular and cellular biology*. Horizon Bioscience, Wymondham, GB, S. 159-191.
- Jahans, K.L., Foster, G., Broughton, E.S. (1997): „The characterisation of *Brucella* strains isolated from marine mammals“. *Veterinary Microbiology* 57 (4), S. 373-382.
- JCBN, IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (1984): „Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983“. *European Journal of Biochemistry* 138 (1), S. 9-37.
- Jensen, J.G., Vanderveer, D.E., Greer, W.T. (1996): „Analysis for the automatic in-line detection of chemical and biological agents in water systems“. Int Rpt AL/CF-TR-1996-0181. Wright-Patterson AFB, OH: Chemical Biological Defense Division, Armstrong Laboratory.
- Jimenez de Bagües, M.P., Ouahrani-Bettache, S., Quintana, J.F., Mitjana, O., Hanna, N., Bessoles, S., Sanchez, F., Scholz, H.C., Lafont, V., Kohler, S., Occhialini, A. (2010): „The new species *Brucella microti* replicates in macrophages and causes death in murine models of infection“. *The Journal of Infectious Diseases* 202 (1), S. 3-10.

- Karcaaltincaba, D., Sencan, I., Kandemir, O., Guvendag-Guven, E.S., Yalvac, S. (2010): „Does brucellosis in human pregnancy increase abortion risk? Presentation of two cases and review of literature“. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 36 (2), S. 418-423.
- Käseverordnung (2010): Käseverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 14. April 1986 (BGBl. I S. 412), die zuletzt durch Artikel 4 der Verordnung vom 17. Dezember 2010 (BGBl. I S. 2132) geändert worden ist.
- Kästli, P., Binz, M. (1948): „Die Lebensfähigkeit von Bangbazillen (*Brucella abortus* Bang) in Milch und Milchprodukten verschiedenen Säuregrades“. *Schweizerische Milchzeitung* 74 (85), S. 1-2.
- Kästli, P., Hausch, R. (1957): „The viability of *Brucella abortus* Bang in different cheese varieties“. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 99 (11), S. 638-644.
- Kaufmann, A.F., Fox, M.D., Boyce, J.M., Anderson, D.C., Potter, M.E., Martone, W.J., Patton, C.M. (1980): „Airborne spread of brucellosis“. *Annals of the New York Academy of Sciences* 353, S. 105-114.
- Kaufmann, A.F., Meltzer, M.I., Schmid, G.P. (1997): „The economic impact of a bioterrorist attack: are prevention and postattack intervention programs justifiable?“. *Emerging Infectious Diseases* 3 (2), S. 83-94.
- Khan, M.Y., Mah, M.W., Memish, Z.A. (2001): „Brucellosis in pregnant women“. *Clinical Infectious Diseases* 32 (8), S. 1172-1177.
- Khare, S., Ficht, T.A., Santos, R.L., Romano, J., Ficht, A.R., Zhang, S., Grant, I.R., Libal, M., Hunter, D., Adams, L.G. (2004): „Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in bovine milk and feces by a combination of immunomagnetic bead separation-conventional PCR and real-time PCR“. *Journal of Clinical Microbiology* 42 (3), S. 1075-1081.
- Kim, S., Watarai, M., Makino, S., Shirahata, T. (2002): „Membrane sorting during swimming internalization of *Brucella* is required for phagosome trafficking decisions“. *Microbial Pathogenesis* 33 (5), S. 225-237.
- Köhler, S., Michaux-Charachon, S., Porte, F., Ramuz, M., Liautard, J.P. (2003): „What is the nature of the replicative niche of a stealthy bug named *Brucella*?“. *Trends in Microbiology* 11 (5), S. 215-219.
- Kökoglu, O.F., Hosoglu, S., Geyik, M.F., Ayaz, C., Akalin, S., Buyukbese, M.A., Cetinkaya, A. (2006): „Clinical and laboratory features of brucellosis in two university hospitals in southeast Turkey“. *Tropical Doctor* 36 (1), S. 49-51.
- Koujitani, E., Horisaka, T., Nomura, Y., Hara-Kudo, Y., Okatani, A.T., Iwata, T., Kumagai, S., Hayashidani, H. (2006): „Immunomagnetic separation and agar layer methods for the isolation of freeze-injured *Yersinia enterocolitica* O:8 from water“. *The Journal of Veterinary Medical Science* 68 (3), S. 195-199.
- Kretzer, J.W., Lehmann, R., Schmelcher, M., Banz, M., Kim, K.P., Korn, C., Loessner, M.J. (2007): „Use of high-affinity cell wall-binding domains of bacteriophage endolysins for

- immobilization and separation of bacterial cells". *Applied Environmental Microbiology* 73 (6), S. 1992-2000, Epub 02.02.2007.
- Krüger, H. (1932): „Über das Vorkommen von Bang-Bakterien im Fleisch geschlachteter Rinder“. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 40 (31), S. 481-484.
- Kula, S., Erer, D., Buyukates, M., Tunaoglu, F.S., Olgunturk, R., Ozdogan, E.M. (2001): „*Brucella* endocarditis: case report and review of the literature“. *The Journal of Heart Valve Disease* 10 (4), S. 486-488.
- Kuzdas, C.D., Morse, E.V. (1954): „The survival of *Brucella abortus*, U.S.D.A. strain 2308, under controlled conditions in nature“. *The Cornell Veterinarian* 44 (2), S. 216-228.
- Le Fleche, P., Jacques, I., Grayon, M., Al Dahouk, S., Bouchon, P., Denoeud, F., Nöckler, K., Neubauer, H., Guilloteau, L.A., Vergnaud, G. (2006): „Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay“. *BMC Microbiology* 6, S. 9.
- Leal-Klevezas, D.S., Martinez-Vazquez, I.O., Lopez-Merino, A., Martinez-Soriano, J.P. (1995): „Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals“. *Journal of Clinical Microbiology* 33 (12), S. 3087-3090.
- Lerche, M. (1931): „Abortus-Bang-Bakterien in Milch und Milchprodukten vom Rind“. *Zeitschrift für Infektionskrankheiten* 38 (4), S. 253-328.
- Lerche, M., Entel, H.J. (1959): „Über die Säureresistenz von *Brucella*-Bakterien und ihr Verhalten während der Fleischreifung“. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 9, S. 194-198.
- Lopez-Goni, I., Garcia-Yoldi, D., Marin, C.M., de Miguel, M.J., Munoz, P.M., Blasco, J.M., Jacques, I., Grayon, M., Cloeckert, A., Ferreira, A.C., Cardoso, R., Correa de Sa, M.I., Walravens, K., Albert, D., Garin-Bastuji, B. (2008): „Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains“. *Journal of Clinical Microbiology* 46 (10), S. 3484-3487.
- Lucero, N.E., Foglia, L., Ayala, S.M., Gall, D., Nielsen, K. (1999): „Competitive enzyme immunoassay for diagnosis of human brucellosis“. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (10), S. 3245-3248.
- Lucero, N.E., Ayala, S.M., Escobar, G.I., Jacob, N.R. (2008): „*Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006“. *Epidemiology and Infection* 136 (4), S. 496-503.
- Lulu, A.R., Araj, G.F., Khateeb, M.I., Mustafa, M.Y., Yusuf, A.R., Fenech, F.F. (1988): „Human brucellosis in Kuwait: a prospective study of 400 cases“. *The Quarterly Journal of Medicine* 66 (249), S. 39-54.
- Lund, A., Hellemann, A.L., Vartdal, F. (1988): „Rapid isolation of K88+ *Escherichia coli* by using immunomagnetic particles“. *Journal of Clinical Microbiology* 26, S. 2572-2575.
- Maichak, E.J., Scurlock, B.M., Rogerson, J.D., Meadows, L.L., Barbknecht, A.E., Edwards, W.H., Cross, P.C. (2009): „Effects of management, behavior, and scavenging on risk of brucellosis transmission in elk of western Wyoming“. *Journal of Wildlife Diseases* 45 (2), S. 398-410.

- Malik, G.M. (1997): „A clinical study of brucellosis in adults in the Asir region of southern Saudi Arabia“. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 56 (4), S. 375-377.
- Malorny, B., Tassios, P.T., Rådström, P., Cook, N., Wagner, M., Hoorfar, J. (2003): „Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens“. *International Journal of Food Microbiology* 83 (1), S. 39-48.
- Manterola, L., Moriyon, I., Moreno, E., Sola-Landa, A., Weiss, D.S., Koch, M.H.J., Howe, J., Brandenburg, K., Lopez-Goni, I. (2005): „The Lipopolysaccharide of *Brucella abortus* BvrS/BvrR Mutants Contains Lipid A Modifications and Has Higher Affinity for Bactericidal Cationic Peptides“. *The Journal of Bacteriology* 187 (16), S. 5631-5639.
- Mantur, B.G., Biradar, M.S., Bidri, R.C., Mulimani, M.S., Veerappa, K., Kariholu P, Patil, S.B., Mangalgi, S.S. (2006): „Protean clinical manifestations and diagnostic challenges of human brucellosis in adults: 16 years' experience in an endemic area“. *Journal of Medical Microbiology* 55, S. 897-903.
- Marianelli, C., Martucciello, A., Tarantino, M., Vecchio, R., Iovane, G., Galiero, G. (2008): „Evaluation of molecular methods for the detection of *Brucella* species in water buffalo milk“. *Journal of Dairy Science* 91 (10), S. 3779-3786.
- Martinez-Nunez, C., Altamirano-Silva, P., Alvarado-Guillen, F., Moreno, E., Guzman-Verri, C., Chaves-Olarte, E. (2010): „The Two-Component System BvrR/BvrS Regulates the Expression of the Type IV Secretion System VirB in *Brucella abortus*“. *The Journal of Bacteriology* 192 (21), S. 5603-5608.
- Matar, G.M., Khneisser, I.A., Abdelnoor, A.M. (1996): „Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA“. *Journal of Clinical Microbiology* 34 (2), S. 477-478.
- Mattingly, J.A. (1984): „An enzyme immunoassay for the detection of all *Salmonella* using a combination of a myeloma protein and a hybridoma antibody“. *Journal of Immunological Methods* 73, S. 147-156.
- Mayer-Scholl, A., Draeger, A., Göllner, C., Scholz, H.C., Nöckler, K. (2010): „Advancement of a multiplex PCR for the differentiation of all currently described *Brucella* species“. *Journal of Microbiological Methods* 80 (1), S. 112-114.
- Mayfield, J.E., Bricker, B.J., Godfrey, H., Crosby, R.M., Knight, D.J., Hailing, S.M., Balinsky, D., Tabatabai, L.B. (1988): „The cloning, expression, and nucleotide sequence of a gene coding for an immunogenic *Brucella abortus* protein“. *Gene* 63 (1), S. 1-9.
- McKillip, J.L., Jaykus, L.A., Drake, M.A. (2000): „A comparison of methods for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 from artificially-contaminated dairy products using PCR“. *Journal of applied microbiology* 89 (1), S. 49-55.
- McOrist, A.L., Jackson, M., Bird, A.R. (2002): „A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples“. *Journal of Microbiological Methods* 50 (2), S. 131-139.
- Meador, V.P., Deyoe, B.L. (1989): „Intracellular localization of *Brucella abortus* in bovine placenta“. *Veterinary Pathology* 26 (6), S. 513-515.

- Meyer, K.F., Shaw, E.B. (1920): „A comparison of the morphologic, cultural and biochemical characteristics of *B. abortus* and *B. melitensis* from cattle. Studies on the genus *Brucella* nov. gen.“. *Journal of Infectious Diseases* 27, S. 173-184.
- Moreno, E., Berman, D.T., Boettcher, L.A. (1981): „Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides“. *Infection and Immunity* 31 (1), S. 362-370.
- Moreno, E., Gorvel, J.P. (2004): „Invasion, intracellular trafficking and replication of *Brucella* organisms in professional and non-professional phagocytes“. In: Lopez-Goni, I., Moriyon, I. (Hrsg.), *Brucella: Molecular and cellular biology*. Horizon Bioscience, Wymondham, GB, S. 287-312.
- Mousa, A.R., Elhag, K.M., Khogali, M., Marafie, A.A. (1988): „The nature of human brucellosis in Kuwait: study of 379 cases“. *Reviews of Infectious Diseases* 10 (1), S. 211-217.
- Müller, W., Frings, S. (2009): „Tier- und Humanphysiologie“. 4. Aufl., Springer-Verlag, Heidelberg.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986): „Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction“. *Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology* 51 (1), S. 263-273.
- Naroeni, A., Porte, F. (2002): „Role of Cholesterol and the Ganglioside GM1 in Entry and Short-Term Survival of *Brucella suis* in Murine Macrophages“. *Infection and Immunity* 70 (3), S. 1640-1644.
- Navarro, E., Escribano, J., Fernández, J., Solera, J. (2002): „Comparison of three different PCR methods for detection of *Brucella* spp in human blood samples“. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 34 (2), S. 147-151.
- Navarro, E., Segura, J.C., Castano, M.J., Solera, J. (2006): „Use of real-time quantitative polymerase chain reaction to monitor the evolution of *Brucella melitensis* DNA load during therapy and post-therapy follow-up in patients with brucellosis“. *Clinical Infectious Diseases* 42 (9), S. 1266-1273.
- Neubauer, H. (2010): „Brucellosis: new demands in a changing world“. *Prilozi* 31 (1), S. 209-217.
- Nielsen, K.H., Kelly, L., Gall, D., Nicoletti, P., Kelly, W. (1995): „Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis“. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 46 (3-4), S. 285-291.
- Nielsen, K.H., Kelly, L., Gall, D., Balsevicius, S., Bosse, J., Nicoletti, P., Kelly, W. (1996): „Comparison of enzyme immunoassays for the diagnosis of bovine brucellosis“. *Preventive Veterinary Medicine* 26 (1), S. 17-32
- Nour, M.A., Naguib, M.M., Salem, A.A. (1975): „The Survival Rates of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis* in Zabady“. *Egyptian Journal of Dairy Science* (3), S. 78-83.
- Nour, M.A. (1982): „Survival of *Brucella* Organisms in Artificially Contaminated Cream“. *Egyptian Journal of Food Science* 10 (1-2), S. 67-70.

- O'Callaghan, D., Cazevieille, C., Allardet-Servent, A., Boschiroli, M.L., Bourg, G., Foulongne, V., Frutos, P., Kulakov, Y., Ramuz, M. (1999): „A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*“. *Mol.Microbiol* 33 (6), S. 1210-1220.
- Ohtsuki, R., Kawamoto, K., Kato, Y., Shah, M.M., Ezaki, T., Makino, S.I. (2008) „Rapid detection of *Brucella* spp. by the loop-mediated isothermal amplification method“. *Journal of Applied Microbiology* 104 (6), S. 1815-1823.
- Oliver, J.D. (2005): „The viable but nonculturable state in bacteria“. *The Journal of Microbiology* 43 (1), S. 93-100.
- Olsvik, O., Popovic, T., Skjerve, E., Cudjoe, K., Homes, E., Ugelstad, J. , Uhlen, M. (1994): „Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology“. *Clinical Microbiology Reviews* 7, S. 43-54.
- Öngör, H., Cetinkaya, B., Karahan, M., Bulut, H. (2006): „Evaluation of immunomagnetic separation-polymerase chain reaction in direct detection of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* from cheese samples“. *Foodborne Pathogens and Disease* 3 (3), S. 245-250.
- Osterman, B., Moriyon, I. (2006): „International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*. Minutes of the meeting, 17 September 2003, Pamplona, Spain“. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56 (5), S. 1173-1175.
- Ouahrani, S., Michaux, S., Sri, W.J., Bourg, G., Tournebize, R., Ramuz, M., Liautard, J.P. (1993): „Identification and sequence analysis of IS6501, an insertion sequence in *Brucella* spp.: relationship between genomic structure and the number of IS6501 copies“. *Journal of General Microbiology* 139 (12), S. 3265-3273.
- Pagnini, P. (1962): „Research on the resistance of *Brucella abortus* in sausage“. *Rivista Italiana D'igiene* 22, S. 154-170.
- Pappas, G., Akritidis, N., Bosilkovski, M., Tsianos, E. (2005): „Brucellosis“. *The New England Journal of Medicine* 352 (22), S. 2325-2336.
- Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L., Tsianos, E.V. (2006): „The new global map of human brucellosis“. *The Lancet Infectious Diseases* 6 (2), S. 91-99.
- Parent, M.A., Goenka, R., Murphy, E., LeVier, K., Carreiro, N., Golding, B., Ferguson, G., Roop II, R.M., Walker, G.C., Baldwin, C.L. (2007): „*Brucella abortus* bacA mutant induces greater pro-inflammatory cytokines than the wild-type parent strain“. *Microbes and Infection* 9 (1), S. 55-62.
- Patir, B., Dincoglu, A. (2001): „Studies on the existence of *Brucella* spp. in fresh white cheese and tulum cheese marketed in Elazig“. *Saglik Bilimleri Dergisi, Firat Universitesi* 15 (1).
- Paton, N.I., Tee, N.W.S., Vu, C.K.F., Teo, T.P. (2001): „Visceral Abscesses Due to *Brucella suis* Infection in a Retired Pig Farmer“. *Clinical Infectious Diseases* 32 (8), S. e129-e130.
- Paulsen, I.T., Seshadri, R., Nelson, K.E., Eisen, J.A., Heidelberg, J.F., Read, T.D., Dodson, R.J., Umayam, L., Brinkac, L.M., Beanan, M.J., Daugherty, S.C., Deboy, R.T., Durkin,

- A.S., Kolonay, J.F., Madupu, R., Nelson, W.C., Ayodeji, B., Kraul, M., Shetty, J., Malek, J., Van Aken, S.E., Riedmuller, S., Tettelin, H., Gill, S.R., White, O., Salzberg, S.L., Hoover, D.L., Lindler, L.E., Halling, S.M., Boyle, S.M., Fraser, C.M. (2002): „The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts“. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99 (20), S. 13148-13153.
- Peery, T.M., Belter, L.F. (1960): „Brucellosis and heart disease. II. Fatal brucellosis: a review of the literature and report of new cases“. The American Journal of Pathology 36, S. 673-697.
- Perkins, S.D., Smither, S.J., Atkins, H.S. (2010): „Towards a *Brucella* vaccine for humans“. FEMS Microbiology Reviews.
- Pizarro-Cerda, J., Meresse, S., Parton, R.G., van der Goot, G., Sola-Landa, A., Lopez-Goni, I., Moreno, E., Gorvel, J.P. (1998): „*Brucella abortus* Transits through the Autophagic Pathway and Replicates in the Endoplasmic Reticulum of Nonprofessional Phagocytes“. Infection and Immunity 66 (12), S. 5711-5724.
- Porte, F., Liautard, J.P., Kohler, S. (1999): „Early Acidification of Phagosomes Containing *Brucella suis* Is Essential for Intracellular Survival in Murine Macrophages“. Infection and Immunity 67 (8), S. 4041-4047.
- Porte, F., Naroeni, A., Ouahrani-Bettache, S., Liautard, J.P. (2003): „Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages“. Infection and Immunity 71 (3), S. 1481-1490.
- Price, R.E., Templeton, J.W., Smith, R., III, Adams, L.G. (1990): „Ability of mononuclear phagocytes from cattle naturally resistant or susceptible to brucellosis to control in vitro intracellular survival of *Brucella abortus*“. Infection and Immunity 58 (4), S. 879-886.
- Probert, W.S., Schrader, K.N., Khuong, N.Y., Bystrom, S.L., Graves, M.H. (2004): „Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*“. Journal of Clinical Microbiology 42 (3), S. 1290-1293.
- Psifidi, A., Dovas, C.I., Banos, G. (2010): „A comparison of six methods for genomic DNA extraction suitable for PCR-based genotyping applications using ovine milk samples“. Molecular and Cellular Probes 24 (2), S. 93-98.
- Queipo-Ortuno, M.I., Colmenero, J.D., Bravo, M.J., Garcia-Ordenez, M.A., Morata, P. (2008): „Usefulness of a quantitative real-time PCR assay using serum samples to discriminate between inactive, serologically positive and active human brucellosis“. Clinical Microbiology and Infection.
- Rajashekara, G., Glasner, J.D., Glover, D.A., Splitter, G.A. (2004): „Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species“. Journal of Bacteriology 186 (15), S. 5040-5051.
- Ramos, J.M., Bernal, E., Esguevillas, T., Lopez-Garcia, P., Gaztambide, M.S., Gutierrez, F. (2008a): „Non-imported brucellosis outbreak from unpasteurized raw milk in Moroccan immigrants in Spain“. Epidemiology and Infection 136 (11), S. 1552-1555.

- Ramos, T.R.R., Pinheiro Junior, J.W., de Moura Sobrinho, P.A., de Assis Santana, V.L., Guerra, N.R., de Melo, L.E.H., Mota, R.A. (2008b): „Epidemiological aspects of an infection by *Brucella abortus* in risk occupational groups in the microregion of Araguaína, Tocantins”. The Brazilian Journal of Infectious Diseases 12 (2), S. 133-138.
- Rijpens, N.P., Jannes, G., Van, A.M., Rossau, R., Herman, L.M. (1996): „Direct detection of *Brucella* spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes“. Applied and Environmental Microbiology 62 (5), S. 1683-1688.
- Romero, C., Gamazo, C., Pardo, M., Lopez-Goni, I. (1995): „Specific detection of *Brucella* DNA by PCR“. Journal of Clinical Microbiology 33 (3), S. 615-617.
- Romero, C., Lopez-Goni, I. (1999): „Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of *Brucella* spp. by PCR“. Applied and Environmental Microbiology 65 (8), S. 3735-3737.
- Roop, R.M., Gaines, J.M., Anderson, E.S., Caswell, C.C., Martin, D.W. (2009): „Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host“. Medical Microbiology and Immunology 198 (4), S. 221-238.
- Rosa, P.A., Azevedo, A.M., Sommerfeld, S., Mutter, A., Aires-Barros, M.R., Bäcker, W. (2009): „Application of aqueous two-phase systems to antibody purification: a multi-stage approach”. Journal of Biotechnology 139 (4), S. 306-313.
- Safarik, I., Safarikova, M., Forsythe, S.J., (1995): „The application of magnetic separations in applied microbiology“. The Journal of Applied Bacteriology 78, S. 575–585.
- Salcedo, S.P., Marchesini, M.I., Lelouard, H., Fugier, E., Jolly, G., Balor, S., Muller, A., Lapaque, N., Demaria, O., Alexopoulou, L., Comerici, D.J., Ugalde, R.A., Pierre, P., Gorvel, J.P. (2008): „*Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1“. PLoS.Pathog. 4 (2), S. e21.
- Salem, A., Nour, M., Shawkat, M., Fayed, A. (1977): „Viability of *Brucella abortus* in white cheese“. Veterinary Medical Journal 25, S. 215-220.
- Samartino, L.E., Enright, F.M. (1993): „Pathogenesis of abortion of bovine brucellosis“. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 16 (2), S. 95-101.
- Sambrook, J., Russell, D. (2001): „Molecular cloning: A laboratory manual“, 3. Aufl. CSHL Press, New York.
- Savas, L., Onlen, Y., Savas, N., Yapar, A.F., Aydin, M., Tugal, O. (2007): “Prospective evaluation of 140 patients with brucellosis in the southern region of Turkey”. Infectious Diseases in Clinical Practice 15 (2), S. 83-88.
- Schmidt, J. (1901): „Familie Bacteriaceae“. In: Schmidt, J., Weis, F. (Hrsg.), Bakterienne. Naturhistorisk Grundlag for det Bakteriologiske Studium. Morten Porsild, Kobenhavn, DK, S. 248-296.
- Schneeberger, C., Speiser, P., Kury, F., Zeillinger, R. (1995): „Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain“. PCR Methods Appl 4 (4), S. 234-238.

- Scholz, H.C., Hubalek, Z., Nesvadbova, J., Tomaso, H., Vergnaud, G., Le Fleche, P., Whatmore, A.M., Al Dahouk, S., Krüger, M., Lodri, C., Pfeffer, M. (2008a): „Isolation of *Brucella microti* from soil“. *Emerging Infectious Diseases* 14 (8), S. 1316-1317.
- Scholz, H.C., Hubalek, Z., Sedlacek, I., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Melzer, F., Kämpfer, P., Neubauer, H., Cloeckaert, A., Maquart, M., Zygmunt, M.S., Whatmore, A.M., Falsen, E., Bahn, P., Göllner, C., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, H.J., Nöckler, K. (2008b): „*Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*“. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58 (Pt 2), S. 375-382.
- Scholz, H.C., Hofer, E., Vergnaud, G., Le Fleche, P., Whatmore, A.M., Al Dahouk, S., Pfeffer, M., Krüger, M., Cloeckaert, A., Tomaso, H. (2009): „Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower Austria“. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 9 (2), S. 153-156.
- Scholz, H.C., Nöckler, K., Göllner, C., Bahn, P., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al, D.S., Kämpfer, P., Cloeckaert, A., Maquart, M., Zygmunt, M.S., Whatmore, A.M., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, H.J., De, B.K. (2010): „*Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection“. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60 (Pt 4), S. 801-808.
- Schurig, G.G., Sriranganathan, N., Corbel, M.J. (2002): „Brucellosis vaccines: past, present and future“. *Veterinary Microbiology* 90 (1-4), S. 479-496.
- Schwerdtfeger, E.-G. (1963), zitiert nach Rammell, 1967.
- Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare (2001): „Brucellosis in Sheep and Goats“. European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General.
- Scott, J.C., Koylass, M.S., Stubberfield, M.R., Whatmore, A.M. (2007): „Multiplex assay based on single-nucleotide polymorphisms for rapid identification of *Brucella* isolates at the species level“. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (22), S. 7331-7337.
- Serpa Santos, M., Da Con-Ceicao Fernandes, J., Pontes, M.C. (1939): „Vitality of pathogenic bacteria in alcoholic beverages“. *Noticias Farmaceut [Coimbra]* 5, S. 424-437.
- Skalsky, K., Yahav, D., Bishara, J., Pitlik, S., Leibovici, L., Paul, M. (2008): „Treatment of human brucellosis: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials“. *British Medical Journal* 336 (7646), S. 701-704.
- Skibeli, V., Nissen-Lie, G., Torjesen, P. (2001): „Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin“. *Blood* 98 (13), S. 3626-3634.
- Skjerve, E., Rørvik L.M., Olsvik, Ø. (1990): „Detection of *Listeria monocytogenes* in foods by immunomagnetic separation“. *Applied Environmental Microbiology* 56 (11), S. 3478-3481.
- Skjerve, E., Olsvik, Ø. (1991): „Immunomagnetic separation of *Salmonella* from foods“. *International Journal of Food Microbiology* 14 (1), S. 11-17.
- Solera, J. (2010): „Update on brucellosis: therapeutic challenges“. *International Journal of Antimicrobial Agents* 36 Suppl 1, S. S18-S20.

- Starr, T., Ng, T.W., Wehrly, T.D., Knodler, L.A., Celli, J. (2008): „*Brucella* Intracellular Replication Requires Trafficking Through the Late Endosomal/Lysosomal Compartment“. *Traffic* 9 (5), S. 678-694.
- Stauffer, S.H., Birkenheuer, A.J., Levy, M.G., Marr, H., Gookin, J.L. (2008): „Evaluation of four DNA extraction methods for the detection of *Tritrichomonas foetus* in feline stool specimens by polymerase chain reaction“. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20 (5), S. 639-641.
- Stiles, G.W. (1945): „Brucellosis in goats. Recovery of *Brucella melitensis* from cheese manufactured from un-pasteurized goats' milk“. *Rocky Mountain Medical Journal* 42 (1), S. 18-25.
- Stoenner, H.G., Lackman, D.B. (1957): „A new species of *Brucella* isolated from the desert wood rat, *Neotoma lepida* Thomas“. *American Journal of Veterinary Research* 18 (69), S. 947-951.
- Tamime, A.Y., Robinson, R.K. (1999): „Yoghurt: Science and Technology“, 2. Aufl. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge.
- Tantillo, G.M., Di Pinto, A., Buonavoglia, C. (2003): „Detection of *Brucella* spp. in soft cheese by semi-nested polymerase chain reaction“. *The Journal of Dairy Research* 70 (2), S. 245-247.
- Thompson, R. (1933): „The isolation of *Brucella abortus* from ice cream“. *Canadian Medical Association Journal* 29 (1), S. 9-11.
- Tiller, R.V., Gee, J.E., Lonsway, D.R., Gribble, S., Bell, S.C., Jennison, A.V., Bates, J., Coulter, C., Hoffmaster, A.R., De, B.K. (2010): „Identification of an unusual *Brucella* strain (BO2) from a lung biopsy in a 52 year-old patient with chronic destructive pneumonia“. *BMC Microbiology* 10, S. 23.
- Tomaso, H., Kattar, M.M., Eickhoff, M., Wernery, U., Al, D.S., Straube, E., Neubauer, H., Scholz, H.C. (2010): „Comparison of commercial DNA preparation kits for the detection of brucellae in tissue using quantitative real-time PCR“. *BMC Infectious Diseases* 10 (1), S. 100.
- Ugelstad, J., Stenstad, P., Kilaas, L., Prestvik, W.S., Herje, R., Berge, A., Hornes, E. (1993): „Monodisperse magnetic polymer particles. New biochemical and biomedical applications“. *Blood Purification* 11 (6), S. 349-369.
- USDA-FSIS (2010): „Detection, isolation and identification of *Escherichia coli* O157:H7 from meat products“ In: *Microbiology Laboratory Guidebook*. Kapitel 5.05 Revision 5. http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_5_05.pdf, aufgerufen am 07.07.2011.
- Ushijima, H., Honma, H., Tsuchie, H., Kitamura, T., Takahashi, I. (1990): „Removal of HIV antigens and HIV-infected cells in vitro using immunomagnetic beads“. *Journal of Virological Methods* 29 (1), S. 23-31.
- Uyttendaele, M., Hoorde, I.V., Debevere, J. (2000): „The use of immunomagnetic separation (IMS) as a tool in a sample preparation method for direct detection of *L. monocytogenes* in cheese“. *International Journal of Food Microbiology* 54, S. 205–212.

- Van Drimmelen, G.C. (1955): „*Brucella abortus* strain 19 cultivated in aerated liquid medium“. *Nature* 175 (4466), S. 999.
- Van Tongeren, S.P., Degener, J.E., Harmsen, H.J. (2011): „Comparison of three rapid and easy bacterial DNA extraction methods for use with quantitative real-time PCR“. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*.
- Velasco, J., Romero, C., Lopez-Goni, I., Leiva, J., Diaz, R., Moriyon, I. (1998): „Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp“. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48 (3), S. 759-768.
- Verger, J.M., Grimont, F., Grimont, P.A.D., Grayon, M. (1985): „*Brucella*, a Monospecific Genus as Shown by Deoxyribonucleic Acid Hybridization“. *International Journal of Systematic Bacteriology* 35 (3), S. 292-295.
- Verger, J.M., Grayon, M., Cloeckert, A., Lefevre, M., Ageron, E., Grimont, F. (2000): „Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals using DNA-DNA hybridization and ribotyping“. *Research in Microbiology* 151 (9), S. 797-799.
- Whatmore, A.M., Murphy, T.J., Shankster, S., Young, E., Cutler, S.J., Macmillan, A.P. (2005): „Use of amplified fragment length polymorphism to identify and type *Brucella* isolates of medical and veterinary interest“. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (2), S. 761-769.
- Whatmore, A.M., Perrett, L.L., Macmillan, A.P. (2007): „Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing“. *BMC Microbiology* 7, S. 34.
- Whatmore, A.M., Dawson, C.E., Groussaud, P., Koylass, M.S., King, A.C., Shankster, S.J., Sohn, A.H., Probert, W.S., McDonald, W.L. (2008): „Marine mammal *Brucella* genotype associated with zoonotic infection“. *Emerging Infectious Diseases* 14 (3), S. 517-518.
- Whatmore, A.M. (2009): „Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens“. *Infection, Genetics and Evolution* 9 (6), S. 1168-1184.
- WHO (1970): „Health aspects of chemical and biological weapons“. World Health Organisation, Geneva, Switzerland.
- WHO (1995): „Brucellosis associated with unpasteurized milk products abroad“. *Weekly Epidemiological Record* 43, S. 308-309
- Williams, E. (1973): „Brucellosis“. *British Medical Journal* 1 (5856), S. 791-793.
- Wilson, I.G. (1997): „Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification“. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (10), S. 3741-3751.
- Yagupsky, P. (1999): „Detection of brucellae in blood cultures“. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (11), S. 3437-3442.
- Yazdankhah, S.P., Hellemann, A.L., Rønningen, K., Olsen, E. (1998): „Rapid and sensitive detection of *Staphylococcus* species in milk by ELISA based on monodisperse magnetic particles“. *Veterinary Microbiology* 62 (1), S. 17-26.

- Young, E.J. (1983): „Human brucellosis“. *Reviews of Infectious Diseases* 5 (5), S. 821-842.
- Young, E.J. (1995): „An overview of human brucellosis“. *Clinical Infectious Diseases* 21 (2), S. 283-289.
- Zobell, C.E., Meyer, K.F. (1932): „Metabolism Studies on the *Brucella* Group: IX. Physicochemical Requirements in Synthetic Mediums“. *The Journal of Infectious Diseases* 51 (2), S. 361-381.
- Zuniga, E.A., Mota, d.l.G., Sanchez, M.M., Santos Lopez, E.M., Filardo, K.S., Lopez, M.A. (2005): „Survival of *Brucella abortus* in milk fermented with a yoghurt starter culture“. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 47 (3-4), S. 88-91.

11 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Bernd Appel für die Überlassung der interessanten Aufgabenstellung und die Ermöglichung der Doktorarbeit am Bundesinstitut für Risikobewertung.

Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel danke ich für die Bereitschaft, die Betreuung der Arbeit im Fachbereich Biologie der Freien Universität Berlin zu übernehmen.

Ganz herzlich danke ich Herrn PD Dr. Karsten Nöckler für die Betreuung und dafür, dass er immer ein offenes Ohr für neue Ergebnisse und Fragestellungen hatte.

Mein herzlicher Dank geht auch an PD Dr. Sascha Al Dahouk für das Korrekturlesen der Doktorarbeit und das tolle Feedback. Ebenfalls für Korrekturen danke ich Dr. Allison Berger.

Außerdem möchte ich der Fachgruppe 45 für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Mein besonderer Dank gilt Keike Schwartz, Steve Martin, Dr. Anne Mayer-Scholl, Dr. Jens-Andre Hammerl sowie Cornelia Göllner und Peter Bahn für die Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

Ein ganz lieber Dank geht an meine Frau, die mich vom Korrekturlesen bis zum Aufpassen auf die Kinder unterstützt hat und mir viel Rückhalt gegeben hat. Ich danke auch meinen Eltern und der ganzen Familie für ihre Unterstützung.

Diese Doktorarbeit wurde vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz finanziert (BLE-Nr. 07HS022).