

Untersuchungen zum Nachweis pathogener Bakterien in Lebensmitteln mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

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

Alexander Rohde

aus Henstedt-Ulzburg

2016

Diese Dissertation wurde in der Zeit von Oktober 2013 bis November 2016 am Bundesinstitut für Risikobewertung in der Abteilung 4 „Biologische Sicherheit“ in der Fachgruppe 47 „Produkthygiene und Desinfektionsstrategien“ unter der Leitung von Professor Dr. Sascha Al Dahouk angefertigt.

1. Gutachter: Professor Dr. Sascha Al Dahouk (Bundesinstitut für Risikobewertung)
2. Gutachter: Professor Dr. Rupert Mutzel (Freie Universität Berlin)

Disputation am 01.02.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	iii
Abkürzungsverzeichnis	viii
1 Einleitung	1
1.1 Bakterielle lebensmittelbedingte Zoonosen	1
1.1.1 Thermophile <i>Campylobacter</i> spp.	2
1.1.2 <i>Salmonella enterica</i>	3
1.1.3 Yersinien	4
1.1.4 Pathogene <i>Escherichia coli</i>	4
1.1.5 <i>Listeria monocytogenes</i>	5
1.2 Antibiotikaresistenz	5
1.3 Nachweisverfahren in der Lebensmittelmikrobiologie.....	6
1.3.1 Konventioneller Erregernachweis durch Kultivierung	6
1.3.2 Alternativmethoden	7
1.3.2.1 Verbesserte kulturelle Methoden	8
1.3.2.2 Immunologische Methoden	8
1.3.2.3 Nukleinsäurebasierte Methoden	9
1.3.3 Methoden zur Lebend/Tot-Unterscheidung	9
1.4 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH).....	11
1.4.1 Ribosomale RNAs als Zielstruktur von FISH in der Mikrobiologie	12
1.4.2 Thermodynamik der Hybridisierung	13
1.4.3 FISH-Methodik	15
1.4.3.1 Probenvorbereitung.....	16
1.4.3.1.1 Feste Proben.....	17
1.4.3.1.2 Flüssige Proben	17
1.4.3.2 Fixierung und Permeabilisierung.....	18
1.4.3.3 Hybridisierung und Waschschrte.....	19
1.4.3.4 Evaluation	20
1.4.4 Probleme in der FISH-Diagnostik und technische Innovationen.....	20
1.4.4.1 Neuerungen in den eingesetzten Oligonukleotiden	21
1.4.4.2 Einsatz unmarkierter Oligonukleotide	22

1.4.4.3 FISH-Systeme mit amplifizierten Signalen.....	23
1.4.5 Einsatz von FISH in der Lebensmittelmikrobiologie und Forschungsbedarf	24
1.5 Zielsetzung.....	25
2 Materialien und Methoden.....	27
2.1 Materialien.....	27
2.1.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	27
2.1.2 Nährmedien.....	30
2.1.3 Enzyme und Antikörper.....	30
2.1.4 Oligonukleotide	30
2.1.4.1 Primersequenzen	30
2.1.4.2 FISH-Sonden	31
2.1.4.3 Kompetitoren.....	32
2.1.5 Kits	34
2.1.6 Bakterienstämme	34
2.1.7 Plasmide	35
2.1.8 Software und Analyseprogramme.....	35
2.2 Methoden	36
2.2.1 Mikrobiologische und phänotypische Methoden	36
2.2.1.1 Mikrobiologische Nachweise.....	36
2.2.1.1.1 <i>Yersinia</i> (in Anlehnung an ISO 10273)	36
2.2.1.1.2 <i>Campylobacter</i> (in Anlehnung an ISO 10272)	36
2.2.1.1.3 <i>Listeria</i> (in Anlehnung an ISO 11290).....	37
2.2.1.1.4 <i>Salmonella</i> (in Anlehnung an ISO 6579).....	37
2.2.1.1.5 <i>Brucella</i>	37
2.2.1.2 Stammhaltung und Kultivierung	38
2.2.1.3 Zellzahlbestimmung	38
2.2.1.4 Nitrocefin-Assay.....	38
2.2.1.5 Etest.....	39
2.2.2 Methoden zur Probenvorbereitung und zur Herstellung kontaminierter Lebensmittelmatrices	39
2.2.2.1 Homogenisierung.....	39
2.2.2.2 Filtration	41

2.2.2.3 Herstellung von Matrices mit interner Kontamination und fraktionierte Probennahme.....	41
2.2.2.4 Herstellung von Matrices mit Oberflächenkontaminationen und Spiking von Flüssigkeiten.....	43
2.2.2.5 Herstellung histologischer Schnitte.....	44
2.2.3 Molekularbiologische Methoden.....	44
2.2.3.1 FISH.....	44
2.2.3.1.1 Puffer und Lösungen.....	44
2.2.3.1.2 Probenfixierung.....	45
2.2.3.1.3 FISH-Färbung.....	46
2.2.3.2 Sequenzierung der 16S und 23S Gene.....	47
2.2.3.3 Immunfluoreszenz.....	48
2.2.4 Methoden zur Lebend/Tot-Differenzierung.....	48
2.2.4.1 Direct viable count.....	48
2.2.4.2 Tests zur Bestimmung der Membranintegrität.....	49
2.2.4.3 Tests zur Bestimmung der intrazellulären Enzymaktivität.....	50
2.2.5 MALDI-TOF Biotyping.....	50
2.2.6 Mikroskopie und Bildauswertung.....	51
2.2.7 FISH-Sondendesign.....	52
2.2.7.1 Identifizierung geeigneter Zielsequenzen.....	53
2.2.7.2 Thermodynamische Optimierung der Sondensequenzen.....	54
2.2.7.3 Verwendung von locked nucleic acids (LNAs).....	55
2.2.7.4 Design von Kompetitoren und Helfersonden.....	55
2.2.7.5 Stellaris mRNA FISH-Sondendesign.....	56
2.2.8 Statistische Methoden.....	57
3 Ergebnisse.....	58
3.1 Entwicklung von FISH-Tests zur Speziesbestimmung und Vergleich mit publizierten FISH-Sonden.....	58
3.1.1 FISH-Sondenentwicklung <i>in silico</i>	58
3.1.2 Test des entwickelten Standardprotokolls und des Auflösungsvermögens von FISH für <i>S. enterica</i> , <i>Brucella</i> spp. und <i>E. coli</i> O157.....	60
3.1.3 Entwicklung von FISH-Nachweisen für Campylobacteraceae.....	65
3.1.4 Entwicklung von FISH-Nachweisen für <i>Listeria</i> spp.	70

3.1.5 Entwicklung von FISH-Nachweisen für <i>Yersinia</i> spp.	73
3.2 Methodische Optimierungen des FISH-Protokolls am Beispiel von <i>Yersinia</i> spp.	79
3.2.1 Schnellfixierung mit Ethanol.....	79
3.2.2 Etablierung eines Direktnachweises mit verbesserter Lebend/Tot- Unterscheidung	79
3.3 Simultannachweis und Sondenmultiplexing.....	85
3.4 Entwicklung von FISH-Tests zum Nachweis von Antibiotikaresistenzen....	86
3.4.1 Etablierung eines FISH-Assays für die Transkription von <i>bla</i>	87
3.4.2 Vergleich mit Nachweisen auf Protein- und Aktivitätsebene.....	90
3.5 Evaluierung verschiedener Methoden zur Probenaufarbeitung	94
3.5.1 Aufarbeitung von festen Proben.....	95
3.5.1.1 Oberflächenkontaminationen	95
3.5.1.2 Innere Kontaminationen	96
3.5.1.2.1 Analyse der Keimverteilung	98
3.5.2 Probenaufarbeitung für Flüssigproben.....	99
3.5.2.1 Etablierung eines quantifizierbaren Standards	102
3.6 Praxisuntersuchungen an kontaminierten Lebensmitteln	103
3.6.1 <i>Yersinia</i>	103
3.6.2 <i>Campylobacter</i>	104
3.6.3 <i>Brucella</i>	105
4 Diskussion	107
4.1 Etablierung der FISH-Tests.....	107
4.1.1 Sondendesign und Auswahl der Zielsequenzen.....	107
4.1.2 Optimierung der SONDENSEQUENZEN	108
4.1.3 Autofluoreszenz und Methoden zur Signalverstärkung	110
4.2 Lebend/Tot-Unterscheidung und Stabilität des Signals	112
4.3 Kulturunabhängige Resistenznachweise	114
4.4 Homogenisierung und Probenvorbereitung	116
4.4.1 Pathogenverteilung in Lebensmitteln	119
4.5 Potenzial von FISH für die Lebensmittelsicherheit	121
4.5.1 Kostenabschätzung des FISH-Nachweises und Vergleich zu konventionellen Nachweissystemen	122

4.6 Ausblick.....	126
5 Zusammenfassung	127
6 Summary.....	128
7 Literaturverzeichnis	129
8 Veröffentlichungen	144
8.1 Wissenschaftliche Artikel	144
8.2 Konferenzbeiträge.....	145
8.2.1 Vorträge	145
8.2.2 Poster.....	145
9 Danksagung.....	146
10 Lebenslauf	147
11 Anhang.....	148

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection
a _w -Wert	Wasseraktivität
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumine
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CARD-FISH	catalyzed reporter deposition-FISH
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cFDA	Carboxyfluoresceindiacetat
CFU (KbE)	koloniebildende Einheiten
CIN-Agar	Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-Agar
CTC	5-Cyano-2,3-di-(p-tolyl)tetrazoliumchlorid
d	Tag(e)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DVC	direct viable count
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFSA	European Food Safety Authority
EHEC	enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMA	Ethidiummonoazid
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
etc.	<i>et cetera</i>
EU	Europäische Union

FDA	Fluoresceindiacetat
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FISHFC	FISH following filter cultivation
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanin
GFP	green fluorescent protein
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
ITC	Irgasan-Ticarcillin-Chlorat Medium
kb	Kilobasen
l	Liter
LB	lysogeny broth
LNA	locked nucleic acid
M	molar
Mb	Megabasen
mCCD-Agar	modifizierter Aktivkohle Cefoperazon Desoxycholat Agar
mg	Milligramm
MHA	Müller-Hinton Agar
MHB	Müller-Hinton Blutagar
MIC	minimal inhibitory concentration
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mRNA	messenger-RNA
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
nM	nanomolar
NZCYM-Broth	NZ amine casamino acids yeast extract magnesium sulfate broth
OCLA	Oxid chromogener <i>Listeria</i> Agar
OD600	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PBS	phosphate buffered saline

PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
pH	pH-Wert (negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionen)
PI	Propidiumiodid
PMA	Propidiummonoazid
PNA	peptide nucleic acid
PSB	peptone sorbitole bile broth
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
s	Sekunde(n)
S	Svedberg (Sedimentationskoeffizient)
sp.	<i>species</i>
spp.	<i>species pluralis</i>
subsp.	<i>subspecies</i>
SBA	Schafsblutagar
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSDC-Agar	<i>Salmonella Shigella</i> desoxycholate calcium Agar
TR	TexasRed
U	Uracil
u. a.	unter anderem
USA	United States of America
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	Volt
VBNC	viable but not culturable
WHO	World Health Organization
XLD-Agar	Xylose-Lysine-Desoxycholat-Agar
z. B.	zum Beispiel
ΔG	Änderung der Gibbs-Energie
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

1 Einleitung

1.1 Bakterielle lebensmittelbedingte Zoonosen

Bakterielle Zoonoseerreger, also Bakterien, die vom Tier auf den Menschen übertragen werden können, sind die Ursache von zahlreichen Infektionserkrankungen. Zoonosen können durch Vektoren (z. B. Insekten oder Zecken), Trinkwasser, Atemluft und durch direkten Kontakt mit Nutz- oder Haustieren übertragen werden. Darüber hinaus stellen insbesondere lebensmittelbedingte Zoonosen ein weltweites Gesundheitsproblem dar. Das genaue Ausmaß und die Häufigkeit dieser Erkrankungen sind dabei sehr schwer abschätzbar. Die WHO schätzte jedoch im Jahr 2015, dass ein Großteil der weltweit jährlich etwa 600 Millionen Fälle lebensmittelassoziierter Erkrankungen (417-962 Millionen; 95 % Konfidenzintervall) auf Bakterien zurückzuführen ist (WHO, 2015).

Diese geschätzt 350 Millionen Fälle bakterieller Lebensmittelerkrankungen (223-590 Millionen; WHO, 2015) werden vor allem durch Infektionen mit *Salmonella*, *Campylobacter* und pathogenen *Escherichia coli* verursacht. Lebensmittelbedingte bakterielle Zoonosen sind außerdem für einige Hunderttausend Todesfälle jährlich verantwortlich, vor allem in Entwicklungsländern (WHO, 2015). Auch in den Industrieländern sind lebensmittelassozierte Zoonosen ein dauerhaftes Problem trotz immer weiter verbesserter Hygienestandards in der Lebensmittelindustrie sowie im Transport- und Lagerungswesen und trotz der Möglichkeiten einer sichereren Zubereitung. Dabei ist das Ausmaß der gesundheitlichen Beeinträchtigung der Bevölkerung (gemessen in DALYs, disability adjusted life years) in Nordamerika oder Westeuropa gut 30-fach geringer als etwa auf dem afrikanischen Kontinent (WHO, 2015). Nicht zuletzt führt die hohe Anzahl an Erkrankungen auch zu einem beträchtlichen volkswirtschaftlichen Schaden. Batz (2013) veranschlagte den jährlichen finanziellen Schaden alleine für die USA auf 14 bis 30 Milliarden US-Dollar. Die Zahl der gemeldeten und mikrobiologisch bestätigten Fälle und die Schätzungen der tatsächlichen Inzidenz gehen dabei weit auseinander. Tabelle 1 listet die fünf häufigsten meldepflichtigen Erkrankungen des Menschen infolge einer Infektion mit bakteriellen lebensmittelassozierten Zoonosen in der Europäischen Union auf und vergleicht sie mit Schätzungen aus den USA.

Tabelle 1: Wichtige lebensmittelassoziierte bakterielle Pathogene: Anzahl der gemeldeten Fälle in der EU und geschätzte Anzahl in den USA

Pathogen	Bestätigte Infektionen in der EU	Geschätzte Infektionen in den USA (Anzahl nicht diagnostizierter Fälle)
<i>Campylobacter</i>	215.000	850.000 (1 Diagnose auf 31 Fälle)
<i>Salmonella</i>	83.000	1.030.000 (1 Diagnose auf 30 Fälle)
<i>Yersinia</i>	6.500	98.000 (1 Diagnose auf 124 Fälle)
<i>E. coli</i> (VTEC)	6.000	206.000 (1 Diagnose auf 38 Fälle)
<i>Listeria</i>	1.800	1.600 (1 Diagnose auf 3 Fälle)

Die Zahlen für die EU beruhen auf Angaben der EFSA (2015); die Zahlen für die USA auf Schätzungen der CDC (2014) und von Scallan *et al.* (2011).

Auf Grund ihrer hohen Bedeutung für die europäische Lebensmittelsicherheit wurden insbesondere diese fünf Erregergruppen für die in der vorliegenden Dissertation durchgeführten Versuche ausgewählt.

1.1.1 Thermophile *Campylobacter* spp.

Thermophile *Campylobacter* spp. verursachen die Campylobacteriose und stellen die zahlenmäßig häufigste Zoonoseerregerklasse in der EU und in Deutschland dar. *Campylobacter* spp. verursachen etwa zwei Drittel aller gemeldeten bakteriellen Lebensmittelzoonosen des Menschen, wobei die Mehrzahl von den sogenannten thermophilen (in diesem Zusammenhang ist ein Wachstum bei 42 °C gemeint) Spezies ausgelöst wird. In der Gruppe der thermophilen *Campylobacter* spp. dominiert *C. jejuni* die Krankheitsausbrüche, gefolgt von *C. coli* und *C. lari* (Schielke *et al.*, 2014). Die Campylobacteriose ist eine verhältnismäßig mild verlaufende Durchfallerkrankung mit nur seltenen Komplikationen wie einer reaktiven Arthritis (Dhama *et al.*, 2013). Die Meldezahlen sind im Gegensatz zu anderen Zoonosen in den letzten Jahren jedoch unverändert hoch geblieben bzw. sogar gestiegen (EFSA, 2015; Newell *et al.*, 2010). In Deutschland wurde im Jahr 2014 ein deutlicher Anstieg auf knapp 71.000 Fälle gemeldet (RKI, 2015). Insbesondere Geflügelfleisch kann mit *Campylobacter* spp. kontaminiert sein, teilweise liegen die Nachweisraten bei Masthühnern bei über 50 % (Hartung *et al.*, 2015). Die Kontamination des Lebensmittels findet häufig während des Schlachtvorganges statt, wenn Darminhalt auf die Oberfläche der Geflügelprodukte gelangt; außerdem können auch Schweinefleischprodukte oder Milch mit *Campylobacter* spp. verunreinigt sein. Außerhalb des Darmes können sich thermophile *Campylobacter* spp. nicht weiter

vermehrten. Trotz der teils hohen Kontaminationsraten zählen thermophile *Campylobacter* spp. zu den schwer nachweisbaren Bakterien, da sie unter diversen Stressbedingungen häufig in einen schwer kultivierbaren VBNC-artigen Zustand eintreten und nur unter mikroaeroben Bedingungen und unter verhältnismäßig langsamen Wachstumsraten isoliert werden können (On, 2013). *Campylobacter* spp. gehören zu der Ordnung der Campylobacterales, zu denen auch *Helicobacter pylori* gehört. Eine dritte wichtige Gattung aus dieser Gruppe, *Arcobacter* mit *A. butzleri* als wohl wichtigste humanpathogene Spezies innerhalb dieser Gattung, ist in den letzten Jahren ebenfalls zunehmend als Zoonoseerreger in der Diskussion und wird im mikrobiologischen Nachweis häufig fälschlich als *Campylobacter* spp. eingestuft (Dhama *et al.*, 2013; Hsu und Lee, 2015).

1.1.2 *Salmonella enterica*

Salmonellen sind die zweithäufigsten bakteriellen Zoonoseerreger in Europa und in Deutschland und verursachen die Salmonellose, eine akute Durchfallerkrankung. Während 1992 noch bis zu 200.000 Salmonellosen alleine in Deutschland gemeldet wurden, gingen die Zahlen seitdem kontinuierlich zurück und lagen im Jahr 2014 mit gut 16.000 gemeldeten Erkrankungen bei unter 10 % des Wertes von 1992 (RKI, 2015). Neben strengeren Hygienekriterien und immer schärferen gesetzlichen Regelungen sind dafür vor allem auch weitreichende Impfkampagnen zur Reduktion der Infektionsraten in den betroffenen Nutztieren verantwortlich. *S. enterica* gehört zu der Familie der Enterobacteriaceae und beinhaltet viele tausend verschiedene Serovare (Dhama *et al.*, 2013). In der Humanmedizin sind dabei *S. enterica* Typhimurium und *S. enterica* Enteritidis am bedeutendsten, aber auch andere Serovare verursachen immer wieder Ausbrüche. Insgesamt waren im Jahre 2013 ein Drittel aller lebensmittelbedingten Ausbrüche auf Salmonellen zurückzuführen (Hartung *et al.*, 2015). Viele verarbeitete und unverarbeitete Lebensmittel können mit Salmonellen belastet sein, bereits geringe Konzentrationen können für eine Infektion des Menschen ausreichen (Newell *et al.*, 2010). Die höchsten Nachweisraten finden sich bei frischem Geflügelfleisch und seltener bei Schweinefleisch (Hartung *et al.*, 2015). Die Belastung von Eiern ist dagegen in den letzten Jahren stark zurückgegangen. Auf Grund der niedrigen Infektionsdosis gilt in Deutschland der Standard, dass in 25 g einer Lebensmittelprobe keine Salmonellen nachweisbar sein dürfen. Neben den in Deutschland dominierenden nichttyphoidalen Salmonellen

können einige Stämme von *S. enterica*, insbesondere *S. Typhi*, auch eine schwere, fiebrige Typhus-Erkrankung verursachen mit weitaus gravierenderen Verläufen und Letalitäten bis zu 10 % (FDA, 2012). Typhus tritt allerdings vornehmlich in Entwicklungsländern auf und ist in Deutschland von geringerer Bedeutung.

1.1.3 Yersinien

Die Gattung der Yersinien gehört zu den Enterobacteriaceen und umfasst etwa ein Dutzend Spezies, von denen aber nur drei, nämlich *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis*, als humanpathogen gelten. In Deutschland ist vor allem *Y. enterocolitica* relevant, der als Erreger der Yersiniose die dritthäufigste bakterielle lebensmittelassoziierte Zoonose darstellt, wenn auch mit stetig fallender Tendenz. Im Jahre 2014 wurden etwa 2.500 diagnostizierte Erkrankungen in Deutschland gemeldet (RKI, 2015). Auch *Y. pseudotuberculosis* kann wie *Y. enterocolitica* eine milde Gastroenteritis auslösen, ist aber sehr viel seltener der Auslöser von Krankheiten. Insgesamt liegen die Infektionsdosen höher und die Erkrankungen verlaufen im Vergleich zu anderen Lebensmittelzoonosen weniger schwer. Viele Serotypen von *Y. enterocolitica* gelten als gering pathogen, die meisten Erkrankungen werden durch die Serotypen O:3 (Biotyp 4) und O:9 (Biotyp 2) verursacht (EFSA, 2015), weswegen kulturelle Nachweissysteme auf diese Serotypen optimiert worden sind. Im Gegensatz zu anderen Enterobacteriaceae wachsen Yersinien deutlich langsamer, dafür aber auch bei niedrigen Temperaturen (0-4 °C). Das Temperaturoptimum liegt bei 28-30 °C (FDA, 2012). Typischerweise werden Infektionen mit *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* durch kontaminiertes Schweinefleisch bzw. Hackfleischzubereitungen vom Schwein hervorgerufen, seltener auch durch Milch (Hartung *et al.*, 2013). *Y. pestis* ist ein naher Verwandter von *Y. pseudotuberculosis* und Auslöser der Pest mit hoher Letalität, tritt in Deutschland allerdings nicht mehr auf und wird nicht über Lebensmittel übertragen (RKI, 2015; FDA, 2012).

1.1.4 Pathogene *Escherichia coli*

Die zur Familie der Enterobacteriaceae zählende Spezies *E. coli* gehört zur normalen Darmflora des Menschen und tritt als solches meist als kommensale Spezies auf (Dhama *et al.*, 2013). Gleichwohl sind mehrere Gruppen beschrieben, die Toxine wie das Shigatoxin (bzw. Verotoxin) exprimieren (STEC) oder über andere

Virulenzfaktoren verfügen. Insbesondere die Gruppe der enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) war durch den großen EHEC O104:H4 Ausbruch im Jahre 2011 mit knapp 3.000, teilweise sehr schweren, Erkrankungen, einschließlich dauerhafter Organschäden, und vielen Dutzend Toten in den Fokus der Öffentlichkeit geraten (RKI, 2012). Toxinbildende *E. coli* Stämme können durch verschiedene Nahrungsmittel übertragen werden, vor allem aber durch den Konsum von belasteten Fleischprodukten oder Rohmilch. Zahlreiche pathogene Serotypen sind beschrieben worden, auf weltweiter Ebene ist dabei vor allem der Serotyp O157:H7 als dominanter Stamm bekannt (FDA, 2012; Newell *et al.*, 2013).

1.1.5 *Listeria monocytogenes*

Infektionen mit *Listeria monocytogenes*, dem Auslöser der Listeriose, sind seltener als die bereits beschriebenen Zoonosen. Im Jahre 2014 wurden in Deutschland nur 609 Fälle gemeldet (RKI, 2015). Im Unterschied zu den anderen Lebensmittelzoonosen haben Listeriosen jedoch eine sehr hohe Letalität, mit Todesraten von bis zu 20-30 % (Newill *et al.*, 2011). Insbesondere immungeschwächte Personen, Schwangere, Alte und Neugeborene gehören zu den Risikogruppen (Dhama *et al.*, 2013). Schwere Verläufe mit Sepsis, Enzephalitis bzw. Meningitis sind häufig (RKI, 2015). *L. monocytogenes* ist sehr umweltstabil und kann auch bei kühlen Temperaturen wachsen, weshalb diese Spezies ein häufiges Problem in der Lebensmittelindustrie darstellt (FDA, 2012). Zusammen mit anderen Vertretern der grampositiven Listerien dient diese Spezies außerdem als Hygieneindikator, ein gängiger Warnwert liegt bei 100 CFU/g. Rohmilchprodukte, Fleisch und Fisch stellen dabei häufig kontaminierte Matrices dar.

1.2 Antibiotikaresistenz

Wie bei anderen humanpathogenen Bakterien spielt die Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen auch für die hier behandelten lebensmittelassoziierten bakteriellen Zoonosen eine zunehmende Rolle. Multiresistente Stämme finden sich sowohl bei Salmonellen (hier insbesondere die Serovare *S. Infantis* und *S. Kentucky*) als auch bei *Campylobacter* und *E. coli* (EFSA, 2016): Die EFSA meldete für *Salmonella*-Isolate Resistenzraten von etwa 30 % für Breitbandantibiotika wie Ampicillin und Tetrazyklin. Für *Campylobacter*, insbesondere *C. coli*, werden steigende Resistenzraten gegenüber Makrolidantibiotika, eine häufige

Therapieoption bei Campylobacteriosen, von bis zu 70 % in einigen EU-Ländern gemeldet. Für *E. coli*, der nicht nur Krankheitserreger ist, sondern auch als wichtiger Indikatororganismus gilt, wurden Resistenzraten von weit über 50 % für gebräuchliche Antibiotika wie Ciprofloxacin, Ampicillin, Tetracyclin und Sulfonamide festgestellt (EFSA, 2016). Plasmide, auf denen viele Resistenzen kodiert sein können, stellen bei der Ausbreitung von Resistenzen eine wichtige Rolle dar, da sie als mobile genetische Elemente den horizontalen Gentransfer zu anderen Bakterienstämmen erlauben. Kulturabhängige Methoden und molekulargenetische Analysen sind die häufigsten Verfahren in der Mikrobiologie, um Antibiotikaresistenzen zu detektieren. Da erstere sehr zeitaufwändig sind und DNA-basierte Ansätze nur begrenzte biologische Aussagekraft haben, gewinnen alternative Methoden zum Resistenznachweis immer mehr an Bedeutung (Frickmann *et al.*, 2014).

1.3 Nachweisverfahren in der Lebensmittelmikrobiologie

Lebensmittel, die zum menschlichen Verzehr bestimmt sind, sollten hinsichtlich ihrer mikrobiologischen Zusammensetzung für die menschliche Gesundheit unbedenklich sein. In der EU existieren daher für einige Erreger wie *S. enterica* oder *L. monocytogenes* (abhängig von der Lebensmittelmatrix) Grenzwerte oder sogar Nulltoleranzlimits, wie unter anderem in der EU-Verordnung Nr. 2073/2005 geregelt (Europäische Kommission, 2005). Neben diesen erregerspezifischen Bestimmungen existieren in den gesetzlichen Regelungen auch allgemeine, speziesunabhängige Grenzwerte wie z. B. für die aerobe Gesamtkeimzahl, für Enterobacteriaceae oder Staphylokokken. Die gesetzlich vorgeschriebenen Analysemethoden sind dabei mehrheitlich durch internationale ISO-Normen festgelegt.

1.3.1 Konventioneller Erregernachweis durch Kultivierung

Der kulturelle Nachweis von Bakterien gilt als der Goldstandard in der Lebensmittelmikrobiologie und bildet die Grundlage fast aller ISO-Methoden (Ge und Meng, 2009; McMeekin *et al.*, 2003). Kulturelle Methoden zielen auf die Erregerisolation ab und damit auf den Erhalt einer bakteriellen Reinkultur. Als zu erreichendes Detektionslimit gilt hier meist 1 CFU in 10 oder 25 g Lebensmittel (Europäische Kommission, 2005). Der Nachweis erfolgt dabei mit Hilfe eines ein- oder zweistufigen Anreicherungsverfahrens mittels selektiver oder halbselektiver

Medien und durch anschließendes Aufbringen von Teilen der Anreicherungsbouillon auf einen festen Selektivnährboden. Erregerisolate aus diesen Verfahren werden schließlich durch biochemische, phänotypische, immunologische oder molekularbiologische Methoden bestätigt und gegebenenfalls anschließend näher charakterisiert. Es stehen außerdem eine Vielzahl quantitativer Methoden zur Verfügung, die Aussagen über Gesamtkeimzahlen erlauben (Jasson *et al.*, 2010). Die kulturellen, ISO-zertifizierten Methoden sind über Jahrzehnte optimiert worden und weltweit anerkannt. Sie gelten dementsprechend als zuverlässig, sensitiv und günstig im apparativen Aufwand und finden breite Anwendung. Durch das mehrstufige Verfahren zum Nachweis und notwendige Bestätigungsuntersuchungen bei vorläufig positiven Befunden dauert es aber meist mehrere Tage bis über eine Woche bis ein endgültiges Ergebnis vorliegt (Velusamy *et al.*, 2009). Ein schneller Erregernachweis und zeitnahe Maßnahmen zum Schutz des Verbrauchers, bevor ein bakteriell kontaminiertes Lebensmittel (insbesondere Frischfleischprodukte) konsumiert wird, sind daher auf diesem Weg kaum zu gewährleisten.

1.3.2 Alternativmethoden

Die Nachteile der konventionellen Erregernachweise haben zur Entwicklung von Alternativmethoden geführt, die das Ziel verfolgen, einen schnelleren Pathogennachweis zu gewährleisten (Jasson *et al.*, 2010; Lopez-Campos *et al.*, 2012). Die Verwendung dieser oftmals kommerziell vermarkteten Methoden in öffentlichen Untersuchungsämtern setzt ihre Validierung und Zertifizierung voraus. Dies wird vor allem von offiziellen unabhängigen Institutionen wie der American Association of Analytical Communities (AOAC), der Association Française de Normalization (AFNOR), des Nordic Validation System (NordVal) oder MicroVal durchgeführt. Der Großteil der validierten Alternativmethoden kann in drei verschiedene Gruppen unterteilt werden: Verbesserte kulturelle Methoden (42 %), immunologische Methoden (17 %) sowie nukleinsäurebasierte Methoden (41 %) (Velusamy *et al.* 2010; Rohde *et al.*, eingereicht 2016). Innerhalb der validierten Verfahren zielen gut 70 % dieser Methoden auf den Nachweis von Salmonellen oder Listerien ab (Tabelle 2). Für *Campylobacter* und *Yersinia*, die zahlenmäßig häufigste bzw. dritthäufigste bakterielle Zoonose in der EU, gibt es dagegen vergleichsweise wenig Alternativmethoden, weswegen dem Nachweis dieser beiden Erregergruppen besondere Aufmerksamkeit in dieser Arbeit gewidmet worden ist. Die Validierung

(z. B. nach ISO 16140) ist dabei ein Indiz dafür, dass eine Alternativmethode gleichwertige Ergebnisse hinsichtlich Sensitivität, Spezifität und anderer Verfahrensparameter erzielen kann. Die hohen Sensitivitäten können hierbei bei allen Alternativmethoden nur durch eine kurze, meist ein- bis zweitägige kulturelle Voranreicherung erreicht werden.

Tabelle 2: Bedeutende bakterielle Zoonoseerreger in Lebensmitteln und die Anzahl validierter Alternativmethoden

Zoonoseerreger	Anzahl validierter Alternativmethoden (AOAC, AFNOR, MicroVal, NordVal)
<i>Campylobacter</i>	14
<i>Salmonella</i>	92
<i>Yersinia</i>	0
<i>E. coli</i>	37
<i>Listeria/L. monocytogenes</i>	106

Insgesamt existieren von den vier Validierungsinstitutionen 282 Zertifikate über validierte Alternativmethoden für den Lebensmittelbereich (Stand Februar 2016); einige Nachweissysteme sind dabei von mehreren Organisationen validiert worden (adaptiert von Rohde *et al.*, eingereicht 2016).

1.3.2.1 Verbesserte kulturelle Methoden

Verbesserte Kulturmethode sind zwar auch auf langwierige Anreicherungs-schritte angewiesen, verkürzen und vereinfachen aber die einzelnen Arbeitsschritte (Jasson *et al.*, 2010; López-Campos *et al.*, 2012) und beruhen häufig auf dem Prinzip „One broth - one plate“, also einer einstufigen Anreicherung und nur einem Selektivnährboden, der oft durch chromogene Eigenschaften hilft, Zielkolonien einfach zu detektieren. Wie in der konventionellen Mikrobiologie, ermöglichen auch diese Methoden, die Bakterien in Reinkultur zu isolieren, was weitergehende Untersuchungen ermöglicht.

1.3.2.2 Immunologische Methoden

Immunologische Methoden in der Lebensmittel-mikrobiologie beruhen auf der spezifischen Erkennung der Bakterien durch Antikörper. Häufige Beispiele umfassen ELISA-Systeme (enzyme-linked immunosorbent assay) oder Ansätze mit immunomagnetischer Separierung, zunehmend beliebter werden aber auch „lateral flow assays“, die sehr einfach in der Durchführung sind und schnell ein Ergebnis produzieren (Dwivedi und Jaykus, 2011). Die Zuverlässigkeit immunologischer

Methoden hängt entscheidend von den eingesetzten Antikörpern ab (Velusamy *et al.*, 2010). Kreuzreaktionen mit anderen Antigenen (meist Proteine, ferner auch (Lipo-)Polysaccharidstrukturen) können zu fehlerhaften Testergebnissen führen. Hinzu kommt, dass immunologische Methoden nicht zwischen toten und lebendigen Bakterien unterscheiden können.

1.3.2.3 Nukleinsäurebasierte Methoden

Neben Proteinen stellen Nukleinsäuren die zweite Möglichkeit dar, Bakterien auf molekularer Ebene identifizieren zu können. Das Feld der nukleinsäurebasierten Methoden wird von den vielen unterschiedlichen Varianten der Polymerasekettenreaktion (PCR) dominiert (López-Campos *et al.*, 2012; Velusamy *et al.*, 2010). Detektionssysteme, die auf dem Nachweis und der Vervielfältigung spezies- oder stammspezifischer DNA-Sequenzen basieren, sind einfacher zu etablieren als immunologische Methoden, die auf die Generierung und den konstanten Nachschub von klonalen Antikörpern angewiesen sind. Klassische PCR-Ansätze, die auf der Amplifikation einer Zielsequenz und dem sich anschließenden Nachweis des Reaktionsproduktes durch Gelelektrophorese beruhen, werden zunehmend durch schnellere, günstigere oder weniger arbeitsintensive Methoden ersetzt. Real-time PCRs können (semi-)quantitative Ergebnisse liefern und benötigen keine gelelektrophoretischen Folgeanalysen. Isothermale Amplifikationen erfordern kein teures Equipment wie Thermocycler und „lateral flow assays“ können nach einer konventionellen PCR schnell etwaige Reaktionsprodukte in dem Amplifikationsgemisch detektieren. Auch vollautomatische Analysesysteme, welche Pipettierroboter einsetzen, haben diese nukleinsäurebasierten Systeme zu Hochdurchsatzverfahren gemacht. Durch die Stabilität der DNA lassen allerdings auch diese Methoden keine Unterscheidung zwischen toten und lebenden Bakterien zu (Jasson *et al.*, 2010), was einen entscheidenden Nachteil zu den kulturellen Nachweismethoden darstellt.

1.3.3 Methoden zur Lebend/Tot-Unterscheidung

Zur Bewertung der Lebensmittelsicherheit ist letztlich die Konzentration lebensfähiger und damit potenziell infektiöser Bakterien von Bedeutung. Der Einsatz von PCR-Systemen und immunologischen Methoden trägt dieser Anforderung nur wenig Rechnung, weswegen ihre Verwendung vor allem im schnellen (Vor-)Screening liegt.

Zur gezielten Detektion lebender Bakterien durch kulturunabhängige Methoden werden Eigenschaften überprüft, die mutmaßlich nur bei lebenden Zellen zu finden sein sollten bzw. deren Abwesenheit als Indiz für das Fehlen lebender Bakterien dienen kann. Auf diese Weise können insbesondere auch schwer kultivierbare Bakterien im sogenannten VBNC-Stadium (*viable but nonculturable*) erfasst werden (Keer und Birch, 2003). In Tabelle 3 sind einige dieser Viabilitätsmarker und ihre (mikroskopische) Realisierung als mikrobiologische Testmethode aufgezählt.

Tabelle 3: Marker für die Lebend/Tot-Unterscheidung von Bakterien und mögliche Anwendungen als Testverfahren

Viabilitätsmarker	Nachweismethode
Intakte Zellmembran	Propidiumiodidfärbung (PI), PMA-/EMA-PCR
Enzymatische Aktivität	
Dehydrogenasen	CTC-Formazanfärbung
Esterasen	FDA-, cFDA- oder Calceinfärbung
Ribosomen (rRNA), mRNAs	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung, RT-PCR
Wachstum	Direct viable count (DVC)

Von den in Tabelle 3 genannten Methoden können nur wenige auch für die Speziesidentifizierung genutzt werden: die PMA/EMA-PCR bzw. die reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) und die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung. Die PMA/EMA-PCR beruht auf der Zugabe von photoreaktiven Farbstoffen, die (der Theorie nach) nur bei toten Zellen mit beschädigter Membran in die Bakterienzelle eindringen können und an die DNA binden. Durch Lichteinwirkung wird die DNA mit diesen Farbstoffen kovalent verbunden und kann in der PCR nicht mehr amplifiziert werden. In lebende Zellen sollten diese Farbstoffe nicht eindringen können, sodass die DNA weiterhin mittels PCR nachweisbar bleibt.

Die PMA/EMA-PCR zeigte in der Praxis allerdings häufig keine zufriedenstellenden Ergebnisse, entweder weil die Farbstoffe (besonders EMA) in lebende Zellen eindringen konnten oder aber weil die Farbstoffe (besonders PMA) auch in abgetöteten Zellen die Membran nicht durchdringen konnten und Restsignale toter Zellen die Folge waren (Cangelosi und Meschke, 2014; Elizaquível *et al.*, 2014). RT-PCRs, die auf mRNAs ausgerichtet sind, zeigten ebenfalls keine zuverlässigen Ergebnisse und gelten als störungsanfällig (Cenciarini-Borde *et al.*, 2009). Die Einsatzmöglichkeiten der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung wurden daher innerhalb

der vorliegenden Arbeit eingehend untersucht und sollen im Folgenden näher beschrieben werden.

1.4 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) ist eine Nachweismethode für Nukleinsäuren, bei der spezifische DNA- oder RNA-Sequenzen durch Hybridisierung, also durch Anlagerung komplementärer, fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide, die sogenannten Sonden (engl. „probes“), angefärbt werden. FISH hat sowohl Eingang in die medizinische Diagnostik gefunden als auch in die mikrobiologische Forschung durch die Etablierungsarbeiten von Amann *et al.* (1990a, 1990b). In der Medizin wird FISH vor allem an eukaryotischen Zellen durchgeführt und wird in der pränatalen Diagnostik oder bei der Tumorerkennung eingesetzt, um beispielsweise Chromosomenaberrationen feststellen zu können. Die zu detektierende Zielstruktur ist hierbei meist die DNA, seltener auch mRNAs.

In der Mikrobiologie dient FISH als kulturunabhängiges Instrument zur Speziesidentifizierung und gilt als eine der wichtigsten (mikroskopischen) Techniken zur Ganzzelldetektion (Brehm-Stecher, 2008). Häufig wird diese Technik auch mit anderen Methoden gekoppelt, z. B. einer Isotopenmarkierung der Bakterien, sodass neben der Speziesidentität, Lokalisation in der Probenmatrix und der bakteriellen Morphologie auch Aussagen über Stoffwechselfvorgänge auf Einzelzellebene getroffen werden können (Musat *et al.*, 2012). Zielstruktur der FISH in der Mikrobiologie ist nicht primär die DNA, sondern die hochabundanten ribosomalen RNAs, die sowohl als Viabilitätsmarker dienen als auch einen hohen phylogenetischen Informationsgehalt aufweisen. Das Grundprinzip der FISH-Methode ist in Abbildung 1 dargestellt.

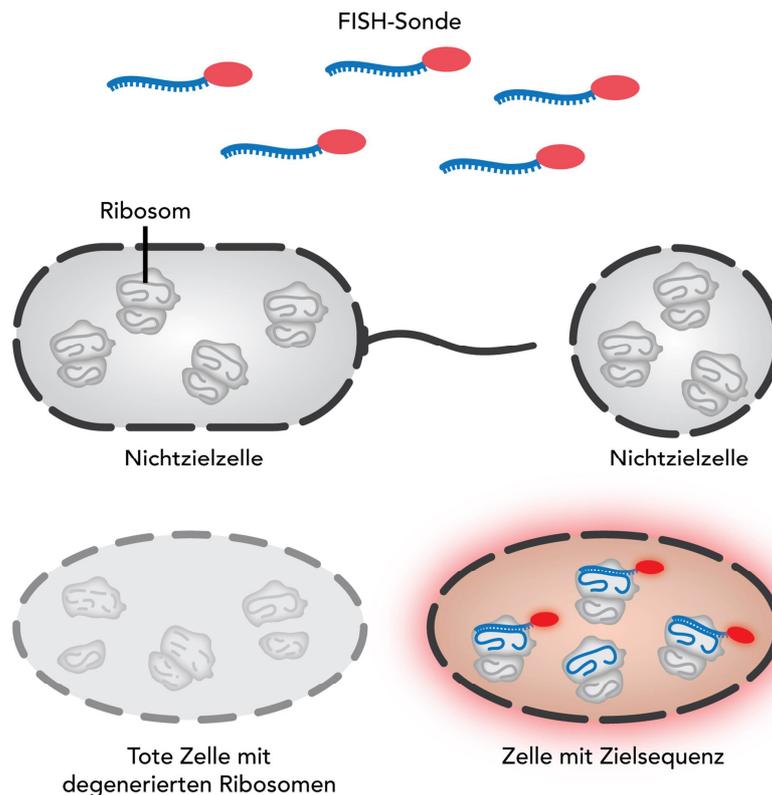


Abbildung 1: Grundprinzip der FISH-Methode

Fluoreszenzsonden, die spezifisch an die bakterielle rRNA lebender Zielbakterien binden, färben die Bakterien an. In toten Zielbakterien mit degenerierten Zellbestandteilen ist die Konzentration an rRNAs zu gering für eine Anfärbung. Zellen, die keine zur Sonde komplementären rRNA-Sequenzen besitzen, werden ebenfalls nicht angefärbt.

Bei der Etablierung eines FISH-Nachweissystems müssen die Besonderheiten der ribosomalen RNAs (und der gewählten Zielsequenz für die Hybridisierung) berücksichtigt und die Sondensequenz dementsprechend angepasst werden. Zusätzlich gilt es, die einzelnen Protokollschritte an den gewählten Erreger und die Matrix zu adaptieren. Beide Bereiche wurden innerhalb der vorliegenden Arbeit eingehend untersucht.

1.4.1 Ribosomale RNAs als Zielstruktur von FISH in der Mikrobiologie

Bakterielle Ribosomen enthalten drei verschiedene Typen ribosomaler RNAs. In der großen 50S Untereinheit befinden sich die 23S und 5S rRNA, in der kleinen 30S Untereinheit ist die 16S rRNA enthalten (Lawrence *et al.*, 2005). Diese drei rRNAs sind durch ein gemeinsames Operon kodiert, dessen zugehörige RNA nach der Transkription von Nukleasen in die drei Einzelbestandteile zerschnitten wird (Shajani *et al.*, 2011). Viele Bakterien verfügen über mehr als ein Operon mit teils

geringfügigen Unterschieden. Die Anzahl pro Zelle variiert dabei von 1 bis 15 Operons, Enterobacteriaceae haben beispielsweise meist 6 bis 7 Operons, während thermophile *Campylobacter* spp. nur 3 Operons besitzen (Stoddard *et al.*, 2015). Die Operon-Kopienzahl ist dabei häufig an die Wachstumsstrategie gekoppelt (Klappenbach *et al.*, 2000). Ribosomen (und damit die zugehörigen rRNAs) gehören zu den Strukturen mit der höchsten Abundanz in einer Zelle und stellen einen beträchtlichen Anteil der Gesamtzellmasse dar. Ihre Anzahl unterliegt allerdings großen Schwankungen: In einer *E. coli*-Zelle können beispielsweise zwischen 7.000 und 50.000 Ribosomen vorhanden sein (Xie *et al.*, 2008); insgesamt geht man für die meisten Bakterienspezies von einer Bandbreite von 1.000 bis 100.000 Ribosomen pro Zelle aus (Amman *et al.*, 1995). Eine oft postulierte direkte Korrelation zwischen Wachstumsrate und Ribosomenzahl ist jedoch nicht immer ableitbar (Lawrence *et al.*, 2005).

Für phylogenetische Analysen sind ribosomale RNAs gute molekulare Marker, da sie in allen Domänen des Lebens präsent sind, also in Bakterien, Archaeen und Eukaryoten, und sowohl hochkonservierte Bereiche wie auch Bereiche mit größerer Variabilität aufweisen. Diese Eigenschaften haben insbesondere die 16S rRNAs mit einer Länge von etwa 1.500 Nukleotiden zum Detektionsziel der Bakterienidentifizierung gemacht (Das *et al.*, 2014; Woo *et al.*, 2008). Die 5S rRNA mit etwa 120 Nukleotiden gilt als zu kurz für phylogenetische Analysen. Die 23S rRNA mit ihren knapp 3.000 Nukleotiden ist ebenfalls gut zur Identifizierung geeignet, findet aber momentan deutlich geringeren Einsatz, unter anderem weil weniger Sequenzen in den öffentlichen Datenbanken verfügbar sind und Universalprimer nicht immer ableitbar sind (Rohde *et al.*, 2015a).

1.4.2 Thermodynamik der Hybridisierung

Im Gegensatz zur PCR, bei der die Zielstrukturen durch einen initialen Denaturierungsschritt für die Primer zugänglich gemacht werden, sind ribosomale RNAs nicht ohne Weiteres für FISH-Sonden leicht zugänglich. Ribosomale RNAs bilden umfangreiche intramolekulare Sekundärstrukturen aus, besitzen modifizierte Nukleotide und gehen Bindungen mit einer Vielzahl ribosomaler Proteine ein (Decatur und Fournier, 2002; Shajani *et al.*, 2011). Diese Faktoren können in ihrer Gesamtheit die Zugänglichkeit beträchtlich einschränken. Umfassende Studien, die sämtliche Regionen der 16S und 23S rRNA untersucht haben, zeigten, dass viele

Regionen nur sehr schlecht für FISH geeignet sind, während andere sehr viel leichter mittels FISH angefärbt werden können (Abbildung 2; Behrens *et al.*, 2003; Fuchs *et al.*, 1998; 2001). Interessanterweise scheinen gerade hochvariable Regionen über eine schlechte Zugänglichkeit für FISH-Sonden zu verfügen (Fuchs *et al.*, 1998).

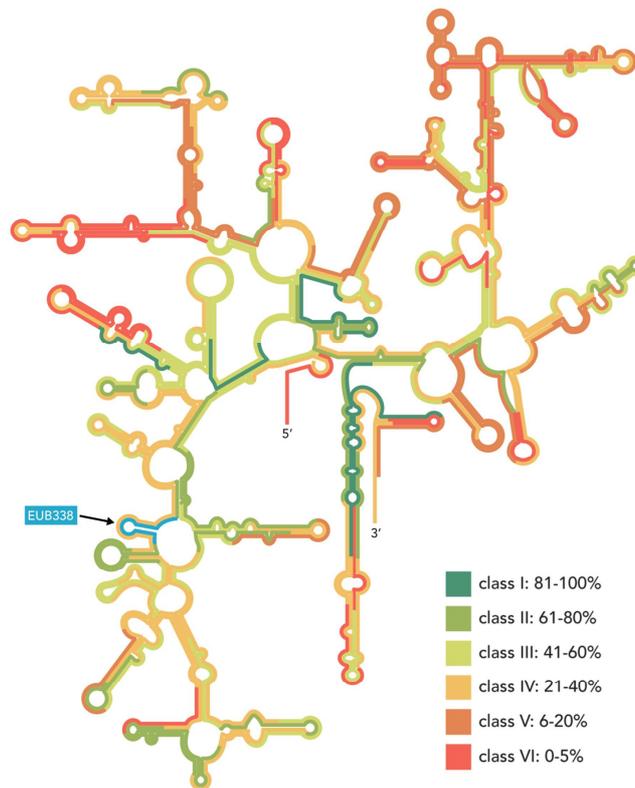


Abbildung 2: Zugänglichkeit der 16S rRNA von *E. coli* für FISH (nach Fuchs *et al.*, 1998)

Die unterschiedlichen Farbtöne veranschaulichen die ortsabhängige Fluoreszenzintensität einer Hybridisierung mit einer FISH-Sonde: Die stärksten Signale ergeben sich bei den grün eingefärbten Regionen, die schwächsten Signale (weniger als 5 % der stärksten Signale) bei den rot eingefärbten Regionen. Eingezeichnet ist auch die Bindestelle für EUB338, eine Universalsonde, die (fast) alle Bakterienspezies erkennen kann.

Trotz dieser Bemühungen das Sondendesign über die Erstellung von „accessibility maps“ zu vereinfachen und damit den Hybridisierungserfolg berechenbarer zu machen, beruhte die Etablierung von FISH-Assays lange Zeit ausschließlich auf dem „Trial-and-Error“ Prinzip. Erst durch die mechanistischen Berechnungen von Yilmaz *et al.* (2004) änderte sich dies. Yilmaz *et al.* bewiesen, dass die schlechte Zugänglichkeit einiger Regionen bei *E. coli* durch die ungünstigen thermodynamischen Eigenschaften bedingt sind (Yilmaz *et al.*, 2006). Dazu unterteilten sie die Hybridisierung in drei gegenläufige Reaktionsgleichgewichte: die

Anlagerung der Sonde an die Zielsequenz (1.), die Selbstfaltung der Sonde (2.) und die intramolekulare Selbstfaltung der RNA (3.) (Abbildung 3; Yilmaz und Noguera, 2007). Ziel der FISH-Optimierungen muss es sein, das Gleichgewicht möglichst stark in Richtung eines Sonde-rRNA-Zielsequenz-Komplexes zu schieben, und unerwünschte Zustände wie die Auflösung dieser Komplexe oder die Selbstfaltung von Sonde und rRNA zu minimieren.

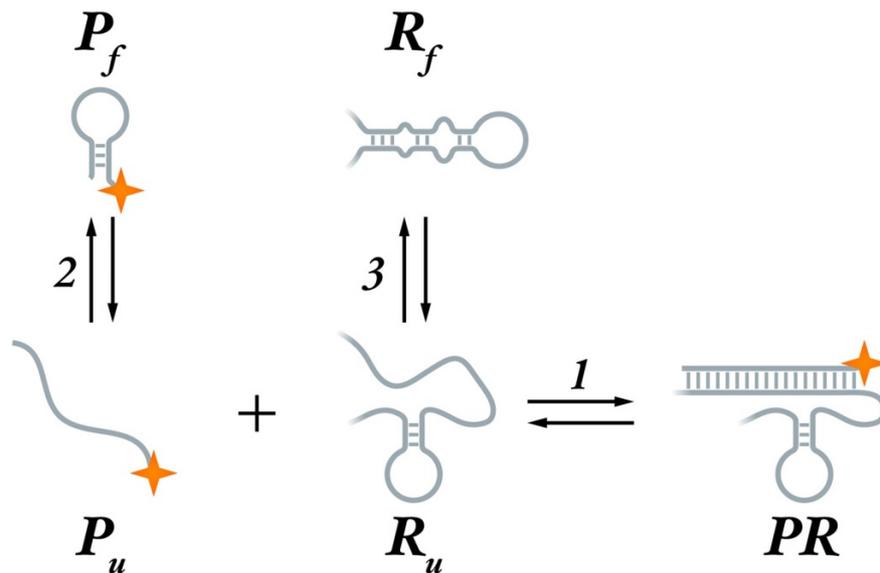


Abbildung 3: Reaktionsgleichgewichte bei FISH (nach Yilmaz und Noguera, 2007)

(1) Bildung eines Komplexes aus Sonde (P; probe) und RNA (R). (2) Selbstfaltung der Sonde. (3) Selbstfaltung der Zielsequenz. Die Indizes *u* und *f* stehen für ungefaltete und gefaltete Zustände.

Unberücksichtigt bleiben in diesem Model allerdings potenzielle Bindungen von Proteinen sowie etwaige Modifikationen der RNA. Nach und nach wurden diese thermodynamischen Modelle erweitert, so dass sie auch den Einfluss verschiedener Pufferkomponenten wie Formamid, NaCl-Konzentration oder die Temperatur berücksichtigen. Inzwischen ist auch das anwenderfreundliche Tool „mathFISH“ verfügbar gemacht worden, das eine erste *in silico* Analyse der thermodynamischen Bindung der Sonde an die Zielsequenz erlaubt (Yilmaz *et al.*, 2011).

1.4.3 FISH-Methodik

Der Ablauf eines FISH-Experimentes ist in Abbildung 4 dargestellt und lässt sich in die fünf Schritte Probenvorbereitung, Permeabilisierung, Hybridisierung der FISH-Sonden, Waschen und (mikroskopische oder durchflusszytometrische) Auswertung

untergliedern. Jeder dieser Schritte bedarf einer Optimierung bei der Etablierung von FISH als Nachweissystem.

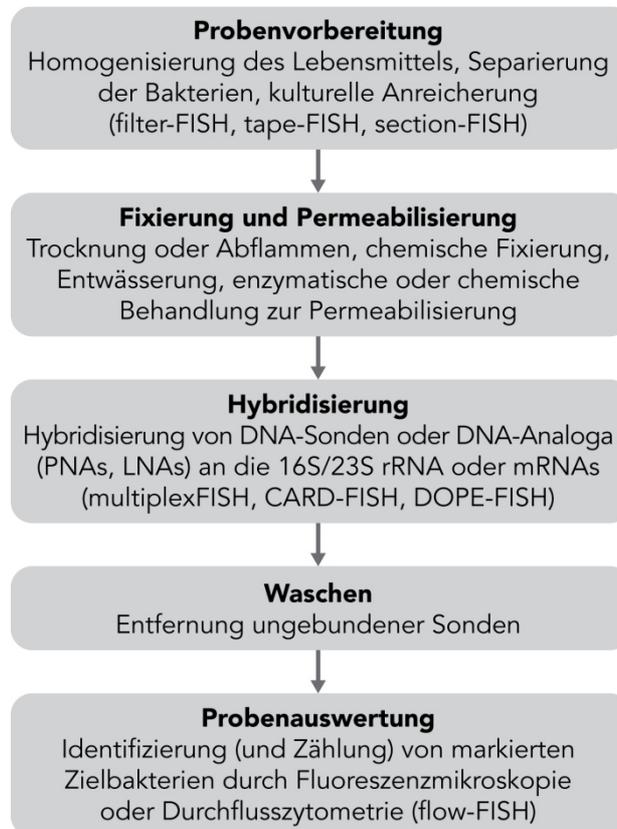


Abbildung 4: Workflow eines FISH-Experimentes (adaptiert von Rohde *et al.*, 2015a)

Dargestellt sind die fünf Schritte einer FISH-Analyse sowie Beispiele für verschiedene FISH-Techniken, die Eingang in die Lebensmittelmikrobiologie gefunden haben.

1.4.3.1 Probenvorbereitung

Lebensmittelproben können prinzipiell in feste und flüssige Matrices unterteilt werden, die unterschiedlich aufbereitet werden müssen (Dwivedi und Jaykus, 2011). Während flüssige Proben oft direkt oder nach einem Konzentrierungsschritt für die kulturelle Anreicherung verwendet werden können, müssen feste Proben meist noch aufgeschlossen bzw. homogenisiert werden. Dieser Homogenisierungsschritt und eine ausgewogene Probennahme sind auch deshalb wichtig, da eine gleichmäßige Verteilung des Erregers in der Matrix keineswegs erwartet werden kann (McMeekin, 2003). Für die Vorbehandlung fester wie flüssiger Proben existieren bisher keine klaren, universell anerkannten Standards und die detaillierten ISO-Methoden geben in diesem Punkt eher vage Empfehlungen. Trotz der Vernachlässigung dieses

Themas gilt die Probenvorbereitung für konventionelle wie alternative Methoden als gleichermaßen essenziell (Brehm-Stecher *et al.*, 2009; Hoorfar, 2011).

1.4.3.1.1 Feste Proben

Zum Herauslösen eines Bakteriums aus einer Lebensmittelmatrix werden in kulturellen Nachweisverfahren meist mechanische Verfahren verwendet. Chemische Extraktionsverfahren (z. B. der DNA oder der Proteine) bieten sich dagegen nur für alternative Methoden wie PCR oder ELISA an, mit denen ein Lebendnachweis ohnehin nicht ohne Weiteres möglich ist. Mechanische Verfahren können in ihrer Ausprägung und Kraftauswirkung sehr unterschiedlich sein, so können beispielsweise für oberflächliche Kontaminationen eines Lebensmittels bereits ein Abspülen oder eine leichte Handmassage genügen (Hammack *et al.*, 2004; Kanki *et al.*, 2009; Seo *et al.*, 2003). Darüber hinaus gibt es eine Vielzahl komplexerer Aufbereitungsmethoden (Sharpe, 2003). In der Lebensmittelmikrobiologie werden insbesondere Homogenisatoren mit dem „Stomacher“-Prinzip verwendet (Kang *et al.*, 2001; Sharpe und Jackson, 1972; Wu *et al.*, 2003). Dabei wird die Probe in einen Beutel platziert und von zwei beweglichen Pedalen durch schnelle Stampfbewegungen zerkleinert. Im Gegensatz zu Mixern ist dieses Prinzip schonender und auch deutlich bedienungsfreundlicher, weil die Apparatur nicht nach jedem Einsatz gereinigt werden muss. Neben dem Stomacher kann auch Ultraschall, insbesondere bei Oberflächenkontaminationen, verwendet werden (Sharpe and Kilsby, 1970). Zusätzlich zu diesen klassischen Methoden der Homogenisierung wurden in den letzten Jahren auch kleine und große Kugelmöhlen wie die SpeedMill (Analytik Jena) oder der FastPrep-24 (MP-Biomedicals) entwickelt, zu deren Leistungsfähigkeit bisher in erster Linie nur Studien für molekulare Nachweisverfahren ohne Lebend/Tot-Differenzierung vorliegen.

1.4.3.1.2 Flüssige Proben

Flüssige Proben (inklusive des Spülwassers zum Ablösen von Bakterien auf der Oberfläche von Lebensmitteln) müssen für die Kultivierung zwar nicht weiter aufgeschlossen werden, dafür liegen die Pathogene häufig stärker verdünnt vor. Vor allem in der Lebensmittelverarbeitung können große Mengen von Spülwasser anfallen, die leicht für den Erregernachweis nutzbar sind. Hier ist eine Konzentrierung der Erreger für den Direktnachweis sinnvoll, um die Zeit für die kulturelle

Anreicherung zu verkürzen (Brehm-Stecher *et al.*, 2009). Unspezifische, physikalische Verfahren wie etwa Filtration und Zentrifugation sind breit anwendbare Vorbehandlungsschritte, die kleinere Partikel wie Bakterien gleichermaßen anreichern. Andere Verfahren sind spezifisch auf Bakterien ausgerichtet, wie die Verwendung von Metallhydroxiden oder bestimmter Lektine (Lucore *et al.*, 2000; Porter *et al.*, 1998). Hochselektive Verfahren wie die immunomagnetische Separierung bestimmter Serovare durch Antikörper haben bereits Eingang in ISO-Methoden gefunden (z. B. ISO-Standard 16654 zur Detektion von *E. coli* O157:H7; ISO, 2001). In dieser Arbeit wurden zur Probenaufbereitung insbesondere (differenzielle) Filtrationsverfahren untersucht. Diese sind günstig, breit anwendbar und für die Einengung großer Probenvolumina geeignet. Im Gegensatz zur (differenziellen) Zentrifugation neigen diese Verfahren weniger zur Anreicherung unerwünschter Lebensmittelpartikel und sind mit weniger Bearbeitungsaufwand verbunden (Brehm-Stecher *et al.*, 2009; Sharpe, 2003).

1.4.3.2 Fixierung und Permeabilisierung

Nach der Vorbereitung der Probe, einschließlich ihrer kultivierungsabhängigen oder -unabhängigen Anreicherung, müssen die Bakterien für die FISH-Analyse fixiert und permeabilisiert werden. Die Fixierung dient dabei nicht nur dem Erhalt der bakteriellen Morphologie, sondern auch der Konservierung der labilen RNAs und tötet die Bakterien ab (Amann und Fuchs, 2008; Moter und Göbel, 2000). Unterschiedliche Fixierungsmethoden werden dabei eingesetzt, so kann diese zum Beispiel mittels (Para-)Formaldehyd, Methanol, Ethanol, Formalin, einem Fixativgemisch oder auch durch kurze Hitzeeinwirkung erfolgen (Amann *et al.*, 1995). Für gramnegative Bakterien wird meist ein quervernetzendes Fixativ wie Formaldehyd empfohlen, für grampositive Bakterien dagegen ein präzipitierendes Fixativ wie Ethanol (Parsley *et al.*, 2010), da quervernetzende Aldehyde die Zellen komplett verschließen könnten (ARB Silva, 2010). Gramnegative Bakterien bedürfen im Allgemeinen keiner weiteren Permeabilisierung, grampositive Bakterien sind dagegen schwerer zugänglich für FISH-Sonden. Häufig wird daher der Hybridisierung ein kurzer enzymatischer Verdau, zum Beispiel mit Lysozym und Proteasen, oder eine Behandlung mit Detergenzien vorangestellt, um das Eindringen der Sonden zu erleichtern (Amann und Fuchs, 2008; Moter und Göbel, 2000). Zuletzt werden die Bakterien durch eine aufsteigende Ethanolreihe dehydriert. Die Fixierung

der Proben erhält zwar die Integrität der Bakterien, führt aber häufig zu einer Schrumpfung der Zellen im Vergleich zu nicht fixierten Bakterien.

1.4.3.3 Hybridisierung und Waschschr

Der Hauptschritt von jedem FISH-Experiment ist die Hybridisierung, bei der sich eine Sonde unter möglichst stringenten Bedingungen an eine spezifische Zielsequenz anlagert. Die thermodynamischen Gleichgewichte, die sich dabei einstellen, wurden im Abschnitt 1.4.2 erläutert. Neben dem Sondendesign und der Auswahl der Zielsequenz, wie in Abschnitt 1.4.2 beschrieben, spielen dabei auch die einzelnen Komponenten des Hybridisierungspuffers und die Temperatur eine entscheidende Rolle, wobei die Temperatur meist in allen Schritten konstant gehalten wird (bzw. leicht erhöht werden kann im Waschschr). In einem konventionellen Hybridisierungspuffer sind neben den Sonden (und nicht markierten Oligonukleotiden) NaCl und Formamid in jeweils variablen Konzentrationen sowie SDS und die Puffersubstanz Tris-HCl in jeweils festen Konzentrationen enthalten. Formamid ist eine Schlüsselkomponente im Hybridisierungspuffer, da die Formamidkonzentration die Stringenz der Sondenbindung beeinflusst und deshalb individuell auf eine neue Sonde eingestellt werden muss (Amann und Fuchs, 2008; Moter und Göbel, 2008). Formamid schwächt die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Sonde und der rRNA-Zielsequenz ab und setzt dadurch die Schmelztemperatur herab (Blake und Delcourt, 1996). Dadurch können Hybridisierungen bei niedrigeren Temperaturen stattfinden und die Zellmorphologie bleibt erhalten. Außerdem hilft Formamid mit seinem denaturierenden Effekt dabei, Sekundärstrukturen der RNA oder Bindungen mit ribosomalen Proteinen aufzulösen und verringert dadurch die notwendige Zeit bis zur Einstellung des Hybridisierungsgleichgewichtes (Yilmaz *et al.*, 2004; 2006). Darüber hinaus übt Formamid auch einen Einfluss auf die Peptidoglycanschicht aus und kann bei eher dünnen Peptidoglycanschichten die Morphologie der Zellen angreifen (Santos *et al.*, 2014). Die Verwendung von Formamid sollte nicht zuletzt auch deswegen auf geringe Mengen begrenzt bleiben, da es als kanzerogen eingestuft wird (National Toxicology Program, 2008). In späteren Waschschr wird daher Formamid meist weggelassen und die Stringenz der Bindung über die NaCl-Konzentration gesteuert (Moter und Göbel, 2000). Im Gegensatz zu Formamid hat NaCl einen stabilisierenden Effekt auf Wasserstoffbrückenbindungen. In Abhängigkeit von der im

Hybridisierungspuffer eingesetzten Formamidmenge wird daher die NaCl-Konzentration im Waschpuffer herabgesetzt (siehe Abschnitt 2.2.3.1.1 und ARB Silva, 2010).

1.4.3.4 Evaluation

Der letzte Schritt eines FISH-Experimentes umfasst die Auswertung der gefärbten Präparate. Grundsätzlich eignen sich dafür die Fluoreszenzmikroskopie sowie die Durchflusszytometrie (Rohde *et al.*, 2015a). Durchflusszytometrische Verfahren haben den Vorteil, dass sie vollautomatisiert und schnell größere Volumina analysieren können (Moter und Göbel, 2000). Der breite Einsatz der Durchflusszytometrie blieb allerdings bisher auf einige wenige Beispiele beschränkt (Amann *et al.*, 1990b; Bisha und Brehm-Stecher, 2009; Fuchs *et al.*, 1998; Gunasekera *et al.*, 2003); teils wegen der teuren Gerätschaften, teils wegen des geringen morphologischen Informationsgehaltes und dem schlechteren Auflösungsvermögen und der daraus resultierenden falsch positiven Signale und nicht zuletzt durch die Schwierigkeiten mit partikulären Umweltproben, die ein Durchflusszytometer verstopfen können. Aus diesen Gründen ist die arbeitsintensivere und häufig weniger sensitive Mikroskopie derzeit der Goldstandard in der Auswertung, wobei es zahlreiche Bemühungen gibt, diesen Prozess zu automatisieren (Rohde *et al.*, 2015a).

1.4.4 Probleme in der FISH-Diagnostik und technische Innovationen

Der geschilderte Ablauf der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung suggeriert ein weitgehend geradliniges Vorgehen bei der Etablierung eines FISH-Nachweissystems. Tatsächlich können in der Praxis jedoch viele Probleme auftreten, weshalb die FISH-Methodik Gegenstand kontinuierlicher Weiterentwicklungen ist. Wagner *et al.* (2003) identifizierte diese Probleme und unterteilte sie in solche, die das Sondendesign, die Detektion in komplexen Umweltproben, die Quantifizierung, die Sensitivitätssteigerung sowie die Bestimmung der Stoffwechselaktivität betreffen. In den letzten Jahren wurden daher zahlreiche methodische Optimierungen vorgenommen. Die technischen Probleme konnten jedoch nur teilweise beseitigt werden. Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war es deswegen, etwaige methodische Verbesserungen auf das Gebiet der Lebensmittelmikrobiologie zu übertragen. Im

Folgenden werden die wichtigsten Limitationen von FISH in der Lebensmittelmikrobiologie erläutert und denkbare Lösungsansätze aufgezeigt.

1.4.4.1 Neuerungen in den eingesetzten Oligonukleotiden

Klassischerweise sind Sonden aus DNA-Bausteinen aufgebaut, DNA-Mimetika mit nahezu analogen Bindungseigenschaften gewinnen jedoch an Bedeutung (Abbildung 5).

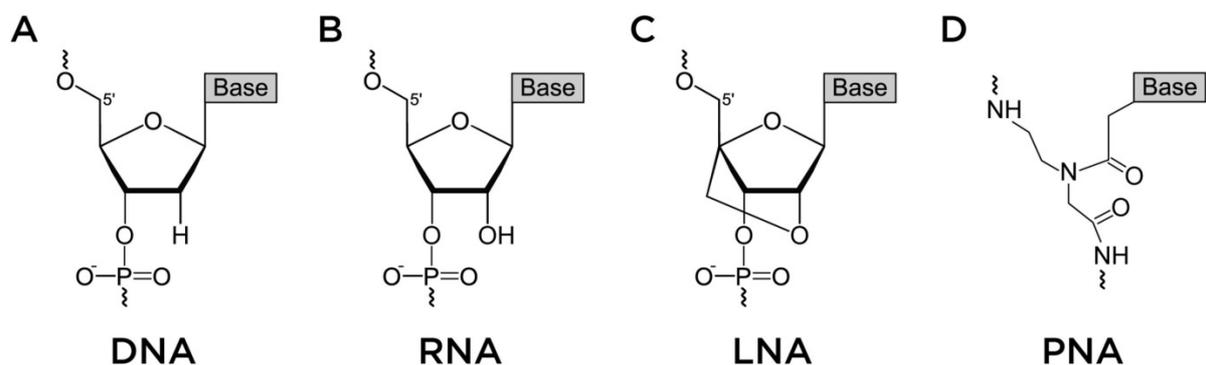


Abbildung 5: Natürliche Nucleinsäuren und ihre Mimetika

Dargestellt sind die Grundstrukturen der beiden natürlich vorkommenden Nucleinsäuren DNA (A) und RNA (B) sowie die nichtnatürlichen Mimetika LNA und PNA (C und D).

Insbesondere Peptid-Nucleinsäuren (peptide nucleic acids, PNAs) haben breiten Eingang in die Entwicklung von FISH-Nachweissystemen gefunden (Cerqueira *et al.*, 2008). Im Gegensatz zur DNA besitzen PNA-Bausteine durch den Austausch des Zucker-Phosphat-Rückgrates gegen eine peptidähnliche Struktur keine negative Ladung und binden somit stärker an ihre Zielsequenzen. Zugleich können sie durch ihre unpolare Natur leichter in die Zellen eindringen und sind vor dem Abbau durch Nucleasen geschützt. Trotz ihrer zunehmenden Verwendung in der Lebensmittelmikrobiologie (Rohde *et al.*, 2015a) haben PNAs eine Reihe von Nachteilen: Die aktuell noch patentgeschützten Sonden sind deutlich teurer und die Verwendung von PNAs erfordert Anpassungen an das FISH-Protokoll. So müssen z. B. der Formamidgehalt und die Temperatur erhöht, der Salzgehalt verringert und die eher hydrophoben PNAs gelöst werden. Zudem ist das Bindungsverhalten von PNAs sehr viel schlechter prognostizierbar als bei einem DNA-Oligonukleotid und kann bisher nicht von Analyseplattformen wie mathFISH abgeschätzt werden. Schließlich muss auch die Sondenlänge deutlich gekürzt werden, was häufig als eine Verbesserung der Sensitivität verstanden wird, weil ein einzelner

Nukleotidunterschied stärker ins Gewicht fällt. Diesem scheinbaren Vorteil stehen allerdings Einschränkungen in der Anzahl der nutzbaren Nukleotidunterschiede gegenüber, da kürzere Sonden einen kleineren Sequenzbereich abdecken, was wiederum die Spezifität beeinträchtigen kann.

Eine weitere Alternative zu den natürlichen DNAs oder den synthetischen PNAs stellen LNAs dar (locked nucleic acids). LNAs sind RNA-ähnliche Moleküle, bei denen in der Ribosestruktur das Kohlenstoffatom C'4 eine Bindung mit dem O'2 des Kohlenstoffatoms C'2 eingeht. Auch LNAs binden stärker als DNA-Bausteine und sind vor Nukleaseabbau geschützt. Im Gegensatz zu PNAs können sie auch in DNA-Oligonukleotide eingebaut werden und „Miximere“ bilden (Cerqueira *et al.*, 2008). Der Effekt von LNAs in einem DNA-Oligonukleotid lässt sich wie schon bei den PNAs nicht genau vorhersagen und ihr Einsatz für FISH beschränkt sich trotz der im Vergleich zu PNAs günstigeren Preise auf wenige Publikationen, in denen sie erfolgreich angewendet worden sind (Kubota *et al.*, 2006). In dieser Arbeit sollte daher auch überprüft werden, ob LNA/DNA-Miximere eine verbesserte Unterscheidung von Fehlbasenpaarungen ermöglichen.

1.4.4.2 Einsatz unmarkierter Oligonukleotide

Trotz eines sehr guten Sondendesigns, der Verwendung der optimalen Formamidkonzentration, Einhaltung der Hybridisierungstemperatur und Durchführung aller Waschschriffe können unspezifische Bindungen auftreten; vor allem dann, wenn sich die Zielsequenz von den Nichtzielsequenzen nahverwandter Arten nur in einigen Nukleotidpositionen unterscheidet. Durch den Einsatz unmarkierter Oligonukleotide, den sogenannten Kompetitoren mit perfekter Übereinstimmung mit Nichtzielsequenzen, kann die Hybridisierung der Sonde mit diesen Nichtzielorganismen blockiert werden (Wright *et al.*, 2014). Außerdem können unmarkierte Oligonukleotide auch als sogenannte Helfersonden („helper probes“) eingesetzt werden, um schwer zugängliche RNA-Strukturen aufzulösen (Fuchs *et al.*, 2000; Wagner *et al.*, 2003). Hierbei binden zwei Helfer-Oligonukleotide kurz vor und kurz nach der eigentlichen Erkennungsstelle der Sonde und erschweren dadurch die Bildung von RNA-Sekundärstrukturen. Beide Verwendungszwecke dieser unmarkierten Oligonukleotide sind in der Lebensmittelmikrobiologie bisher kaum verbreitet bzw. in ihrem Nutzen wenig erforscht und werden deshalb in dieser Arbeit dahingehend evaluiert.

1.4.4.3 FISH-Systeme mit amplifizierten Signalen

Um Bakterienzellen mit Hilfe der Standard-FISH Prozedur erkennen zu können, sind ausreichend hohe rRNA-Gehalte bzw. eine bestimmte Mindestanzahl an Ribosomen erforderlich. Für *E. coli* liegt dieser Wert beispielsweise bei 300-400 Ribosomen in Reinkulturen und 1.200-1.600 in Proben mit starker Hintergrundfluoreszenz (Hoshino *et al.*, 2008) und damit deutlich unterhalb der üblichen Anzahl in *E. coli*. Auch für die meisten anderen Lebensmittelpathogene stellt dieses Detektionslimit kein Problem dar, sofern eine starke Hintergrundfluoreszenz fehlt. Sobald aber weniger abundante Strukturen wie einzelne Gene beziehungsweise ihre mRNA-Transkripte detektiert werden sollen, reichen die Signale des Standard-FISH ohne Amplifizierung nicht mehr aus: rRNAs sind zwar für die Speziesbestimmung gut geeignet, viele Pathogenitätsfaktoren und Resistenzen sind jedoch nicht über die rRNA-Sequenz detektierbar.

Die populärste Nachweismethode für RNAs mit geringer Häufigkeit ist bislang der sogenannte CARD-FISH (catalyzed reporter deposition-FISH), bei der statt einer fluoreszenzmarkierten Sonde eine Enzymmarkierung benutzt wird (Kubota, 2013). Eine an die Sonde gebundene (horseradish-)Peroxidase katalysiert dabei die Umsetzung von fluoreszenzmarkierten Tyramid zu reaktiven Zwischenprodukten, die in unmittelbarer Umgebung zur Sonde akkumulieren. CARD-FISH erreicht dadurch eine 26-41-fach verstärkte Sensitivität und benötigt je nach Stärke des Hintergrundes nur noch etwa 9-36 Zielmoleküle pro Zelle (Hoshino *et al.*, 2008). Die Durchführung eines CARD-FISH Experimentes ist allerdings sehr viel aufwändiger und kann bis zu 2 Tage in Anspruch nehmen. Zudem gibt es viele weitere methodische Probleme wie den Transport der großen enzymmarkierten Sonden ins Zytoplasma, die Enzymstabilität und möglicherweise veränderte Spezifitäten oder auch endogene Peroxidasen, die erst inaktiviert werden müssen (Kubota, 2013). Die neu entwickelte „hybridization chain reaction“ (HCR; Yamaguchi *et al.*, 2015) und die „branched-DNA“-Technologie (bDNA; Battich *et al.*, 2013) setzen ebenfalls auf eine Posthybridisierungsamplifikation (hier jedoch nichtenzymatisch) und benötigen deutlich weniger Zeit bis zum Ergebnis. Über die Spezifität und Robustheit dieser Systeme mit eingebautem Amplifikationsschritt ist allerdings noch wenig bekannt. Zudem werden diese Systeme primär in eukaryotischen Zellen angewandt, die leichter zu permeabilisieren sind.

Die von Raj *et al.* (2008) entwickelte Methode stellt einen alternativen und deutlich weniger umständlichen Weg dar, der potenziell fehlerträchtige Amplifikationsschritte umgeht. Statt nur einer Sonde werden hier etwa 50 oder mehr fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide verwendet. Die Sonden decken nahezu die gesamte Länge der mRNA ab und erreichen ohne weitere Amplifikationsschritte eine 50-fache Signalsteigerung. Die Methode von Raj *et al.* hat sich vor allem für eukaryotische Zellen durchgesetzt, wurde inzwischen aber auch für *E. coli* erfolgreich etabliert (Skinner *et al.*, 2013; So *et al.*, 2011).

1.4.5 Einsatz von FISH in der Lebensmittelmikrobiologie und Forschungsbedarf

FISH wird seit etwa 15 Jahren verstärkt in der Lebensmittelmikrobiologie eingesetzt, um Pathogene zu detektieren (Rohde *et al.*, 2015a). Tabelle 4 gibt einen Überblick über den bisherigen Entwicklungsstand zum Nachweis pathogener Bakterien zu Beginn der vorliegenden Arbeit.

Tabelle 4: FISH-Studien in der Lebensmittelmikrobiologie zur Erkennung von pathogenen Bakterien

Anzahl der Studien zum Nachweis von bakteriellen Pathogenen im Lebensmittel	29 (darunter Testsysteme für <i>Salmonella</i> (8), <i>Listeria</i> (5), <i>E. coli</i> (4) und <i>Campylobacter</i> (2))
Zielstrukturen	16S rRNA (15), 23S rRNA (10), 16S und 23S rRNA (3), unbekannt (1)
Studien mit Vergleich zur ISO-Methode	7
Verwendete Oligonukleotide für die Sonden	DNA (23), PNA (6)
Multiplex-Assays	2
Filter-FISH-Studien	7 (6 davon kultivierungsabhängig mit Mikrokoloniebildung)

Daten auf Grundlage der Tabelle 1 des Übersichtsartikels "FISHing for bacteria in food - A promising tool for the reliable detection of pathogenic bacteria?" (Rohde *et al.*, 2015a)

Etwa zwei Drittel der entwickelten Systeme haben sich dabei auf den Nachweis von Salmonellen, *E. coli* und Listerien konzentriert. Nur bei einem knappen Viertel der FISH-Studien erfolgte auch eine Validierung durch den Vergleich mit den ISO-Methoden. Dieser Vergleich von FISH mit dem Goldstandard erfolgte aber nur für Salmonellen, *E. coli* und Listerien. Für andere wichtige und häufige Zoonosen wie thermophile *Campylobacter* spp. und *Y. enterocolitica* existieren dagegen entweder nur unzureichende oder gar keine getesteten Systeme für den Nachweis im

Lebensmittel. Noch weniger Daten liegen für weniger prominente Erreger wie *Brucella*, *Arcobacter* oder *Y. pseudotuberculosis* vor. Die meisten Sonden wurden zwar mit einem mehr oder weniger umfassenden Erregerpanel überprüft, bioinformatische Analysen und Datenbankvergleiche fanden dagegen nur selten statt und thermodynamische Berechnungen oder Optimierungen wurden nicht durchgeführt bzw. nicht angegeben. Bei den entwickelten Detektionssystemen handelt es sich überwiegend um Einzelnachweise, die nicht mit anderen publizierten Testsystemen kombinierbar sind (Rohde *et al.*, 2015a). Nur Oliveira *et al.* (2004) haben ein System publiziert, mit dem Salmonellen und Listerien gleichzeitig detektiert werden können, sowie Yamaguchi *et al.* (2012), die gleichzeitig Enterobacteriaceae und Pseudomonaden detektierten. Der Versuch mehr als zwei pathogene Gruppen in Lebensmitteln mittels FISH nachzuweisen ist bisher noch nicht gelungen. Der überwiegende Anteil der Studien nutzt DNA-Sonden, in den letzten Jahren wurden zwar vermehrt PNA-Sonden verwendet, jedoch keine LNA-Sonden. Die meisten vorhandenen Studien erfolgten nach kultureller Anreicherung und ohne spezifische Matrixanpassungen, nur in sieben Studien wurden Filtrationseinrichtungen verwendet. Mit Ausnahme von einer Studie waren aber auch diese filter-FISH-Ansätze nicht kulturunabhängige Direktnachweise, da die Filter zunächst auf einen Nährboden transferiert und erst nach dem Wachstum von Mikrokolonien mittels FISH untersucht worden sind (FISH following cultivation, FISHFC; Ootsubo *et al.*, 2003). Für den Direktnachweis im Lebensmittel fehlen außerdem bisher quantitative Standards, genauso wie eingehende Untersuchungen zur Stabilität der FISH-Signale unter Lagerungsbedingungen und zur Unterscheidung lebender von toten Bakterien.

1.5 Zielsetzung

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung bietet vielfältige Anwendungsmöglichkeiten in der Mikrobiologie und in der klinischen Diagnostik, allen voran die Speziesidentifizierung von Bakterien auf Einzelzellebene. In der Lebensmittelmikrobiologie werden die Vorteile von FISH-Tests jedoch noch nicht hinreichend genutzt und eine breite Anwendung steht bisher aus. Ziel dieser Arbeit war es daher, FISH-basierte Lebendnachweissysteme zur Anwendung im Lebensmittel für die zuverlässige und schnelle Detektion der wichtigsten lebensmittelassoziierten bakteriellen Zoonosen zu entwickeln. Dieses Vorhaben beinhaltete die drei folgenden Arbeitsziele:

1. Etablierung von FISH-Nachweissystemen

Zunächst sollten geeignete Sonden zum hochspezifischen Nachweis eines breiten Erregerspektrums entwickelt und *in vitro* validiert sowie ein effizientes und anwenderfreundliches Hybridisierungsprotokoll etabliert werden. Die Nachweissysteme sollten als Multiplextests einsetzbar sein. Bereits publizierte Sonden sollten auf ihre Eignung hin überprüft und gegebenenfalls optimiert werden. Sollten keine geeigneten Sonden zur Verfügung, sollten neue entwickelt werden, die hinsichtlich ihrer Spezifität und Sensitivität den bereits publizierten Sonden überlegen sind. Anschließend sollte die Fähigkeit dieser kulturunabhängigen Methode zum Lebend/Tot-Nachweis getestet und gegebenenfalls das Potenzial der FISH-Methodik zur Lebend/Tot-Unterscheidung optimiert werden. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob weitere relevante Eigenschaften der Pathogene wie Antibiotikaresistenzen mittels FISH nachweisbar sind und ob ein solcher Test ähnlich gute Ergebnisse erzielt wie andere Methoden zum Resistenznachweis.

2. Optimierung der Aufarbeitung von Lebensmittelproben

Neben einem sensitiven und spezifischen Testsystem ist für eine effiziente Erregerdetektion eine geeignete Vorbereitung der Lebensmittelmatrix erforderlich. Ein weiteres Ziel war daher der Vergleich verschiedener Verfahren zur Matrixaufarbeitung, um den Direktnachweis im Lebensmittel zu verbessern. Für feste Matrices sollten dazu verschiedene Homogenisierungssysteme verglichen und bewertet sowie der Einfluss der Probennahme bei matrixinternen Kontaminationen untersucht werden. Für flüssige Proben sollte eine Methode zur Konzentrierung der Bakterien erarbeitet werden, die den direkten Nachweis mittels FISH ermöglicht. Durch das gleichzeitige Mitführen geeigneter Zählstandards sollten mit dieser Methode zudem quantitative Informationen gewonnen werden können.

3. Praxisanwendung der FISH-Nachweise in kontaminierten Lebensmitteln

Abschließend sollten die entwickelten Erregernachweissysteme exemplarisch an kontaminierten Lebensmitteln getestet und das Ausmaß störender Faktoren wie Autofluoreszenz erfasst werden. Als Vergleichsmethoden sollten hier die bisherigen Goldstandardverfahren in Form der kulturellen ISO-Methoden verwendet werden. Um bewerten zu können, inwieweit sich die FISH-Nachweissysteme für die Lebensmittelmikrobiologie eignen, sollte die Methodik bezüglich wichtiger Parameter wie Sensitivität, Spezifität und der Geschwindigkeit des Erregernachweises mit etablierten Nachweisverfahren verglichen werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Tabelle 5: Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät/Verbrauchsmaterial	Hersteller
2 ml innuSpeed Lysis tubes E (2,4-2,8 mm ceramic spheres)	Analytik Jena
SpeedMill	Analytik Jena
Räucherofen Bastra MC 500	Bastra
Falcon 50 ml tubes	BD Biosciences
Brutschrank KB 400	Binder
Laborkühlschrank LKexv 5400	Binder
Labortiefkühlschrank LGex 3410	Binder
Densimat	bioMerieux
Etest-Streifen	bioMerieux
PowerPac HC power supply	Bio-Rad
Sub-Cell GT cell	Bio-Rad
Branson Sonifier 450	Branson Ultrasonics
MALDI Biotyper	Bruker Daltonic GmbH
Einmalimpfösen (1 µl, 10 µl)	Carl Roth
Filterpapiere - Rundfilter, mittelschnell filtrierend, L870.1	Carl Roth
Millipore Isopore polycarbonate membrane filter 0,4 µm pore size, 47 mm	Carl Roth
PP-Netzfilter XC05.1, XC09.1	Carl Roth
Rotilabo-Rundfilter, Typ 11A XP16.1	Carl Roth
Küvetten-Test Photometer LKT	Dr. Lange
Einkanalpipetten Reference	Eppendorf
Mastercycler gradient	Eppendorf
Safe-Lock Tubes (1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf
PhAST Blue	GenIUL
Schüttelapparat GFL 3015	GFL
Schüttelinkubator GFL 3033	GFL
Inkubationsschüttler New Brunswick G25	GMI
Magnetheizrührer MR3002	Heidolph
Reagenzglasschüttler Reax 2000	Heidolph
CO ₂ -Brutschrank BB 6220	Heraeus
Sicherheitswerkbank KS 12	Herasafe

Kutter	HFM Fleischereimaschinen
HUKKI V Kunstdärme	Huckfeldt & Thorlichen GmbH
Vortex Mixer VF2	IKA
Bunsenbrenner FIREBOY eco	INTEGRA Biosciences
BagMixer 400	Interscience
BagPage 400 ml	Interscience
MF-Millipore Membran, Zellulosemischester, hydrophil, 8,0 µm, 47 mm, weiß, glatt	Merck
Mixed cellulose ester HABP04700 MF-Millipore membrane, 0,45 µm pore size, 47 mm	Merck
pH-Meter delta 345	Mettler
Heizplatte	Miacom diagnostics
Multiwell-Objektträger	Miacom diagnostics
Non-filtered pipette tips (long)	Molecular BioProducts
6,35 mm (1/4 inch) Ceramic Sphere	MP Biomedicals
FastPrep-24	MP Biomedicals
neoPipette controller	Neolab
Pipettenspitzen mit Filter	nerbe plus
Auto-Flow NU-4750 Water Jacket CO ₂ -Brutschrank	NuAire
Föhn OHS 400 W	OK.
PCR-Box workstation Pro	PEQLAB
Thriller Thermoshaker Incubator	PEQLAB
Spectrophotometer Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech
Analysewaage BA 210 S	Sartorius
Laborpräzisionswaage LC MC4801 P	Sartorius
Plattierhilfe petriturn-M	Schuett-biotec
Semperguard Handschuhe Nitril/Latex	Sempermed
Stomacher 400	seward
Mikrowelle	Siemens
Kühlzentrifuge Sigma 1-16K	Sigma-Aldrich
Parafilm	Sigma-Aldrich
Whatman Cyclopore 0,4 µm pore size, 47 mm	Sigma-Aldrich
Cryovials T310 2A	Simport
Brutschrank Heratherm IMH60	Thermo Scientific
Menzel-Gläser/Deckgläschen	Thermo Scientific
Tiefkühlschrank -80 °C HFU 500 TV 63	Thermo Scientific
Tischzentrifuge Heraeus Megafuge 8R	Thermo Scientific
Membran-Vakuumpumpe	vacuubrand
Geldokumentationssystem Syngene G:Box	VWR
AxioScope mit 100x N-achroplan Ph3 M27 Öl-Immersion- Objektiv und AxioCam MRm	Zeiss

Tabelle 6: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
α -Cyano-4-hydroxymethylsäure (HCCA)	Bruker Daltonic GmbH
20x SSC	Carl Roth
Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth
Biotin	Carl Roth
Dextransulfat	Carl Roth
EDTA	Carl Roth
Ethanol, vergällt (99,8 %)	Carl Roth
Formaldehyd (37 %)	Carl Roth
Formaldehyd (4 %)	Carl Roth
Formamid	Carl Roth
Immersionöl	Carl Roth
Kanamycin	Carl Roth
NaCl	Carl Roth
Nalidixinsäure	Carl Roth
Natriumhydroxid (Plätzchen)	Carl Roth
Roche blocking reagent for nucleic acid hybridization	Carl Roth
Roti-Liquid Barrier Marker	Carl Roth
Roti-Mount FluorCare	Carl Roth
Roti-Mount FluorCare DAPI	Carl Roth
Salzsäure 6 mol/l - 6 N	Carl Roth
Tris-Hydrochlorid	Carl Roth
Triton X 100	Carl Roth
Nitrocefin	Merck
DMSO	PanReac Applichem
PMA	PanReac Applichem
5(6)-Carboxyfluoresceindiacetat	Sigma-Aldrich
Calcein-AM	Sigma-Aldrich
DAPI (1 mg)	Sigma-Aldrich
Desoxycholsäure	Sigma-Aldrich
Fluoresceindiacetat	Sigma-Aldrich
Fluoroshield with PI	Sigma-Aldrich
Glycerin	Sigma-Aldrich
HCl (37 %)	Sigma-Aldrich
NZCYM	Sigma-Aldrich
Rinderserumalbumin	Sigma-Aldrich
SDS (10 %)	Sigma-Aldrich

2.1.2 Nährmedien

Alle Nährmedien zur Kultivierung sowie Puffer zur Verdünnung von Bakterienkulturen wurden aus der hauseigenen zentralen Nährbodenküche des BfR bezogen. Die Zusammensetzung und Herstellung der verwendeten Medien erfolgte nach den pathogenspezifischen ISO-Normen (ISO, 1996; 2001; 2002; 2003; 2006)

2.1.3 Enzyme und Antikörper

Tabelle 7: Enzyme und Antikörper und ihre Bezugsquelle

Enzym/Antikörper	Hersteller
Anti-Beta Lactamase antibody [8A5.A10] (ab12251)	Abcam
Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor 488) preadsorbed (ab150117)	Abcam
Lysozym	Carl Roth
Proteinase K	Carl Roth

2.1.4 Oligonukleotide

Oligonukleotide für den konventionellen rRNA-FISH und die PCRs wurden von TIB MOLBIOL sowie Sigma-Aldrich und die Stellaris FISH-Sonden für den mRNA-FISH von LGC Biosearch Technologies als Lyophilisate bezogen. Alle Oligonukleotide wurden in destilliertem, nukleasefreiem Wasser verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.1.4.1 Primersequenzen

Tabelle 8: Primersequenzen

Name	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
Bact-0027-F	GTTTGATCCTGGCTCAG	16S Sequenzierung
Uni-1492-R	CGGCTACCTTGTTACGAC	16S Sequenzierung
23SYers-F	GGTGAGTCGACCCCTAAGGC	23S Sequenzierung von <i>Yersinia</i> spp.
23SYers-R	TCGGGTGGAGACAGCCTGG	23S Sequenzierung von <i>Yersinia</i> spp.
23SCamparc-Fw	GGGTAGAGCACTGAATGGGC	23S Sequenzierung von Campylobacteraceae
23SCamparc-Rv	GTCGGGAGGGACTCTTTGTT	23S Sequenzierung von Campylobacteraceae

23SSalmFw	CGAATGGGGAAACCCAGTGT	23S Sequenzierung von <i>S. enterica</i>
23SSalmRv	GCCGAAACAGTGCTCTACCC	23S Sequenzierung von <i>S. enterica</i>

2.1.4.2 FISH-Sonden

Tabelle 9: Sonden

Sondenname	Sequenz (5'→3')	Ziel rRNA	Zielspezies
Salment	ATGCGCTTTTGTGTACGGGGCTGT	23S	<i>S. enterica</i>
Campytherm	CTTAGCCCTAAGCGTCCTT	23S	Thermophile <i>Campylobacter</i> spp.
EcoliO157	CACACAGTGTCGCTGCCG	23S	<i>E. coli</i> O157
Listmono	CGACCCTTTGTA CTATCCATTG	16S	<i>L. monocytogenes</i>
Listall	GGACAAGCAGTTACTCTTATCCT	16S	<i>Listeria</i> spp.
Arcobul	GCAAGCAGACACTAATCTATCTCTAAATCA	16S	<i>A. butzleri</i>
Arcobull	AGTTATGCGTCATCGTCTTGGTAG	16S	<i>A. butzleri</i>
Arcobac	ACCAGAAATTCATCTACCTCT	16S	<i>Arcobacter</i> spp.
Campy268/	AACCCCCAGTGCAAGCACTGGGTTTG	23S	Thermophile
Campy268LNA	C <u>CCC</u> CAGTGCAAG <u>CA</u> CTGGG <u>TT</u> T		<i>Campylobacter</i> spp. (teilweise)
Campy696	CACTAGTTCTTACACTAGCTTCAACTTGC	23S	Thermophile <i>Campylobacter</i> spp. (teilweise)
Campy835	CTACCCCCTTATATTACGACACAACGC	23S	Thermophile <i>Campylobacter</i> spp. (teilweise)
Campy1508	AGCCTTTCAGTTCTCGGAGT	23S	Thermophile <i>Campylobacter</i> spp. (teilweise)
Campy2124	CTGGCGTCATATACTCAAAGCCTC	23S	Thermophile <i>Campylobacter</i> spp. (teilweise)
Enterobac	TCGTGTTTGCACAGTGCTGTGTTT	23S	Enterobacteriaceae (Bohnert <i>et al.</i> , 2000; modifiziert)
YersEcol16	TATTAAGTTATTGGCCTTCCTCCT	16S	Erkennung von <i>Y. enterocolitica</i> (subsp. <i>enterocolitica</i>)

YersEcoll16	TTAACCTTTATGCCTTCCTCCTC	16S	Erkennung von <i>Y. enterocolitica</i> (subsp. <i>paleartica</i>)
YersEco23	CAAGTCCCTTTACCTAATGCCAGC	23S	Bestätigung von <i>Y. enterocolitica</i>
YersPseu23	ATCACGCCTCAGGGTTGATAAG	23S	Erkennung von <i>Y. pestis</i> und <i>Y. pseudotuberculosis</i>
YersPseu16	GCGTATTA ^u AACTCA ^u ACCCTTCC	16S	Bestätigung von <i>Y. pestis</i> und <i>Y. pseudotuberculosis</i>
Yerspest1523- TexasRed	CTGCACCGT <u>g</u> GGTGCATCGTC	23S	Erkennung von <i>Y. pestis</i>
Yerspseu1523- Alexa488	CTGCACCGT <u>a</u> GTGCATCGTC	23S	Negative Bestätigung von <i>Y. pestis</i>
Yersall- Demaneche	GTTTCGCTTCACTTTGTATCT	16S	Erkennung (Bestätigung) von <i>Yersinia</i> spp.
Bruc236	TCCGGTCCAGCCTAACTGAAGGATAG	16S	<i>Brucella</i> spp.
Gam42a	GCCTTCCCACATCGTTT	23S	Gammaproteobacteria
Hecampar	AACAGTCGGGAGGGACTCTT	23S	Campylobacteriales
ALF968	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	16S	Alphaproteobacteria
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S	Bakterien
EUK516	ACCAGACTTGCCCTCC	16S	Eukaryoten
ARC915	GTGCTCCCCCGCCAATTCT	16S	Archaeen

Unterstrichene Nukleotide repräsentieren LNAs.

2.1.4.3 Kompetitoren

Tabelle 10: Kompetitoren

Name des Oligonukleotids	Sequenz (5'→3')	Ziel rRNA	Einsatzzweck
Enterobac-Komp	TCGTGTTTGCAGAGTGCTGTGTTT	23S	Kompetitor für die Erkennung von Enterobacteriaceae (adaptiert von Bohnert <i>et al.</i> , 2000)
ArcobuKompl	AGTTATGCGTCATTGTCTTGGTAG	16S	Kompetitor für die Erkennung von <i>A. butzleri</i>

ArcobuKomplI	AGTTATGCGTCATAGTCTTGGTAG	16S	Kompetitor für die Erkennung von <i>A. butzleri</i>
HelperCampy268I	TCTTGCGCTTTTCGCTCGCCGC	23S	Aufbruch von RNA-Sekundärstrukturen
HelperCampy268II	TCAGCTCTTGACATTGCAGTCC	23S	Aufbruch von RNA-Sekundärstrukturen
HelperCampy268III	TTACCTCTTGACATTGCAGTCC	23S	Aufbruch von RNA-Sekundärstrukturen
HelperCampy696I	TGGATAGATCACTTCGTTTCGGGTC T	23S	Aufbruch von RNA-Sekundärstrukturen
HelperCampy696II	GCTTTTCAACGCCTATGGGTTCACT C	23S	Aufbruch von RNA-Sekundärstrukturen
HelperCampythermI	TCGCACACTAATGTTGGTATTGGAA TATTAACC	23S	Aufbruch von RNA-Sekundärstrukturen
HelperCampythermII	GACCTTAGACTAGCACTTCCATCCG CTAGC	23S	Aufbruch von RNA-Sekundärstrukturen
Yersall-Demaneche-Kompl	GGTCGCTTCACTTTGTATCC	16S	Kompetitor für die Erkennung von <i>Yersinia</i> spp.
Yersall-Demaneche-KomplI	GTTTCGCTTCTCTTTGTATAT	16S	Kompetitor für die Erkennung von <i>Yersinia</i> spp.
Yersall-Demaneche-KomplII	GCTCGCTTCTCTTTGTATCT	16S	Kompetitor für die Erkennung von <i>Yersinia</i> spp.
Yersall-Demaneche-KomplIII	GGTCGCTTCTCTTTGTATCT	16S	Kompetitor für die Erkennung von <i>Yersinia</i> spp.
Yersall-Demaneche-KomplIV	GGTCGCTTCTCTTTGTATCT	16S	Kompetitor für die Erkennung von <i>Yersinia</i> spp.
YersEcol16-Komp	TATTAAGCTATTGGCCTTCCTCCT	16S	Kompetitor für YersEcol16
YersEcol16LNA-Komp	TTAACCTTAATGCCTTCCTCCTC	16S	Kompetitor für YersEcol16
YersEcol16Komp2MM	TTAACCTTAACGCCTTCCTCCTC	16S	Kompetitor für YersEcol16
KompYersEco23	CAAGTCTCTTTACCTAATGCCAGC	23S	Kompetitor für YersEco23
YersPseu23-Komp	ATCACACCTCAGCGTTGATAAG	23S	Kompetitor für YersPseu23
KompSfonticola	CGCCTCAGGGTTGAATAAGAGAAC	23S	Kompetitor für YersPseu23

KompSprotemaculans	CGCCTCAGGGTTG <u>A</u> ATAAGCAACC	23S	Kompetitor für YersPseu23
KompSliquefaciens	CGCCTCAGGGTTA <u>G</u> TAAGTAACCG	23S	Kompetitor für YersPseu23
KompSplymuthica	CGCCTCAGGGTTG <u>A</u> ATAAGAGAAC	23S	Kompetitor für YersPseu23
KompSnematodiphila	CGCCTCAGGGTTGATA <u>I</u> GCAACCG	23S	Kompetitor für YersPseu23
KompSmarcescens	CGCCTCAGGGTTAATA <u>I</u> GCAACCG	23S	Kompetitor für YersPseu23
ListmonoKomp	CGACCCTTTGTACC <u>A</u> TCCATTG	16S	Kompetitor für die Erkennung von <i>L. monocytogenes</i>

Unterstrichene Nukleotide repräsentieren LNAs.

2.1.5 Kits

Die in Tabelle 11 aufgeführten Kits wurden für die Amplifizierung und Sequenzierung der genomischen 16S und 23S Gene eingesetzt und nach den Angaben des Herstellers verwendet.

Tabelle 11: Kits und ihre Bezugsquelle

Kitname	Hersteller
Taq PCR Master Mix Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen

2.1.6 Bakterienstämme

Spezifitätsuntersuchungen für die Validierung der FISH-Tests erfolgten mit einer Stammauswahl bedeutsamer Zoonoseerreger und phylogenetisch nahverwandter Spezies. Insgesamt wurden 216 Stämme untersucht, darunter 18 *Arcobacter* spp., 26 *Brucella* spp., 26 *Campylobacter* spp., 44 *E. coli* (28 mit TEM-Resistenz), 1 *Helicobacter pylori*, 31 *Listeria* spp. (davon 15 *L. monocytogenes*), 10 *Ochrobactrum* spp., 1 *Pseudomonas aeruginosa*, 6 *Salmonella* spp., 1 *Staphylococcus aureus*, 1 *Tropheryma whipplei* sowie 42 *Yersinia* spp. Eine Auflistung der Stämme und ihrer Kultivierungsbedingungen befindet sich im Anhang in den Tabellen 32 und 33.

2.1.7 Plasmide

Die in Tabelle 12 aufgelisteten Plasmide dienen in dieser Arbeit als optische Marker (pVv3-GFP) oder als Positivkontrolle bei der Etablierung eines Antibiotikaresistenznachweises.

Tabelle 12: Plasmide und Vektoren

Vektorname	Besondere Eigenschaften
pVv3-GFP (Klevanskaa <i>et al.</i> , 2014)	GFP-Expression, Kanamycinresistenz
pBR328 (Covarrubias <i>et al.</i> , 1981)	Expression einer TEM-1 β -Lactamase (Ampicillinresistenz), geringe Kopienzahl, instabiles Plasmid
pLitmus (Evans <i>et al.</i> , 1995)	Expression einer TEM-1 β -Lactamase (Ampicillinresistenz), hohe Kopienzahl
puc18 (Vieira und Messing, 1982)	Expression einer TEM-1 β -Lactamase (Ampicillinresistenz), hohe Kopienzahl

2.1.8 Software und Analyseprogramme

Die in Tabelle 13 aufgelisteten Softwareprogramme wurden für das Sonden- und Primerdesign sowie zur Bild- und Datenauswertung verwendet. Mit Ausnahme von Zeiss 2012 und Microsoft Excel 2010 handelt es sich um frei verfügbare und kostenlose Programme.

Tabelle 13: Softwareprogramme

Programmname	Anwendungszweck
Zen 2012 (Zeiss)	Mikroskopische Bildauswertung
mathFISH (Yilmaz <i>et al.</i> , 2011)	Thermodynamische Sondenoptimierung
OligoCalc (Kibbe, 2007)	Sonden-/Primeroptimierung
OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies)	Sonden-/Primeroptimierung
ClustalW (Larkin <i>et al.</i> , 2007)	Sequenzvergleiche und Sondendesign: Identifikation von potenziellen Zielsequenzen für FISH
probeCheck (Loy <i>et al.</i> , 2008)	Sondendesign: Spezifitäts- und Sensitivitätsanalyse
TestProbe (Quast <i>et al.</i> , 2013)	Sondendesign: Spezifitäts- und Sensitivitätsanalyse
Blast (Altschul <i>et al.</i> , 1990)	Sondendesign: Spezifitäts- und Sensitivitätsanalyse
PATRIC (Wattam <i>et al.</i> , 2014)	Sondendesign: Spezifitäts- und Sensitivitätsanalyse
Stellaris Probe Designer version 4.1 (LGC Biosearch Technologies)	Sondendesign für Stellaris FISH für mRNA-Nachweis
Microsoft Excel 2010	Statistische Auswertung und Visualisierung

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische und phänotypische Methoden

2.2.1.1 Mikrobiologische Nachweise

2.2.1.1.1 *Yersinia* (in Anlehnung an ISO 10273)

10 g einer zu untersuchenden Lebensmittelprobe wurden zusammen mit 90 ml Peptone-Sorbitol-Gallensalz Medium (PSB) in einen Stomacherbeutel eingebracht und bei mittlerer Intensität für 2 min homogenisiert. 10 ml des Homogenisates wurden dann in 90 ml Irgasan-Ticarcillin-Chlorate Medium (ITC) überführt, ein Medium, das insbesondere die Isolation des wichtigsten Serotypes (O:3) von *Y. enterocolitica* begünstigt. Statt einer 1:100 Verdünnung des Lebensmittels in ITC, konnte auch 1:10 in ITC verdünnt werden, falls sehr geringe Kontaminationen mit *Y. enterocolitica* erwartet wurden. Außerdem wurde ohne weitere Anreicherung eine Impföse des PSB-Ansatzes auf Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-Agar (CIN-Agar) ausgestrichen. Der ITC-Ansatz wurde für 48 h bei 25 °C ohne Schütteln inkubiert, der verbleibende PSB-Ansatz (90 ml) wurde unter Schütteln (100 rpm) für ebenfalls 48 h bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde eine Impföse des ITC-Ansatzes auf SSDC-Agar ausplattiert und der PSB-Ansatz auf CIN-Agar ausgestrichen. Zusätzlich wurde eine KOH-Behandlung des PSB-Ansatzes zur Reduzierung der Begleitflora vorgenommen. Hierzu wurden 0,5 ml Kulturflüssigkeit in 4,5 ml KOH (5 g/l) überführt, genau 20 s darin inkubiert und sofort danach auf CIN-Agar ausgestrichen. Kolonien, die eine charakteristische Morphologie auf CIN oder SSDC zeigten (z. B. das "CIN-Kuhaue", ein kleiner dunkelroter Punkt umgeben von einem leicht transparenten milchigen Rand) sowie atypische Morphologien wurden mittels des Bruker-Biotypers geprüft bzw. bestätigt.

FISH-Analysen erfolgten mit Proben, die entweder direkt aus dem PSB-Homogenisat oder nach 4, 24 und 48 h selektiver Anreicherung in PSB oder ITC entnommen worden sind.

2.2.1.1.2 *Campylobacter* (in Anlehnung an ISO 10272)

10 g einer Lebensmittelprobe wurden mit 90 ml Bolton-Bouillon versetzt und in einem Stomacherbeutel für 1 min bei mittlerer Intensität homogenisiert, anschließend für 4 h

unter mikroaerophilen Bedingungen bei 37 °C inkubiert, danach für 44 h bei 42 °C. Im Anschluss wurden die bebrüteten Proben auf modifiziertem Aktivkohle Cefoperazon Desoxycholat Agar (mCCD) ausgestrichen und für 48 h bei 42 °C inkubiert. Kolonien mit charakteristischer Morphologie wurden auf Müller-Hinton-Blutagar ausplattiert und mittels des Bruker-Biotypers überprüft bzw. bestätigt. Für die FISH-Analyse wurden Proben entweder direkt aus dem Homogenisat oder nach 24 und 48 h selektiver Anreicherung verwendet.

2.2.1.1.3 *Listeria* (in Anlehnung an ISO 11290)

25 g einer Lebensmittelprobe wurden in 225 ml ½-Fraser-Bouillon 1:10 verdünnt und für 1 min im Stomacherbeutel bei mittlerer Intensität homogenisiert. Der Ansatz wurde für 24 h bei 30 °C bebrütet, danach 0,1 ml der Kultur in 10 ml Vollfraser-Bouillon überführt und für weitere 48 h bei 37 °C inkubiert. Aus der ½-Fraser-Bouillon und der Vollfraser-Bouillon wurde jeweils eine Impföse auf Oxoid chromogenem Listerienagar (OCLA) und Palcam Agar ausgestrichen und für 24-48 h bei 37 °C inkubiert. Verdächtige Kolonien wurden mittels des Bruker-Biotypers überprüft bzw. bestätigt.

2.2.1.1.4 *Salmonella* (in Anlehnung an ISO 6579)

25 g einer Lebensmittelprobe wurden unter Zugabe von 225 ml Peptonwasser für 1 min im Stomacherbeutel bei mittlerer Intensität homogenisiert. Das Homogenisat wurde 20 h bei 37 °C bebrütet und danach 0,1 ml des Ansatzes in 10 ml Rappaport-Vassiliadis Medium mit Soja gegeben. Der Ansatz wurde dann für weitere 24 h bei 41,5 °C bebrütet. Schließlich erfolgte ein Impfösausstrich auf Xylose-Lysine-Desoxycholat-Agar (XLD-Agar) für 24 h bei 37 °C. *Salmonella*-Kolonien wachsen als schwarze Kolonien auf XLD. Mutmaßliche *Salmonella*-Kolonien und andere Morphologien wurden mittels des Bruker-Biotypers überprüft bzw. bestätigt.

2.2.1.1.5 *Brucella*

Da für den Nachweis von Brucellen keine allgemein anerkannten ISO- oder DIN-Standards existieren, erfolgte der Erregernachweis über hauseigene Verfahrensanweisungen und in Anlehnung an die mikrobiologisch-infektiologischen Qualitätsstandards. Viele Brucellen sind hochpathogen für den Menschen, weshalb

der kulturelle Erregernachweis in einem Hochsicherheitslabor (BSL3) durchgeführt werden muss.

Für den Erregernachweis wurde zum einen eine Direktplattierung der Proben auf *Brucella*-Selektivagar mit anschließender Inkubation für 48-96 h bei 37 °C unter mikroaerophilen Bedingungen vorgenommen. Zum anderen erfolgte eine mehrtägige Anreicherung in *Brucella*-Selektivbouillon oder in nichtselektiver *Brucella*-Bouillon (jeweils 1:10 Verdünnung der Probe) für 24, 48, 72 und 144 h mit anschließender Ausplattierung und Inkubation für 48-96 h auf *Brucella*-Selektivagar. Mutmaßliche *Brucella*-Kolonien wurden nach Inaktivierung der Proben mittels des Bruker-Biotypers überprüft bzw. bestätigt.

2.2.1.2 Stammhaltung und Kultivierung

Die verwendeten Bakterienstämme wurden wie in Tabelle 32 (Anhang) beschrieben auf Agarplatten angezogen, für Flüssigkulturen von Enterobacteriaceae und Listerien erfolgte die Anzucht in LB-Medium, thermophile *Campylobacter* spp. wurden in NZCYM-Broth kultiviert. Zur Langzeitaufbewahrung von Bakterienstämmen wurden 800 µl einer Übernachtskultur (bzw. mehrere Kolonien in LB gelöst) zu 400 µl einer Glycerinlösung (80 %) gegeben und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Kulturen wurden in einer seriellen Verdünnungsreihe in Peptonwasser oder isotonischer Kochsalzlösung verdünnt und je 0,1 ml der Verdünnungsstufen 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} auf geeignetem Nähragar ausplattiert, nach Inkubation ausgezählt und mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor verrechnet. Alternativ wurde auf Eichgeraden zurückgegriffen, die in Abhängigkeit der optischen Dichte (OD) bei 600 nm erstellt worden sind. In erster Näherung für viele Enterobacteriaceae indiziert eine OD von 0,1 eine (Lebend-)Zellzahl von 10^8 CFU/ml, unter der Voraussetzung, dass die Kultur frisch angesetzt worden ist.

2.2.1.4 Nitrocefin-Assay

Eine Nitrocefin-Stammlösung wurde entweder frisch in DMSO angesetzt (in einer Konzentration von 5 mg/ml) und direkt verwendet oder bei -20 °C bis zu ihrem Einsatz lichtgeschützt gelagert, um eine vorzeitige Degradation zu vermeiden. Für eine Nitrocefin-Arbeitslösung wurden 50 µl dieser Stocklösung zu 950 µl PBS

gegeben. Für die Untersuchung von Flüssigkulturen wurden zu 150 µl Bakterienkultur 50 µl der Nitrocefin-Arbeitslösung gegeben. Falls funktionelle β-Lactamasen vorhanden sind, färbt sich der Ansatz innerhalb weniger Minuten rot; anderenfalls verbleibt die Lösung leicht gelblich. Alternativ können Bakterienkolonien auch direkt auf einen Objektträger ausgestrichen und 50 µl der Nitrocefin-Arbeitslösung hinzugefügt werden. Im Allgemeinen liefert diese Schmiertechnik schnellere Ergebnisse.

2.2.1.5 Etest

Das Etest-System von bioMérieux zur Antibiotikaresistenztestung erlaubt die schnelle quantitative Analyse der Ausprägung einer Antibiotikatoleranz. Dazu wurde zunächst der zu untersuchende Stamm über Nacht auf Müller-Hinton-Agar ausgestrichen und am Folgetag mit den frisch gewachsenen Bakterien im Densimat eine Bakterienlösung mit einer Trübung von 1 McFarland (in 2 ml 0,9 % NaCl) eingestellt. Mittels eines sterilen Wattetupfers wurde dann dreimal eine frische Müller-Hinton-Agarplatte vollständig ausgestrichen. Die Platte wurde zweimal um jeweils 60 °C gedreht und der Vorgang wiederholt, um einen gleichmäßigen und vollständigen Bakterienrasen zu gewährleisten. Schließlich wurde ein Etest-Streifen in der Mitte der Platte platziert und der Ansatz für 48 h bei 37 °C inkubiert (bzw. der idealen Wachstumstemperatur des Stammes). Der Etest-Streifen bildet einen Antibiotikagradienten aus (z. B. für Ampicillin von 0,016 bis 256 µg/ml), der bei sensitiven Stämmen einen Hemmhof zur Folge hat. Die Kante des Hemmhofes, an dem der Etest-Streifen gekreuzt wird, ist die Ableseposition für die minimale Hemmkonzentration (MIC). pBR328 hat eine geringe Plasmidstabilität und wurde daher abweichend von den sonstigen Etest-Prozeduren nicht am Vortag auf Müller-Hinton-Agar kultiviert, sondern unter ständigem Ampicillinselektionsdruck in LB angezogen und direkt aus dieser Kultur der Etest angesetzt.

2.2.2 Methoden zur Probenvorbereitung und zur Herstellung kontaminierter Lebensmittelmatrices

2.2.2.1 Homogenisierung

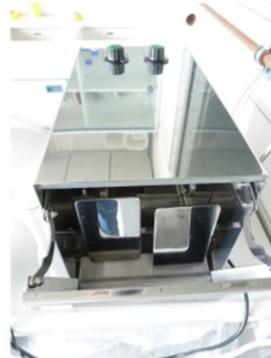
Vier verschiedene Homogenisatoren mit unterschiedlichen Aufschlussprinzipien wurden für die Zerkleinerung der Lebensmittelmatrices verwendet (Abbildung 6).



SpeedMill



FastPrep-24



Stomacher



Ultraschall

Abbildung 6: Verwendete Homogenisierungssysteme

Zur Homogenisierung wurden die Lebensmittelproben zunächst 1:10 in einem geeigneten Flüssigmedium (z. B. in Peptonwasser bzw. in dem von der jeweiligen ISO-Methode vorgeschriebenen Nährmedium) verdünnt. FastPrep-24 und SpeedMill beruhen auf dem Prinzip eines Aufschlusses der Lebensmittelmatrix durch Kugeln in Röhrchen, die durch das Schütteln des Röhrchens die Matrix zerkleinern. Für das großvolumige FastPrep-24 System wurden 27 ml des Flüssigmediums mit 3 g Lebensmittelmatrix vermischt und drei Keramikugeln (6,35 mm Durchmesser) hinzugegeben. Die Behandlung im FastPrep-24-Homogenisator erfolgte mit einer Schüttelgeschwindigkeit von 5 m/s. Für die kleinvolumige SpeedMill wurden zu 0,15 g Probe jeweils 1,35 ml Medium in 2 ml innuSpeed Lysis tubes E gegeben, die 10 Keramikugeln (2,4-2,8 mm Durchmesser) enthalten. Der Stomacher, der zusammen mit seinen Konkurrenzprodukten das vermutlich populärste Probenvorbereitungsinstrument in der Lebensmittelmikrobiologie ist, zerkleinert die Lebensmittelproben mit Hilfe zweier beweglicher Metallplatten, die in schneller Folge alternierend auf die in dem Stomacherbeutel befindlichen Lebensmittelproben eindrücken. 36 ml Medium und 4 g Lebensmittelprobe wurden in einen Stomacherbeutel mit Fettabscheidemembran gegeben und bei höchster Intensität und einem Plattenabstand von 7 mm homogenisiert. Der Branson Sonifier 450 bedient sich des Prinzips des Ultraschallaufschlusses von Lebensmitteln und findet häufige Erwähnung im Rahmen von Oberflächenkontaminationen. Die Ultraschallbehandlung fand in einem 50 ml Falcon Tube statt, befüllt mit 27 ml Medium und 3 g Probe, unter konstanter Kühlung und höchster Beschallungsintensität.

Zum Vergleich der verschiedenen Homogenisierungsmethoden wurden alle Lebensmittelproben für 8 min homogenisiert und nach 30 s, 1, 2, 4 und 8 min eine Probe für den mikrobiologischen Nachweis entnommen. Um Erwärmungseffekte zu minimieren, wurden nach jeweils 1 min die Proben auf Eis gekühlt. Außerdem wurde eine Nullprobe vor der Homogenisierung entnommen, bei der das Verdünnungsmedium/Lebensmittel-Gemisch für 20 s gevortext worden war.

2.2.2.2 Filtration

Flüssige Probenvolumina von 25-1000 ml mit erheblichem Anteil an großen nichtbakteriellen Partikeln wurden dreistufig vorfiltriert (mit abnehmender Porengröße) um ein späteres Verstopfen der Filter zu vermeiden. Zunächst wurden die größten Partikel durch einen Polypropylen-Netzfilter (Porengröße von 25 µm) zurückgehalten, dann folgte ein schnellfiltrierender Zellulosefilter (Rückhaltebereich von 12-15 µm) und zuletzt wurden durch eine Zellulosemischestermembran (Porengröße von 8 µm) kleinere Partikel entfernt. Um die Bakterien schließlich auf den Filtern zu sammeln, kamen Membranfilter mit einer Porengröße von 0,4 µm zum Einsatz. Zwei unterschiedliche Filtermaterialien von drei verschiedenen Herstellern wurden dabei verglichen; Polykarbonatmembranfilter (Whatman Cyclopore oder Isopore) und Zellulosemischestermembranen (MF-Millipore). Nach der Filtrierung wurden kleine Filterstücke mit einer Größe von etwa 1 cm² herausgeschnitten, fixiert (siehe Abschnitt 2.2.3.1.2), entsprechend dem FISH-Protokoll gefärbt (siehe Abschnitt 2.2.3.1.3) und zum Schluss auf einen Objektträger gelegt und eingebettet.

2.2.2.3 Herstellung von Matrices mit interner Kontamination und fraktionierte Probennahme

Der Herstellungsprozess künstlich kontaminierter Würste mit interner Kontamination ist in Abbildung 7 dargestellt. Zur Herstellung von drei *Salmonella*-belasteten Würsten (Mettwurst, luftgetrocknete und geräucherte Salami) wurden je Ansatz 2,4 kg mageres Schweinefleisch und 1,3 kg Speck für 90 min kurz angefroren, dann vermischt und im Fleischkutter zerkleinert. Zur Mettwurstherstellung wurde die Fleischmasse vollständig zu einem feinen Fleischbrei zermahlen, zur Herstellung der Salamis wurden die Fleischstücke nur grob zermahlen. Eine Gewürzmischung bestehend aus 90 g Nitritpökelsalz, 8 g schwarzem gemahlenem Pfeffer und 12 g ungarischem Paprikagewürz wurde beim Kuttern hinzugefügt. Während des

Kutternvorganges wurden außerdem 50 ml einer *Salmonella*-Kultur hinzugegeben (in einer Endspiking-Konzentration von 10^0 - 10^8 CFU/g).

Die Würste wurden dann in HUKKI V Kunstdärme gefüllt und zur Reifung bei 18 °C entweder für 5 Tage geräuchert (geräucherte Salami), für 6 Tage luftgetrocknet (luftgetrocknete Salami) oder 2 Stunden geräuchert und anschließend für 6 Tage luftgetrocknet (Mettwurst).

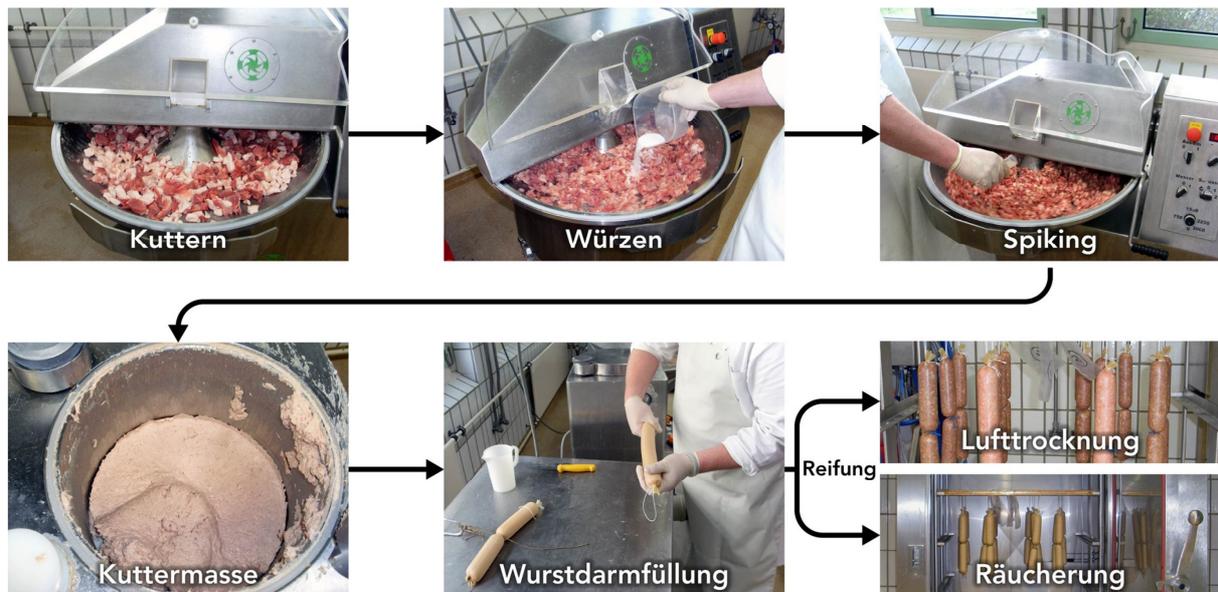


Abbildung 7: Herstellung kontaminierter Würste

Bis zur weiteren Verarbeitung und Analyse wurden die Würste bei -20 °C gelagert. Zu jeder Wurstsorte wurde jeweils eine nicht kontaminierte Leerkontrolle mitgeführt, mittels derer unter Verwendung der ISO/DIN 6579 die Abwesenheit von Salmonellen in der Fleischrohmasse überprüft wurde.

Um den Einfluss der Keimverteilung in der Wurst näher zu untersuchen, wurden unterschiedliche Bereiche aus der Wurst getrennt untersucht und mit dem Gesamtquerschnitt einer Wurstscheibe verglichen (Gesamtdurchmesser 3,7 cm): die Wurstrinde (die äußeren 3 mm), die Kernregion (mit einem Durchmesser von 7 mm) und die übrige intermediäre Zone. Diese Zonen sind in Abbildung 8 dargestellt.

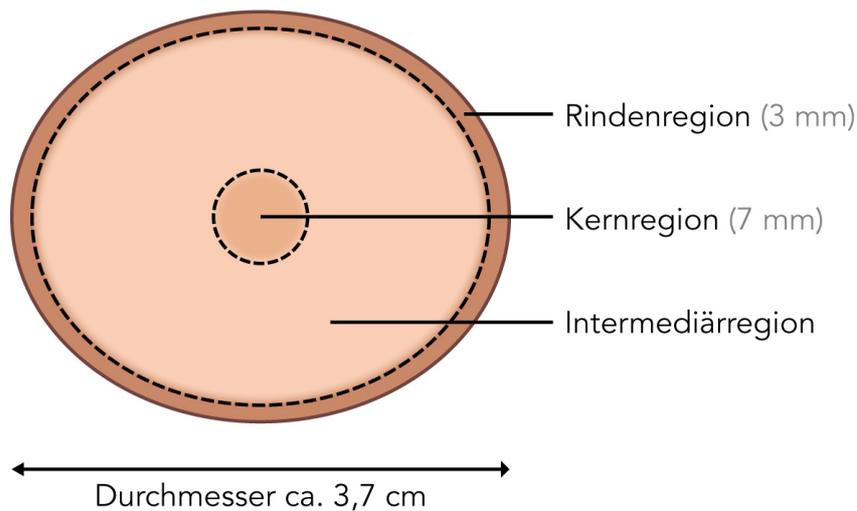


Abbildung 8: Zoneneinteilung der Würste für die Keimzahlbestimmung

2.2.2.4 Herstellung von Matrices mit Oberflächenkontaminationen und Spiking von Flüssigkeiten

Zur Herstellung von Lebensmitteln mit Oberflächenkontaminationen wurde Schweinehackfleisch (für Kontaminationen mit *Y. enterocolitica*) und Geflügelbrust (für Kontaminationen mit *S. enterica* oder *C. jejuni*) aus Berliner Supermärkten verwendet. Die nötigen Fleischmengen wurden in einem sterilen Stomacherbeutel oder 50 ml Falcon Röhrchen vorgelegt und anschließend mit einer entsprechenden Menge an Bakterienkultur (mit der gewünschten Konzentration) gleichmäßig beträufelt. Die Ansätze wurden dann für 1 Stunde bei 4 °C im Kühlschrank gelagert, um eine Anheftung der Bakterien an die Fleischmatrix zu ermöglichen. Eine Leerkontrolle ohne Bakterienzugabe wurde als Negativkontrolle für jede Lebensmittelmatrix mitgeführt und mittels kulturellen Nachweises nach DIN/ISO überprüft, ob die verwendeten Fleischmatrices keine initialen Pathogenkontaminationen enthielten.

Zur Herstellung von *Brucella* kontaminierten Flüssigproben wurden in einem BSL3-Hochsicherheitslabor 40 ml einer pasteurisierten Voll(kuh)milchprobe (3,5 % Fett) und einer frischen Ziegenmilchprobe mit 10^0 bis 10^7 CFU/ml einer Übernachtskultur von *B. melitensis* 16M inokuliert und bei 4 °C für 1 Stunde inkubiert. In einer Negativkontrolle wurde über eine Selektivanreicherung beziehungsweise über eine Direktplattierung auf *Brucella*-Selektivagar die Abwesenheit einer inerten Brucellenkontamination in der Vollmilch überprüft.

2.2.2.5 Herstellung histologischer Schnitte

Zur Herstellung von Gewebeschnitten wurden die zuvor fixierten Lebensmittelproben in Paraffin eingebettet und mit Hilfe eines Mikrotoms Schnitte mit einer Breite von 10 µm angefertigt. Die Schnitte wurden direkt vorsichtig auf einen Objektträger überführt ohne die Textur des Gewebes zu zerstören und nach Möglichkeit direkt mittels FISH angefärbt oder bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert. Vor der weiteren Verwendung wurde das Paraffin durch eine Inkubation in Xylol für 45 min und eine sich daran anschließende absteigende Ethanolreihe (100, 100, 96, 80, 70 %; je 1 min) entfernt. Schließlich wurden die paraffinbefreiten Schnitte für 20 min in destilliertem Wasser gespült.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 FISH

2.2.3.1.1 Puffer und Lösungen

Standard FISH-Hybridisierungspuffer (zum Einsatz bei 52 °C):

0,9 M NaCl

20 mM Tris-HCl pH 7,2

0,01 % SDS

15 % Formamid

0,1-1 mM FISH-Sonden

0,02-0,5 mM Kompetitoren

Hybridisierungspuffer (für mRNA-Nachweise bei 30 °C):

1 M NaCl

20 mM Tris-HCl pH 7,2

0,01 % SDS

15 % Formamid

800 nM Stellaris FISH-Sonden (bzw. ca. 20 nM pro Einzelsonde)

SDS wurde nach Möglichkeit ganz am Ende zugegeben, um das Ausfallen zu vermeiden. Für die Unterscheidung zwischen *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*

wurde abweichend von allen anderen Ansätzen eine Konzentration von 50 % Formamid verwendet.

Standard FISH-Waschpuffer (für Waschschritte bei 30 °C und 52 °C):

310 mM NaCl

20 mM Tris-HCl pH 7,2

0,01 % SDS

Permeabilisierungspuffer:

10 mg/ml Lysozym in PBS

Standardfixierlösung I (gramnegative Bakterien, Filter und Gewebe):

4 % Formaldehyd in PBS

Standardfixierlösung II (grampositive Bakterien und Schnellfixierung für gramnegative Bakterien):

50 % Ethanol in PBS

2.2.3.1.2 Probenfixierung

Flüssige oder halbflüssige (d.h. mit kleinkörnigen Matrixpartikeln) Proben wurden für eine Färbung mittels FISH oder Immunfluoreszenz entweder mit Formaldehyd (gängige Methode für gramnegative Bakterien) oder Ethanol (vornehmlich für grampositive Bakterien, aber auch als Schnellfixierung üblich für einige gramnegative Bakterienspezies) fixiert. Feste Matrices (z. B. Wurstscheiben) wurden ausschließlich mit Formaldehyd (oder auch Formalin oder ähnlich starken Fixierungsagenzien) fixiert.

Zur Fixierung mittels Formaldehyd wurden je 1 ml einer Flüssigprobe (bzw. 1 ml PBS mit bis zu 10 resuspendierten Bakterienkolonien von einer Agarplatte) für 5 min bei 14.000 g zentrifugiert und das Pellet in 4 % PBS/Formaldehyd aufgenommen und vollständig resuspendiert. Die Ansätze wurden dann für etwa 2 Stunden bei 4 °C fixiert. Durch zweimaliges Zentrifugieren (3-5 min bei 14.000 g) und Aufnahme der Pellets in PBS wurden Reste von Formaldehyd nach der Fixierung wieder aus der Probe entfernt. Die so gewaschenen Zellen wurden nach erneuter Zentrifugation in 50 % Ethanol/PBS-Lösung aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung

bei -20 °C gelagert. Formaldehydfixierte Präparate sind mehrere Monate bis Jahre haltbar. Feste Proben wurden in Würfeln mit einer ungefähren Größe von 1x1x1 cm³ geschnitten, in Falcons überführt und in 25 ml 4 % PBS/Formaldehyd bei Raumtemperatur über Nacht fixiert. Anschließend wurden die Präparate fünfmal für 30 min in destilliertem Wasser gewaschen und sofort Kryoschnitte angefertigt. Zur Fixierung von Filterstücken wurden die Filtermembranen für 15 min bei Raumtemperatur in 4 % PBS/Formaldehydlösung getaucht, zweimal mit Wasser gewaschen und schließlich für 5 min in 95 % Ethanol endfixiert und luftgetrocknet. Zur Fixierung mittels Ethanol wurden je 0,5 ml einer Flüssigprobe mit 0,5 ml auf -20 °C vortemperiertem Ethanol (100 %) versetzt und gut gemischt. Alternativ wurden Bakterienpellets in auf -20 °C gekühlte 50 % Ethanol/PBS-Lösung aufgenommen. Die Proben wurden danach direkt eingesetzt oder bei -20 °C gelagert. Zur Fixierung von Filtermembranen wurden die Filter mit 95 % Ethanol benetzt und für 5 min in Ethanol belassen. Nach Lufttrocknung konnten sie direkt für die Färbung eingesetzt werden.

2.2.3.1.3 FISH-Färbung

10 µl einer fixierten Probe (bzw. analog dazu ein kleiner Filterabschnitt oder Gewebeschnitt) wurden auf einen beschichteten Objektträger pipettiert und auf einer auf 52 °C vorgeheizten Heizplatte eingetrocknet. Für die Untersuchung kamen nach Möglichkeit Multiwell-Objektträger zum Einsatz, um die simultane Verarbeitung von mehreren Proben zu ermöglichen. Im Falle von grampositiven Bakterien folgte ein Permeabilisierungsschritt mit Lysozym für 5 min bei Raumtemperatur und ein kurzes Abspülen in destilliertem Wasser. Der Objektträger wurde dann zur Entwässerung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50, 80, 96 %) für je drei bis fünf Minuten inkubiert und das Präparat luftgetrocknet. Anschließend wurde der Hybridisierungspuffer mit dem Sondengemisch (inklusive etwaiger Kompetitoren) aufgegeben und für mindestens 1 Stunde bei 52 °C (konventioneller rRNA-FISH) bzw. 2 Stunden bei 30 °C (mRNA-FISH) lichtgeschützt im Brutschrank in einer Feuchtekammer (bestehend aus wassergetränkten Tüchern und einer Verdunstungsschutzabdeckung für die einzelnen Objektträger) inkubiert. Die Gesamtsondenkonzentration im Ansatz sollte 1 mM nicht übersteigen. Kamen mehrere Sonden zum Einsatz, wurden diese in gleichen Konzentrationen eingesetzt. Die Gesamtkompetitorkonzentration sollte 0,5 mM nicht übersteigen. Wurden mehrere Kompetitoren verwendet, wurde darauf

geachtet, dass jeder Kompetitor bzw. das Gesamtgemisch maximal halb so stark konzentriert eingesetzt wurde wie die zugehörigen Sonden. Die optimale Konzentration für eine neue Sonde wurde dabei zunächst *in silico* ermittelt und dann *in vitro* überprüft.

Nach der Hybridisierung wurde der Objektträger kurz zweimal für 10 s in kaltem, destilliertem Wasser abgespült und im Waschpuffer für 10 min bei 52 °C (konventioneller rRNA-FISH) bzw. bei 30 °C (mRNA-FISH) inkubiert. Der Waschpuffer enthält kein Formamid, dafür eine herabgesetzte Salzkonzentration, die für die nötige Stringenz sorgt. Der Objektträger wurde anschließend zweimal für 10 s in kaltem, destilliertem Wasser abgespült und mit einem Föhn (auf Kühlstufe) und unter Vermeidung direkter Sonneneinstrahlung schnell luftgetrocknet. Der Objektträger wurde schließlich mit einigen Tropfen des Einbettmediums Roti-Mount FluorCare (mit oder ohne DAPI-Zusatz) bedeckt, welches das Ausbleichen der Präparate verlangsamt, und anschließend mit einem Deckgläschen eingedeckelt. Die Proben wurden entweder sofort mikroskopisch untersucht oder bei 4 °C lichtgeschützt bis zur mikroskopischen Auswertung gelagert.

2.2.3.2 Sequenzierung der 16S und 23S Gene

Zur Sequenzierung der genomischen 16S und 23S Gene wurden diese Bereiche mittels des *Taq* PCR Master Mix Kits (Qiagen) nach Angaben des Herstellers amplifiziert. Die zugehörigen Primer für jede Amplifikationsreaktion sind in Tabelle 8 aufgelistet. Sie wurden in einer Stammkonzentration von 10 µM angesetzt und kamen in der PCR in einer Konzentration von 0,5 µM zum Einsatz. Während für die 16S Analyse Universalprimer eingesetzt werden können, benötigt man für die 23S-Amplifikation gruppenspezifische Primer. Die Primer wurden so gestaltet, dass alle PCRs mit den folgenden Spezifikationen durchgeführt werden konnten:

5 min	95 °C	(initiale Denaturierung)	
45 s	95 °C	(Denaturierung)	} 30 Zyklen
45 s	55 °C	(Primerannealing)	
90 s	72 °C	(Elongation)	
∞	6 °C		

Die Amplifikationsprodukte wurden durch das QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen gereinigt (Vorgehen nach Herstellerangaben). Reinheit, ungefähre Konzentration und Qualität des Amplifikationsproduktes wurden anschließend auf einem 1 % Agarosegel überprüft (Laufbedingungen: 100 V, 45 min). Waren diese Qualitätsparameter zufriedenstellend, wurden die Amplifikationsprodukte zur Sequenzierung nach Sanger an die Eurofins Genomics GmbH weiterverschickt.

2.2.3.3 Immunfluoreszenz

10 µl der fixierten Bakterienkulturen wurden auf Objektträger geträufelt und auf einer Heizplatte kurz eingetrocknet. Zur Permeabilisierung wurden 10 µl einer Lysozymlösung (10 mg/ml) zugegeben, der Ansatz für 7 min bei Raumtemperatur anverdaut und danach mit destilliertem Wasser abgespült. Zur Absättigung der Präparate wurden die Proben für 1 h mit 2 % BSA/PBS-Blockierpuffer inkubiert. Anschließend wurden 10 µl des primären Antikörpers (1:200 in Blockierpuffer) auf das Präparat gegeben und der Ansatz für mindestens 1 h bei Raumtemperatur (oder über Nacht bei 6 °C) inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden danach durch drei dreiminütige Waschschrte in PBS und einen Waschschrte in Blockierpuffer entfernt. Nach Zugabe von 10 µl des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers (1:300 in Blockierpuffer) wurden die Präparate lichtgeschützt für mindestens 1 h bei Raumtemperatur gelagert. Nach kurzem Abspülen in destilliertem Wasser wurden die Präparate wiederum dreimal für 3 min mit PBS gewaschen, kurz in Wasser getaucht, dann mit dem Föhn luftgetrocknet und mit etwas Einbettmedium eingedeckt.

Falls eine Kombination mit FISH angestrebt werden sollte, wurde zunächst die Hybridisierung durchgeführt und danach die Antikörperfärbung. In diesem Fall wurde die Lysozym-Permeabilisierung bereits vor der (FISH-)Ethanol-Dehydratisierung vorgenommen.

2.2.4 Methoden zur Lebend/Tot-Differenzierung

2.2.4.1 Direct viable count

Der direct viable count (DVC) dient der Unterscheidung von toten und lebenden Bakterien. Hierzu wurde eine bakterienhaltige Probe in zwei gleiche Teile aufgeteilt. Dem ersten Teil wurde ein geeignetes Nährmedium zugesetzt (z. B. LB), das das Antibiotikum Nalidixinsäure in subletalen Mengen enthielt; der andere Teil diente als

Kontrolle und wurde nur mit Nährmedium ohne Antibiotikum inkubiert. In subletalen Konzentrationen (meist zwischen 1 und 100 $\mu\text{g/ml}$) inhibiert Nalidixinsäure die Zellteilung, nicht aber das Zellwachstum, was zu einer starken Zellverlängerung bei lebensfähigen Zellen führt. Nach einigen Stunden (meist zwischen 2 und 10 h) wurden die Ansätze fixiert und mikroskopisch untersucht. In dieser Arbeit wurden Bakterien, die mehr als doppelt so lang waren wie durchschnittliche Bakterienzellen in der antibiotikafreien Kontrollprobe als sicher lebensfähig eingestuft; nicht verlängerte Zellen wurden als vermutlich tot angesehen. In Abbildung 9 ist das Prinzip des DVC schematisch dargestellt:

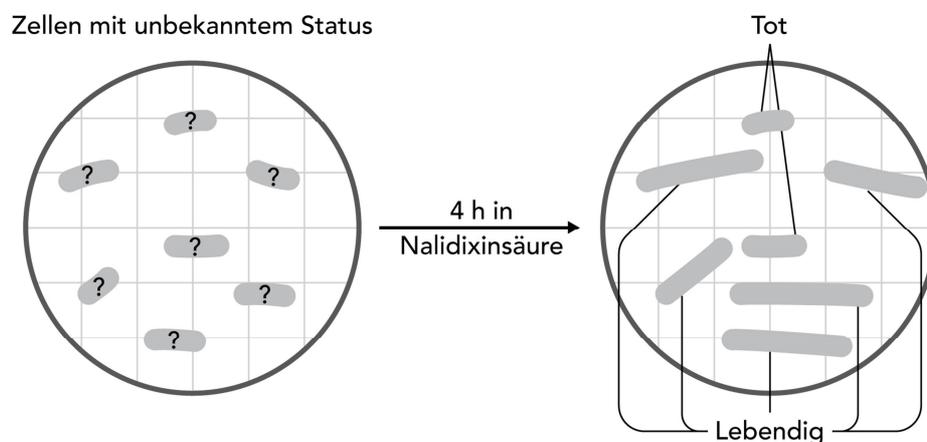


Abbildung 9: Prinzip des direct viable count

In Anwesenheit von Nalidixinsäure wird die Zellteilung der Bakterien gehemmt, nicht jedoch das Zellwachstum. Lebende Bakterien wachsen dadurch in die Länge, während die Gestalt toter Bakterien unverändert bleibt.

2.2.4.2 Tests zur Bestimmung der Membranintegrität

Zur Überprüfung der Membranintegrität wurden die zwei (strukturell verwandten) Substanzen Propidiummonoazid (PMA), das für die PMA-PCR benutzt wird, und Propidiumiodid, das primär zur Mikroskopie benutzt wird, eingesetzt. Diese Substanzen sollten der Theorie nach nur in tote Zellen mit beschädigten Membranen eindringen können und dort an die DNA binden. Propidiumiodid wurde direkt nach Aufbringen (und vorsichtigem Eintrocknen) der Zellen auf den Objektträger über das Einbettmedium hinzugegeben und direkt mikroskopisch ausgewertet. Alternativ zu Propidiumiodid, wurde eine 20 mM PMA-Stocklösung 1:1000 verdünnt zu einer Bakterienlösung gegeben (Endkonzentration 20 μM) und 15 min bei Zimmertemperatur im Dunkeln inkubiert. Dann erfolgte eine intensive Lichtbehandlung im LED PhAST Blue für 15 min, wodurch Propidiummonoazid eine

kovalente Bindung mit der DNA eingeht und die DNA durch eine PCR nicht mehr amplifizierbar ist. Danach wurden die Zellen zweimal bei 15.000 g zentrifugiert und mit PBS gewaschen und anschließend auf einen Objektträger aufgetragen, eingebettet und direkt analysiert. Sowohl Propidiummonoazid wie auch Propidiumiodid verleihen markierten Zellen eine starke rote Fluoreszenz.

2.2.4.3 Tests zur Bestimmung der intrazellulären Enzymaktivität

Um die enzymatischen Zellaktivitäten bestimmen zu können, wurden drei Substrate verwendet, die nach Eindringen in die Bakterienzellen durch intrazelluläre Esterasen zu grünfluoreszierenden Molekülen umgesetzt werden: Fluoresceindiacetat, Carboxyfluoresceindiacetat und Calcein-AM wurden in DMSO gelöst und die angelegten Stocklösungen von 25 mg/ml bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Je 1 µl dieser Lösungen wurden zu 1 ml Bakterienlösung gegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bakterienlösungen wurden bei 15.000 g abzentrifugiert, in PBS aufgenommen und sofort auf einem Objektträger eingebettet und analysiert.

2.2.5 MALDI-TOF Biotyping

Die MALDI-TOF Analyse mittels des Biotypers von Bruker Daltonik ist eine massenspektrometrische Analyse zur schnellen Identifizierung von Einzelkolonien auf einer Platte oder von bakteriellen Reinkulturen in Flüssigmedium. Der Biotyper nimmt das charakteristische Peakspektrum der bakteriellen Proteine und Peptide auf und vergleicht dieses mit einer im Programm hinterlegten Datenbank bestehend aus umfangreichen Stammsammlungen und zugehörigen Peakprofilen. Je nach Trennschärfe sowie Qualität und Umfang der Datenbank ist eine Identifizierung bis zur Spezies- bzw. Gattungsebene möglich, zum Teil auch noch genauer.

Für die Analyse wurde jeweils eine Einzelkolonie mit einem sterilen Zahnstocher von einer frisch bewachsenen Platte gepickt und auf einem Well des MALDI-Probenträgers ausgerieben. Anschließend wurden die Bakterien in 1 µl der MALDI-TOF-Matrix (α -Cyano-4-hydroxymethylsäure; HCCA) eingebettet, eingetrocknet und in den Biotyper eingesetzt. Zur Kalibrierung und Validierung der Ergebnisse wurde außerdem ein bakterieller Teststandard (BTS; *E. coli* DH5 α) mitgeführt. Die Analyse erfolgte danach automatisch und es wurde eine Reihe von möglichen Treffern generiert. Die Wahrscheinlichkeit für jede Klassifizierung konnte mittels eines Scores

ermittelt werden, der zwischen 0 und 3 liegen kann. Werte oberhalb von 2,3 sprechen für eine sehr wahrscheinliche Speziesidentifizierung, oberhalb von 2 noch für eine sichere Gattungsidentifizierung. Bis zu einem Wert von über 1,7 kann die identifizierte Gattung als wahrscheinlich angegeben werden; darunter ist die Analyse nur noch eingeschränkt aussagefähig.

2.2.6 Mikroskopie und Bildauswertung

Die mikroskopischen Auswertungen der Fluoreszenzfärbungen erfolgten mittels eines AxioScope LED-Fluoreszenzmikroskopes (Zeiss) unter Verwendung eines 100x N-achroplan Ph3 M27 Öl-Immersion-Objektivs (Zeiss). Die Bilder wurden über eine AxioCam MRm aufgenommen und durch die Zeiss-Software ZEN 2012 weiter prozessiert (z. B. für die Größenskalierung oder die Überlagerung mehrerer Fluoreszenzkanäle). In Tabelle 14 sind die genutzten drei Farbkanäle und Leuchtdioden aufgeschlüsselt. Bei der Auswahl der Filter, LEDs und vor allem der Fluorophore war zu beachten, dass keine farblichen Überlappungen zwischen den drei Kanälen zu erwarten sind. Außerdem wurden nach Möglichkeit schwächere (AMCA) und photolabile Farbstoffe (FAM, Fluorescein) vermieden und helle und stabile Fluorophore (z. B. Alexa488) verwendet.

Tabelle 14: Verwendete Lichtquellen, Filter und Fluorophore

Lichtquelle	Filter	Farbe (verwendete Fluoreszenzfarbstoffe)
LED Modul 365 nm	Filterset 49: Anregung bei 365 nm (Range ca. 320-380 nm), Emission bei 445 nm (Bandbreite 50 nm)	Blau (DAPI, AMCA)
LED Modul 470 nm	Filterset 38: Anregung bei 470 nm (Bandbreite 40 nm), Emission bei 525 nm (Bandbreite 50 nm)	Grün (FAM, Fluorescein, Alexa488)
LED Modul neutralweiß 540-580 nm	Filterset 45: Anregung bei 560 nm (Bandbreite 40 nm), Emission bei 630 nm (Bandbreite 75 nm)	Rot (TexasRed, CalFluor610, PI, PMA)

Zum Vergleich der Fluoreszenzintensitäten von verschiedenen Proben oder Bakterienspezies wurden die LED-Intensität und die Expositionszeiten auf feste Werte eingestellt. Hierbei diente die Probe mit den hellsten Signalen als Referenzwert: Expositionszeit und LED-Intensität wurden so justiert, dass sich die

gemessenen (maximalen) Werte knapp unterhalb des Sättigungsbereiches der Kamera befanden. Im Rahmen einer Bildanalyse wurden mindestens 15-50 Zellen je Probe vermessen und deren Wert gemittelt. Außerdem wurden mindestens 5 zellfreie Punkte aus dem gesamten Bildbereich vermessen, um die Hintergrundfluoreszenz zu ermitteln, die von Probe zu Probe deutlich variieren kann. Der ermittelte Hintergrundwert wurde von der Signalintensität der Zellen abgezogen, um das Nettosignal zu erhalten.

Zur optimalen Signaldarstellung kann in ZEN 2012 außerdem die Funktion „Bester Fit“ gewählt werden, die nicht genutzte Signalbereiche automatisch herausfiltert: Minimale Messwerte werden dabei auf schwarz gesetzt, die höchsten Messwerte auf die maximale Farbintensität des Kanales abgebildet, wobei die Schwellwertbereiche auf beiden Seiten des Signalhistogramms übergangen werden. Der Gammawert, also die Linearität der Signalwiedergabe und ihre proportionale Darstellung, bleibt bei der Verwendung dieser Funktion unverändert.

2.2.7 FISH-Sondendesign

Die Entwicklung geeigneter FISH-Sonden ist ein Schlüssel in der Etablierung eines zuverlässigen FISH-Assays. In Abbildung 10 ist der in dieser Arbeit verwendete Ablauf bei dem *in silico* Design einer FISH-Sonde gezeigt.

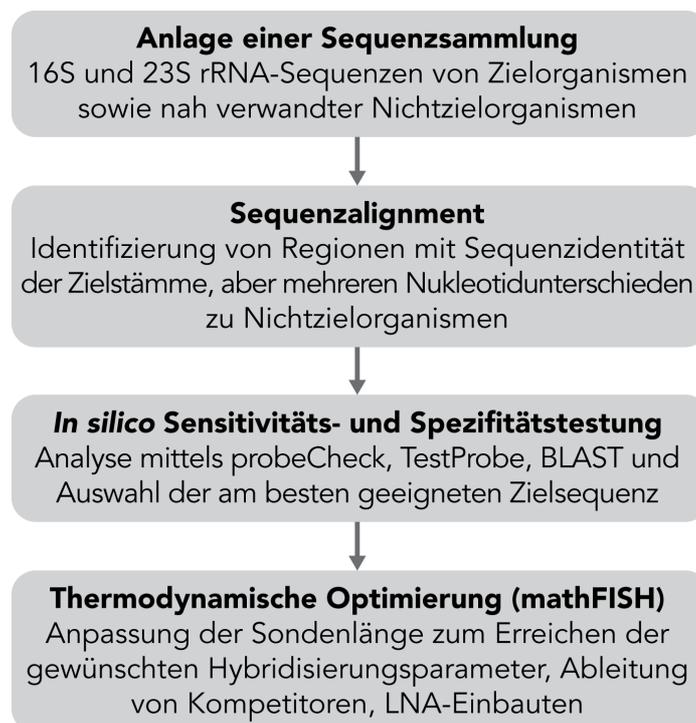


Abbildung 10: Schematische Darstellung der FISH-Sonden-Entwicklung

2.2.7.1 Identifizierung geeigneter Zielsequenzen

Zu Beginn des Sondendesigns wurde zunächst ein Set aus mindestens acht Sequenzen aus der Blast-Datenbank erstellt (nach Möglichkeit sowohl von der 16S wie auch der 23S rRNA), vier davon Stämme, die mit der zu entwickelnden FISH-Sonde erfasst werden sollten (und phylogenetisch möglichst divers sein sollten, um eine repräsentative Auswahl der zu detektierenden Gruppe zu erhalten) und vier weitere Stämme, die phylogenetisch nahverwandt zu den Zielorganismen sind, aber von der Sonde nicht erfasst werden sollten. Diese Stammauswahl wurde anschließend in ClustalW (Larkin *et al.*, 2007) aligniert und alle Genregionen in eine Liste potenzieller Sondenkandidaten aufgenommen, in denen alle vier Zielsequenzen übereinstimmen, gleichzeitig aber alle Nichtzielsequenzen zwei oder mehr Nukleotidunterschiede aufweisen, die nicht weiter als zehn Nukleotide auseinanderliegen.

Diese potenziell geeigneten Regionen wurden als nächstes in probeCheck getestet, einer Plattform, die sehr schnell diese kurzen Sequenzen mit einer großen Datenbank mit mehreren Hunderttausend rRNA-Einträgen vergleicht (Loy *et al.*, 2008). Die Sondenkandidaten wurden auf ihre Inklusivität (Erfassung aller Zielstämme) und Exklusivität (keine Sequenzidentität zu Nichtzielorganismen) untersucht und eine priorisierte Rangliste erstellt. Außerdem wurde ermittelt, wie viele Nukleotidunterschiede zu anderen Nichtzielstämmen existieren. Idealerweise sollten mindestens zwei Fehlpaarungen zu Nichtzielstämmen vorhanden sein und diese möglichst mittig innerhalb der SONDENSEQUENZ liegen.

Nach dieser weiteren Einschränkung möglicher Sondenkandidaten wurden die verbleibenden Zielsequenzen in TestProbe analysiert (Quast *et al.*, 2013), einer Plattform mit einem eher langsameren und zeitaufwändigeren Suchalgorithmus als probeCheck, die dafür aber genauere Ergebnisse liefert und über eine aktuellere Datenbank verfügt.

Abschließend wurden die verbleibenden Zielsequenzen noch in BLAST überprüft, um mögliche nichtribosomale Kreuzreaktionen zu identifizieren. Hierbei sind allerdings nur falsch positive Treffer von high-copy Sequenzen oder stark exprimierten RNAs von größerer Bedeutung, da sehr geringe Konzentrationen falsch positiver Zielsequenzen durch die Standard-FISH-Prozedur ohnehin nicht erkannt und als unproblematisch eingestuft werden können.

2.2.7.2 Thermodynamische Optimierung der Sondensequenzen

Das Verhalten von FISH-Sonden kann mittels mathFISH, einem Tool zur thermodynamischen Modellierung des Bindungsverhaltens an die ribosomalen RNAs, *in silico* modelliert werden (Yilmaz *et al.*, 2011). Drei Energiegleichgewichte müssen hierbei betrachtet und aufsummiert werden zum $\Delta G^{\circ}_{\text{overall}}$ -Wert (der gesamten freien Energieänderung durch die Hybridisierung): die Bindungsstärke der Sonde zum freien RNA-Abschnitt (ΔG_1), die Stärke der Bindung, die die Sonde mit sich selber eingehen kann (ΔG_2), und schließlich die Stärke der intramolekularen Selbstfaltung und Sekundärstrukturierung der RNA-Zielregion (ΔG_3 , auch als Zugänglichkeit zu interpretieren). Studien von Yilmaz *et al.* legen nahe, dass ein $\Delta G^{\circ}_{\text{overall}}$ von -13 bis -17 kcal/mol eine optimale Bindung der Sonde gewährleistet (Yilmaz *et al.*, 2006).

Das Sondendesign, der in dieser Arbeit entwickelten Sonden zielte darauf ab, alle Sonden simultan einsetzen zu können, was nur bei thermodynamisch ähnlichen Eigenschaften möglich ist. Daher wurde ein $\Delta G^{\circ}_{\text{overall}}$ -Wert von -13 bis -16 kcal/mol als Zielbereich festgelegt. Als unveränderliche Hybridisierungsparameter wurden eine einheitliche Hybridisierungstemperatur von 52 °C, ein konstanter Salzgehalt von 0,9 M NaCl und eine auf 15 % begrenzte Formamidkonzentration festgesetzt. Um die Thermodynamik der Sondenbindung auf diese Bedingungen zu normen, wurden die Sonden verlängert oder verkürzt, was eine stärkere bzw. schwächere Bindung bewirkte.

War aus thermodynamischen Gründen eine Sondenlänge von über 28 Nukleotiden erforderlich, wurde nach Möglichkeit auf andere Sondensequenzen mit gegebenenfalls weniger Nukleotidunterschieden zu den Nichtzielorganismen zurückgegriffen. In einigen Fällen wurde die optimale Sondensequenz für die spezifische Erkennung auch um einige Nukleotide nach links oder rechts auf der Sequenz verschoben; nach Möglichkeit sollten die Nukleotidfehlpaarungen (Mismatch) zu Nichtzielgenen aber in der Mitte platziert bleiben. In Tabelle 15 sind die wichtigsten Kriterien für die Sondenentwicklung zusammengefasst.

Tabelle 15: Richtlinien für das Sondendesign

Kriterium	Optimale Ausprägung
Bindungsaffinität der Sonde ($\Delta G^{\circ}_{\text{overall}}$)*	-13 bis -16 kcal/mol
Theoretische Sensitivität	> 95 % Abdeckung aller Zielsequenzen in einer Datenbank
Theoretische Spezifität	< 3 % falsch positive Treffer in einer Datenbank
Anzahl der Fehlpaarungen zu Nichtzielorganismen	≥ 2 (je mehr, desto robuster)
Position der Fehlpaarungen	Möglichst mittig liegend, nicht außen
Länge der Sonde	18-26 Nukleotide
Hybridisierungseffizienz* (Zielbakterium)	> 85 %
Hybridisierungseffizienz* (andere Bakterien)	< 15 %

* laut mathFISH-Berechnung bei gegebener Hybridisierungstemperatur (z. B. 52 °C), Salzgehalt (z. B. 0,9 M), Sonden- (z. B. 500 nM) und Formamidkonzentration (z. B. 15 %)

2.2.7.3 Verwendung von locked nucleic acids (LNAs)

LNAs sind DNA-Analoga, die eine deutlich höhere Bindungsstärke als DNA-Nukleotide aufweisen. Sie wurden in dieser Arbeit in Sonden und Kompetitoren eingesetzt, wenn den Positionen einzelner Mismatches besondere Bedeutung zukam, z. B. wenn diese die einzigen Fehlpaarungen zu einem Nichtzielorganismus darstellen (Kubota *et al.*, 2006). Bisher erlaubt die noch unvollständige Datenlage keine präzisen Vorhersagen über das Verhalten von LNAs in DNA-Oligonukleotiden. Im Falle des Einbaus von LNA-Nukleotiden (zum Beispiel bei der Unterscheidung von *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*) können daher genaue thermodynamische Berechnungen in mathFISH nicht mehr durchgeführt werden. Dies gilt gleichermaßen für andere verfügbare Analyseprogramme. LNAs bilden besonders starke Haarnadelstrukturen oder Eigendimere aus, daher wurde bei der Verwendung von LNAs mit den frei verfügbaren Tools OligoAnalyzer 3.1 und OligoCalc überprüft, ob durch den LNA-Einbau diese internen Strukturen verstärkt ausgebildet werden können.

2.2.7.4 Design von Kompetitoren und Helfersonden

Kompetitoren wurden entworfen, wenn beispielsweise zwischen Ziel- und Nichtzielsequenzen nur geringe Unterschiede bestehen und die Hybridisierungseffizienz für Nichtzielorganismen als zu hoch eingestuft worden war (z. B. bei nur einem Nukleotidunterschied oder Fehlpaarungen an den Rändern der

Sondensequenzen, siehe Kriterienkatalog in Tabelle 15). Thermodynamisch bedeutete dies zum Beispiel eine Hybridisierungseffizienz oberhalb von 20 % und eine $\Delta\Delta G^\circ$ -Differenz (Affinitätsunterschied in der Bindung von Ziel- und Nichtzielsequenz) von weniger als 3-4 kcal/mol. Für die Kompetitoren wurden die gleichen Zielregionen verwendet wie für die zugehörigen Sonden, mit dem Unterschied, dass sie vollständig identisch zu den Nichtzielsequenzen sein mussten. Für das Design von Kompetitoren gelten ähnliche Erfordernisse wie für die FISH-Sonden (Tabelle 15); nach Möglichkeit sollte der Kompetitor mit einer etwas höheren thermodynamischen Affinität zur Nichtzielsequenz ausgestattet sein (z. B. -14 bis -16 kcal/mol) als die Sonde zu ihrer Zielsequenz (z. B. -13 bis -15 kcal/mol), um falsch positive Bindungen sicher verhindern zu können. Falls sich die Nichtzielsequenzen voneinander unterscheiden, wurden entsprechend mehrere Kompetitoren abgeleitet. Helfersonden wurden entworfen, wenn der Betrag von ΔG_3 sehr hoch lag, folglich also starke intramolekulare Bindungen und Sekundärstrukturen vorhanden waren bzw. anders ausgedrückt die Unzugänglichkeit der rRNA für die Sonde sehr hoch war. In diesem Fall wurden in einem Abstand von 3 Nukleotiden zur Sondensequenz je zwei Helferoligonukleotide mit sehr hohen Affinitäten zur RNA (-16 bis -18 kcal/mol) entwickelt. Die Spezifität dieser Bindungen spielte dabei eine untergeordnete Rolle, da sie nur zum Aufbruch der Sekundärstrukturen dienten. Durch den Einsatz von Helfersonden können exakte thermodynamische Prognosen für die zugehörige Sonde nicht mehr getroffen werden.

2.2.7.5 Stellaris mRNA FISH-Sondendesign

Für das Design des mRNA FISH-Sondengemisches wurde eine andere Vorgehensweise gewählt als bei dem rRNA-FISH. Die gesamte mRNA-Zielsequenz (β -Lactamase TEM-1, *bla*-Gen; GenBank: L08858.1) wurde verwendet, um ein Sondengemisch bestehend aus 41 Einzelsonden abzuleiten. Dazu wurde auf das Programm Stellaris Probe Designer Version 4.1 des Herstellers LGC Biosearch Technologies zurückgegriffen, das die Ableitung von maximal 48 Sonden zulässt. Der Eingabedatensatz umfasste die vollständige Sequenz des *bla*-Gens. Weiterhin kann ein Masking-Level von 0 bis 5 ausgewählt werden, wobei Werte oberhalb von 2 einigen eukaryotischen Organismen vorbehalten sind. Je höher das Masking-Level gewählt wird, desto spezifischer binden die Sonden und desto weniger Fehlhybridisierungen sind zu erwarten. Allerdings verringert sich dadurch die Anzahl

der verfügbaren Sondenkandidaten deutlich. Weitere Freiheitsgrade sind wählbar über die Sondenlänge (18-22 Nukleotide) und beim Mindestabstand der Sonden voneinander. Für den *bla*-mRNA-FISH wurden ein Mindestabstand von 2 Nukleotiden, eine Sondenlänge von 19 Nukleotiden und ein Masking-Level von 0 gewählt. An Hand der vorgeschlagenen Sonden wurden mittels mathFISH die idealen Hybridisierungsbedingungen (Temperatur und Salzkonzentration) für das Sondengemisch kalkuliert. Die Formamidkonzentration von 15 % wurde auch für den mRNA FISH beibehalten. Da LGC Biosearch Technologies nicht die üblichen Alexa- oder TexasRed-Fluorophore vertreibt, wurde das Sondengemisch mit einer CalFluor610 Markierung versehen, die vergleichbare Eigenschaften wie TexasRed aufweist.

2.2.8 Statistische Methoden

Ein zweiseitiger, ungepaarter Student *t*-test wurde zur Bestimmung der Signifikanz herangezogen, unter der Annahme ungleicher Varianzen zwischen den beiden zu vergleichenden Populationen. *P*-Werte unterhalb von 0,05 wurden als signifikant eingestuft. Soweit nicht anders angegeben, beziehen sich alle gezeigten Daten auf den Durchschnitt von drei unabhängigen Experimenten unter Angabe eines Fehlerbalkens mit der jeweiligen Standardabweichung.

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung von FISH-Tests zur Speziesbestimmung und Vergleich mit publizierten FISH-Sonden

3.1.1 FISH-Sondenentwicklung *in silico*

Für die Etablierung der einzelnen FISH-Systeme zum Nachweis bakterieller Zoonoseerreger mussten zunächst für die getroffene Pathogenauswahl Sonden entworfen und *in silico* getestet bzw. so optimiert werden, dass sie unter gleichen Bedingungen eingesetzt werden können. Eine Literaturrecherche zu bereits beschriebenen Sonden und Nachweissystemen (Rohde *et al.*, 2015a; 2016a) ergab, dass ein Großteil der FISH-Tests über ungenügende Sensitivitäten und Spezifitäten verfügen (vergleichende Analysen finden sich im Folgenden zu jedem Erreger separat). Daher wurden nach dem in Abschnitt 2.2.7 erläuterten iterativen Verfahren zum Sondendesign neue SONDENSEQUENZEN identifiziert und so angeglichen, dass sie für Multiplexanwendungen ähnliche thermodynamische Affinitäten aufwiesen (Tabelle 16).

Obwohl die Sonden in ihren thermodynamischen Bindungseigenschaften vergleichbar sind, unterscheiden sie sich teilweise deutlich in ihrer Länge und im GC-Gehalt genauso wie in der Zugänglichkeit der jeweiligen Zielsequenz in der ribosomalen RNA. Die Sonden für *S. enterica*, *Brucella* spp. und *Y. enterocolitica* weisen dabei besonders schlechte thermodynamische Zugänglichkeiten für die ausgewählten RNA-Sequenzen auf (hohe ΔG_3 -Beträge).

Es gelang, den Großteil der Sonden auf eine *in silico* Affinität von 13,7-15,7 kcal/mol einzustellen und den Formamidschmelzpunkt (bei 52 °C) zwischen 21-29 % zu halten. Bei der angestrebten Formamidkonzentration von 15 % war damit eine hohe Spezifität der Bindung zu erwarten, aber keine starke Beeinträchtigung der Bindungseffizienz. Nicht immer konnten alle Zielparameter (Tabelle 15, Abschnitt 2.2.7.2) für das Sondendesign optimal gewählt werden, so zum Beispiel bei den Sonden EcoliO157 oder Arcobull. Die Sonde EcoliO157 wurde als Einzige von einer bereits publizierten Sonde abgeleitet, die laut Almeida *et al.* (2013) nur den medizinisch relevanten *E. coli* O157:H7 detektieren sollte. Da diese Abgrenzung

lediglich auf einem Nukleotidunterschied beruht, wurde die thermodynamische Affinität etwas unter dem Zielwert von -13 bis -16 kcal/mol gehalten.

Tabelle 16: Überblick über die thermodynamischen Parameter der FISH-Sonden

Sondenname	Thermodynamische Affinität $\Delta G^{\circ}_{\text{overall}}$ (in kcal/mol)	Zugänglichkeit ΔG_3 (in kcal/mol)	Länge (Nukleotide)	GC-Gehalt (in %)	Schmelz-Formamidkonzentration (in %)
Salment	-13,7	-11,5	24	54,2	27,7
Campytherm	-14,1	-5,5	19	52,6	26,9
EcoliO157	-12,6	-5,7	18	66,7	21,8
Listmono	-14,5	-4,6	22	45,5	23,5
Listall	-15,6	-4,1	23	43,5	27,0
Arcobu	-14,9	-6,1	30	36,7	20,2
Arcobull	-17,6	-3,6	24	45,8	33,0
Arcobac	-14,0	-4,4	22	40,9	21,0
Bruc236	-14,6	-9,3	26	53,8	29,0
YersEcol16	-14,7	-7,0	24	37,5	25,3
YersEcoll16	-14,4	-8,2	23	43,5	26,2
YersEco23	-14,2	-9,3	24	50,0	26,1
YersPseu23	-15,7	-3,2	22	50,0	27,0
YersPseu16	-14,0	-6,7	23	47,8	22,6

Für *Y. enterocolitica* wurden zwei Sonden entwickelt, die zusammen die Gesamtheit der beiden auf 16S Ebene leicht unterschiedlichen Subspezies, *Y. enterocolitica* subsp. *enterocolitica* beziehungsweise subsp. *paleoartica* erkennen. Um der Diversität der Yersinien Rechnung zu tragen, wurden außerdem für *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis/pestis* jeweils eine Kontrollsonde mit vergleichbar hoher Spezifität entwickelt. Für die Detektion von *A. butzleri* wurden ebenfalls zwei Sonden entwickelt. Die Zielsequenz von Arcobul weist zwar mehrere Nukleotidunterschiede zu Nichtzielsequenzen auf, musste allerdings auf Grund des niedrigen GC-Gehalts stark vergrößert werden und ist mit Abstand die längste Sonde. Demgegenüber ist Arcobull deutlich kürzer, weist aber eine etwas zu hohe thermodynamische Affinität auf. Eine Verkürzung der Sondensequenz war hier jedoch nicht möglich, ohne auf wichtige Nukleotidunterschiede zu verzichten.

3.1.2 Test des entwickelten Standardprotokolls und des Auflösungsvermögens von FISH für *S. enterica*, *Brucella* spp. und *E. coli* O157

Um die Praxistauglichkeit des FISH-Protokolls zu überprüfen, wurden die neu entwickelten Sonden an Reinkulturen getestet. Hierfür wurden drei gramnegative Erregergruppen exemplarisch ausgewählt, um nicht nur das Protokoll, sondern auch das taxonomische Auflösungsvermögen der FISH-Methode auf drei verschiedenen Hierarchieebenen zu überprüfen: die speziesspezifische Sonde Salment für *Salmonella enterica*, beispielhaft für einen Vertreter der Enterobacteriaceae bzw. der großen Klasse der Gammaproteobacteria sowie die gattungsspezifische Sonde Bruc236 für *Brucella* spp., ein Vertreter aus der Klasse der Alphaproteobacteria und im Vergleich zu den Salmonellen sehr viel kleiner, sowie eine serotypspezifische Sonde für *E. coli* O157 (EcoliO157), die mit geringen thermodynamischen Anpassungen aus der Publikation von Almeida *et al.* (2013) übernommen worden ist. Sowohl Salment als auch Bruc236 lieferten trotz der vergleichsweise schlechten Zugänglichkeit der rRNA bereits nach einem Hybridisierungszeitraum von einer Stunde gute Signale, vergleichbar zu den Signalen mit der bakteriellen Universalsonde EUB338, die als Positivkontrolle diente.

Um den Einfluss der Stringenz zu überprüfen wurde die Formamidkonzentration in 5 %-Schritten erhöht und jeweils eine Kultur von *S. enterica* und *E. coli*, dessen rRNA-Sequenz sehr ähnlich zu *S. enterica* ist, mit Salment und EUB338 simultan angefärbt. Während bei geringen Formamid-Konzentrationen noch eine schwache Anfärbung von *E. coli* erkennbar war, reduzierte sich das Signal deutlich bei 15 % Formamid. Gleichzeitig blieb die Anfärbung von *S. enterica* bis zu diesem Punkt konstant, erst ab 20 % wurde auch hier die Abschwächung deutlich. Alle sechs getesteten *Salmonella*-Serovare (Typhimurium, Enteritidis, Paratyphi B, Virchow, Abony, Dublin) wurden von der Sonde erkannt, während alle anderen getesteten Enterobacteriaceae-Spezies (z. B. *Yersinia* spp., *Klebsiella* spp., *E. coli*) bei den gewählten Puffer- und Temperaturbedingungen von Salment nicht angefärbt wurden (Abbildung 11). Das Signal der bakteriellen Universalsonde EUB338 blieb auch bei höheren Formamidkonzentrationen konstant für Ziel- wie Nichtzielstämme.

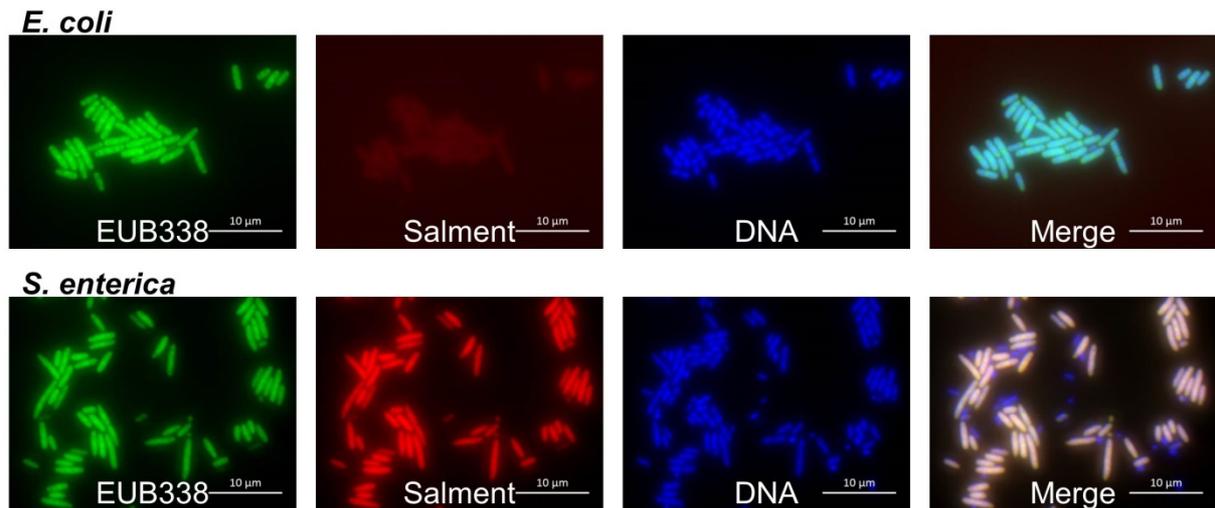


Abbildung 11: Unterscheidung von Ziel- und Nichtzielorganismen

Bei 15 % Formamid zeigen *S. enterica* und *E. coli* starke Signale von EUB338-FAM, aber nur *S. enterica* wird durch die speziesspezifische Sonde Salment angefärbt.

Grün: EUB338-FAM. Rot: Salment-TexasRed. Blau: DAPI. Rechts: Überlagerung aller Kanäle (Merge).

Oben: *E. coli* O157. Unten: *S. enterica* Typhimurium.

Analog dazu wurde auch die Sonde Bruc236 zum Nachweis von *Brucella* spp. getestet und ihre Abgrenzung zu den nahverwandten *Ochrobactrum*-Spezies *O. anthropi*, *O. intermedium*, *O. oryzae* und *O. lupini*. Auch hier konnte eine spezifische Erkennung bei den gewählten Standardhybridisierungsparametern erreicht werden, die alle 24 getesteten Brucellenstämmen umfasste. Interessanterweise zeigten sich deutliche Unterschiede in der Intensität der Fluoreszenz: Hochpathogene Spezies (z. B. *B. melitensis*) waren nicht nur deutlich kleiner, sondern lieferten auch schwächere Intensitäten als die atypischen *Brucella*-Spezies wie *B. inopinata* (Abbildung 12a). Außerdem ließ sich beobachten, dass in besonders dicht bewachsenen Kulturen viele DAPI-gefärbte Zellen kein FISH-Signal mehr besaßen. Ein Lysozymverdau, der eventuell schlecht permeabilisierte Zellen zugänglich machen sollte, zeigte keine Verbesserung der Färbung, sodass es sich bei den nicht gefärbten Zellen um tote Bakterien handeln müsste (Abbildung 12a). Der Farbstoff FAM erwies sich als sehr photolabil. Bei den großen Enterobacteriaceae mit hohen Ribosomendichten war dies nicht von Bedeutung, bei den schwächeren FISH-Signalen der Brucellen waren bei geringen Bakterienkonzentrationen die Brucellen jedoch nur schwer identifizierbar. Alexa488 ist eine sehr viel stabilere Alternative und wurde daher gegen FAM ausgetauscht. Um

die Signalintensität weiter zu steigern, wurde die Sonde an beiden Enden markiert, was zu einer deutlicheren Signalsteigerung führte und so die Expositionszeiten für die Bildaufnahme mehr als halbiert werden konnten. Beim Übereinanderlegen des Kanals der Universalsonde EUB338 und des Kanals für die modifizierte Sonde Bruc236-2Alexa488 fiel allerdings auf, dass Bruc236-2Alexa488 nur einen Teil der Zielzellen anfärben konnte (Abbildung 12b). Erst nach einem Lysozymverdau konnte die relativ große Sonde Bruc236-2Alexa488 (50 % länger als EUB338) in alle durch EUB338 gefärbten Zellen eindringen.

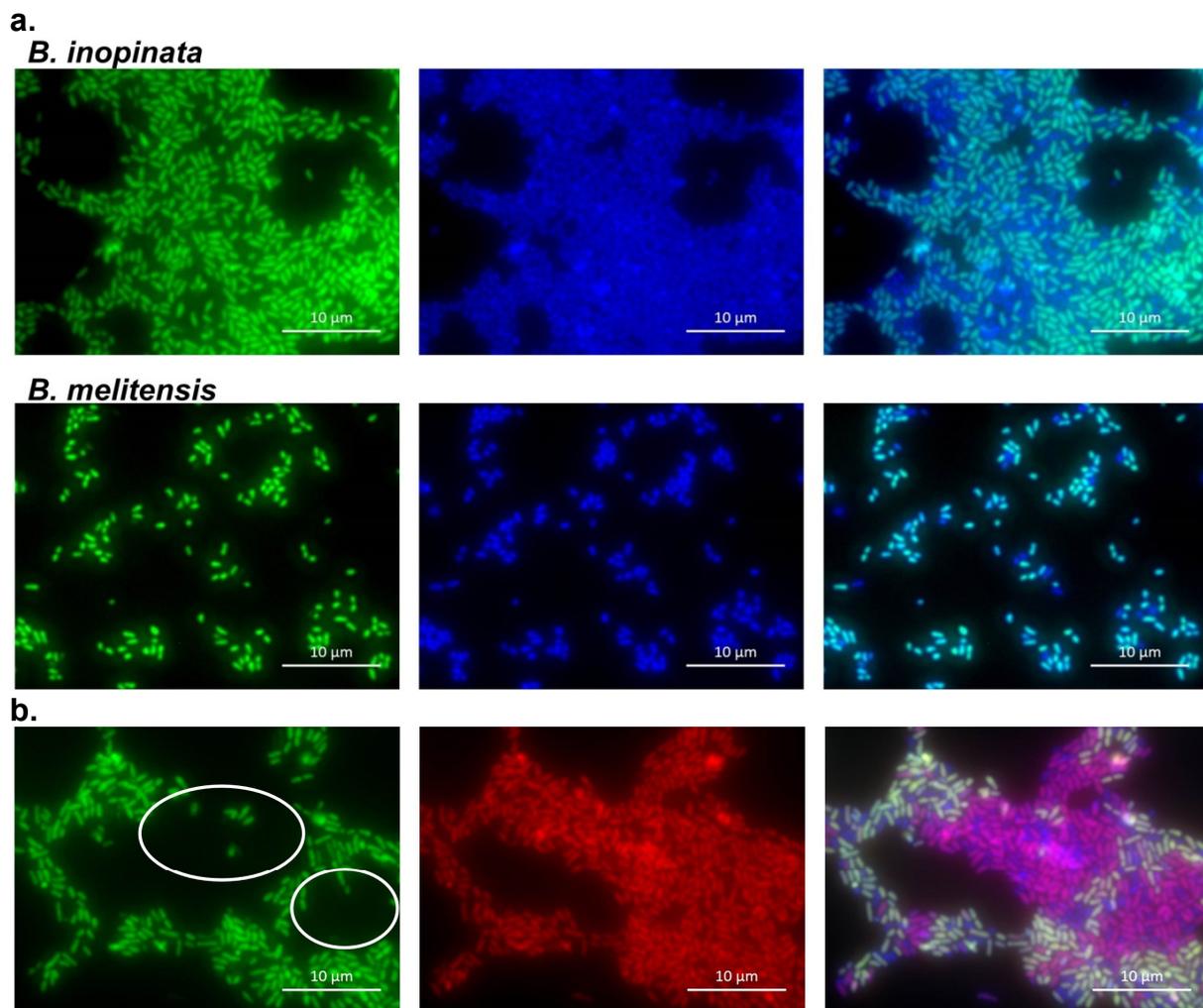


Abbildung 12: Testung der *Brucella*-Sonde Bruc236

a. Anfärbung von *B. inopinata* und *B. melitensis*

Grün: Bruc236-FAM. Blau: DAPI. Rechts: Merge aus FAM- und DAPI-Signal.

b. Bruc236-2Alexa488 dringt ohne Lysozymverdau nur teilweise in *B. inopinata* ein

Die markierten Bereiche zeigen beispielhaft Brucellen, die nur mit EUB338-TexasRed angefärbt werden konnten, nicht jedoch mit Bruc236-2Alexa488.

Grün: Bruc236-2Alexa488. Rot: EUB338-TexasRed. Rechts: Merge aus Alexa488-, TexasRed- und DAPI-Signal.

Schließlich wurde noch die angepasste Sonde EcoliO157 von Almeida *et al.* (2013) getestet. Im Gegensatz zu den anderen beiden Sonden sollte sie nicht spezifisch für eine Gattung oder eine Spezies sein, sondern nur einen bestimmten (pathogenen) Serotyp von *E. coli* identifizieren. Die Sonde EcoliO157 differenzierte erfolgreich zwischen dem Serotyp O157:H7 und anderen bedeutsamen Serotypen und Referenzstämmen (O145:H28, O103:H2, O26:H11, O121:H19, O111:H8, O104:H21, O104:H4, O118:H16, Referenzstamm ATCC 25922 O6), obwohl teilweise nur ein Nukleotidunterschied in der Zielsequenz zwischen den Serotypen vorliegt. Bei der erweiterten Spezifitätstestung mit anderen Enterobacteriaceen zeigte sich aber eine ausgeprägte Kreuzreaktivität mit den *Salmonella*-Serovaren Enteritidis und Virchow. Blast-Analysen und probeCheck ergaben, dass auch die *Salmonella*-Serovare Newport, Saintpaul und Heidelberg eine vollständige Komplementarität zur Sonde EcoliO157 aufweisen. Eine Analyse mittels TestProbe ergab eine Übereinstimmung mit 42 % aller hinterlegten 23S rRNA Sequenzen von *S. enterica*. Die Abgrenzung von vielen Salmonellenstämmen konnte daher nur erreicht werden, wenn die Sonde Salment in einer Doppelfärbung gleichzeitig mit EcoliO157 eingesetzt wurde (Abbildung 13): Jedes positive Hybridisierungsereignis mit EcoliO157 konnte nur dann als Nachweis von *E. coli* O157:H7 eingestuft werden, wenn keine Hybridisierung mit Salment stattfand.

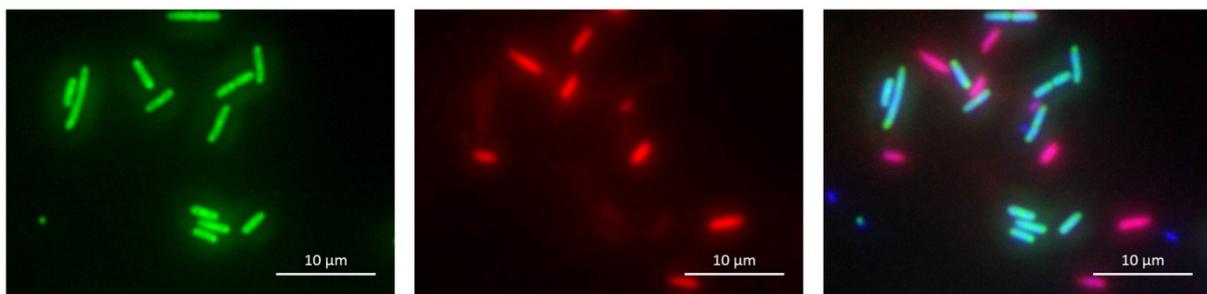


Abbildung 13: Differenzielle Unterscheidung von *E. coli* O157 und *S. enterica* Typhimurium in einem Gemisch

Grün: EcoliO157-FAM. Rot: Salment-TexasRed. Rechts: Merge aus FAM-, TexasRed und DAPI-Signal.

Die Testung der drei Sonden ergab also ein grundsätzlich gutes taxonomisches Auflösungsvermögen auf Gattungs- und Speziesebene. Analysen unterhalb dieser Ebenen sind dagegen häufig schwieriger durchzuführen bzw. nur in Kombination mit anderen FISH-Sonden.

Die Salmonellen gehören neben den Listerien zu der Erregergruppe mit den meisten publizierten FISH-Sonden. Die neu entwickelte *Salmonella*-Sonde Salment erwies sich in bioinformatischen Analysen als deutlich sensitiver als andere publizierte *Salmonella*-Sonden, bei gleichbleibend hoher Spezifität (Tabelle 17). Im Unterschied zu vielen bereits bekannten Sonden, die ebenfalls alle auf die 23S rRNA ausgerichtet sind, erkennt sie die für Menschen apathogene Spezies *S. bongori* nicht.

Tabelle 17: Vergleich von Salment mit anderen publizierten Sonden zur Detektion von *S. enterica*

Name der Sonde	Sequenz (Position 23S rRNA)	Abdeckung <i>Salmonella</i> (TestProbe)	Falsch positive Sequenzen (probeCheck)
Sal1 (Nordentoft <i>et al.</i> , 1997)	ACAGCACATGCGCTTTTGTG (340)	90,1 %	0 %
Sal3 (Rönner und Stackebrandt, 1994)	AATCACTTCACCTACGTG (1711)	86,1 %	0 %
Sal544 (Fang <i>et al.</i> 2003)	GCAGTCACACAGGTAAAC (544)	55,6 %	0 %
Salm-63 (Kutter <i>et al.</i> 2006)	TCGACTGACTTCAGCTCC (1736)	85,3 %	6,0 %
SalPNA1873 (Almeida <i>et al.</i> 2010)	AGGAGCTTCGCTTGC (1868)	90,0 %	0,3 %
Sal23S10 (Perry-O'Keefe <i>et al.</i> , 2001)	TAAGCCGGGATGGC (882)	92,7 %	65,2 %
Sal343 (Shimizu <i>et al.</i> , 2013)	GCTCACAGCACATGCGCTTTTG (342)	90,3 %	0 %
Salment (diese Arbeit)	ATGCGCTTTTGTGTACGGGGCTGT (329)	98,2 %	0 %

Die Sensitivität (Abdeckung der Zielspezies) wurde durch eine TestProbe-Analyse bestimmt, der Anteil falsch positiver Genustreffer (Anzahl der falsch positiven Genustreffer geteilt durch die Anzahl der Gesamttreffer) wurde mittels probeCheck-Analyse ermittelt. Datenstand: 24.03.2016

Die Sonde EcoliO157 nutzt die gleiche Region wie die von Almeida *et al.* (2013) vorgeschlagene und weist dementsprechend vergleichbare Sensitivitäten und Spezifitäten auf (Tabelle 35, Anhang). Auch die bereits publizierte *Brucella*-Sonde Bru-996 von Wellinghausen *et al.* (2006) war nur geringfügig weniger sensitiv als die neu entwickelte Sonde Bruc236 (Tabelle 18). Allerdings muss Bru-996 mit mindestens einem Kompetitor eingesetzt werden und besitzt im Gegensatz zu

Bruc236 häufig nur eine Nukleotidfehlpaarung zu Nicht-*Brucella* Spezies (Bru-996: 234 Treffer, 280 Sequenzen mit einer singulären Nukleotidfehlpaarung; Bruc236: 236 Treffer, 7 Sequenzen mit einer singulären Nukleotidfehlpaarung; probeCheck-Analyse) und ist daher weitaus anfälliger für falsch positive Hybridisierungen.

Tabelle 18: Vergleich der Sonde Bruc236 mit Bru-996

Name der Sonde	Sequenz (Position 16S rRNA)	Abdeckung <i>Brucella</i> (TestProbe)	Falsch positive Sequenzen (probeCheck)
Bru-996 (Wellinghausen <i>et al.</i> , 2006)	CCACTAACCGCGACCGGGATG (994)	93,7 %	0 %
Bruc236 (diese Arbeit)	TCCGGTCCAGCCTAACTGAAGGATAG (1018)	97,6 %	0 %

Die Sensitivität (Abdeckung der Gattung) wurde durch eine TestProbe-Analyse bestimmt, der Anteil falsch positiver Genustreffer (Anzahl der falsch positiven Genustreffer geteilt durch die Anzahl der Gesamttreffer) wurde mittels probeCheck-Analyse ermittelt. Datenstand: 24.03.2016

3.1.3 Entwicklung von FISH-Nachweisen für *Campylobacteraceae*

Für die Familie der *Campylobacteraceae* sollten drei Gruppen mit humanmedizinischer Bedeutung und Vorkommen im Lebensmittel gesondert erfasst werden: die Gruppe der thermophilen (und humanpathogenen) *Campylobacter* spp. (mehrere Spezies, aber nicht die Gesamtheit der Gattung *Campylobacter*), die Gattung *Arcobacter* und separat die darin inbegriffene Spezies *A. butzleri*. Die Sonde Campytherm erkannte zuverlässig alle getesteten thermophilen *Campylobacter*-Spezies (10 *C. jejuni*, 5 *C. coli*, 2 *C. lari*, 2 *C. upsaliensis*). Andere apathogene *Campylobacter* spp., Vertreter nahverwandter Gattungen wie *Arcobacter*, die häufig beim kulturellen Nachweis als störende Begleitflora auftreten, oder *Helicobacter* wurden nicht detektiert. Die Arcobac-Sonde erkannte alle vier getesteten Spezies *A. butzleri*, *A. skirrowii*, *A. cibarius* und *A. cryaerophilus*, nicht jedoch andere *Campylobacteraceae*. Arcobul, die mit 30 Nukleotiden längste Sonde, hybridisierte trotz der guten *in silico* Prognosen (Tabelle 36, Anhang) nicht nur mit der eigentlichen Zielspezies *A. butzleri*, sondern zeigte auch starke positive Signale bei anderen *Arcobacter*-Spezies. Daher wurde auf die mit 24 Nukleotiden deutlich kürzere Sonde Arcobull zurückgegriffen, dessen Verwendung mit einem leichten Sensitivitätsverlust einhergeht (Tabelle 36, Anhang). Arcobull weist außerdem teilweise nur einen

Nukleotidunterschied zu anderen *Arcobacter* sp. auf. In Verbindung mit zwei Kompetitoren, die perfekte Übereinstimmung zu der Sequenz der entsprechenden Nichtziel-*Arcobacter*-Spezies aufwiesen, konnte aber im Gegensatz zu Arcobul eine hohe Spezifität erreicht werden (Abbildung 14).

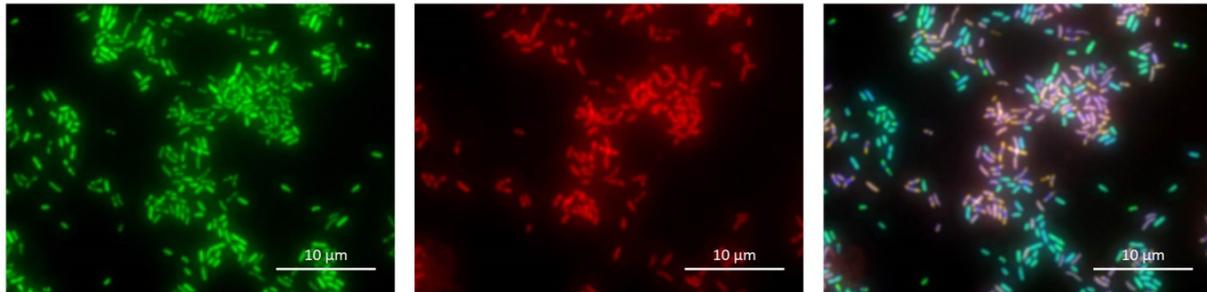


Abbildung 14: Differenzielle Erkennung von *A. butzleri* in einer Mischung von anderen *Arcobacter*-Spezies

Grün: Arcobac-FAM. Rot: Arcobull-TexasRed. Rechts: Merge aus FAM-, TexasRed- und DAPI-Signal.

Im Unterschied zu den getesteten Sonden für größere Enterobacteriaceae waren insbesondere die Intensitäten der Campytherm-Sonde deutlich schwächer. Multiplex-Nachweise von Salmonellen und thermophilen *Campylobacter* spp. waren zwar in Flüssigkulturen möglich (Abbildung 15), in Anwesenheit einer Hintergrundmatrix (z. B. von einem beprobten Lebensmittel) wäre dieser Nachweis aber deutlich schwieriger gewesen. Abbildung 15 zeigt, dass das im Vergleich zu *S. enterica* schwache Signal bei thermophilen *Campylobacter* spp. sowohl in der Spirillenform als auch bei einer kokkenförmigen Morphologie (ein Zustand mit deutlich verschlechterter Kultivierungsfähigkeit) vorhanden ist. Insbesondere bei der bedeutendsten humanpathogenen Spezies *C. jejuni* war das FISH-Signal schwach, während *C. lari* stärkere Signale produzierte.

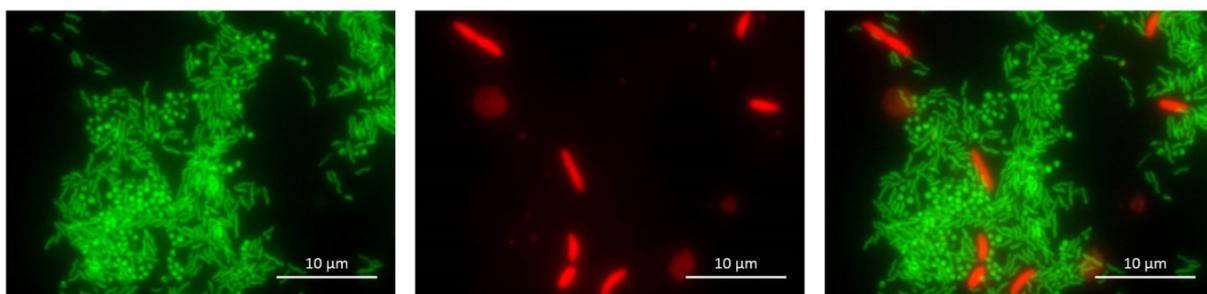


Abbildung 15: Multiplexnachweis von *S. enterica* und thermophilen *Campylobacter* spp. (Kokken- und Spirillenmorphologie)

Grün: Campytherm-FAM. Rot: Salment-TexasRed. Rechts: Merge aus FAM- und TexasRed-Signal.

Um das FISH-Signal steigern zu können, wurde der Einsatz weiterer Sonden erprobt. Fünf neue zusätzliche hochspezifische Sonden, die ebenfalls auf die 23S rRNA gerichtet sind, konnten abgeleitet werden: Campy268, Campy696, Campy835, Campy1508, Campy2124 (die Nummern beziehen sich dabei auf die Position in der 23S rRNA). Im Gegensatz zur Sonde Campytherm, die eine sehr gute Abdeckung aller thermophilen *Campylobacter* spp. ermöglicht, sind diese fünf Sonden zwar ebenfalls sehr spezifisch, decken aber nicht alle thermophilen Spezies ab, sondern primär die beiden mit Abstand wichtigsten Spezies *C. jejuni* und *C. coli* (Tabelle 19).

Tabelle 19: Stammabdeckung der zusätzlichen FISH-Sonden für thermophile *Campylobacter* spp.

Sondenname	Treffer für thermophile <i>Campylobacter</i> (probeCheck)	Fehlende Sequenzen
Campytherm	99,1 % (113/114)	1 <i>C. jejuni</i>
Campy268	90,4 % (103/114)	1 <i>C. jejuni</i> , 10 <i>C. lari</i>
Campy696	86,8 % (99/114)	10 <i>C. lari</i> , 3 <i>C. upsaliensis</i> , 2 <i>C. canadensis</i>
Campy835	78,9 % (90/114)	19 <i>C. lari</i> , 3 <i>C. upsaliensis</i> , 2 <i>C. canadensis</i>
Campy1508	92,1 % (105/114)	6 <i>C. lari</i> , 2 <i>C. canadensis</i> , 1 <i>C. coli</i> (Speziesklassifizierung nicht eindeutig)
Campy2124	78,9 % (90/114)	1 <i>C. jejuni</i> , 1 <i>C. coli</i> , 18 <i>C. lari</i> , 2 <i>C. upsaliensis</i> , 2 <i>C. canadensis</i>

23S rRNA Datenbankabfrage am 20.07.2016: 114 Treffer insgesamt mit 72 *C. jejuni*, 17 *C. coli*, 19 *C. lari*, 3 *C. upsaliensis*, 2 *C. canadensis* und 1 *Campylobacter* spp. (vermutlich *C. coli*).

Trotz dieser Einschränkungen in der Stammabdeckung konnte sichergestellt werden, dass auch die weniger bedeutsamen Spezies *C. lari*, *C. upsaliensis* und *C. canadensis* von mindestens zwei bis drei der sechs Sonden erkannt werden. Zur Bestimmung der Signalintensität wurden die Sonden einzeln und in verschiedenen Kombinationen an Kulturen von *C. jejuni* getestet (Abbildung 16).

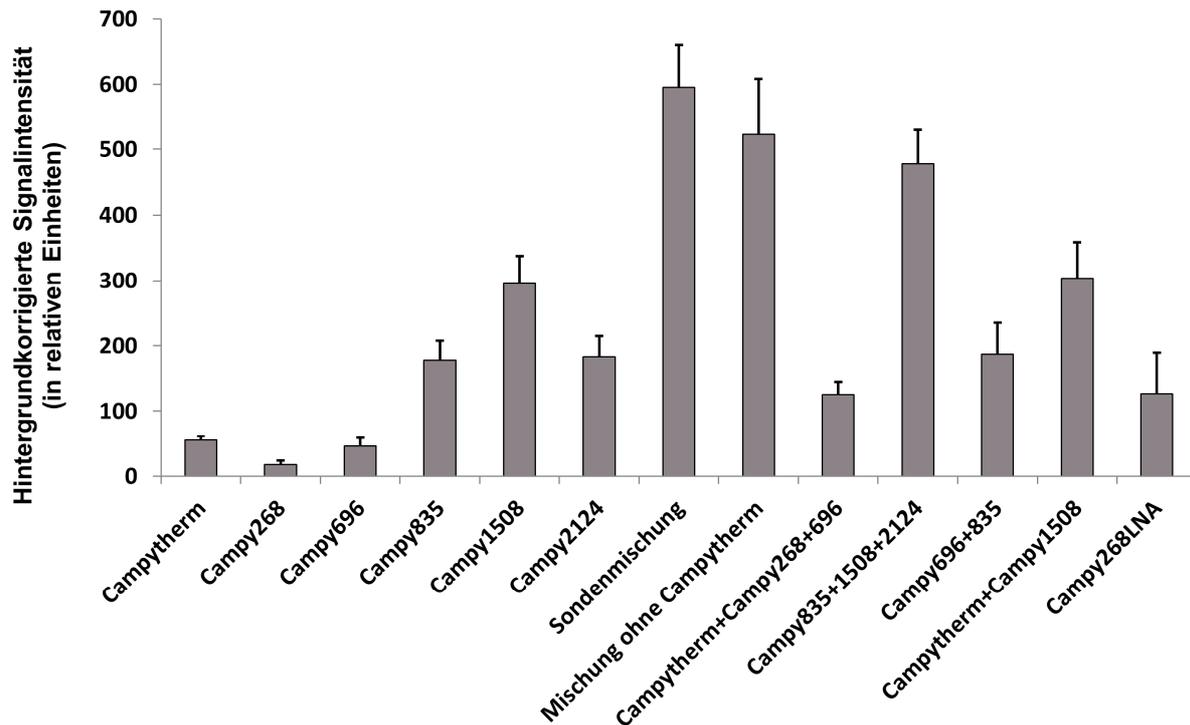


Abbildung 16: Signalintensitäten der einzelnen auf thermophile *Campylobacter* spp. gerichteten FISH-Sonden und von verschiedenen Sondenkombinationen

Die letzte Säule zeigt die LNA-modifizierte Sonde Campy268LNA. Für jede Messung wurde von 15 Zellen die Signalintensität gemessen und mit der Hintergrundfluoreszenz verrechnet. Alle Werte sind als Durchschnitt mit der jeweiligen Standardabweichung angegeben.

Trotz ähnlicher thermodynamischer Affinitäten *in silico* (mathFISH-Analyse) variierten die Signale *in vitro* sehr stark zwischen den einzelnen Sonden. Campy835, Campy1508 und Campy2124 produzierten zwei- bis dreimal so hohe Signalintensitäten wie Campytherm, Campy696 zeigte eine vergleichbare Intensität wie Campytherm und durch den Einsatz von Campy268 konnten nur extrem schwache Signale erreicht werden.

Alle sechs Sonden kombiniert erreichten ein bis zu 10-fach verstärktes FISH-Signal. Nahe benachbarte Sonden wie Campy1508 und die nur 14 Nukleotide entfernte Sonde Campytherm scheinen sich dabei nur wenig zu beeinflussen. Alle getesteten Sondenkombinationen zeigten additive Effekte, allerdings waren die kombinierten FISH-Signale systematisch etwas schwächer als die Summe der Einzelsignale. Eine eingehendere thermodynamische Analyse der Erkennungssequenz von Campy268 ergab, dass die Zielregion in der 23S rRNA in diesem Bereich besonders starke intramolekulare Bindungen ausbildet und daher besonders schlecht zugänglich ist. Gleichzeitig bildet die Sonde selbst starke intramolekulare Strukturen aus. Um das

Signal von Campy268 zu steigern, wurden daher zwei Strategien getestet: Zum einen eine LNA-Sonde (Campy268LNA) mit drei eingebauten LNA-Nukleotiden und derart gekürzt, dass Haarnadelstrukturen und Eigendimere weniger thermodynamisch begünstigt sind, zum anderen Helfersonden, die in den flankierenden Regionen binden und die rRNA-Sekundärstrukturen aufbrechen sollten.

Während Helfersonden weder für Campy268 noch für Campytherm und Campy835 eine signifikante Verbesserung bewirkten, konnte die LNA-Sonde eine mehr als siebenfache Signalverstärkung herbeiführen und produzierte dadurch mehr als doppelt so helle Signale wie Campytherm oder Campy835 (Abbildung 16). Bisher sind für thermophile *Campylobacter* und *Arcobacter* spp. nur wenige FISH-Nachweise etabliert worden. Für beide Erregergruppen konnten Sonden mit teils deutlich höheren Sensitivitäten und Spezifitäten hergeleitet werden (siehe Tabelle 20 und 21).

Tabelle 20: Vergleich der Sonde Campytherm mit anderen publizierten FISH-Sonden zum Nachweis von thermophilen *Campylobacter* spp.

Name der Sonde	Sequenz (Position 23S rRNA)	Abdeckung thermophiler <i>Campylobacter</i> (TestProbe)	Falsch positive Sequenzen (probeCheck)
CAJECO1427 (Schmid <i>et al.</i> , 2005)	AGCCCTAAGCGTCCTTCC (1420)	98,0 %	0 %
Catherm (Poppert <i>et al.</i> , 2008)	GCCCTAAGCGTCCTTCCA (1419)	98,0 %	0 %
CJE195 (Lehtola <i>et al.</i> , 2005)	CCCTACTCAACTTGT (Position 186 in der <u>16S RNA</u>)	84,0 %	0 %
Campytherm (diese Arbeit)	CTTAGCCCTAAGCGTCCTT (1422)	99,7 %	0 %

Die Sensitivität (Abdeckung der Speziesgruppe) wurde durch eine TestProbe-Analyse bestimmt, der Anteil falsch positiver Genustreffer (Anzahl der falsch positiven Genustreffer geteilt durch die Anzahl der Gesamttreffer) wurde mittels probeCheck-Analyse ermittelt. Datenstand: 24.03.2016

Tabelle 21: Vergleich der Sonde Arcobac mit anderen publizierten FISH-Sonden zum Nachweis von *Arcobacter* spp.

Name der Sonde	Sequenz (Position 16S rRNA)	Abdeckung <i>Arcobacter</i> (TestProbe)	Falsch positive Sequenzen (TestProbe)
ARC94 (Snaidr <i>et al.</i> , 1997)	TGCGCCACTTAGCTGACA (93)	72,5 %	5,3 %
ARC1430 (Snaidr <i>et al.</i> , 1997)	TTAGCATCCCCGCTTCGA (1429)	72,8 %	11,7 %
Arcobac	ACCAGAAATTCCATCTACCTCT (662)	91,5 %	1,5 %

Die Sensitivität (Abdeckung der Gattung) wurde durch eine TestProbe-Analyse bestimmt, der Anteil falsch positiver Genustreffer (Anzahl der falsch positiven Genustreffer geteilt durch die Anzahl der Gesamttreffer) wurde auf Grund der eingeschränkten Datenlage in probeCheck ebenfalls durch eine TestProbe-Analyse ermittelt. Datenstand: 24.03.2016

3.1.4 Entwicklung von FISH-Nachweisen für *Listeria* spp.

Für die zu den Firmicutes gehörende grampositive Gattung der Listerien sollten zwei FISH-Nachweissysteme entwickelt werden, eines für *Listeria* spp. als Hygieneindikator und eines für die humanpathogene Spezies *L. monocytogenes*. Das in dieser Arbeit für gramnegative Bakterien angewandte FISH-Protokoll lieferte für *Listeria* spp. nur sehr geringe FISH-Signale, sowohl für die spezifischen Sonden wie auch für die bakterielle Universalsonde EUB338. Daher wurde ein in der Literatur beschriebenes Fixierungsverfahren angewendet (Parsley *et al.*, 2010), das eine Fixierung mit Ethanol vorsieht (vergleiche Abschnitt 2.2.3.1.2). Durch dieses Verfahren konnten viele Listerien effizienter angefärbt werden. Abbildung 17 zeigt aber das sogenannte „Kirchenfensterphänomen“ einer unvollständigen Permeabilisierung einer Bakterienkultur, in dem einige Zellen sehr stark angefärbt werden, während andere nur schwache Signale zeigen. Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit den Brucellen konnte selbst die kurze bakterielle Universalsonde EUB338 nicht in alle Zellen einer Listerienkultur eindringen. Daher wurde, wie bereits für die Brucellen erprobt, vor der Hybridisierung noch ein Lysozymverdau vorgenommen, um das Eindringen der Sonden zu erleichtern. Lysozymverdau und Ethanolfixierung zusammen führten schließlich zu einer homogenen FISH-Anfärbung aller Listerienspezies. Die Morphologie der Zellen wurde durch die Lysozymbehandlung nur leicht verändert (Abbildung 17).

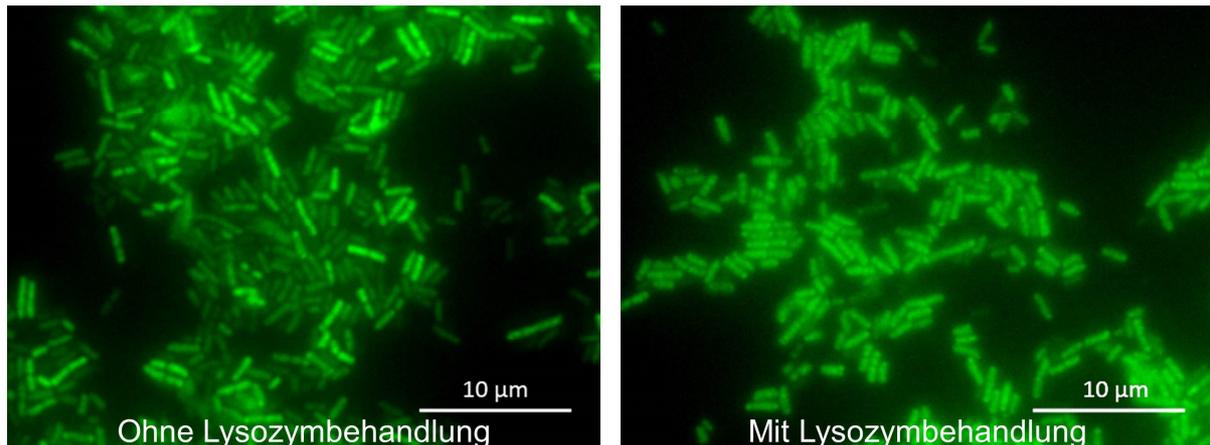


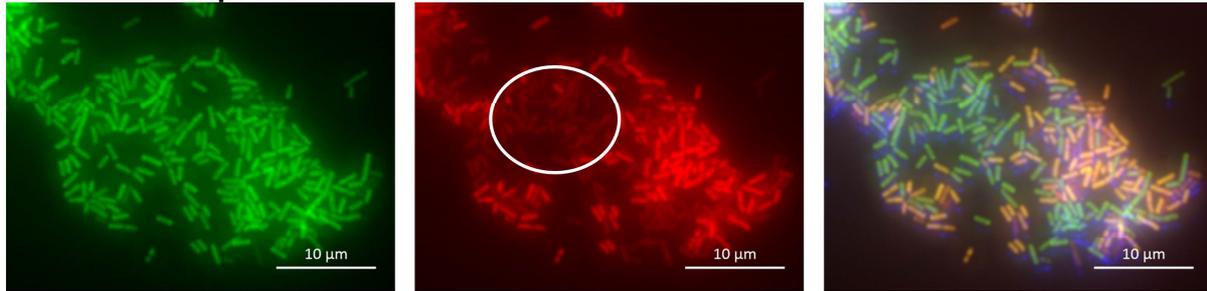
Abbildung 17: Einfluss der Permeabilisierung von Ethanolfixaten auf *L. monocytogenes*

Links: Ohne Lysozym mit „Kirchenfensterphänomen“. Rechts: Mit Lysozym und einer homogenen Anfärbung. Zur Visualisierung von schlecht permeabilisierten Zellen wurde das Präparat ohne Lysozymbehandlung länger belichtet.

Grün: Listall-FAM.

Die Sonde Listall erkannte alle acht getesteten Spezies (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. marthii*, *L. grayi* und *L. rocourtiae*). Die Sonde Listmono zur spezifischen Erkennung von *L. monocytogenes* wurde zunächst mit einem DNA-Kompetitor eingesetzt, der jedoch nicht ausreichte, um die Sequenzen der anderen Listerienspezies, die sich nur in einem Nukleotid unterscheiden, von einer Hybridisierung mit Listmono auszuschließen. Daher wurde die Kompetitorsequenz mit einem LNA-Baustein an der betreffenden Mismatchposition modifiziert, um die gewünschte Trennschärfe zu erreichen (Abbildung 18). Die Sonde Listmono unterschied danach korrekt zwischen *L. monocytogenes* und anderen Listerien, mit Ausnahme von *L. marthii*, einer erst kürzlich beschriebenen, sehr eng verwandten Art von *L. monocytogenes*.

Mit DNA-Kompetitor



Mit LNA-Kompetitor

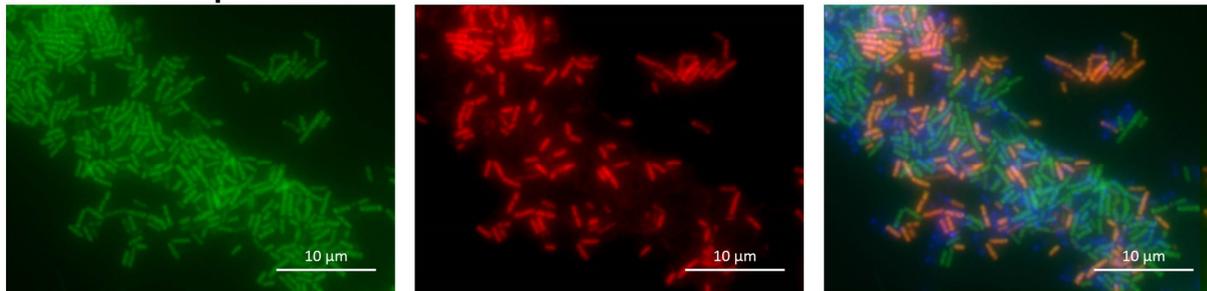


Abbildung 18: Differenzierung zwischen *L. monocytogenes* und *L. innocua* in einer Bakterienmischung

Oben: mit DNA-Kompetitor Kompmono. Der markierte Bereich zeigt beispielhaft die schwache falsch positive Bindung von Listmono an *L. innocua*. Unten: mit LNA-Kompetitor und ohne Kreuzreaktivitäten. Grün: Listall-FAM. Rot: Listmono-TexasRed. Rechts: Merge aus FAM-, TexasRed- und DAPI-Signal.

Bei den Anfärbungen der Listerienstämmen wurde weiterhin deutlich, dass, im Gegensatz zu den Enterobacteriaceen, eine Zellzählung über die parallel durchgeführte DAPI-Färbung andere Ergebnisse lieferte als die FISH-Färbung, da Listerien häufig zwei distinkte Regionen mit hoher DNA-Konzentration (bzw. starken DAPI-Signalen) innerhalb einer Zelle aufwiesen, die leicht mit zwei kleineren Zellen zu verwechseln waren (Abbildung 19).

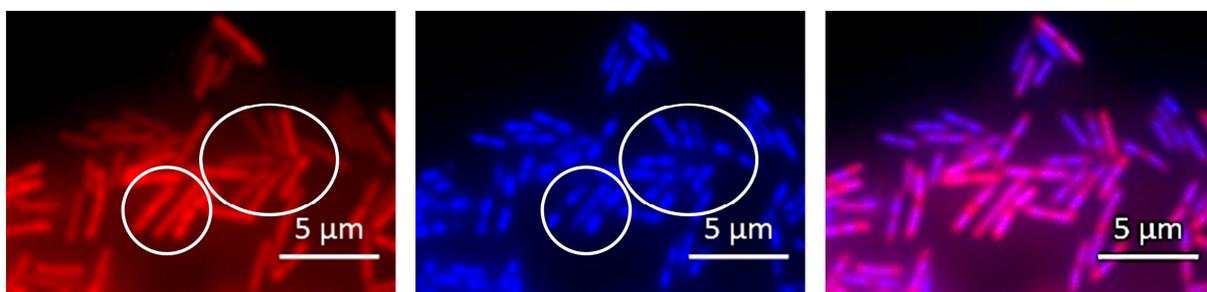


Abbildung 19: FISH- und DNA-Färbung von *L. monocytogenes*

Die markierten Bereiche zeigen beispielhaft die unterschiedlichen Ergebnisse, die sich aus Zellzählungen basierend auf einer FISH- bzw. einer DAPI-Färbung von *Listeria* spp. ergeben können. Rot: EUB338. Blau: DAPI. Rechts: Merge aus TexasRed- und DAPI-Signal.

Für *L. monocytogenes* und *Listeria* spp. sind zusammen mit *S. enterica* die meisten FISH-Nachweise etabliert worden. Während die Sensitivität bei den meisten Sonden vergleichbar ist, zeigte ein bioinformatischer Vergleich, dass Listmono hinsichtlich der Spezifität eine deutlich bessere *in silico* Leistungsfähigkeit aufweist (Tabelle 22, Listall siehe Tabelle 37, Anhang).

Tabelle 22: Vergleich der Sonde Listmono mit anderen publizierten Sonden zum Nachweis von *L. monocytogenes*

Name der Sonde	Sequenz (Position 16S rRNA)	Abdeckung <i>L. monocytogenes</i> (TestProbe)	Falsch positive Sequenzen (probeCheck)
RL-2 (Wang <i>et al.</i> , 1991)	ATAGTTTTATGGGATTAGC (1275)	90,0 %	20,1 %
RL-1 (Wang <i>et al.</i> , 1991)	CTTTGTACTATCCATTGTA (1234)	90,0 %	32,5 %
mRL-2 (Fuchizawa <i>et al.</i> , 2009)	AGAATAGTTTTATGGGATTAGCT CCACC (1269)	90,0 %	19,8 %
Lm-16S-2 (Zhang <i>et al.</i> , 2012)	TAGTACAAAGGGTCCG (1243)	90,0 %	6,1 %
Lm-16S-3 (Zhang <i>et al.</i> , 2012)	CGAATGATAAAGTGT (175)	70,0 %	0 %
Lm-16S-4 (Zhang <i>et al.</i> , 2012)	CGCATGCCACGCTTT (185)	74,4 %	2,3 %
Lmono (Moreno <i>et al.</i> , 2011)	CTATCCATTGTAGCACGTG (1227)	91,1 %	77,6 %
Listmono (diese Arbeit)	CGACCCTTTGTA CTATCCATTG G (1236)	90,0 %	0 %

Die Sensitivität (Abdeckung der Speziesgruppe) wurde durch eine TestProbe-Analyse bestimmt, der Anteil falsch positiver Genustreffer (Anzahl der falsch positiven Genustreffer geteilt durch die Anzahl der Gesamtreffer) wurde mittels probeCheck-Analyse ermittelt. Datenstand: 24.03.2016

3.1.5 Entwicklung von FISH-Nachweisen für *Yersinia* spp.

Die Gattung der Yersinien umfasst neben einer Vielzahl harmloser Spezies auch die drei humanpathogenen Spezies *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis*, die differenziell durch FISH erfasst werden sollten. Das Sondendesign wurde hier insbesondere dadurch erschwert, dass zum einen auf der Ebene der 16S und 23S rRNA die verschiedenen Yersinienspezies sehr ähnlich sind und zum anderen für die apathogenen Spezies häufig nur wenige Sequenzen vorliegen. In der

Literatur beschäftigten sich bisher nur die Arbeiten von Kenny *et al.* (2008) und Trebesius *et al.* (1998) mit dem FISH-Nachweis von pathogenen Yersinien. In beiden Arbeitsgruppen gelang es aber nicht, die drei humanpathogenen Spezies effizient zu unterscheiden. So konnten durch Trebesius *et al.* keine spezifischen FISH-Sonden entworfen werden bzw. die von Primern abgeleiteten Sonden zeigten keine Signale. Kenny *et al.* entwickelten einen Nachweis auf mRNA-Ebene, der jedoch nur bei bestimmten Vorkultivierungstemperaturen bzw. bei ausreichenden mRNA-Konzentrationen messbare Signale lieferte.

Dennoch konnte auf der Grundlage bestehender Sequenzsammlungen in dieser Arbeit eine Sequenz in der 23S RNA abgeleitet werden (YersEco23), die bis auf einen Stamm von *Y. rohdei* gute theoretische Spezifitäten aufwies. Die Sonde YersEco23 erwies sich jedoch in der Praxis als ungeeignet, da es zu starken Kreuzreaktivitäten mit den apathogenen Yersinienspezies *Y. kristensenii*, *Y. aldovae*, *Y. frederiksenii*, *Y. mollaretii*, *Y. intermedia* und *Y. rohdei* kam. Die Sequenzierung der 23S rRNA ergab bei diesen Yersinien jeweils nur einen Nukleotidunterschied zur Sondensequenz von YersEco23 (bei *Y. aldovae* 2 Nukleotidaustausche), bei *Y. kristensenii* wurde eine komplette Übereinstimmung mit YersEco23 gefunden. Weitere Sequenzvergleiche auf der Ebene von 16S und 23S rRNA identifizierten keine Zielsequenzen, die einerseits in allen *Y. enterocolitica* Stämmen vorhanden sind, andererseits bei keiner anderen Spezies von *Yersinia* spp. oder bei anderen Gattungen. Allerdings konnte eine hypervariable Region in der 16S rRNA identifiziert werden, für die es innerhalb der Spezies *Y. enterocolitica* zwei Varianten gibt und die gleichzeitig bisher in keiner anderen *Yersinia*-Spezies gefunden wurde. Auch innerhalb anderer *Yersinia*-Spezies gibt es in dieser hypervariablen Region unterschiedliche Sequenzsubtypen, zum Beispiel bei *Y. frederiksenii*, *Y. aldovae*, *Y. kristensenii*, *Y. intermedia*, *Y. mollaretii* und *Y. rohdei*. Dieser Di- oder sogar Polymorphismus vieler Spezies in dieser hypervariablen 16S rRNA-Region wurde bereits von Neubauer *et al.* (2000) beschrieben und veranlasste damals die Autoren dazu, die Stämme von *Y. enterocolitica* in die amerikanischen *Y. enterocolitica* subsp. *enterocolitica* und euroasiatischen *Y. enterocolitica* subsp. *palaearctica* zu unterteilen. Analog dazu wurden daher unter Ausnutzung dieser spezifischen Sequenzregion zwei Sonden für *Y. enterocolitica* entworfen (YersEco16 und YersEco116), die als Gemisch beide Untergruppen von *Y. enterocolitica* abdecken. Auch bei der Verwendung dieser Sonden traten schwache Kreuzreaktivitäten auf, die

durch drei Kompetitoren (YersEcol16-Komp, YersEcol16LNA-Komp, YersEcol16Komp2MM) vollständig unterdrückt werden konnten. Da falsch negative Hybridisierungen mit Nichtzielstämmen auf Grund der geringen Verfügbarkeit von ribosomalen *Yersinia*-Sequenzen nicht auszuschließen waren, wurde auf beide Sequenzen zurückgegriffen: Das bedeutet, dass jedes Hybridisierungssignal mit der Mischung aus YersEcol16 und YersEcol16 nur dann als tatsächlich positiv gewertet wird, wenn die Bestätigungssonde YersEco23 ebenfalls positive Ergebnisse liefert (entweder in einem anderen Fluoreszenzkanal oder aber in einem separaten Ansatz).

Zur gleichzeitigen Erkennung von *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* wurde auf dasselbe Prinzip der (*in silico*) hochspezifischen Screeningsonde und ihrer etwas weniger genauen Bestätigungssonde zurückgegriffen, da auch hier die Existenz von Nichtzielstämmen mit identischer Sondenerkennungssequenz nicht ausgeschlossen werden konnte. Die Sonde YersPseu23 (Bindung an eine Sequenz in der 23S rRNA) besitzt in der Theorie eine hohe Spezifität und in Kombination mit dem Kompetitor YersPseu23-Komp konnte keine Kreuzreaktivität mit anderen Yersinien festgestellt werden. Bei den Untersuchungen von Bakterienisolaten aus Hackfleischproben zeigten sich aber Kreuzreaktivitäten mit *Serratia* spp. Um diese zu vermeiden, wurden sechs Kompetitoren entwickelt, die die Spezies *S. fonticola*, *S. marcescens*, *S. proteamaculans*, *S. liquefaciens*, *S. plymuthica* und *S. nematodiphila* blockieren sollten. Die sechs Kompetitoren wurden zu einem *Serratia*-Kompetitorgemisch vereinigt und so im Hybridisierungspuffer eingesetzt, dass jeder Kompetitor halb so stark konzentriert vorlag wie die Sonde YersPseu23. Als Bestätigungssonde für YersPseu23 diente hier die zweite für *Y. pseudotuberculosis* entwickelte Sonde YersPseu16 (Bindung an eine Sequenz in der 16S rRNA). Diese erkennt neben *Y. pseudotuberculosis* auch die Spezies *Y. similis* und einige andere Nichtzielstämme.

Der Einsatz von zahlreichen Kompetitoren hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Stärke des FISH-Signals oder auf die Hybridisierungseffizienz. Trotz der eher langsamen Wachstumsgeschwindigkeit und einer deshalb denkbaren geringeren Ribosomenzahl waren die FISH-Signale von allen drei pathogenen Yersinienstämmen ähnlich stark wie die von anderen, schnell wachsenden Enterobacteriaceen (Abbildung 20).

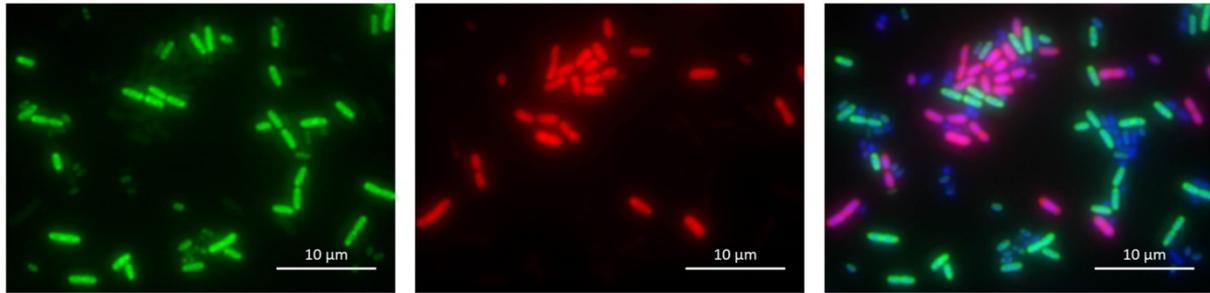


Abbildung 20: Differenzielle Erkennung pathogener Yersinien in einem Gemisch von *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* und *S. enterica*

Grün: YersEco23S-FAM. Rot: YersPseu23S-TexasRed. Rechts: Merge aus FAM-, TexasRed- und DAPI-Signal.

Die beiden eng verwandten Spezies *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis*, deren phylogenetische Trennung erst vor einem evolutionär gesehen sehr kurz zurückliegenden Zeitpunkt stattgefunden hat, weisen in ihrer 16S und 23S Sequenz eine fast vollständige Sequenzidentität auf und gelten daher auf ribosomaler Ebene als *de facto* nicht unterscheidbar.

Es konnten keine Sequenzen in *Y. pestis* gefunden werden, die nicht auch in einigen Stämmen von *Y. pseudotuberculosis* zu finden sind. Ein eingehender Vergleich der ribosomalen Genkopien (in *Yersinia* zwischen sechs und sieben pro Genom) ergab jedoch, dass in *Y. pseudotuberculosis* zwei ribosomale Genvarianten zu finden sind (hier Variante „C“ und Variante „T“ genannt), während in (bisher sequenzierten) Stämmen von *Y. pestis* nur die Variante „C“ vorkommt. Alle Stämme von *Y. pseudotuberculosis* besitzen ribosomale Gene der Variante „T“ und einige außerdem die Variante „C“, aber niemals nur die Variante „C“ wie dies bei Stämmen von *Y. pestis* der Fall ist (Abbildung 21). Die beiden Genvarianten unterscheiden sich lediglich in einem Nukleotid in der Position 1533 der 23S rRNA.

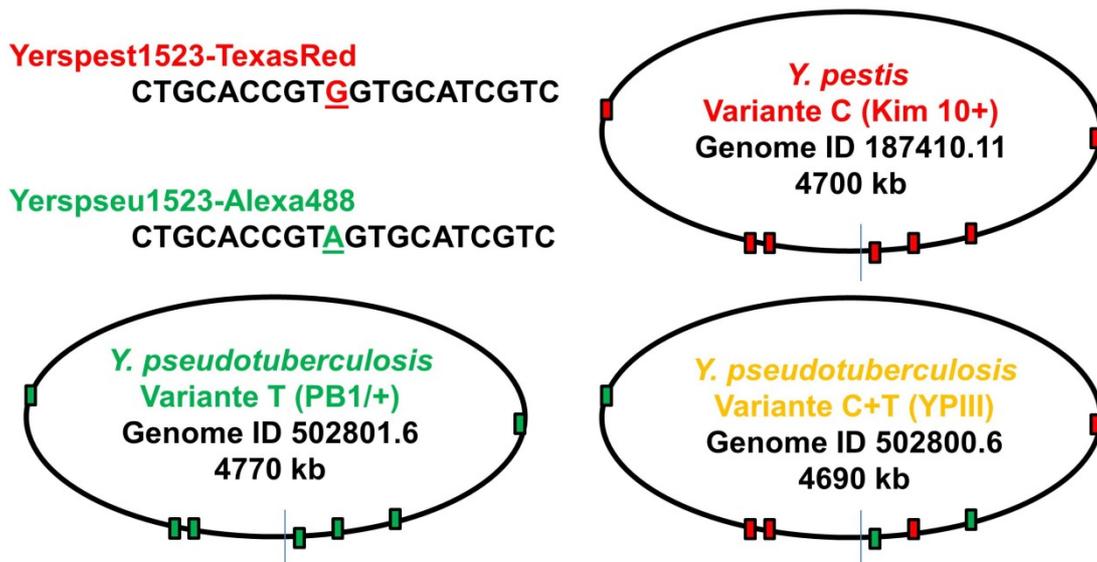


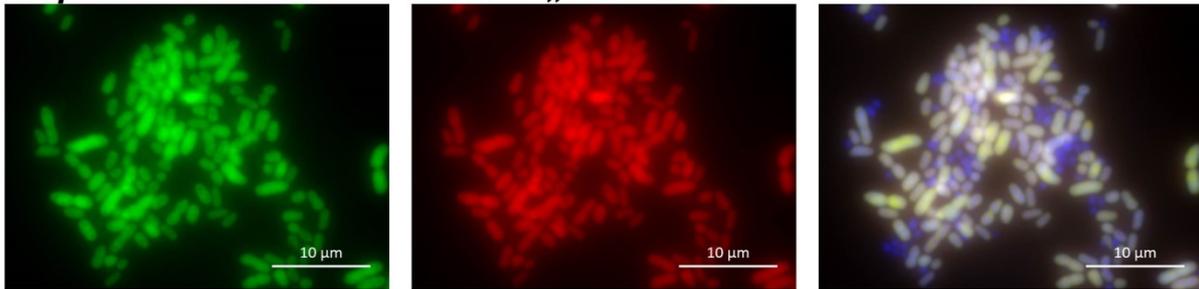
Abbildung 21: 23S rRNA-Genvarianten in *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*

Grüne Kästchen zeigen die Genvariante „T“ an, rote Kästchen die Variante „C“. Sequenzen, Genomgrößen und die Positionen der Gene sind aus der PATRIC-Datenbank (Wattam *et al.*, 2014) entnommen. Die unterstrichenen und rot- oder grünmarkierten Positionen der Sondensequenzen zeigen die Positionen der LNA-Bausteine.

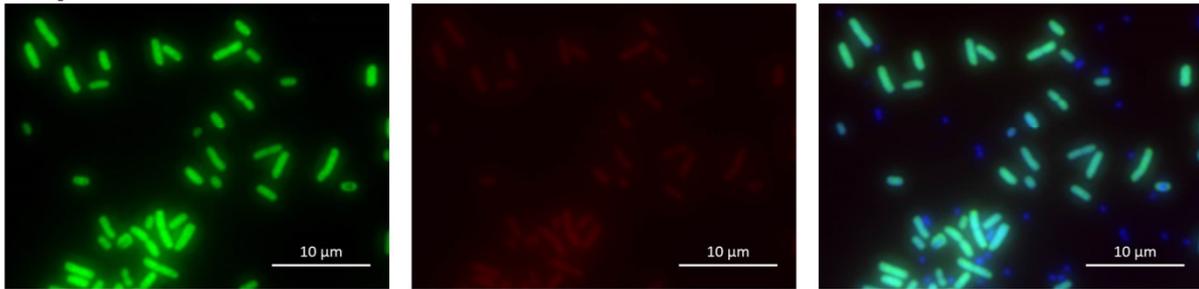
Auf der Grundlage dieses singulären Unterschiedes konnte ein Assay zur Unterscheidung der beiden Spezies aufgestellt werden. Yerspest1523-TexasRed färbt alle Stämme von *Y. pestis* rot sowie einige Stämme von *Y. pseudotuberculosis*, während Yerspseu1523-Alexa488 ausschließlich *Y. pseudotuberculosis* grün färbt. Unter dem Mikroskop erscheinen daher alle *Y. pestis* Stämme rot und alle *Y. pseudotuberculosis* Stämme grün oder gelb (Überlagerung des roten und grünen Kanals), aber niemals nur rot (Abbildung 22).

Jede der beiden Sonden stellt gleichzeitig auch den Kompetitor für die andere dar. Der einzige Nukleotidunterschied zwischen den beiden Sonden wurde durch den Einbau eines LNA-Bausteins stärker hervorgehoben (Abbildung 21). Im Unterschied zu allen anderen entwickelten FISH-Sonden war es hier nicht möglich, die Formamidkonzentration auf 15 % einzustellen. Experimentell wurde eine ideale Abgrenzung zwischen beiden Spezies erst ab einer Formamidkonzentration von 50 % erreicht.

***Y. pseudotuberculosis* Variante „C+T“**



***Y. pseudotuberculosis* Variante „T“**



***Y. pestis* Variante „C“**

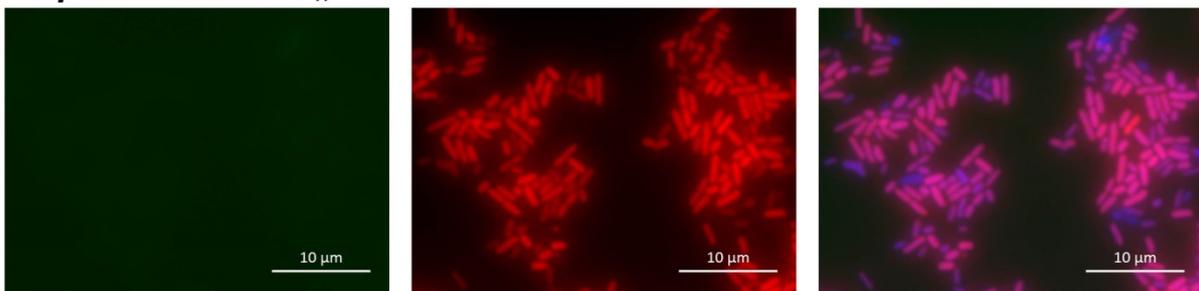


Abbildung 22: Unterscheidung von *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis*

Oben: *Y. pseudotuberculosis* 21 (unterschiedliche 23S Gene: Variante „C+T“). Mitte: *Y. pseudotuberculosis* 41 (identische 23S Gene: Variante „T“). Unten: *Y. pestis* (Variante „C“).
Grün: Yerspseu1523-Alexa488. Rot: Yerspest1523-TexasRed. Rechts: Merge aus Alexa488-, TexasRed- und DAPI-Signal.

Um zusätzlich noch die Gesamtheit aller Yersinien als weitere Kontrolle (hier allerdings auf Genusebene) für die Identifizierung in Lebensmittelproben mit hohen Keimbelastungen (z. B. Hackfleisch) erfassen zu können, wurde eine Microarrayzielsequenz von Demaneche *et al.* (2008) als FISH-Sonde Yersall-Demaneche getestet. Alle Yersinienstämme zeigten starke Fluoreszenzsignale; probeCheck- und mathFISH-Analysen ließen aber Kreuzreaktivitäten mit anderen Genera vermuten, sodass vier Kompetitoren abgeleitet wurden (Yersall-Demaneche-Kompl-IV, siehe Abschnitt 2.1.4.3).

3.2 Methodische Optimierungen des FISH-Protokolls am Beispiel von *Yersinia* spp.

Yersinien wachsen im Vergleich zu vielen anderen lebensmittelassoziierten, bakteriellen Pathogenen (z. B. anderen Enterobacteriaceae wie Salmonellen oder *E. coli*) relativ langsam. Nachweissysteme für *Yersinia* spp., die auf der kulturellen Voranreicherung beruhen, sind daher besonders zeitaufwändig. Sowohl der Direktnachweis ohne Anreicherung als auch Maßnahmen zur Zeiteinsparung im FISH-Protokoll sind deshalb besonders wünschenswert und sollten an dieser Erregergruppe (und auch exemplarisch für andere Erreger) optimiert werden.

3.2.1 Schnellfixierung mit Ethanol

Die Probenfixierung nimmt einen beträchtlichen Zeitanteil im FISH-Protokoll ein. Wie sich in den vorhergehenden Versuchen für *Listeria* spp. gezeigt hatte, ist die Ethanolfixierung eine schnelle (und für grampositive Bakterien unabdingbare) Alternative zur herkömmlichen Fixierungsmethode mit Formaldehyd (bzw. Paraformaldehyd). Für viele Enterobacteriaceae (und gramnegative Bakterien im Allgemeinen) ist die Formaldehyd-Methode in der FISH-Literatur als Methode der Wahl beschrieben (Amann *et al.*, 1995; Parsley *et al.*, 2010). Um zu evaluieren, ob die Ethanolschnellfixierung (mit einer Zeitersparnis von mehr als zwei Stunden) auch für die gramnegativen Yersinien eine mögliche Alternative darstellt, wurde geprüft, inwieweit diese Art der Fixierung vergleichbare FISH-Signale liefert und eine vollständige Inaktivierung der Bakterien bewirkt. Tatsächlich ergaben sich keine Unterschiede zwischen beiden Methoden und eine Lagerungszeit von 1 min in Ethanol reichte aus, dass *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* ihre Kultivierungsfähigkeit vollständig verloren hatten. Auf Grund der gleichwertigen Ergebnisse konnte diese Schnellmethode zur Fixierung für alle folgenden Untersuchungen genutzt werden.

3.2.2 Etablierung eines Direktnachweises mit verbesserter Lebend/Tot-Unterscheidung

Ein Direktnachweis setzt voraus, dass das Signal von lebenden Zellen auch im Ruhezustand und bei Lagerung unter Kühschrankbedingungen möglich ist. Außerdem ist eine möglichst genaue Differenzierung zwischen lebenden und toten Bakterien erforderlich.

Kulturen von *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* wurden zur Untersuchung der Signalstabilität in drei verschiedenen Medien mit unterschiedlichem Nährstoffgehalt (PBS, Peptonwasser und LB) bei Kühlschranktemperatur für fünf Wochen gelagert. Die Kultivierungsfähigkeit von beiden Spezies blieb in PBS über den Untersuchungszeitraum erhalten und in Peptonwasser und LB kam es bei 4 °C zu einer stetigen Vermehrung der Yersinien. Das FISH-Signal in PBS sank innerhalb von diesen fünf Wochen um etwa zwei Drittel ab und die Zellen reduzierten ihre Größe schrittweise, aber alle Bakterien blieben deutlich erkennbar unter dem Mikroskop (Abbildung 23).

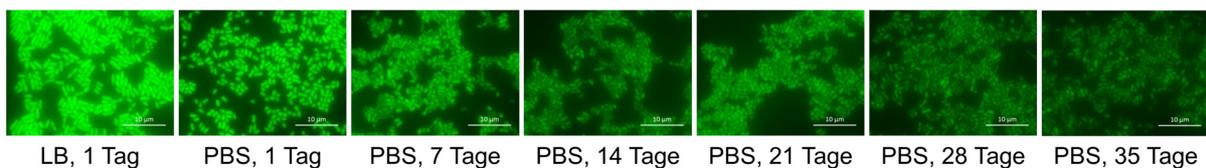
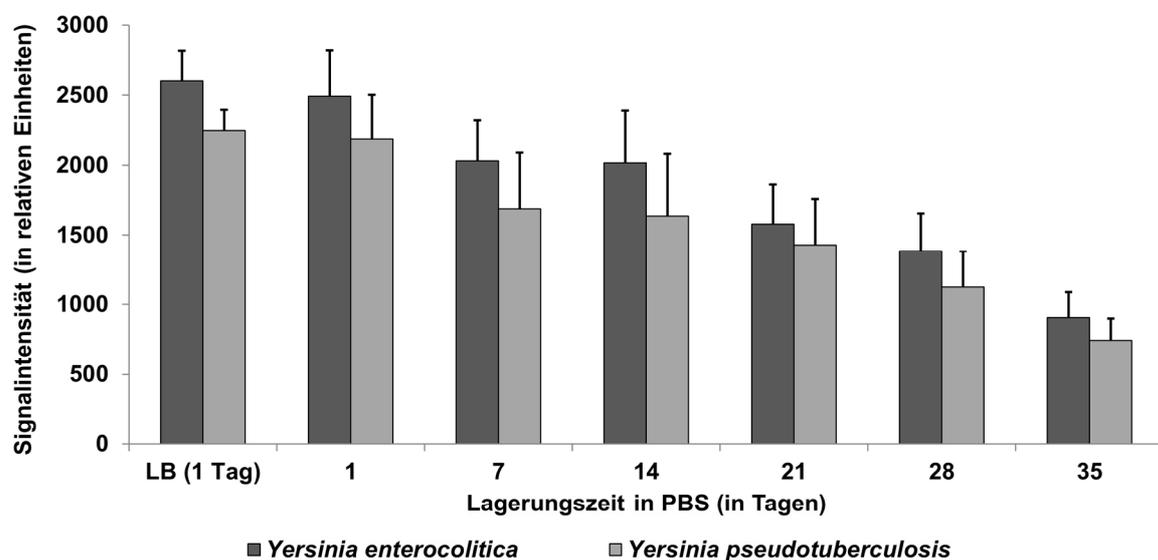


Abbildung 23: Stabilität des FISH-Signals von *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* bei Lagerung bei 4 °C

Oben: Quantifizierung des zeitlichen Verlaufes des FISH-Signals von *Y. enterocolitica* (dunkle Säulen) und *Y. pseudotuberculosis* (helle Säulen). Unten: exemplarische Aufnahmen der FISH-gefärbten Zellen nach Lagerung für einen Tag in LB beziehungsweise nach einem Tag in PBS oder nach 1, 2, 3, 4, 5 Wochen in PBS.

Grün: Yersall-DemanecheAlexa488.

Zur Überprüfung der Lebend/Tot-Differenzierung wurden *Yersinia*-Kulturen bei 80 °C hitzeinaktiviert, sofort fixiert und die Intensität des verbleibenden FISH-Signals untersucht. Interessanterweise zeigte sich zwar eine sofortige Signalreduktion nach

7,5 min Hitzeeinwirkung, verbunden mit dem vollständigen Verlust der Kultivierungsfähigkeit, einige Zellen zeigten aber immer noch deutliche FISH-Signale. Erst nach über 30 min bei 80 °C waren die Signale so schwach, dass keine Verwechslung mit lebenden Zellen mehr möglich war (Abbildung 24).

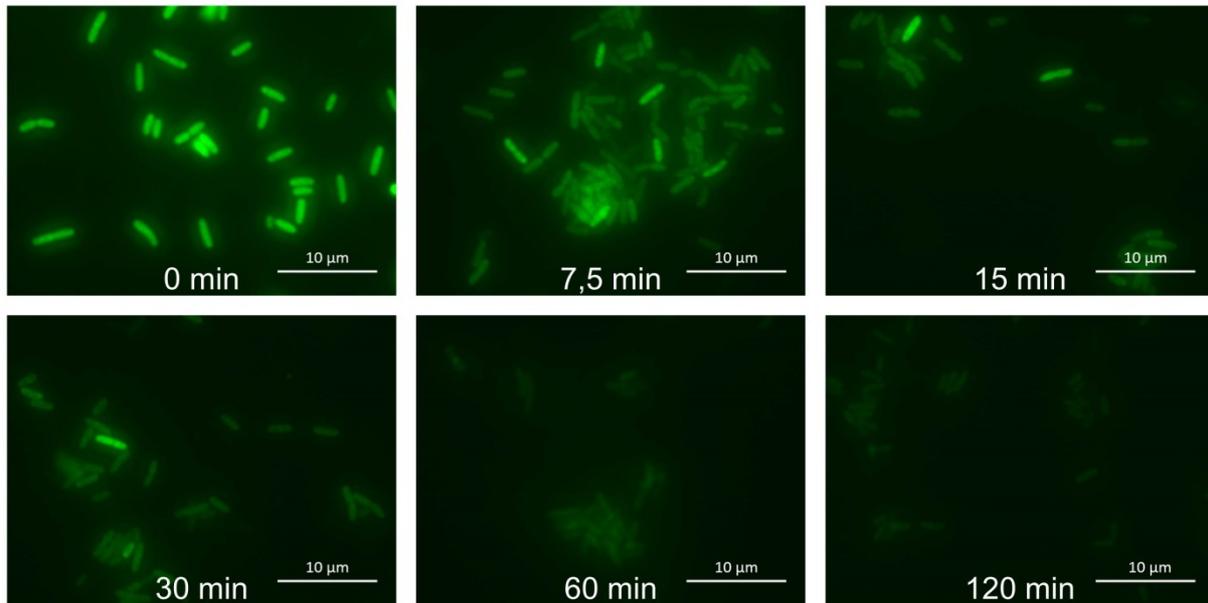


Abbildung 24: FISH-Signal von *Y. enterocolitica* nach Hitzeabtötung

Bakterienzellen wurden für 0 min, 7,5 min, 15 min, 30 min, 60 min und 120 min auf 80 °C erhitzt, sofort mit Formaldehyd fixiert und mittels FISH angefärbt.

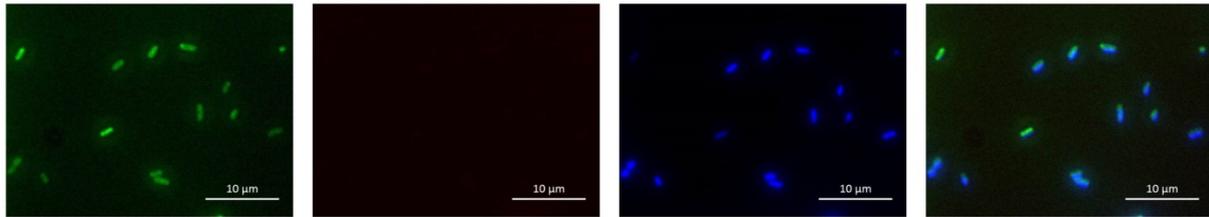
Grün: YersEco16SI/II-FAM.

Um dieses fehlerbehaftete Zeitfenster von FISH zu schließen, bei der eine sichere Abgrenzung zwischen toten und lebenden Bakterien nicht möglich ist, wurde eine Kopplung mit einer anderen kultivierungsunabhängigen, mikroskopischen Methode zur Lebend/Tot-Unterscheidung angestrebt. Drei unterschiedliche Ansätze, die auf jeweils andere Viabilitätsmarker abzielen, nämlich eine intakte Zellmembran, intakte Enzyme beziehungsweise die Wachstumskapazität der Bakterien, bieten sich hierfür prinzipiell an. Zunächst wurde eine Färbung mit Propidiumiodid und dem strukturell verwandtem Propidiummonoazid getestet, mit der die Membranpermeabilität getestet werden kann. Kulturen von *Y. enterocolitica* wurden dabei simultan mit DAPI (blaue Färbung), das in jede Zelle eindringen kann, und Propidiumiodid oder Propidiummonoazid (rote Färbung) gefärbt. Die zwei letztgenannten Substanzen, die wie DAPI an die DNA binden, können in der Theorie nur in Zellen mit beschädigter Membran eindringen, die aus diesem Grund als tot betrachtet werden. In

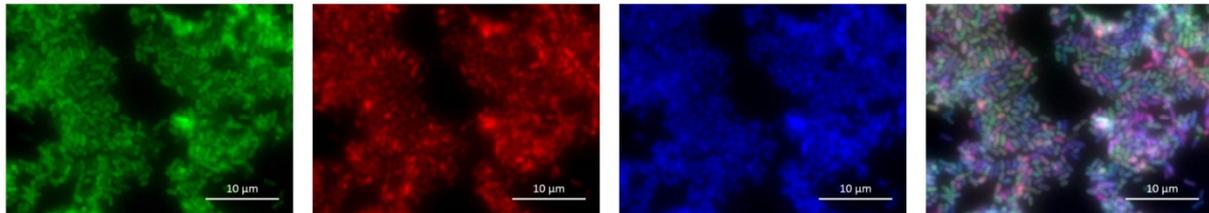
Übernachtskulturen von *Y. enterocolitica* ließen sich nur wenige Zellen durch Propidiumiodid oder Propidiummonoazid anfärben. Eine kurze Hitzeinaktivierung der Yersinien bei 80 °C (analog zu den FISH-Experimenten) bewirkte eine rasche Zunahme rot eingefärbter Zellen. Diese Anfärbung war dabei häufig mit einer schwächeren DAPI-Färbung verbunden. Außerdem konnte man bei der Verwendung von Propidiumiodid auch eine starke, grüne Anfärbung der Zellen beobachten, die durch längere Lichteinwirkung im LED PhAST Blue und nach mehreren Waschschrritten reduziert werden konnte. Die Intensität der Rotfärbung variierte zum Teil beträchtlich (Abbildung 25) und nach 30 min Hitzeeinwirkung fanden sich weiterhin Zellen, die zwar durch DAPI gefärbt worden waren, nicht aber durch PMA oder PI. Das Zeitfenster von FISH, in dem keine sichere Lebend/Tot-Unterscheidung möglich ist, konnte also auch durch die Verwendung von PMA oder PI nicht geschlossen werden.

Als zweite Möglichkeit wurden über einen Esterase-Assay essentielle zelluläre Enzymaktivitäten gemessen. Dazu wurden die drei fluoreszierenden Enzymsubstrate Fluoresceindiacetat, Carboxyfluoresceindiacetat (cFDA), mit einer besseren Zurückhaltung in der Zelle, sowie Calcein-AM genutzt und in Kombination mit DAPI und Propidiumiodid eingesetzt. Alle drei Esterasefarbstoffe wurden nur mäßig gut in den Zellen zurückgehalten und die Resultate schwankten beträchtlich, insbesondere die Dauer zwischen Einbettung des Präparates und der mikroskopischen Untersuchung hatte einen großen Einfluss auf das Ergebnis. Neben dem raschen Auswaschen des Farbstoffes stellte die Photolabilität der Farbstoffe ein weiteres Problem dar. Nur cFDA zeigte relativ stabile Färbeergebnisse und wurde am längsten in den Zellen zurückgehalten. In lebenden Zellen zeigten die Yersinien unterschiedlich starke cFDA-Signale, die auch nach Abtötung bei 80 °C erhalten blieben und nach 30 min Hitzeeinwirkung stark reduziert waren (Abbildung 25). Durch die verbleibenden Restsignale zeigte sich aber, dass auch mit diesem Verfahren die Lebend/Tot-Unterscheidung bei Zellen, die durch kurze Hitzeperioden abgetötet worden sind, nicht vollständig möglich ist. Selbst in exponentiell wachsenden Kulturen fanden sich für einige DAPI-gefärbte Zellen weder ein „Lebensignal“ von den Esterasen noch ein „Totsignal“ von Propidiumiodid (Abbildung 25), ein weiterer Hinweis dafür, dass mindestens eine Methode (wenn nicht sogar beide) auch ohne Hitzeeinwirkung inkorrekte Ergebnisse liefert.

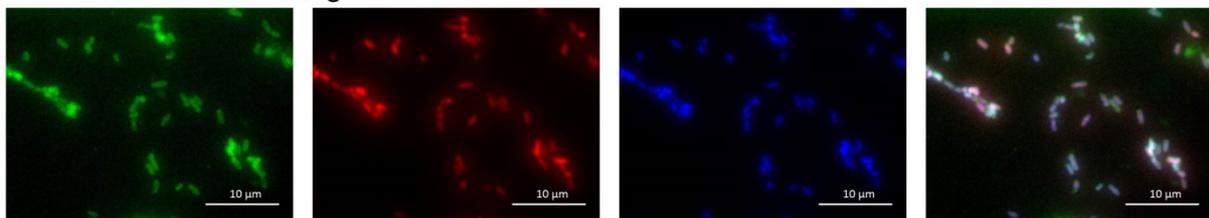
Keine Hitzeabtötung



7,5 min Hitzebehandlung



30 min Hitzebehandlung



Enzymaktivität

Membranpermeabilität

DNA

Merge

Abbildung 25: Andere Färbemethoden zur Lebend/Tot-Unterscheidung

Anfärbung einer Kultur von *Y. enterocolitica* mit cFDA (Nachweis von Enzymaktivitäten; erste Spalte (grün)) und Propidiumiodid (Indikator für beschädigte Membranen, zweite Spalte (rot)).

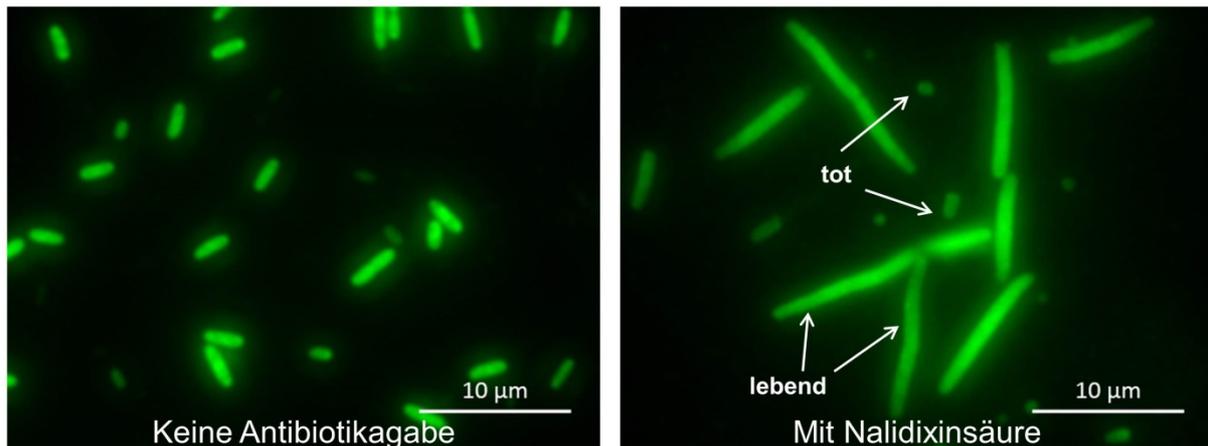
Oben: ohne Hitzeabtötung. Mitte: nach 7,5 min bei 80 °C. Unten: nach 30 min Hitzeeinwirkung.

Grün: cFDA. Rot: Propidiumiodid. Blau: DAPI. Rechts: Merge aus cFDA-, Propidiumiodid- und DAPI-Signal.

Als dritte Alternative zur Lebend/Tot-Unterscheidung auf mikroskopischer Ebene wurde die Methode des direct viable count (DVC) getestet, bei der eine Probe in Anwesenheit eines Replikationshemmers wie Nalidixinsäure inkubiert wird. Lebende Zellen können sich dann zwar nicht mehr teilen, aber noch wachsen, was zu einer starken Zellverlängerung führt. Tote Zellen ändern ihre Größe dagegen nicht. Tatsächlich zeigte diese Methode eine hohe Trennschärfe zwischen lebenden und toten Zellen (Abbildung 26a). Die Zellverlängerung in Anwesenheit des Replikationshemmers wurde bereits nach 1 h deutlich, eine sehr gute Unterscheidung durch eine Verlängerung um mehr als das Dreifache der normalen Länge war aber für die langsam wachsenden Yersinien erst nach 4 h möglich (Abbildung 26b). In abgetöteten Kulturen konnten dagegen bereits bei den Ansätzen mit der kürzesten getesteten Hitzeeinwirkung von 7,5 min keine Wachstumseffekte

mehr nachgewiesen werden. Der DVC-Assay konnte problemlos mit FISH kombiniert werden wie Abbildung 26 demonstriert; die Intensität des FISH-Signals von DVC-verlängerten Zellen war dabei jedoch häufig schwächer als bei unbehandelten Zellen.

a.



b.

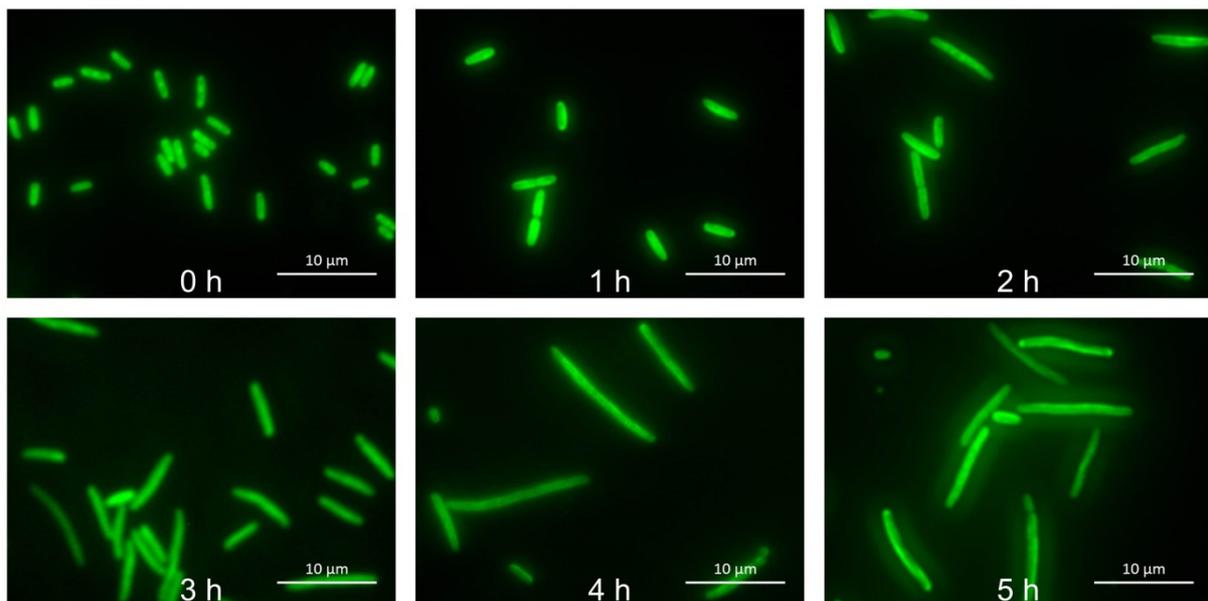


Abbildung 26: Kopplung des direct viable count mit FISH

a. Lebend/Tot-Unterscheidung einer Kultur von *Y. enterocolitica*

Links: Ohne Zugabe von Nalidixinsäure. Rechts: 4 h Inkubation mit Nalidixinsäure. Lebende Zellen erscheinen um ca. das Vierfache verlängert ($9,70 \pm 2,39 \mu\text{m}$), tote Zellen bleiben unverändert klein ($2,36 \pm 0,53 \mu\text{m}$).

b. Zeitliche Zunahme der Zelllänge über einen Inkubationszeitraum von 5 h (mit Nalidixinsäure)

Grün: Sondengemisch YersEco16I/II-FAM.

3.3 Simultannachweis und Sondenmultiplexing

Alle in dieser Arbeit etablierten Sonden (mit Ausnahme der beiden LNA-Sonden zur Differenzierung zwischen *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*) können bei den gleichen Hybridisierungsbedingungen verwendet werden, eine Verknüpfung der Einzelnachweise ist also theoretisch möglich. Die meisten Mikroskope verfügen über maximal drei verschiedene Fluoreszenzkanäle. Durch die kürzlich beschriebene Mehrfachbelegung der Fluoreszenzkanäle und Doppelfärbungen (Behnam *et al.*, 2012; Valm *et al.*, 2012) sollte bei einer freien Kombinierbarkeit der Sonden ein Multiplex-Nachweis praktisch möglich sein. Um dies zu überprüfen, sollten in einem Ansatz gleichzeitig die Pathogene *S. enterica*, thermophile *Campylobacter* spp., *L. monocytogenes* und *E. coli* O157 erfasst werden. Zusätzlich sollten *Listeria* spp. und Enterobacteriaceen als zwei wichtige Hygieneindikatoren in demselben Ansatz detektiert werden. Dazu wurde das folgende Färbeschema gewählt (Tabelle 23):

Tabelle 23: Färbeschema für Multiplex-Erkennung

Detektionsziel	Verwendete Sonden	Entstehende Farbe/ Kanalüberlagerung
<i>S. enterica</i>	Salment-TexasRed + Enterobac-AMCA	Violett
Thermophile <i>Campylobacter</i> spp.	Campytherm-TexasRed	Rot
<i>E. coli</i> O157	EcoliO157-Alexa488 + Enterobac-AMCA	Türkis
<i>L. monocytogenes</i>	Listmono-TexasRed + Listall-FAM	Gelb
<i>Listeria</i> spp.	Listall-FAM	Grün
Enterobacteriaceae	Enterobac-AMCA	Blau

Grün: FAM, Alexa488. Rot: TexasRed. Blau: AMCA. Die resultierende Farbe in der Kanalüberlagerung ergibt sich durch die jeweiligen Farbkombinationen: Violett: Rot und Blau. Türkis: Grün und Blau. Gelb: Rot und Grün.

Wie in Abbildung 27 gezeigt konnten durch dieses Färbeschema die sechs verschiedenen Bakteriengruppen in einem Ansatz mit nur drei Farbkanälen erfasst werden.

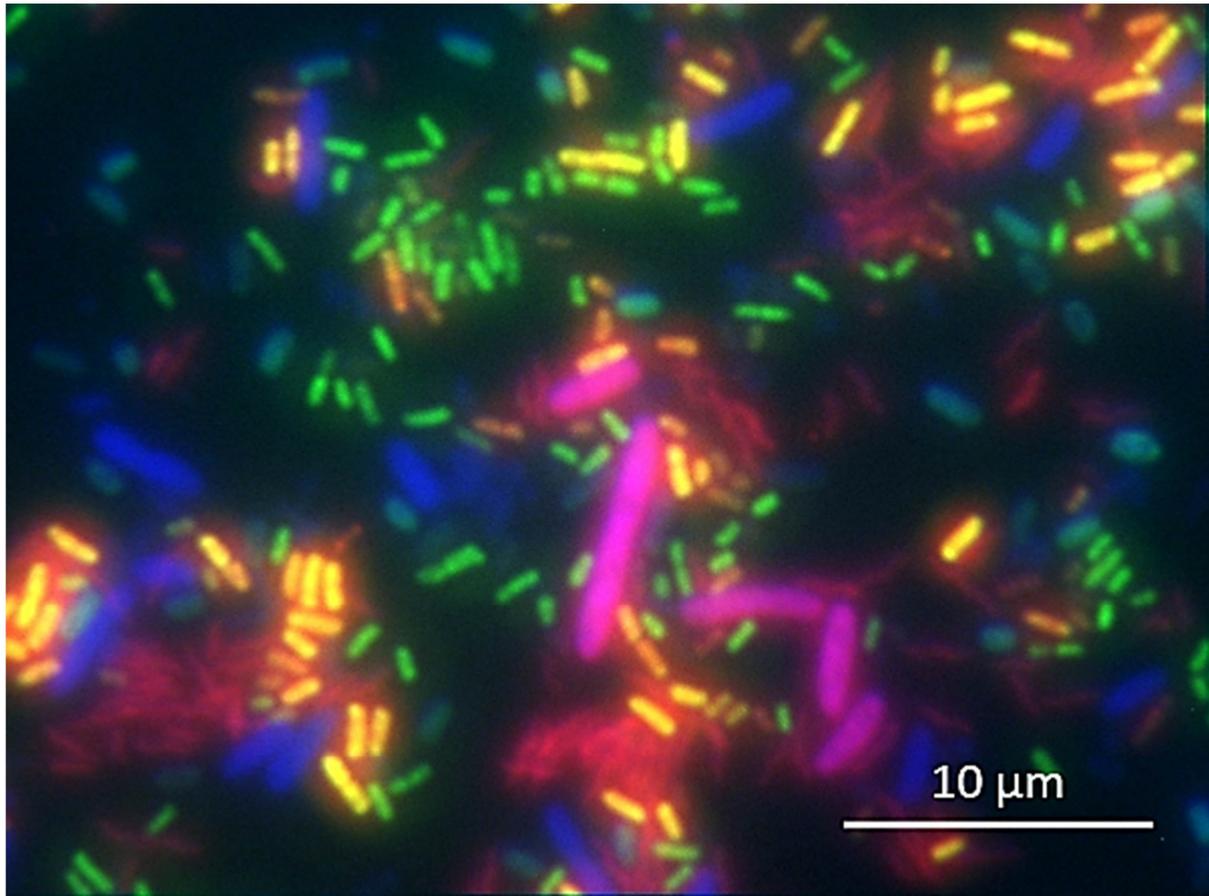


Abbildung 27: Multiplexnachweis in einem Gemisch von Salmonellen (violett), Listerien (grün) mit Feindifferenzierung in *L. monocytogenes* (gelb), thermophilen *Campylobacter* spp. (rot), *E. coli* O157 (türkis) und anderen Enterobacteriaceen (blau)

3.4 Entwicklung von FISH-Tests zum Nachweis von Antibiotikaresistenzen

Neben der Identifizierung der in einer Probe vorhandenen Erreger über rRNA-Sonden, der Bestimmung ihrer Anzahl und dem Nachweis ihrer Lebensfähigkeit (z. B. über DVC-FISH) sind weitere Eigenschaften dieser Bakterien von Interesse. Hierzu zählen insbesondere Resistenzen gegen Antibiotika oder die Existenz von Toxin- und Virulenzgenen. Diese Eigenschaften sind sowohl auf DNA-, mRNA- und Proteinebene nachweisbar als auch mittelbar über ihre enzymatische Aktivität. Anhand eines typischen Antibiotikaresistenzgens gegen β -Lactamasen, dem plasmidär kodierten *bla*-Gen, sollte das Potenzial von FISH für den Resistenznachweis getestet werden. FISH kann sowohl auf DNA- wie auch auf mRNA-Ebene zum Einsatz kommen. In diesem Fall ist die mRNA-Ebene sinnvoller,

da hier nicht nur das Vorhandensein des *bla*-Gens bewiesen werden kann, sondern auch dessen Transkription.

3.4.1 Etablierung eines FISH-Assays für die Transkription von *bla*

Das *bla*-Gen kodiert für eine TEM-1 β -Lactamase, ein häufiges Resistenzgen in Enterobacteriaceae und auf vielen Laborplasmiden. Über einen konventionellen rRNA-FISH (also unter Verwendung von nur einer Sonde) ist mit herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopen und Farbstoffen ein Nachweis nicht möglich, da die Abundanz einer mRNA meist deutlich geringer ist als die Anzahl ribosomaler RNAs in einer Zelle, die für *E. coli* bei einigen Zehntausend Exemplaren liegen kann. Eine Signalverstärkung für FISH wird häufig enzymatisch über CARD-FISH erreicht, wodurch eine Signalverstärkung um das 26- bis 41-fache erreicht werden kann (Hoshino *et al.*, 2008; Kubota, 2013). Diese Methode ist allerdings teuer, fehleranfällig, aufwändig und sehr zeitintensiv, was ihre Anwendung als Hochdurchsatzverfahren limitiert. Daher wurde hier ein relativ neuer und deutlich preiswerterer Ansatz („Stellaris FISH“, LGC Biosearch Technologies) gewählt, der bisher vornehmlich für eukaryotische Zellen Anwendung findet. Das Prinzip von diesem mRNA-FISH beruht auf dem Einsatz von bis zu 48 Sonden, die Bereiche aus dem gesamten Zieltranskript abdecken. Für den Nachweis der Transkription des *bla*-Gens wurden insgesamt 41 Sonden entwickelt und als Gemisch eingesetzt, die im Abstand von einigen Nukleotiden die komplette kodierende mRNA-Sequenz mit einer Länge von etwa 800 Nukleotiden erfassen (Abbildung 28).

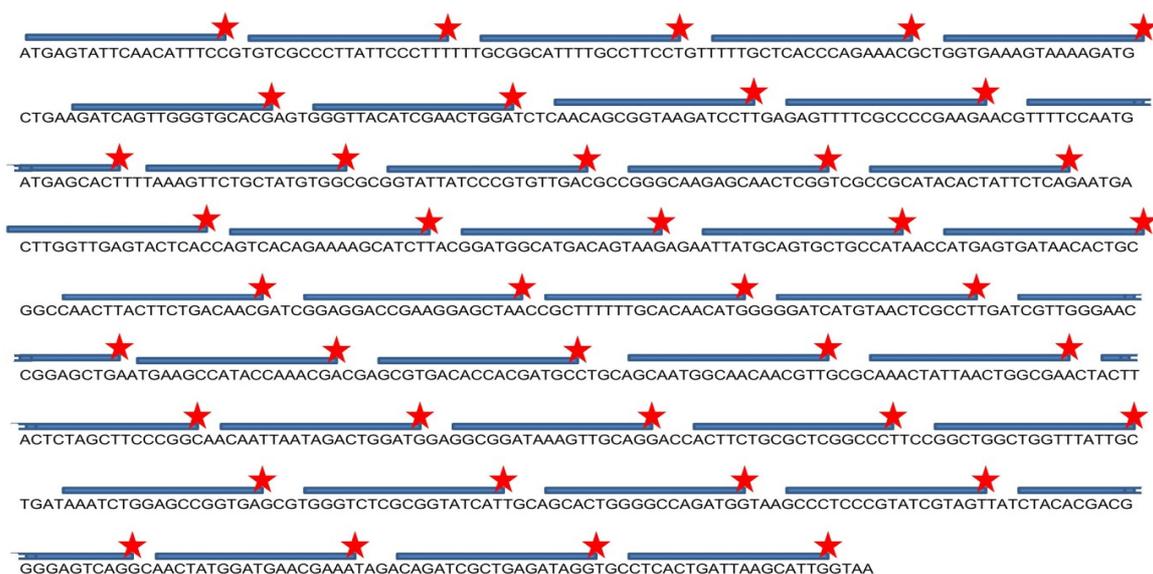


Abbildung 28: Abdeckung von *bla* TEM-1 mit Fluoreszenzsonden

Im Gegensatz zu dem rRNA-FISH mit nur einer verwendeten Sonde (oder maximal sechs wie bei den thermophilen *Campylobacter* spp.) mussten die einzelnen Sonden hier keine hundertprozentige Spezifität für die Ziel-mRNA haben, da einige wenige falsch positive Hybridisierungen an andere mRNAs unterhalb des Detektionslimits liegen. Erst bei einigen hundert ungewollten Hybridisierungsereignissen sind falsch positive Signale zu befürchten (Hoshino *et al.*, 2008). Keine der Sonden durfte aber eine hohe Affinität zu einer rRNA aufweisen, weil deren hohe Abundanz starke falsch positive Ergebnisse verursachen könnte.

Da die Sonden kürzer und nicht thermodynamisch optimiert worden sind (um ihre Anzahl und damit die Signalintensität zu erhöhen), mussten die Protokollbedingungen angepasst werden. Nach einer mathFISH-Analyse wurde die Hybridisierungstemperatur auf 30 °C herabgesetzt und die Salzkonzentration im Puffer von 0,9 M auf 1 M NaCl erhöht, um ein möglichst gutes Hybridisierungsumfeld zu schaffen. Die Formamidkonzentration wurde dagegen konstant gehalten, um ein Mindestmaß an Spezifität zu gewährleisten und gleichzeitig potenzielle mRNA-Sekundärstrukturen aufzulösen. Durch die geringere Temperatur war zu erwarten, dass auch die Hybridisierung der Sonden langsamer erfolgt, sodass die Hybridisierungsdauer auf 1,5 bis 2 h verlängert wurde.

Zur Testung des Sondengemisches wurden vier TEM-1 plasmidtragende *E. coli* Stämme eingesetzt: die high-copy Plasmide pUC18 (Vieira *et al.*, 1982) und pLitmus38 (Evans *et al.*, 1995), pBR328 (Covarrubias *et al.*, 1981) mit einer geringen Stabilität und Kopienzahl sowie einer schwachen β -Lactamase-Expression sowie der TEM-1 Referenzstamm ATTC 35218. Als Negativkontrollen dienten die beiden kommerziell erhältlichen *E. coli* Stämme DH5 α und GeneHogs ohne Plasmide sowie *Y. pseudotuberculosis* ATCC 29833. Zwei resistente Isolate von *Klebsiella pneumoniae*, K2 mit einer mittleren Resistenz und My6107 mit einer hohen Resistenz, sowie *Y. enterocolitica* DSM 13030 wurden als resistente Stämme getestet, die über eine Ampicillinresistenz verfügen, die nicht auf einem TEM-Gen basiert. Tabelle 24 fasst die über Etest quantifizierten Resistenzen (minimal inhibitory concentration, MIC) der verwendeten Stämme zusammen.

Tabelle 24: Quantifizierung der Ampicillinresistenz der verwendeten Bakterienstämme mittels Etest

Stamm	MIC (Ampicillin)
<i>E. coli</i> pUC18	> 256 µg/ml
<i>E. coli</i> pLitmus38	> 256 µg/ml
<i>E. coli</i> pBR328	> 256 µg/ml
<i>E. coli</i> ATCC 35218	> 256 µg/ml
DH5α	< 1,5 µg/ml
GeneHogs	< 2 µg/ml
<i>K. pneumoniae</i> K2	< 24 µg/ml
<i>K. pneumoniae</i> My6107	> 256 µg/ml
<i>Y. enterocolitica</i> DSM 13030	> 256 µg/ml
<i>Y. pseudotuberculosis</i> ATCC 29833	< 0,125 µg/ml

Alle Negativkontrollen, einschließlich aller Stämme mit einer nicht durch TEM-1 vermittelten Resistenz zeigten kein FISH-Signal, während alle vier resistenten TEM-1 *E. coli*-Stämme ein deutliches Fluoreszenzsignal aufwiesen (Abbildung 29; Abbildung 41, Anhang). Im Gegensatz zu dem konventionellen rRNA-FISH-Nachweis, der problemlos in einem weiteren Farbkanal simultan durchgeführt werden konnte (zum Beispiel über die allgemeine Enterobacteriaceen-FISH-Sonde Enterobac in Abbildung 29), zeigten nicht alle von Enterobac gefärbten Zellen ein mRNA-Signal. Außerdem variierte das mRNA-Signal zum Teil beträchtlich von Zelle zu Zelle. Weiterhin auffällig war, dass das mRNA-Signal keinesfalls homogen in der Zelle verteilt war, sondern sich häufig in einigen wenigen Regionen innerhalb der Zellen konzentrierte. Unterschiede zeigten sich nicht nur innerhalb einer Reinkultur, sondern auch zwischen den getesteten Stämmen: Die high-copy Plasmide pLitmus38 und pUC18 zeigten stärkere Signale als pBR328 oder als der Referenzstamm ATCC 35218.

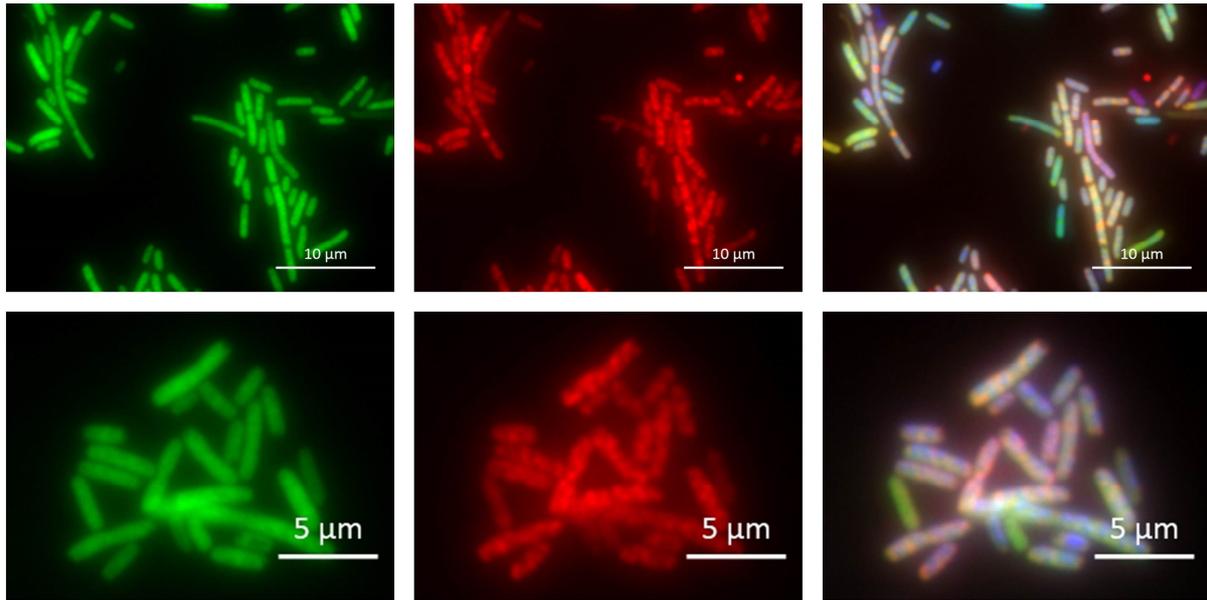


Abbildung 29: Anfärbung der TEM-1-mRNA in stationären Kulturen von *E. coli* pLitmus38

Die zwei Bildreihen zeigen die angefärbten Zellen in zwei verschiedenen Vergrößerungsstufen. Deutlich zu erkennen ist die punktförmige, inhomogene Verteilung der mRNAs in den Bakterien. Grün: Enterobac-Alexa488. Rot: TEM-1-Sondengemisch-CalFluor610. Rechts: Merge aus Alexa488-, TexasRed- und DAPI-Signal.

3.4.2 Vergleich mit Nachweisen auf Protein- und Aktivitätsebene

Nachweise auf Ebene der mRNA sind funktionell gesehen zwar aussagekräftiger als auf DNA-Ebene, lassen aber keine direkten Rückschlüsse auf die tatsächliche Expressionsleistung oder die enzymatische Aktivität des Genproduktes zu. Daher wurden über eine zweistufige Antikörperfärbung (Abschnitt 2.2.3.3) die tatsächlichen Proteinmengen an β -Lactamase in den Zellen visualisiert und mittels des Nitrocefin-Assays (Abschnitt 2.2.1.4) die Aktivität beziehungsweise Funktionalität der β -Lactamase bestimmt. Für den mikroskopischen Nachweis mittels Antikörperfärbung existieren bisher keine allgemein gültigen Protokolle für Bakterien. In diesen Versuchen stellten sich die FISH-fixierten Bakterien aber als gutes Ausgangsmaterial heraus, mit dem Unterschied, dass die formaldehydfixierten (gramnegativen) Bakterien vor der Anfärbung mit Lysozym vorbehandelt werden mussten, genau wie es sich bei den grampositiven Bakterien für den FISH-Nachweis als notwendig gezeigt hatte. Dieser Permeabilisierungsschritt hatte keinen Einfluss auf die Bakterienmorphologie. Wie schon in den FISH-Versuchen, erwies sich auch der TEM-1 Nachweis über Antikörper als sehr spezifisch (Abbildung 42, Anhang). Auf Proteinebene waren die Färbungen der Bakterien heterogen und pLitmus38 gefolgt von pUC18 zeigten wieder die stärksten Signale. Bei allen vier Stämmen waren die

größten Proteinmengen in der Randzone der Bakterien zu finden, was eine Lokalisation im Periplasma vermuten ließ. Das Verteilungsmuster der β -Lactamasen unterschied sich teilweise deutlich zwischen den Stämmen (Abbildung 30). Während *E. coli* mit pUC18 Halo-ähnliche, ringförmige Verteilungen zeigte, konzentrierten sich die β -Lactamasen bei den anderen Teststämmen an den Zellpolen. Da diese bipolare Verteilung sowohl bei dem stark exprimierenden Stamm mit pLitmus38 wie auch bei den schwach exprimierenden Stämmen mit dem Plasmid pBR328 (Covarrubias *et al.*, 1981) oder ATCC 35218 auftrat, nicht jedoch bei dem ebenfalls relativ stark exprimierenden Stamm pUC18, sind Überexpressionseffekte alleine vermutlich nicht ausschlaggebend für diesen Befund.

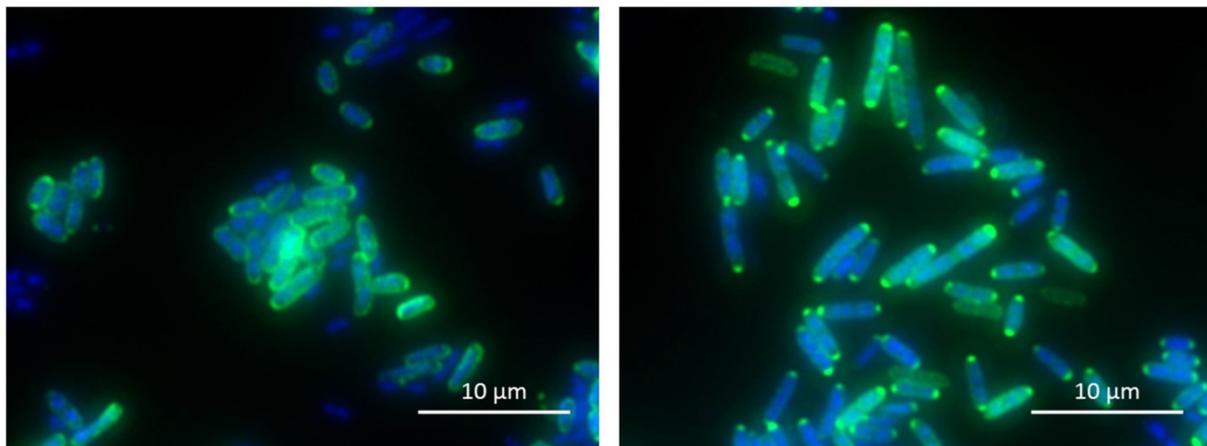


Abbildung 30: Anfärbung der β -Lactamase auf Proteinebene

Links: *E. coli* mit pUC18 (Halo-Verteilung). Rechts: *E. coli* mit pLitmus38 (polare Verteilung).

Grün: β -Lactamase (Protein)-Alexa488 (zweistufige Antikörperfärbung). Merge aus Alexa488- und DAPI-Signal.

Um zu überprüfen, ob eine direkte Korrelation zwischen mRNA-Konzentration und Proteinlevel nicht nur auf Ebene der Gesamtpopulation zu finden ist, sondern auch auf Einzelzellebene abgeleitet werden kann, wurde versucht die Bakterien sequentiell erst mit FISH und dann über die zweistufige Antikörperfärbung zu markieren. Die Kombination aus mRNA- und Proteinnachweis gelang, allerdings waren die FISH-Signale durch die einzelnen Arbeitsschritte der darauffolgenden Antikörperfärbung (inklusive der Waschschrte) abgeschwächt worden. Der kombinierte Nachweis des β -Lactamase-Proteins und der zugehörigen mRNA ergab keine klare positive oder negative Korrelation auf Einzelzellebene (Abbildung 31): In einigen Zellen, die ein starkes mRNA-Signal aufwiesen, waren nur geringe

Proteinmengen zu finden (und umgekehrt), während andere Bakterien sowohl große Mengen an Protein wie auch an mRNA aufwiesen.

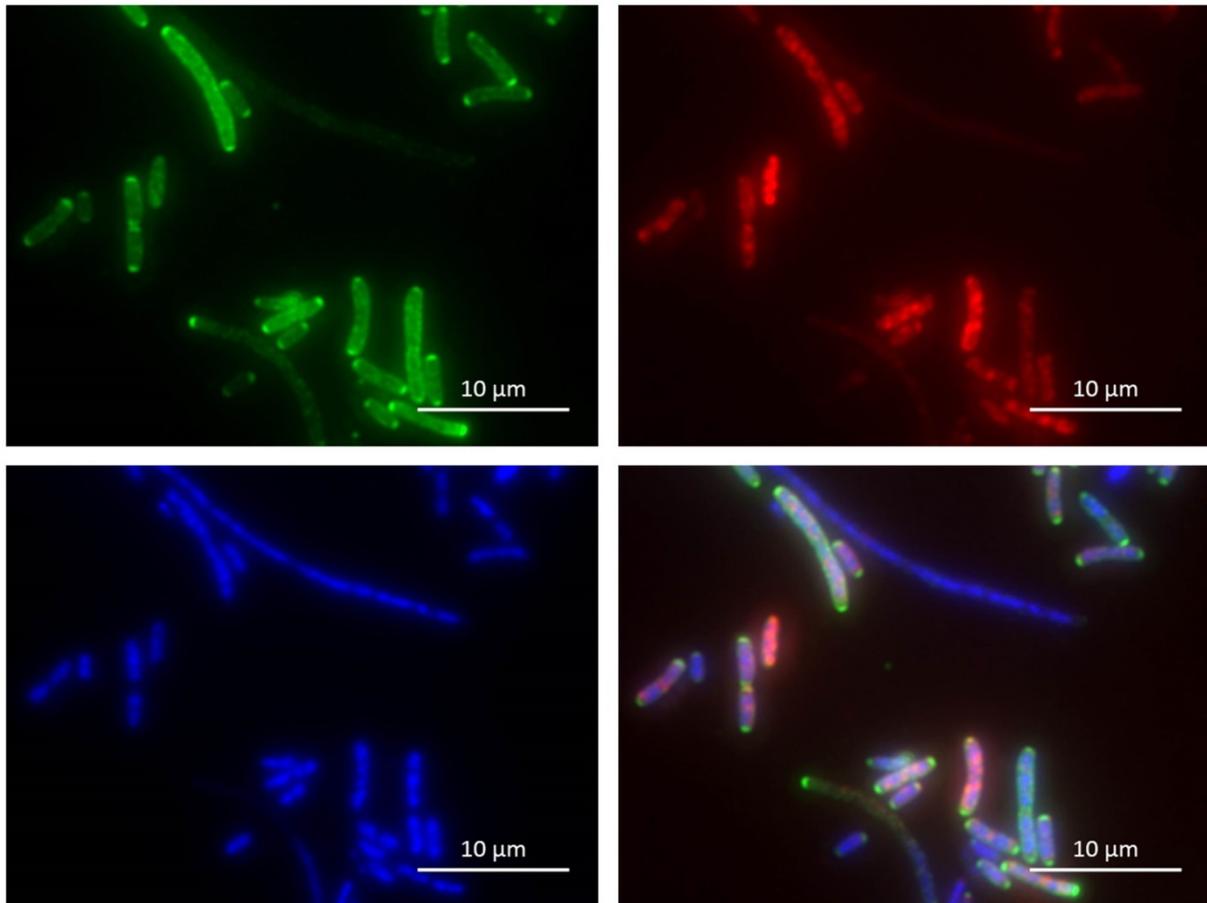


Abbildung 31: Simultanfärbung von mRNA und Protein in einer stationären Kultur von *E. coli* mit pLitmus38

Grün: β -Lactamase (Protein)-Alexa488 (zweistufige Antikörperfärbung). Rot: TEM-1-Sondengemisch-CalFluor610. Blau: DAPI. Rechts unten: Merge aus Alexa488-, TexasRed- und DAPI-Signal.

Um die Anwendbarkeit der beiden Assays auf Feldstämme zu testen, wurden 26 *E. coli* Isolate mit einer TEM-Resistenz, die aus verschiedenen Nutztieren bzw. dem Menschen stammen, mittels Immunfluoreszenz und FISH untersucht (Tabelle 33, Anhang). Beide Testsysteme identifizierten sowohl TEM-1 wie auch andere TEM-Varianten (z. B. TEM-52 oder TEM-30). Die Antikörperfärbung zeigte bei allen Stämmen eine bipolare Verteilung der β -Lactamase, wie sie auch schon für die meisten Laborstämme beobachtet worden war. Vier der 26 Stämme zeigten jedoch eine eher schwache Anfärbung. FISH wiederum zeigte bei zwei Isolaten schwache Signale. Durch die Kombination beider Methoden war aber immer eine zuverlässige Charakterisierung möglich (Tabelle 33, Anhang).

Um die Fähigkeit zur Detektion einer Antibiotikaresistenz in komplexen Bakterienkulturen mit den beiden etablierten Tests zu untersuchen, wurde ein Gemisch aus verschiedenen Bakterien untersucht. Dieses Bakteriengemisch enthielt neben einem TEM-*E. coli* Isolat eine Reihe von Spezies ohne TEM-Element (*Listeria* spp., *Campylobacter* spp. und Enterobacteriaceae wie *Y. enterocolitica*, *S. enterica* und nichtresistente *E. coli*). Sowohl der FISH-Test wie auch die Antikörperfärbung identifizierten in solchen komplexen Bakterienproben die resistenten Bakterien (Abbildung 32).

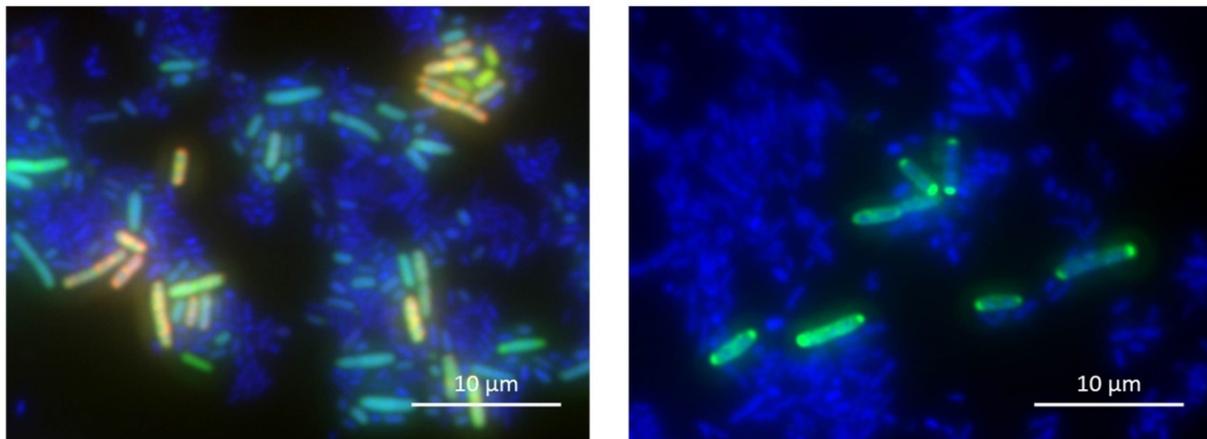


Abbildung 32: Erkennung von resistenten Bakterien in komplexen Bakteriengemischen

Links: FISH-Färbung.

Grün: Enterobac-Alexa488. Rot: TEM-1-Sondengemisch-CalFluor610. Merge aus Alexa488-, TexasRed- und DAPI-Signal.

Rechts: Immunfluoreszenzfärbung.

Grün: β -Lactamase (Protein)-Alexa488 (zweistufige Antikörperfärbung). Merge aus Alexa488- und DAPI-Signal.

Eine der ältesten kulturunabhängigen Methoden zum funktionellen Nachweis von β -Lactamasen stellt der Nitrocefin-Assay dar. Ein chromogenes Substrat der β -Lactamase wird hierbei zu einer Probe hinzugegeben und ändert durch den enzymatischen Umsatz von β -Lactamasen seine Farbe von gelb zu rot (Papanicolaou und Medeiros, 1990).

Alle zehn getesteten Bakterienstämme wurden in LB-Medium ohne Antibiotikaselektionsdruck angezogen und mit Nitrocefin versetzt. Stämme mit den high-copy Plasmiden pLitmus38 und pUC18 zeigten eine schnelle und starke Farbreaktion, genau wie *K. pneumoniae* My6107, während der Referenzstamm ATCC 35218 eine schwächere Reaktion zeigte und Stämme mit dem unter nicht-

selektiven Bedingungen sehr instabilen Plasmid pBR328 und *K. pneumoniae* K2 eine sehr schwache bzw. zeitlich deutlich spätere Farbreaktion aufwiesen (Abbildung 33). Alle Ampicillin-sensitiven Stämme zeigten keinen Farbumschlag. Der Versuch diesen Farbumschlag auch auf zellulärer Ebene beobachten zu können schlug fehl, da der Farbstoff nicht innerhalb des Periplasmas zurückgehalten werden konnte, sondern rasch in die Umgebung abgegeben wurde.

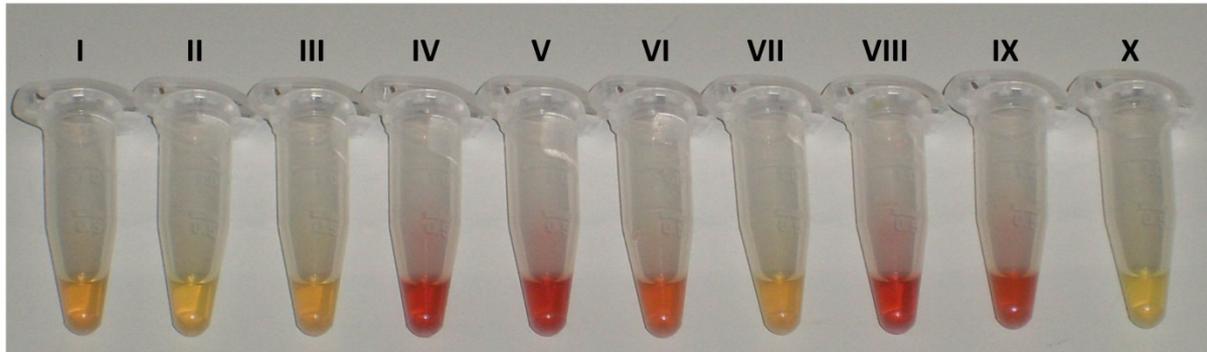


Abbildung 33: Nachweis der β -Lactamase-Enzymaktivität durch den Nitrocefin-Assay

Eine rote Färbung zeigt die Resistenz gegenüber β -Lactamasen an. Die Bilder wurden 15 min nach der Zugabe von Nitrocefin aufgenommen.

Von links nach rechts: *E. coli* GeneHogs (I), *E. coli* DH5 α (II), *E. coli* pBR328 (III), *E. coli* pLitmus38 (IV), *E. coli* pUC18 (V), *E. coli* ATCC 35218 (VI), *K. pneumoniae* K2 (VII), *K. pneumoniae* My6107 (VIII), *Y. enterocolitica* (IX), *Y. pseudotuberculosis* (X).

Insgesamt zeigte sich im Vergleich zum FISH-Nachweis, dass die Antikörperfärbung des Proteins und die Nitrocefin-Methode vergleichbare Ergebnisse lieferten. Die Nitrocefin-Methode war aber deutlich weniger sensitiv und auf Grund der fehlenden Farbstoffzurückhaltung nicht auf Einzelzellebene anwendbar; die Antikörperfärbung war zwar genauso sensitiv wie FISH, nahm aber deutlich mehr Zeit in Anspruch und beinhaltete mehr Arbeitsschritte.

3.5 Evaluierung verschiedener Methoden zur Probenaufarbeitung

Neben der Etablierung und Optimierung der FISH-Tests für die Identifizierung von Pathogenen und etwaiger Resistenzen stellt die Probenvorbereitung einen weiteren Faktor für den erfolgreichen Nachweis dar, insbesondere für Direktnachweise ohne kulturelle Anreicherung. Für die Probenvorbereitung existieren allerdings (wenn überhaupt) meist nur relativ unspezifische Hinweise in den ISO-Methoden oder in anderen Verfahrensanweisungen.

3.5.1 Aufarbeitung von festen Proben

Für feste Proben ist häufig ein Homogenisierungsschritt vorgeschrieben, über dessen Ausgestaltung meist keine genauen Angaben gemacht werden. An Hand von artifiziellen *Salmonella*-Kontaminationen in unterschiedlichen Fleischmatrices sollten vier verschiedene Methoden beziehungsweise Gerätschaften (Stomacher, SpeedMill, FastPrep-24, Ultraschall; siehe Abschnitt 2.2.2.1) miteinander verglichen und evaluiert werden. Insbesondere der Einfluss der Homogenisierungsmethode und der Homogenisierungszeit sind hier von Interesse, genauso wie mögliche Unterschiede zwischen der Homogenisierung von Oberflächenkontaminationen und von internen Kontaminationen, bei denen dem Matrixaufschluss eine entscheidende Bedeutung zukommt. Die vier verwendeten Geräte unterscheiden sich unter anderem in dem Prinzip des Aufschlusses (Ultraschall im Branson Sonifier, mechanische Zerkleinerung durch Kugeln in der SpeedMill und dem FastPrep-24 oder dem Zermahlen zwischen zwei Paddeln im Stomacher) und in dem einsetzbaren Probenvolumen (von weniger als 2 ml für die SpeedMill bis zu 400 ml für den Stomacher). Neben dem Einfluss der einzelnen Homogenisierungsparameter sollte auch der Einfluss der Probennahme bei internen Kontaminationen sowie Möglichkeiten zur Konzentrierung flüssiger Proben näher untersucht werden.

3.5.1.1 Oberflächenkontaminationen

Zunächst wurde der Effekt der Homogenisierung auf Oberflächenkontaminationen untersucht. Dazu wurde Geflügelfleisch, das 1 h vor Versuchsbeginn mit Salmonellen in einer definierten Konzentration beträufelt worden war, verwendet und über einen Zeitraum von 8 min homogenisiert. Proben aus dem Homogenisat wurden in regelmäßigen Abständen entnommen und die Konzentration an Salmonellen mikrobiologisch ermittelt. Über den betrachteten Gesamtzeitraum von 8 min zeigten sich keine signifikanten Verbesserungen durch die Homogenisierung. Ein kurzes Vortexen der Proben reichte bereits aus, um einen großen Teil der Salmonellen im Medium wiederzufinden (Abbildung 34). Beim direkten Vergleich der vier Methoden zeichnete sich aber die Tendenz ab, dass bei der SpeedMill und dem Sonifier ein leichter Verlust der Koloniezahl über die Zeit erfolgte, während dieser Trend beim Stomacher und dem FastPrep-24 nicht erkennbar war. Reinkulturen ohne Matrix zeigten unabhängig von der Methode keine Absterbekinetiken über den betrachteten Gesamtzeitraum von 8 min.

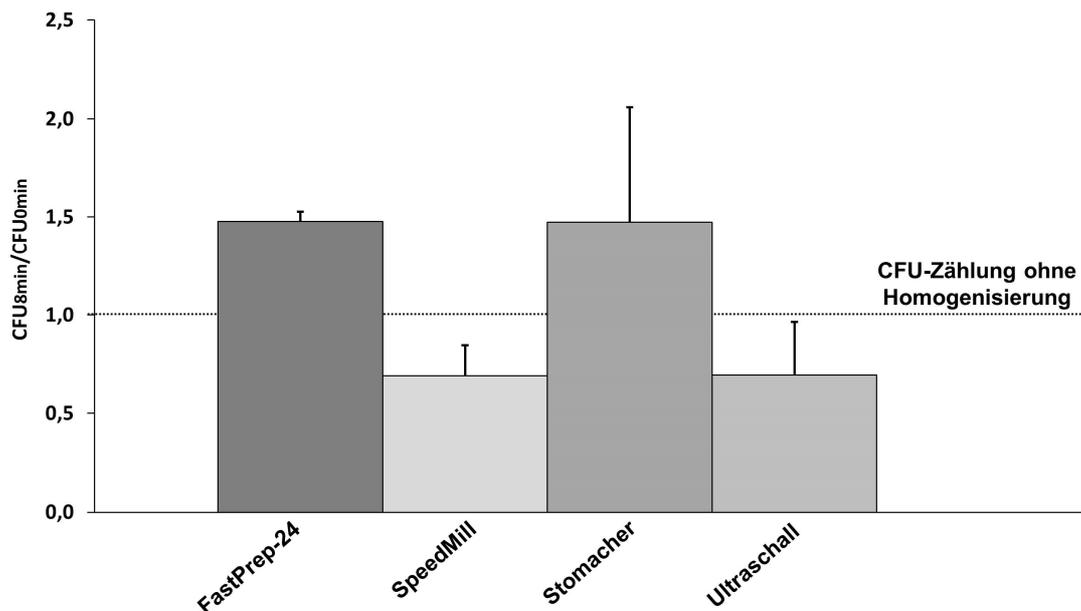


Abbildung 34: Effekt der Homogenisierung auf die nachgewiesene Pathogenkonzentration bei Oberflächenkontaminationen

Die Säulen zeigen die normalisierte Pathogenkonzentration von künstlich kontaminierter Hähnchenbrust nach 8 min Homogenisierung (im Verhältnis zur gemessenen Konzentration nach 20 s Vortexen; durchgezogene Linie bei 1,0).

3.5.1.2 Innere Kontaminationen

Für die Simulation innerer Kontaminationen von Lebensmitteln wurden drei unterschiedliche Wurstsorten (aus Schweinefleisch) hergestellt und im Produktionsprozess mit Salmonellen versetzt (siehe Abschnitt 2.2.2.3): eine luftgetrocknete, weiche Mettwurst, gekennzeichnet durch einen hohen Zerkleinerungsgrad des Fleisches, eine luftgetrocknete, grobkörnige und sehr harte Salami sowie eine geräucherte Salami mit einer ähnlichen Konsistenz. Durch die Reifung und Lagerung der Würste kam es zu einer substantiellen Abnahme der Konzentration an Salmonellen um 3-4 log-Stufen in den luftgetrockneten Würsten; in der geräucherten Salami waren noch einmal um den Faktor 50 weniger Salmonellen zu finden als in der luftgetrockneten Salami, sodass diese Wurstsorte auf Grund zu geringer Salmonellenkonzentrationen nicht mehr statistisch auswertbar war. Für die beiden verbliebenen Wurstsorten wurden analog zum Modell der Oberflächenkontamination die vier Homogenisatoren verglichen.

Im Unterschied zur Oberflächenkontamination waren zum Zeitpunkt 0 (also nach einem kurzen Vortexen der in Peptonwasser verdünnten Proben) keine Bakterien im Medium nachweisbar. Stattdessen nahm die Freisetzung der Salmonellen in das Medium kontinuierlich mit der Homogenisierungsdauer zu (Abbildung 35). Der

FastPrep-24 zeigte für die weiche Mettwurst mit Abstand die besten Ergebnisse: Bereits nach einer kurzen Aufschlussphase von 30 s erreichte man mit dem FastPrep-24 eine doppelt so große Freisetzung an Salmonellen wie mit der SpeedMill oder dem Stomacher nach 8 min. Durch eine längere Homogenisierung im FastPrep-24 ließ sich die Konzentration im Medium sogar noch einmal verdoppeln. Durch Ultraschallbehandlung konnten dagegen keinerlei Bakterien isoliert werden. Ähnlich wie bei der weichen Mettwurst zeigten sich auch für die harte Salami deutliche Unterschiede zur Oberflächenkontamination (Abbildung 35b). Sowohl FastPrep-24 wie auch der Stomacher zeigten eine fast zeitlich lineare Freisetzung der Bakterien auf ähnlich hohem Niveau, während die SpeedMill deutlich schlechtere Ergebnisse lieferte und durch die Ultraschallbehandlung wie schon bei der Mettwurst keine Bakterienfreisetzung ins Medium zu beobachten war.

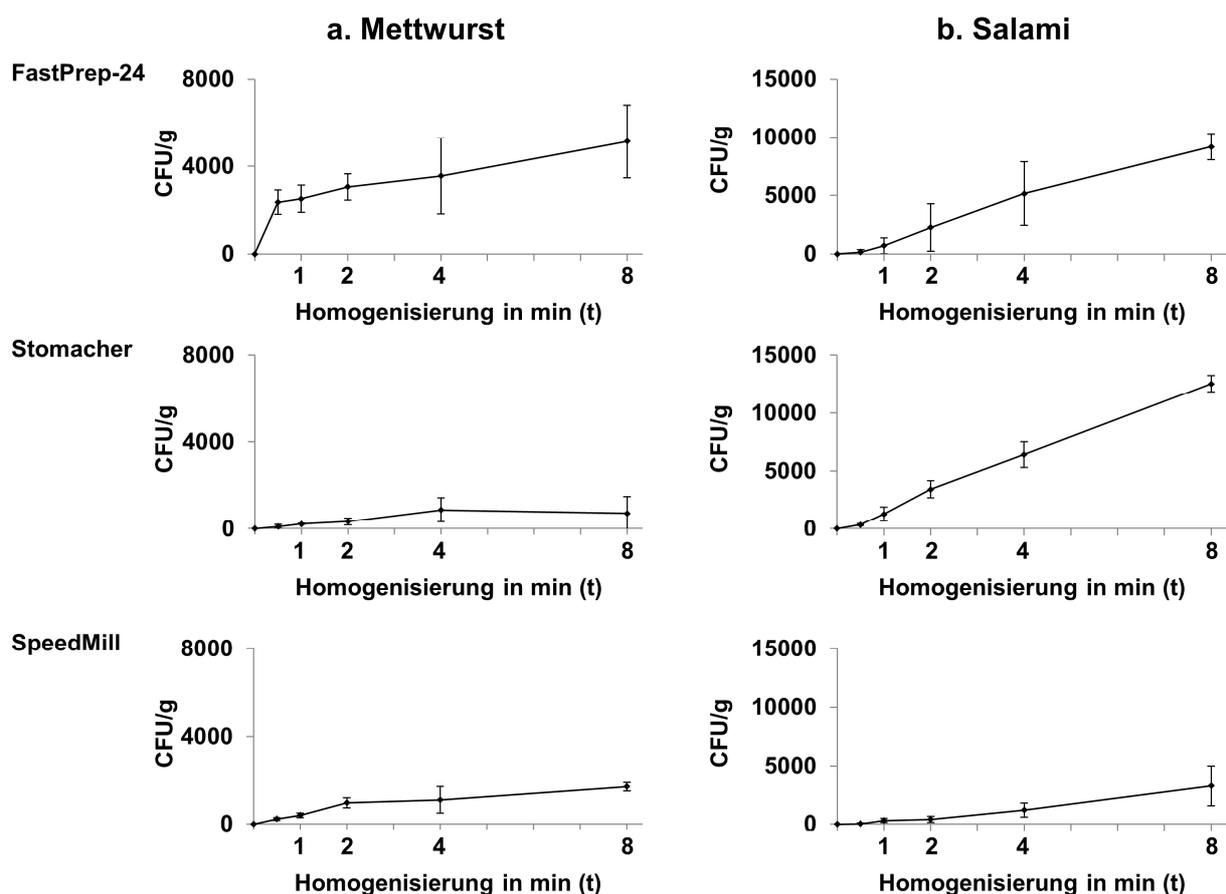


Abbildung 35: Homogenisierung von internen Kontaminationen

Die Freisetzung von Salmonellen aus intern kontaminierten Würsten (a. Mettwurst; b. Salami) nach Homogenisierung mit FastPrep-24, Stomacher und SpeedMill wurde über einen Zeitraum von 8 min gemessen und die Konzentration an Bakterien mikrobiologisch bestimmt.

3.5.1.2.1 Analyse der Keimverteilung

Die Ergebnisse der Homogenisierungsversuche belegten, dass sowohl die Methode wie auch die Dauer ihrer Anwendung eine wichtige Rolle beim Erregernachweis spielen. Auch die Region der Probennahme könnte bei internen Kontaminationen von Bedeutung sein. Über die Verteilung von Bakterien innerhalb einer (verarbeiteten) Lebensmittelmatrix liegen bisher nur sehr wenige Daten vor. Daher wurden verschiedene Regionen in der Wurst beprobt: die Rindenregion, die Kernregion und der gesamte Querschnitt (siehe auch Abbildung 8, Abschnitt 2.2.2.3). Da die FastPrep-24-Behandlung gute Ergebnisse für beide Wurstsorten geliefert hatte, wurden die verschiedenen Regionen der Wurst mit diesem Gerät 8 min lang homogenisiert und der Gehalt an Salmonellen mikrobiologisch quantifiziert (Abbildung 36).

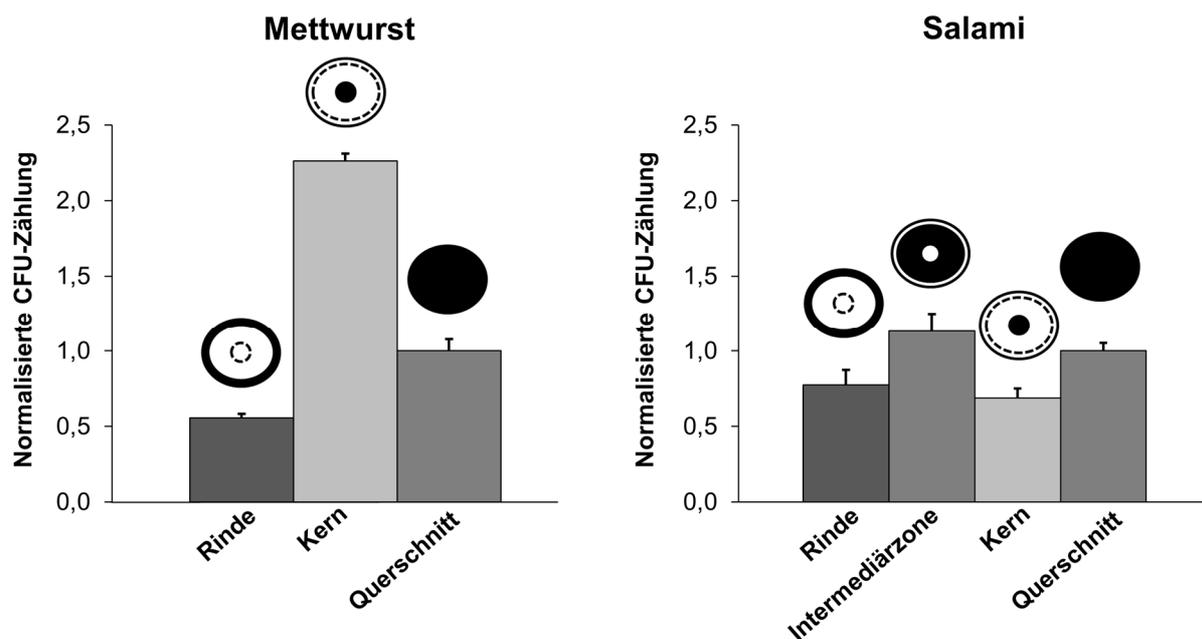


Abbildung 36: Salmonellenverteilung in der Mettwurst und Salami

Die schematischen Zeichnungen über den Säulen verdeutlichen die untersuchte Wurstregion (in schwarz). Pathogenkonzentrationen wurden nach 8 min Homogenisierung im FastPrep-24 gemessen und sind im Verhältnis zur Gesamtkonzentration im kompletten Querschnitt angegeben.

Die beiden Würste wiesen sehr unterschiedliche Erregerverteilungen auf: Während die weiche Mettwurst im Wurstkern eine viermal höhere Konzentration aufwies als in der Randzone, waren die Unterschiede in der harten Salami viel kleiner. Hier zeigte sich, dass die Intermediärzone einen leicht höheren Gehalt an Salmonellen hatte als die anderen Regionen.

In der Literatur wird immer wieder über die Existenz von „Keimnestern“ diskutiert (Wimpenny *et al.*, 1995), also mikroskopisch kleinen Regionen, in denen besonders viele Bakterien vorhanden sind, z. B. weil hier eine starke Vermehrung während der Reife erfolgen konnte.

Zur Überprüfung dieser Theorie wurden dünne histologische Wurstschnitte angefertigt und mittels FISH auf Salmonellen (mit Salment) und auf lebende Bakterien allgemein (bakterielle Universalsonde EUB338) untersucht (Abbildung 37). Die Bakteriendichte in der Wurstmatrix war jedoch sehr gering, in Übereinstimmung mit der mikrobiologisch gemessenen Bakterienreduktion um 3-4 log-Stufen und mehr. Bakteriennester wie von Wimpenny *et al.* (1995) postuliert konnten nicht identifiziert werden, nur sehr sporadisch fanden sich Salmonellen in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander. Bei der Suche nach Bakteriennestern kam technisch erschwerend hinzu, dass die Wurstmatrix eine hohe Eigenfluoreszenz in allen drei untersuchten Kanälen aufwies und nur selten Bakterien parallel zur Bildebene lagen.

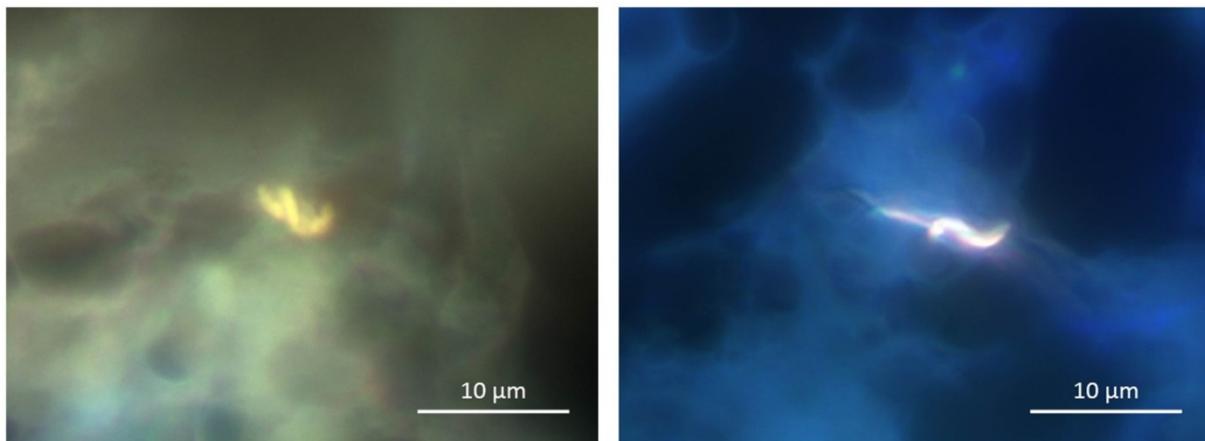


Abbildung 37: Untersuchung der Keimverteilung in der Mettwurst mittels FISH

Links: Bakterienansammlung. Rechts: Einzelbakterium.

Histologische Schnitte der Mettwurst wurden mittels EUB338-FAM (grün), Salment-TexasRed (rot) und DAPI (blau) angefärbt und alle Kanäle übereinandergelegt (Merge).

3.5.2 Probenaufarbeitung für Flüssigproben

Für Direktnachweise ohne kulturelle Voranreicherung sind neben dem Herauslösen des Erregers aus der Matrix auch effiziente Methoden zur Konzentrierung erforderlich, um höhere Sensitivitäten zu erreichen. Nicht immer sind Verfahren zum Aufschluss von festen Proben notwendig, denn viele Erreger wie thermophile *Campylobacter* spp. treten primär als Oberflächenkontamination auf (z. B. auf

Geflügelfleisch) und werden bereits durch gründliches Abspülen der Oberfläche in das Verdünnungsmedium befördert.

Zur Bearbeitung von Flüssigproben ist neben (differenziellen) Zentrifugationsschritten insbesondere die Filtrierung und die Sammlung des Erregers auf einer Membran ein vielversprechender Ansatz. Daher sollte für die FISH-Analytik auch ein effizientes kultivierungsunabhängiges Filtrierungssystem für Flüssigproben etabliert werden. Zunächst wurden Filtermembranen mit einer Porengröße von kleiner als 0,8 µm für die mikroskopische Auswertung verglichen. Mehrere handelsübliche Filter zur Mediensterilisation erwiesen sich als ungeeignet, da sie zum einen eine hohe Eigenfluoreszenz zeigten und zum anderen die Dicke der Filter die Handhabung während der Färbung und die Einbettung auf dem Objektträger erschwerten. Deshalb wurden drei sehr dünne Filtermembranen mit einer Porengröße von etwa 0,4 µm, bestehend aus Polykarbonaten oder Zellulosemischestern, getestet, die sich laut Herstellerangaben speziell für mikroskopische Auswertungen eignen und dementsprechend adaptiert worden sind.

Die drei Membranen unterschieden sich sowohl in ihrer Eigenfluoreszenz insgesamt als auch in ihrer Eignung für bestimmte Farbkanäle (Abbildung 38). Die Polykarbonatfilter Cyclopore und (mit Einschränkungen) Isopore zeigten für alle drei Farbkanäle (DAPI, blau; TexasRed, rot; Alexa488, grün) ein gutes „signal-to-noise“ Verhältnis, während der Mischzelluloseester von Millipore nur im grünen Kanal eine akzeptable Erkennung der Bakterien erlaubte.

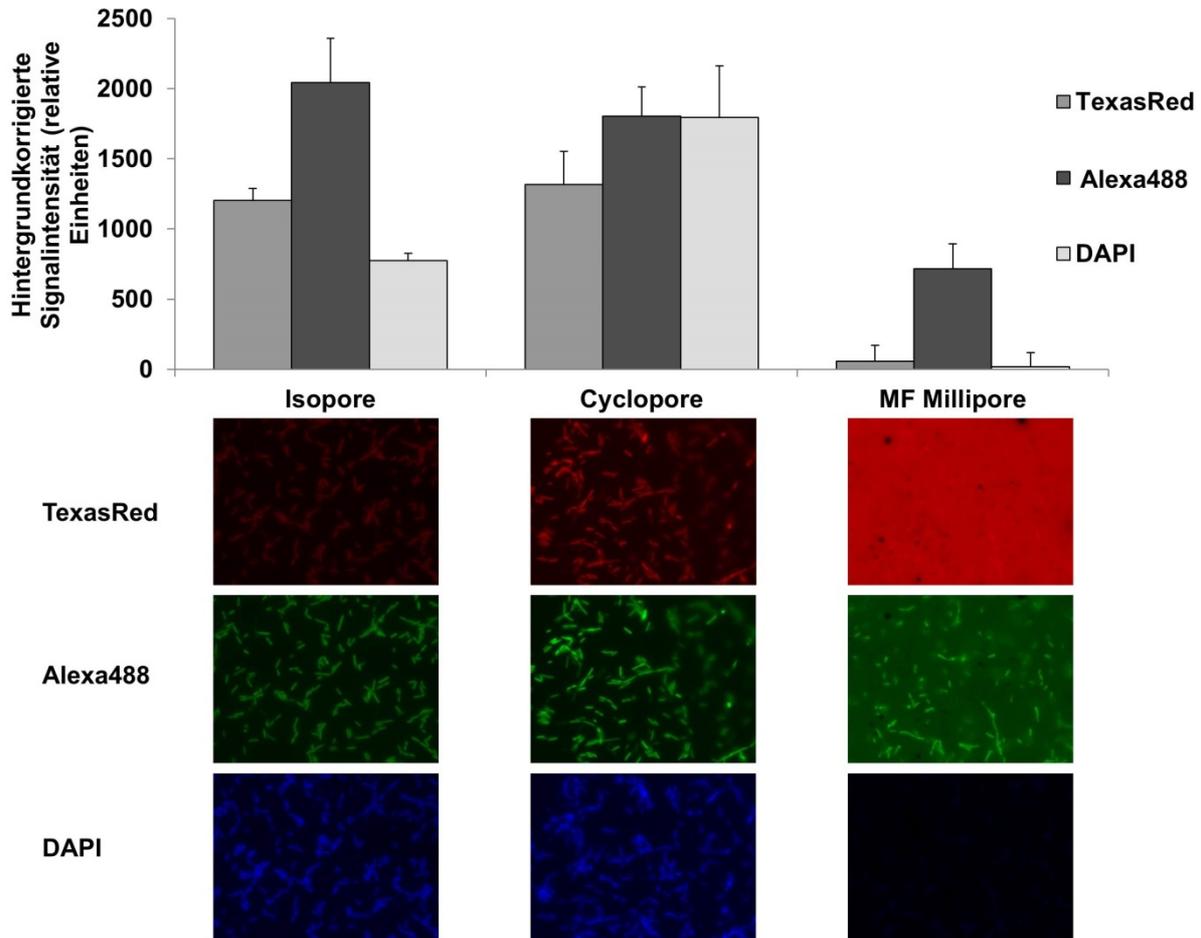


Abbildung 38: Eignung verschiedener Membranfilter für FISH

FISH-Signale von drei verschiedenen Filtertypen und von drei Fluorophoren wurden miteinander verglichen. Eine Kultur von 10^7 CFU *Y. enterocolitica* wurde filtriert, mit FISH-Sonden (TexasRed (rot) und Alexa488 (grün)) und DAPI (blau) gefärbt und die hintergrundkorrigierten Signalintensitäten aufgezeichnet.

Flüssigproben, die einen gewissen Feststoffanteil bzw. viele kleine Partikel aufwiesen wie zum Beispiel das Abspülwasser von Fleisch oder Salatproben, verstopften die kleinporigen Filter bei Praxisuntersuchungen sehr schnell.

Zur Probenvorbereitung von großen Volumina (200-1000 ml) wurde daher ein dreistufiges Vorfiltersystem entwickelt, das schrittweise größere Partikel entfernte: Zunächst wurde die Probe durch einen Polypropylen-Netzfilter (Porengröße 25 μm), anschließend durch einen schnell-filtrierenden (Rotilabo-)Zelluloserundfilter mit einem Größenausschluss bei 12 bis 15 μm und schließlich einen Mischzelluloseester (Porengröße 8 μm) gefiltert. Durch dieses Stufenverfahren konnten auch Proben mit großer Trübung gefiltert werden. Proben mit sehr hohem Bakteriengehalt, zum Beispiel das Abspülwasser von Salat, verstopften trotz dreistufiger Vorfiltrierung

immer noch den Filter. Mikroskopische Analysen zeigten aber, dass dies nicht mehr durch Partikel der Lebensmittelmatrix verursacht wurde, sondern durch den hohen Anteil der Bakterien in diesen Lebensmitteln (Abbildung 39).

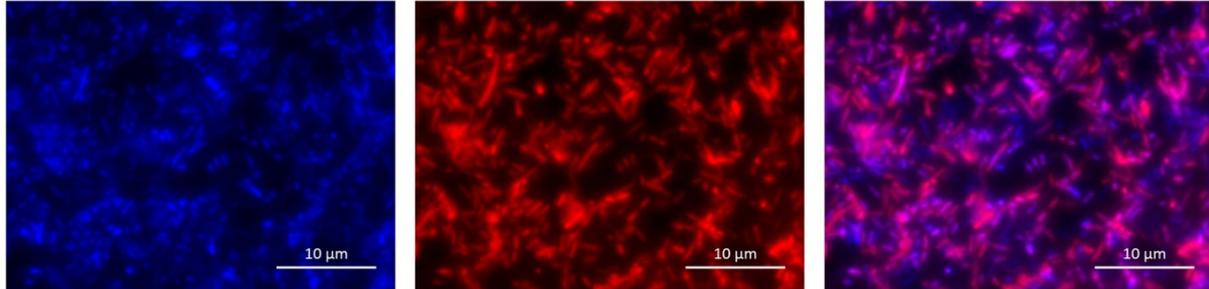


Abbildung 39: Filtrierung einer Salatprobe

Eine durch drei Vorfilter prozessierte Salatprobe enthält im letzten Filtrierungsschritt nur noch Bakterien.

Blau: DAPI. Rot: Propidiumiodid. Rechts: Merge aus DAPI- und Propidiumiodid-Signal.

3.5.2.1 Etablierung eines quantifizierbaren Standards

Direktnachweise ohne kulturelle Anreicherung haben neben der verkürzten Zeitspanne bis zum Nachweis den zusätzlichen Vorteil, dass sie eine Quantifizierung der Bakterien ermöglichen. Mikroskopische Methoden wie FISH werden allerdings meist als ungeeignet für die Quantifizierung erachtet, da sie experimentellen Schwankungen und Zellverlusten in der Vorbereitung und Färbung der Probe unterliegen wie auch der subjektiven und fehleranfälligen Auswertung des Betrachters.

Um diese Limitationen zu adressieren, wurde als interner Quantifizierungsstandard ein *E. coli* Stamm (GeneHogs pVv3-GFP; Klevanskaa *et al.*, 2014) zu Beginn einer Untersuchung in einer definierten Konzentration hinzugefügt, der GFP als optischen Marker exprimiert. Alle Verluste, die durch Probenvorbereitungsschritte wie Homogenisierung, Filtrierung, Färbung und Waschschrte anfallen, sollten auch anteilig diesen internen Quantifizierungsmarker betreffen. In einem Volumen von 250 ml waren Konzentrationen bis 10^2 CFU/ml nachweisbar. Für eine verlässliche Quantifizierung des Zielbakteriums sollten aber in jedem Blickfeld genügend Markerbakterien als Vergleichsstandard vorhanden sein. Eine Konzentration von 10^4 GFP-*E. coli*/ml erwies sich daher als am besten geeignet.

3.6 Praxisuntersuchungen an kontaminierten Lebensmitteln

Nach der Etablierung der einzelnen FISH-Nachweise und der Optimierung der Probenaufarbeitung sollte die Leistungsfähigkeit des FISH-Nachweises in kontaminierten Lebensmitteln mit dem bisherigen Goldstandard, den ISO-Methoden, verglichen werden. Wie bei jeder Alternativmethode in der Lebensmittelmikrobiologie (einschließlich anderer Schnelldiagnostikmethoden wie der PCR oder Immunoassays) können die Sensitivitäten der kulturellen ISO-Methoden nur durch eine kulturelle Voranreicherung erreicht werden. Für den Vergleich von FISH mit den Goldstandardmethoden wurden drei typische Modellsysteme gewählt, bei denen auch die ISO-Methoden und andere konventionelle Methoden häufig an ihre Grenzen stoßen.

Der kulturelle Nachweis von *Yersinien* in Lebensmitteln (gewähltes Modellsystem: *Y. enterocolitica* in Hackfleisch) gilt als schwierig und störungsanfällig, da diese langsam wachsenden Enterobacteriaceae häufig von der abundanten Begleitflora überwachsen und verdrängt werden. Zudem konnten effiziente Selektivmedien noch nicht entwickelt werden. Auch thermophile *Campylobacter* spp. (gewähltes Modellsystem: *C. jejuni* auf Geflügelbrust) zählen zu den schwer nachweisbaren Erregern auf Grund ihrer komplizierten und zeitaufwändigen Kultivierung. Für Brucellen in Lebensmitteln (gewähltes Modellsystem: *B. melitensis* in Milch) gibt es schließlich noch keinen allgemeingültigen Nachweisstandard, aber die FISH-Methode könnte möglicherweise geeignet sein, um schwierige Matrices wie Milch zu untersuchen, deren Bestandteile bei anderen nukleinsäurebasierten Nachweisen oft inhibierend wirken.

3.6.1 *Yersinia*

Für den Methodenvergleich des *Yersinia*-Nachweises wurde Hackfleisch in Konzentrationen von 1 CFU/g bis 10^6 CFU/g mit *Y. enterocolitica* inokuliert und nach ISO 10723 in PSB oder ITC angereichert. Die höchste Spikingstufe konnte direkt ohne Anreicherung mittels FISH detektiert werden, alle anderen Spikingstufen bis zu einer Konzentration von 1 CFU/g konnten entweder noch am selben Tag (10^5 CFU/g) oder innerhalb von 24 h in der ITC-Anreicherungsbouillon nachgewiesen werden (Tabelle 25).

In der weniger selektiven PSB-Bouillon war dagegen der Nachweis durch das starke Wachstum der Begleitflora nicht realisierbar. In beiden Proben war die

Hintergrundfluoreszenz moderat, insbesondere ausgeprägt aber im DAPI-Kanal. Durch die Mehrfachfärbung der Zielbakterien war aber immer die Abgrenzung zum Hintergrund leicht möglich (Abbildung 40).

Tabelle 25: Vergleich der Detektionsdauer von *Y. enterocolitica* in kontaminiertem Hackfleisch mittels FISH und mittels Direktplattierung/ISO 10273

Spikinglevel (CFU/g)	Detektionsdauer mittels FISH	Detektionsdauer mittels Direktplattierung/ISO 10273
10 ⁶	3 h	2 d
10 ⁵	7 h	2 d
10 ⁴	1 d	2 d
10 ³	1 d	4 d
10 ²	1 d	4 d
10 ¹	1 d	4 d
1	1 d	Nicht nachweisbar

Der kulturelle Nachweis aus Hackfleisch dauerte dagegen sehr viel länger und wurde durch die Begleitflora erschwert: Während hohe Konzentrationen durch direktes Ausplattieren auf CIN-Agar innerhalb von 2 Tagen problemlos identifiziert werden konnten, wurden Spikingkonzentrationen unter 10³ CFU/g durch eine große Anzahl falsch positiver *Yersinia*-ähnlicher Koloniemorphologien auf den beiden selektiven Festmedien CIN und SSDC überdeckt.

Eine massenspektrometrische Analyse dieser Kolonien ergab, dass vor der Anreicherung bzw. nach Direktausstrich die Begleitflora dominiert wurde von *Pseudomonas* spp. und ferner *Providencia* spp. sowie *Stenotrophomonas* spp. Nach der Anreicherung in ITC, PSB und nach KOH-Behandlung waren auf beiden Selektivfestmedien *Serratia* spp. und *Citrobacter* spp. die häufigsten Gruppen. Sehr geringe Kontaminationslevel von 1 CFU/g konnten daher über die ISO-Methode nicht mehr aus dem Hackfleisch isoliert werden.

3.6.2 *Campylobacter*

Für den *Campylobacter*-Nachweis mittels FISH und ISO 10272 wurden Geflügelfleischproben mit *C. jejuni* in sechs verschiedenen Konzentrationen von 0,3 bis zu 3*10⁴ CFU/g kontaminiert. Nach Voranreicherung in Bolton-Bouillon konnte

C. jejuni mittels FISH bis zu einer Konzentration von 3 CFU/g nachgewiesen werden, für 0,3 CFU/g war ein weiterer Anreicherungstag notwendig.

Die kulturelle Methode identifizierte alle Spikingkonzentrationen innerhalb von fünf Tagen (Tabelle 26). Im Gegensatz zu den Beobachtungen beim *Yersinia*-Nachweis stellte Begleitflora beim *Campylobacter*-Nachweis kein Problem dar. Durch die simultane Verwendung der sechs Sonden für *Campylobacter* konnte die Belichtung der Proben stark reduziert werden, sodass die Autofluoreszenz der Geflügelbrustmatrix schwach ausfiel (Abbildung 40).

Tabelle 26: Vergleich der Detektionsdauer von *C. jejuni* in kontaminiertem Geflügelfleisch mittels FISH und ISO 10272

Spikinglevel (CFU/g)	Detektionsdauer mittels FISH	Detektionsdauer mittels ISO 10272
3*10 ⁴	1 d	5 d
3*10 ³	1 d	5 d
3*10 ²	1 d	5 d
3*10 ¹	1 d	5 d
3	1 d	5 d
0.3	2 d	5 d

3.6.3 *Brucella*

Brucellen ließen sich durch den kulturellen Nachweis innerhalb von 4 bis 5 Tagen bis zu einem Spikinglevel von 1 CFU/ml nachweisen, wobei die kleinen Kolonien durch den Milchanteil nur schwer auf den grauweiß gefärbten Platten auszumachen waren. Die FISH-Methode konnte in einigen der Triplikat-Ansätze hohe Kontaminationsraten von 10⁷ CFU/ml direkt ohne Anreicherung innerhalb weniger Stunden nachweisen. Die Milchbestandteile verursachten dabei eine moderate Hintergrundfluoreszenz. Diese beeinträchtigte aber weder die mikroskopischen Untersuchungen in den direkt genommenen, unverdünnten Milchproben noch in den Anreicherungsproben (Abbildung 40).

Bei geringen Kontaminationsraten von 1 CFU/ml benötigte man für den FISH-Nachweis (einschließlich Anreicherung und Färbung) maximal 48 Stunden; in einigen Ansätzen war dies auch schon nach 24 Stunden möglich (Tabelle 27).

Tabelle 27: Vergleich der Detektionsdauer von *B. melitensis* in kontaminierten Milchproben mittels FISH und Kultivierung

Spikinglevel (CFU/ml)	Detektionsdauer mittels FISH	Detektionsdauer mittels Kultivierung
10 ⁷	1 d (teilweise 4 h)	4 d
10 ⁶	1 d	4 d
10 ⁵	1 d	4 d
10 ⁴	1 d	4 d
10 ³	1 d	4 d
10 ²	1 d	4 d
10 ¹	1 d	4 d
1	2 d (teilweise 1 d)	5 d

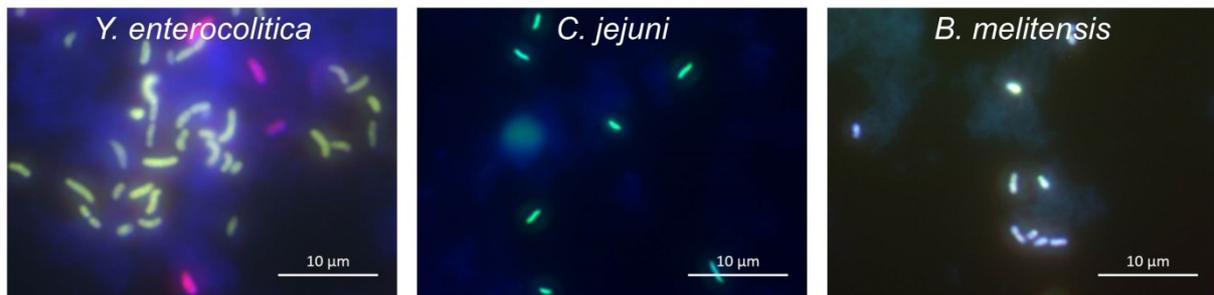


Abbildung 40: Praxisuntersuchungen in künstlich kontaminierten Lebensmitteln

Links: Erkennung von *Y. enterocolitica* (gelb) in kontaminiertem Hackfleisch mit Begleitflora (rot) nach 24 h Anreicherung. Merge aus Sondengemisch YersEco16I/II-FAM (grün) EUB338- (rot) und DAPI-Signal

Mitte: Erkennung von *C. jejuni* in kontaminiertes Geflügelbrust. Färbung einer mit 3 CFU/g kontaminierten Lebensmittelprobe nach 24 h Anreicherung. Merge aus *Campylobacter*-Sondengemisch-Alexa488- (grün) und DAPI-Signal.

Rechts: Erkennung von *B. melitensis* in Milch nach 24 h Anreicherung. Merge aus Bruc236-2Alexa488- (grün), EUB338- (rot) und DAPI-Signal.

4 Diskussion

4.1 Etablierung der FISH-Tests

4.1.1 Sondendesign und Auswahl der Zielsequenzen

Die Wertigkeit eines FISH-Tests wird entscheidend von der Spezifität und Sensitivität (also der Abdeckung aller Zielstämme) der verwendeten Sonden bestimmt. In Hinblick auf diese beiden Gütekriterien wurde bei den *in silico* Analysen der bisher publizierten Sonden in dieser Arbeit deutlich, dass bei einem Großteil der bislang entwickelten FISH-Sonden deutliche Defizite bezüglich eines oder beider Parameter bestehen. Interessanterweise werden diese Defizite nur selten in den entsprechenden Publikationen erwähnt und eine schnelle Überprüfung der SONDENSEQUENZEN in öffentlichen Datenbanken mittels Tools wie probeCheck findet nur selten statt (Almeida *et al.*, 2010). Sonden aus den 90er-Jahren werden immer noch in unveränderter Form verwendet und nur selten leicht modifiziert (Fuchizawa *et al.*, 2009), obwohl sich die bioinformatische und experimentelle Datenlage inzwischen grundlegend verbessert hat und zahlreiche neue rRNA-Sequenzen verfügbar sind. Häufig verlässt man sich in diesen Studien ausschließlich auf die in einem Labor verfügbaren Bakterienstämme (Moreno *et al.*, 2011), die die tatsächliche biologische Vielfalt im Lebensmittel aber nur ungenügend widerspiegeln und einer systematischen Verzerrung unterliegen können. So beinhalten beispielsweise die Stammsammlungen klinisch-diagnostischer Labore oft nur humane Ausbruchsstämme, Betriebe aus der Lebensmittelindustrie verfügen meist nur über Stämme aus der dort verarbeiteten Lebensmittelmatrix, europäische Labore besitzen nur Isolate aus der EU etc. Ein gutes Beispiel für dieses Bias ist die Sonde EcoPNA1169 von Almeida *et al.* (2013). Diese Sonde erkennt zwar tatsächlich *E. coli* O157, aber auch sehr viele Salmonellenstämme, die allerdings in dem gewählten Stammpanel für die *in vitro* Analysen nicht enthalten waren. Ein Vergleich der gewählten SONDENSEQUENZ mit den verfügbaren Datenbanken wie z. B. TestProbe oder probeCheck hätte diese Limitation schneller offenbart. Diese häufig unvermeidbare Voreingenommenheit hinsichtlich der Stammauswahl lässt sich also nur durch sorgfältige Datenbankabgleiche mildern, obwohl auch in diesen Sammlungen systematische Fehler in Bezug auf die sequenzierten Isolate nicht ausgeschlossen werden können. Die in dieser Arbeit in einem iterativen

Designprozess (siehe Abschnitt 2.2.7) entwickelten Sonden sind alle eingehend unter Verwendung verschiedener Datenbanken und Analysetools bioinformatisch überprüft worden. Dies ermöglichte eine sehr viel bessere Abdeckung der jeweiligen Zielspezies und begrenzte falsch positive Reaktionen, die bei bisher veröffentlichten Sonden eher zu erwarten sind und in dieser Arbeit auch zahlreich identifiziert worden sind.

Die Einsicht, dass viele FISH-Testsysteme bzw. die verwendeten Zielsequenzen überholt sind, hat sich bisher nur in einigen Bereichen der Mikrobiologie durchgesetzt. Amman und Fuchs (2008) wiesen darauf hin, dass insbesondere die weithin genutzten gruppenspezifischen Sonden (z. B. für ganze Domänen, Abteilungen oder Klassen von Lebewesen) oft weniger als 85 % aller Zielorganismen abdecken. So wird beispielsweise die mutmaßlich universelle „Eubakteriensonde“ EUB338 immer häufiger in Kombination mit den zwei Sonden EUB338-II und EUB338-III verwendet und erreicht selbst in dieser Dreierkombination nur eine Abdeckung von 94 % aller bekannten Bakterienspezies (Amman und Fuchs, 2008).

4.1.2 Optimierung der Sondensequenzen

Die Identifikation einer geeigneten Zielsequenz ist nur der erste Schritt eines erfolgreichen Sondendesigns. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal ein frei kombinierbares Sondenpanel zum Nachweis der wichtigsten zoonotischen bakteriellen Pathogene in Lebensmitteln entwickelt (Rohde *et al.*, 2016a). Dies konnte nur gelingen, da die einzelnen Sonden mit ähnlichen thermodynamischen Bindungseigenschaften ausgestattet wurden. Das Modell von Yilmaz *et al.* (2004) und die technische Implementierung in der frei verfügbaren Anwendung mathFISH (Yilmaz *et al.*, 2011) erwiesen sich dabei als sehr präzise und gut geeignet, um einen isothermalen Multiplex-Erregernachweis zu etablieren, der bei gleicher Konzentration der Pufferbestandteile (Formamid, NaCl) durchgeführt werden kann. Nur in Einzelfällen, nämlich bei der Etablierung einer Sonde für *A. butzleri* (Arcobu) und der Entwicklung zusätzlicher Sonden für thermophile *Campylobacter* spp. (z. B. Campy268) waren die Ergebnisse der *in silico* Analysen in der Praxis schlecht übertragbar. Bisher existiert nur eine begrenzte Anzahl an Studien, in denen es gelang, mehrere Bakterien gleichzeitig mittels FISH nachzuweisen (Schimak *et al.*, 2015; Takada *et al.*, 2004; Valm *et al.*, 2012). Diese Systeme beruhen meist auf der Verwendung einiger weniger Fluorophore, die durch geschickt gewählte

Kombinationen und der Simultanfärbung einer Zielzelle mit mehreren Sonden ihre Multiplexkapazität erreichen.

Ein zweiter Aspekt, der in anderen Studien selten berücksichtigt wird, ist der Effekt von Fehlpaarungen und ihre optimale Positionierung. Im Gegensatz zu anderen publizierten Sonden wurden in dieser Arbeit Sequenzen verwendet, die nach Möglichkeit mehr als einen Nukleotidunterschied zum phylogenetisch nächsten Verwandten aufwiesen. Gleichzeitig hat es sich bestätigt, dass Nukleotidfehlpaarungen, die in der Mitte der Sondensequenz positioniert werden, einen deutlich stärkeren Effekt in der Unterbindung falsch positiver Hybridisierungen ausüben (Naiser *et al.*, 2008).

Die dritte Neuerung, die in den meisten vorhergehenden FISH-Studien keine Verwendung fand, ist der umfangreiche Einsatz von Kompetitoren und der Einbau von LNAs zur Steigerung der Spezifität. Bisherige Studien verwendeten (wenn überhaupt) maximal ein oder zwei Kompetitoren und inkorporierten LNAs trotz ihrer im Vergleich zu PNAs niedrigeren Preise nur sehr selten in FISH-Sonden (Kuboto *et al.*, 2006). In dieser Arbeit erwiesen sich Kompetitorpools (z. B. für Yersall-Demaneche oder YersPseu23 mit einer Vielzahl leicht unterschiedlicher Sequenzen von Nichtzielspezies) oder Kompetitoren mit einzelnen LNAs zur verbesserten Abgrenzung (Listmono-Komp) als sehr hilfreich. Der Einbau von LNAs in FISH-Sonden ermöglichte in dieser Arbeit sowohl eine bessere Zielerkennung (Yerspest1523; Yerspseu1523) als auch deutlich verbesserte Hybridisierungsergebnisse bei schwer zugänglichen Zielsequenzen in der RNA (Campy268LNA).

Als eine weitere Optimierung ist schließlich auch der speziell für den *Yersinia*-Nachweis erprobte Standard der Doppelfärbung hervorzuheben. Bei einer mangelhaften Datenlage in den Sequenzdatenbanken und einer Vielzahl nahverwandter Arten ist es nicht immer sicher möglich, eine Spezies nur durch eine Sonde zu identifizieren. Unter diesen Umständen empfiehlt sich ein zweistufiges Verfahren, bestehend aus einer Screening- und einer Bestätigungssonde mit einer anderen Fluoreszenzmarkierung. Wenn es viele nahverwandte Nichtzielspezies gibt, kann das Einführen einer dritten Detektionsebene sinnvoll sein, weshalb im Falle der Yersinien zusätzlich eine genuspezifische Kontrollsonde (Yersall-Demaneche) zum Einsatz kam. Dieses Vorgehen bietet sich insbesondere für komplexe Matrices mit starker Hintergrundfluoreszenz und hohen Bakteriendichten an.

Ein Spezialfall bei den Doppelfärbungen bildet der *Y. pestis* Nachweis. Er illustriert ein Phänomen, das bisher noch von keiner vorhergehenden FISH-Studie genutzt worden ist, nämlich die Diversität der RNA-Genkopien innerhalb einer Zelle. Die Existenz oder Abwesenheit dieser häufig minimalen Genpolymorphismen erlaubte die Abgrenzung zwischen *Y. pestis* und *Y. pseudotuberculosis*. Dieses Prinzip könnte eventuell auch für die Feindifferenzierung anderer Erregergruppen einschließlich bestimmter Speziessubtypen nutzbar sein, die bislang auf 16S oder 23S rRNA-Ebene als nicht unterscheidbar galten. Eine Unterscheidung unter Verwendung von mRNAs (Kenny *et al.*, 2008) mag zwar in der Theorie auch denkbar sein, ist aber weitaus weniger robust. So schlug Kenny *et al.* eine Unterscheidung mittels einer temperaturabhängig exprimierten mRNA vor, ein System, das nur bei sehr starken Expressionsraten und unter den richtigen Temperaturbedingungen funktionieren kann.

Weder die Verbesserungen im Sondendesign noch die Verwendung von mehreren Sonden und Kompetitoren haben bisher breiten Eingang in die Mikrobiologie gefunden. Allerdings wird bereits seit geraumer Zeit versucht, den Prozess des Sondendesigns bioinformatisch zu standardisieren, das bekannteste Beispiel dafür ist wohl das ARB Softwarepaket, das auch das Tool PROBE_DESIGN beinhaltet. Während es gute Ergebnisse zur Identifizierung potenziell spezifischer SONDENSEQUENZEN liefern kann, ist die thermodynamische Optimierung, welche die Besonderheiten einer Hybridisierung berücksichtigt, bisher nicht zufriedenstellend und orientiert sich noch maßgeblich am Primerdesign. Diese Aufgabe wurde bisher nur in anderen Programmen wie z. B. mathFISH hinreichend realisiert. Ein kombinierter Algorithmus, der beide Felder bedient, inklusive Vorschläge für mögliche Kompetitoren, für den Einbau von LNAs oder einer geeigneten Positionierung von Fehlpaarungen zu Nichtzielorganismen, wäre für die Zukunft wünschenswert. In Teilen wurde dies mittlerweile auf Genusebene in dem neuem Softwarepaket DECIPHER realisiert (Wright *et al.*, 2014).

4.1.3 Autofluoreszenz und Methoden zur Signalverstärkung

Für die Anwendung von FISH-basierten Nachweisverfahren im Lebensmittel stellen die Auto- und Hintergrundfluoreszenz große Herausforderungen dar. Die Ursachen für diese störende Fremdfluoreszenz können vielfältig sein und sind häufig nicht eindeutig bestimmbar. In dieser Arbeit wurden unter anderem die

Hintergrundfluoreszenzen von verschiedenen Filtermembranen analysiert, die nicht nur von Material zu Material variieren, sondern auch maßgeblich durch die Wahl des Fluorophors bestimmt werden. Bei definierten, konstanten Versuchskomponenten wie Membranfiltern kann dieser Störquelle Rechnung getragen werden, bei matrixspezifischer Fluoreszenz, die in ihrer Zusammensetzung stark variabel sein kann, ist dies sehr viel schwieriger. Pflanzliche wie tierische Pigmente, zum Beispiel Chlorophyll oder Hämoglobin, sind bekannt für ihre Autofluoreszenz und können erhebliche Probleme bei einer FISH-Analyse bereiten (Zeller *et al.*, 2016). In dieser Arbeit wurden ähnliche Phänomene beobachtet, insbesondere beim Direktnachweis von Bakterien in Lebensmitteln (z. B. bei den Wurstschnitten, den Hackfleischproben oder bei der FISH-Analyse von Milch). Unterschiedliche Lösungen wurden für verschiedene Matrices oder Organismen empfohlen. Zeller *et al.* (2016) untersuchten die Effekte einer Vorbehandlung mit Wasserstoffperoxid oder Kupfersulfat bei Cyanobakterien, Tajbakhsh *et al.* (2008) verwendeten Biotin für Sputumproben, Almeida *et al.* (2013) benutzten eine milde Detergenzbehandlung mit Triton X-100 für Rinderhack und Koga *et al.* (2009) variierten die Fixierungsbedingungen und setzten ebenfalls Wasserstoffperoxid für das Gewebe von Insekten ein. Auch kommerzielle „Blocking“-Puffer oder die Bestrahlung mit UV-Licht können hilfreich sein. Eine universelle Strategie zur Reduktion der Autofluoreszenz ist bisher jedoch noch nicht gefunden worden. Vielversprechender scheint daher die Verstärkung der FISH-Signale, um ein günstigeres „signal-to-noise“ Verhältnis zu erreichen. Die meisten Systeme zur Signalverstärkung beruhen auf mehrstufigen Amplifikationsschritten, entweder über enzymmarkierte Sonden, die chromogene Substrate in Folgeschritten umsetzen (CARD-FISH; Kubota, 2013), oder durch nichtenzymatische Hybridisierungs-Kettenreaktionen (HCR-FISH; Yamaguchi *et al.*, 2015). Beide Methoden können die FISH-Signale um mehr als eine Zehnerpotenz steigern. Das mehrstufige Verfahren erhöht aber Komplexität, Zeitaufwand, Kosten, und Fehleranfälligkeit mitunter beträchtlich. Die in dieser Arbeit erprobte Methode des simultanen Einsatzes von bis zu sechs Sonden für thermophile *Campylobacter* spp. ist eine sehr viel einfachere und kostengünstigere Alternative, die keiner besonderen Protokollanpassung bedarf, wohl aber eines sehr sorgfältigen Sondendesigns. Weitere Möglichkeiten zur Steigerung der FISH-Signalintensität könnten der Einsatz stärkerer Fluorophore und Sondenmehrfachmarkierungen sein. Bei Mehrfachmarkierungen muss aber immer auch mit Quenchingeffekten und dem

Risiko einer unspezifischen Bindung durch die Fluorophorkomponenten gerechnet werden. Bei der Verwendung von Mehrfachmarkierungen und einem Fluorophoraustausch können ebenfalls unerwartete Phänomene auftreten, zum Beispiel Permeabilisierungsprobleme, wie sie beim Wechsel von Bruc236-FAM zu Bruc236-2Alexa488 zu beobachten waren. Bei der Suche nach stärkeren Fluorophoren gilt zu berücksichtigen, dass die hier primär verwendeten Alexa-Farbstoffe zwar sehr hell und stabil (im Vergleich zu FAM), aber durch hohe Patentgebühren auch relativ teuer sind. Bessere Farbstoffe mögen zwar verfügbar sein, ihre Verwendung könnte die Wirtschaftlichkeit von FISH-Nachweisen für die Lebensmittelmikrobiologie bei heutigen Marktpreisen jedoch in Frage stellen.

4.2 Lebend/Tot-Unterscheidung und Stabilität des Signals

Die Abgrenzung zwischen toten und lebenden Bakterien im Lebensmittel ist ein entscheidendes Kriterium, um das Risiko für den Endkonsumenten zu bewerten, denn abgesehen von assoziierten bakteriellen Toxinen stellen nur die lebenden Bakterien ein Gesundheitsrisiko dar. Bemerkenswerterweise wird diese wichtige Eigenschaft durch internationale Validierungs- und Zertifizierungsstellen wie AOAC, AFNOR, NordVal oder MicroVal bei der Bewertung kommerzieller Detektionskits nicht erfasst. Schnelle Immunoassays oder PCR-Analysen werden dadurch als gleichwertig zu den kulturellen ISO-Methoden eingestuft, obwohl ihre Aussagekraft durch den fehlenden Lebendnachweis wesentlich geringer ist. In dieser Hinsicht ist FISH eine wichtige Brückenmethode, die als Schnellnachweisverfahren in der Literatur mit der Eigenschaft der Lebend/Tot-Unterscheidung assoziiert ist (Jasson *et al.*, 2010). Die Lagerungsexperimente mit *Yersinia*-Kulturen zeigten, dass die FISH-Signale unter Mangelbedingungen zum Teil deutlich abnehmen, aber gut erkennbar bleiben. Auch Fang *et al.* (2003) zeigten für *Salmonella*, dass das FISH-Signal unter wachstumshemmenden Bedingungen über mehrere Wochen erhalten bleibt.

Die Untersuchungen zur Nachweisbarkeit des FISH-Signals bei *Yersinien* nach Hitzeabtötung ergaben interessanterweise, dass auch noch nach 30 min milder Hitzeeinwirkung (und vollständigem Abtöten) einzelne Bakterien mittels FISH nachweisbar bleiben. Cenciarini-Borde *et al.* (2009) verglichen zahlreiche Studien, die unterschiedliche Methoden zur Amplifikation von Nukleinsäuren nutzten (z. B. RT-PCR, NASBA), und hinterfragten kritisch den Nutzen von Nukleinsäuren als Viabilitätsmarker. Während es allgemeiner Konsens ist, dass DNA zur Lebend/Tot-

Unterscheidung ungeeignet ist, stellten sie fest, dass auch mRNAs und rRNAs häufig nach dem Zelltod über längere Zeiträume (wenn auch in reduzierten Mengen) nachweisbar bleiben, wobei dies von Spezies zu Spezies sehr unterschiedlich sein kann. Entsprechend gibt es auch zur FISH-Methodik in der Literatur widersprüchliche Angaben. Kenny *et al.* (2008) konnten *Y. pestis* nach einer Behandlung bei 55 °C (für 1 h) mittels FISH nicht mehr nachweisen, genau wie Almeida *et al.* (2013) bei 72 °C (20 min) kein FISH-Signal für *E. coli* O157 erhielten. Tolker-Nielsen *et al.* (1997) fanden dagegen für *S. enterica* bei einer mildereren Hitzeeinwirkung von 52 °C (für bis zu 20 min) noch große Mengen intrazellulärer rRNA, genauso wie nach Behandlung mit Essigsäure, hohen Salzkonzentrationen oder Ethanol. Die FISH-Methode besitzt also ein (vermutlich speziesabhängiges) diagnostisches Fenster, in dem es nicht möglich ist, tote von lebenden Bakterien zu unterscheiden. Dieses diagnostische Fenster ist aber bei FISH wahrscheinlich deutlich kleiner als bei RT-PCRs oder anderen Ansätzen mit rRNA/mRNA-Amplifikation, da bei einer FISH-Analyse tote Zellen mit einem um mehr als 90 % verringerten RNA-Gehalt (und dementsprechend deutlich schwächeren Fluoreszenzsignalen) klar von lebenden Zellen unterscheidbar sein sollten.

Die zeitliche Lücke zwischen Zelltod und dem korrekten Nachweis beziehungsweise der korrekten Abgrenzung zu lebenden Zellen betrifft auch andere Verfahren zur Lebend/Tot-Differenzierung wie die Färbung mit Propidiumiodid bzw. die PMA-PCR. Villarino *et al.* (2000) beschrieben, dass die Art des Zelltodes die Lebend/Tot-Unterscheidung einer Viabilitätsfärbung beeinflusst. Während nach der Hitzeabtötung von *E. coli* sowohl mittels FISH, Propidiumiodidfärbung, CTC-Formazan-Färbung (respiratorische Aktivität) oder chromogener Esterasesubstrate (z. B. cFDA) korrekte Ergebnisse erzielt wurden, versagten diese Methoden nach der Abtötung mit UV-Licht und lieferten zum Teil 48 h später noch falsch positive Ergebnisse. Villarino *et al.* (2000) stellten weiterhin fest, dass einzig der DVC-FISH-Assay direkt nach der UV-Behandlung negative Ergebnisse lieferte. Fiksdal und Tryland (1999) zeigten, dass selbst bei Hitzeinaktivierung verschiedene Enzymaktivitäten und die Membranintegrität bzw. die zu ihrem Nachweis eingesetzten Substanzen nur unzureichende Indikatoren für die Lebensfähigkeit von *E. coli* darstellen; die DVC-Methode zeigte hingegen hier eine enge Korrelation mit der Kultivierungsfähigkeit. Auch in dieser Arbeit erwiesen sich enzymatische Reaktionen und die Membranintegrität als unzureichend und fehlerträchtig. In Übereinstimmung mit den

Ergebnissen in dieser Arbeit scheint die DVC-Methode in Verbindung mit FISH die derzeit zuverlässigste und vielversprechendste Schnelldiagnostikmethode zu sein, um lebende Bakterien zu detektieren. Eine ähnliche Trennschärfe bei der Abgrenzung zwischen toten und lebenden Bakterien könnte höchstens noch von Bakteriophagenbasierten Nachweismethoden erwartet werden, unter der Prämisse, dass Phagen nur lebende Bakterien infizieren und sich darin replizieren können (Schmelcher und Loessner, 2014). Die Aussagekraft der DVC-Methode beruht allerdings maßgeblich auf dem Einsatz eines Antibiotikums, gegen das der zu untersuchende Zielorganismus keine bzw. keine ausreichende Resistenz aufweisen sollte. Gegen die in dieser Arbeit verwendete Nalidixinsäure besitzen viele lebensmittelrelevante Pathogene jedoch bereits Resistenzen und könnten so in einem allein auf Nalidixinsäure basierten DVC-Assay fälschlich als tot eingestuft werden. Zudem ist Nalidixinsäure für grampositive Bakterien wie *L. monocytogenes* weniger gut geeignet. Buchrieser und Kamper (1993) zeigten, dass auch andere Substanzen wie Ciprofloxacin, Mitomycin C und Novobiocin gute Ergebnisse erzielen können. Joux und Lebaron (1997) nutzten deshalb eine Mischung aus fünf Antibiotika, um ein möglichst großes Spektrum an Bakterien im DVC-Assay zu erfassen; eine Lösung, die auch für die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien denkbar wäre.

4.3 Kulturunabhängige Resistenznachweise

Antibiotikaresistenzen sind ein wachsendes Problem bei fast allen der in dieser Arbeit behandelten Erreger. Kulturverfahren dominieren nach wie vor die Resistenzbestimmung sowohl in der Lebensmittelmikrobiologie wie auch in der Humanmedizin. Kulturunabhängige Methoden gewinnen jedoch immer mehr an Bedeutung, vor allem weil sie deutlich schnellere Ergebnisse liefern und zeitnahe Therapieentscheidungen möglich machen (Frickmann *et al.*, 2014). FISH wurde bereits in früheren Studien dazu verwendet, Antibiotikaresistenzen festzustellen. Diese Arbeiten beschränkten sich aber darauf, ribosomal-kodierte Resistenzen zu detektieren, insbesondere Resistenzen gegen Makrolidantibiotika, die sich in Punktmutationen in der 16S oder 23S RNA ausdrücken: Beispielsweise wiesen Haas *et al.* (2008) mit Hilfe von FISH Erythromycinresistenzen in thermophilen *Campylobacter* spp. nach und Trebesius *et al.* (2000) zeigten Ähnliches für *H. pylori* und Clarithromycinresistenzen. Viele andere Resistenzen werden aber durch die Expression von Genen vermittelt, die beispielsweise Enzyme kodieren, die die

Antibiotika neutralisieren können. Die in dieser Arbeit nachgewiesenen TEM- β -Lactamasen stellen dabei nur ein (wenn auch in der Natur weitverbreitetes) Resistenzmodell dar für ein bisher ungenutztes Potenzial der FISH-Methode in der Mikrobiologie. Wie schon bei der Lebend/Tot-Unterscheidung kann FISH auch hier eine Brückentechnologie zwischen Genotyp und Phänotyp sein. Die bloße Existenz von Genelementen mit potenziellen Resistenzeigenschaften und ihr Nachweis über eine PCR besagt noch nicht, ob diese tatsächlich transkribiert, korrekt translatiert und funktionell wirksam sind. FISH deckt die Ebene der Transkription ab, während die in dieser Arbeit entwickelte Antikörperfärbung auf Proteinebene und der bereits seit längerem etablierte Nitrocefin-Assay auf enzymatischer Ebene ansetzen. In Tabelle 28 sind die Charakteristika der drei kulturunabhängigen Verfahren gegenübergestellt.

Tabelle 28: Kulturunabhängige Methoden zur Bestimmung der Antibiotikaresistenz (adaptiert von Rohde *et al.*, 2016b)

Nachweismethode	FISH	Immunfluoreszenz	Nitrocefin
Zielstruktur	mRNA	Protein	Enzymaktivität
Geschwindigkeit	5 h	7 h	< 1 h
Kosten	Moderat	Moderat bis hoch	Gering
Simultane Speziesbestimmung	Möglich	Möglich	Nicht möglich
Spezifität	Eng, gruppenspezifisch (z. B. alle TEMs)	Eng, gruppenspezifisch (z. B. alle TEMs)	Breit (z. B. alle β -Lactamasen)
Nachteile	Transkription korreliert nicht mit Expression	Spezifische Antikörper notwendig	Nicht geeignet auf Einzelzellebene

Von diesen drei Brückentechnologien zwischen dem kulturabhängigen Resistenznachweis und dem wesentlich weniger stichhaltigen Nachweis auf Genebene hat FISH im Vergleich zur Immunfluoreszenz oder zum Nitrocefin-Assay die geringste biologische Aussagekraft, da es auf mRNA-Ebene ansetzt. Gleichwohl ist FISH sehr viel robuster, schneller und einfacher zu etablieren als ein Antikörpernachweis und ermöglicht problemlos die gleichzeitige Speziesbestimmung über konventionelle rRNA-Sonden. Durch den Einsatz von einer Vielzahl von Sonden haben einzelne Mutationen in der Gensequenz nur geringe Auswirkungen, weil der Ausfall einer Sonde das FISH-Signal nur geringfügig beeinflusst. Die von Raj *et al.* (2008) für eukaryotische Organismen entworfene Methode des mRNA-Nachweises

ließ sich in dieser Arbeit ohne größere Schwierigkeiten auf Bakterien übertragen. Das sehr heterogene Transkriptionsmuster der plasmidtragenden *E. coli* steht in Übereinstimmung mit Studien für andere Gene, bei denen ebenfalls starke Schwankungen innerhalb einer Bakterienpopulation und einzelne mRNA-Foci beobachtet wurden (Skinner *et al.*, 2013; So *et al.*, 2011). Der Nitrocefin-Assay hat zwar die höchste biologische Relevanz unter den kulturunabhängigen Resistenznachweisen, besaß aber in den Experimenten die geringste Sensitivität und ließ sich nicht auf Einzelzellebene übertragen. Somit kann in gemischten Kulturen die resistente Spezies nicht identifiziert werden. Eine mögliche Alternative zu Nitrocefin wären fluoreszierende Substrate der β -Lactamase wie das CCF2-AM, ein Reportersubstrat mit primärer Verwendung in eukaryotischen Zellkulturen (Nord *et al.*, 2005). CCF2-AM würde zwar vermutlich besser in den Zellen zurückgehalten werden, ist aber dafür weitaus teurer und zudem noch ungenügend für Bakterien getestet worden.

Die Erkennung von Resistenzen ist nur ein mögliches Beispiel für den hier eingesetzten mRNA-FISH-Test. Von ähnlicher Bedeutung ist auch der Nachweis von Virulenzfaktoren wie zum Beispiel Toxinen, um das Gefahrenpotenzial, das von einem Bakterium ausgeht, besser einschätzen zu können. Neben der hier angewandten Form des mRNA-FISH (unter Verwendung mehrerer Dutzend Sonden) könnten in Zukunft andere Ansätze mit wachsender Popularität wie die „branched-DNA“-Technologie (bDNA; Battich *et al.*, 2013), die „hybridization chain reaction“ (HCR; Yamaguchi *et al.*, 2015) oder die *in situ* PCR zum mRNA-Nachweis genutzt werden. Bislang ist aber fraglich, ob diese Testsysteme ähnlich robuste Ergebnisse erzielen können, insbesondere in Anwesenheit einer störenden Lebensmittelmatrix.

4.4 Homogenisierung und Probenvorbereitung

In dieser Arbeit hat sich der Effekt der Homogenisierung insbesondere bei internen Kontaminationen bemerkbar gemacht. Harsche Verfahren, die auf dem Prinzip einer Kugelmühle aufbauen, waren keinesfalls ungeeignet bzw. anderen Methoden sogar deutlich überlegen, obwohl sie bisher weit weniger Eingang in die Lebensmittelmikrobiologie gefunden haben als der Stomacher. In Tabelle 29 sind die Charakteristika der getesteten Homogenisierungsverfahren gegenübergestellt.

Tabelle 29: Eigenschaften der gewählten Homogenisierungssysteme (adaptiert von Rohde *et al.*, 2015b)

Methode	Stomacher (Bagmixer 400)	FastPrep-24	SpeedMill	Branson Sonifier 450
Prinzip	Platten- vermitteltes Zerstampfen	Kugelvermitteltes Zermahlen	Kugelvermitteltes Zermahlen	Ultraschall
Handhabung	+	+	+	+/-
Nutzbarkeit vor Ort	-	-	+	-
Anpassungs- möglichkeiten an die Matrix	+/-	++*	++*	+/-
Gegenwärtige Nutzung für den kulturellen Nachweis	++	-	-	-
Simultane Probenverarbeitung	-	+(2-48)**	+(2-20)	-
Eignung für große Volumina***	++ (< 400 ml)	+(< 50 ml)	- (< 2 ml)	+(< 50 ml)
Nutzbares Volumenspektrum***	+/-	+	+/-	+
Vermeidung der Probenerwärmung	+	+/-	+/-	+/-
Leistungsfähigkeit				
Oberflächenkontamination	+	+	+	+
Interne Kontamination	Variabel	+	+/-	-

++: exzellent, +: gut, +/-: mäßig, -: schlecht

* Verschiedene Matrix-spezifische Kits und Kugeln für die Probenvorbereitung sind kommerziell erhältlich.

** Die gleichzeitige Vorbereitung von bis zu 48 Proben ist nur möglich für Volumina bis zu 2 ml. Bei den maximalen Volumina können nur zwei Proben gleichzeitig verarbeitet werden.

*** Die genauen Volumina hängen von der Größe der Beutel sowie von den BD Falcon™ oder Lysis Tubes ab.

Mit Ausnahme der Ultraschallbehandlung war keines der genutzten Geräte grundsätzlich ungeeignet, vielmehr zeichnen sich alle Geräte durch spezifische Vor- und Nachteile aus. Unabhängig vom Gerät zeigte sich in dieser Arbeit, dass die von

den ISO-Methoden veranschlagten Homogenisierungszeiträume (meist 1-2 min) zumindest für den Direktnachweis interner Kontaminationen viel zu kurz gewählt sind. Längere Homogenisierungszeiträume von bis zu 8 min waren bei keiner der getesteten Methoden mit einer deutlichen Reduktion der Überlebensrate verbunden, sondern mit einer signifikant höheren Freisetzung lebensfähiger Bakterien aus dem Lebensmittel.

FastPrep-24 und SpeedMill sind anpassungsfähige und flexible Geräte, die explizit für den Zellaufschluss angeboten werden, zum Beispiel als Vorbereitung für eine sich anschließende DNA-Extraktion. Die dafür verwendeten und von den Herstellern empfohlenen Kügelchen, z. B. aus Sand, sind aber weitaus kleiner als die in dieser Arbeit eingesetzten mehrere Millimeter großen Kugeln, die ursprünglich für den Aufschluss von eukaryotischem Gewebe vorgesehen waren, wie zum Beispiel für Fleisch oder pflanzliches Material. Es kann davon ausgegangen werden, dass große Kugeln weit weniger schädigende Scherkräfte auf Bakterien ausüben als die sehr viel kleineren Sandpartikel. Tabelle 29 verdeutlicht, dass im Gegensatz zum Stomacher der FastPrep-24 und die SpeedMill durch das kugelmühlenartige Aufschlussprinzip große Variationsmöglichkeiten in der Anwendung bieten. Anzahl, Größe und Material der Kugeln stellen leicht zu verändernde Parameter dar, über deren Einfluss bisher nur sehr wenig bekannt ist. Die Optimierung dieser Stellschrauben birgt das Potenzial von weiteren Verbesserungen im Erregernachweis.

In der Lebensmittelmikrobiologie ist der Stomacher eines der am häufigsten genutzten Instrumente. Das unterschiedliche Abschneiden des Stomachers in der harten Salami und in der weichen Mettwurst verdient daher besondere Aufmerksamkeit. Hier könnte die Ursache in der unterschiedlichen Beschaffenheit der Würste liegen beziehungsweise in dem Zerkleinerungsgrad. Bei der feinen Mettwurst sind die Fleischpartikel sehr viel kleiner, wodurch sich die verfügbare Fläche, auf denen sich die zugegebenen Salmonellen anlagern konnten, vergrößert. Umgekehrt ist die zur Anheftung der Bakterien verfügbare Fläche bei der groben Salami kleiner. Um die Salmonellen in das Anreicherungsmedium zu überführen, ist ein Kontakt der Fleischoberfläche mit der flüssigen Phase notwendig. Bei harschen Homogenisierungsmethoden wie dem FastPrep-24, die den raschen Austausch zwischen beiden Phasen erlaubt, werden diese Kontakte zwischen Fleischoberfläche und flüssiger Phase in viel höherer Zahl hergestellt als beim Stomacher. Bei Lebensmitteln mit geringerer Oberfläche wie der Salami fällt dieser Unterschied

weniger stark ins Gewicht, sodass hier Stomacher und FastPrep-24 ähnliche Ergebnisse erzielen, während bei der feinen Mettwurst der FastPrep-24 überlegen ist.

Sharpe *et al.* (2003) spekulierten über einen „mass action“-Effekt während der Homogenisierung, bei dem sich ein Verteilungsgleichgewicht der Bakterien zwischen den homogenisierten Lebensmittelpartikeln und der flüssigen Phase einstellt. Bei einer intern kontaminierten Matrix kann sich dieses naturgemäß erst nach längerer Homogenisierung einstellen, während der Vorgang bei Oberflächenkontaminationen schneller abläuft. Passend zu den Beobachtungen in dieser Arbeit stellte man in anderen Studien ebenfalls fest, dass für Oberflächenkontaminationen lange Homogenisierungsprozeduren entweder unnötig oder sogar tendenziell schädlich sind und sehr viel einfachere Prozeduren wie ein kurzes Abspülen ausreichend sein können (Hannah *et al.*, 2011; Jacobson *et al.*, 2008; Seo *et al.*, 2003; Sharpe, 2003).

4.4.1 Pathogenverteilung in Lebensmitteln

Verarbeitete Lebensmittel wie Würste stellen besonders komplexe Matrices dar, weil sie während des Verarbeitungs- und Reifungsprozesses unterschiedlichen, nicht immer genau reproduzierbaren Bedingungen ausgesetzt sind. Bei der Herstellung, Reifung und Lagerung von Würsten spielen insbesondere Temperatur, pH-Wert, Begleitflora und die Wasseraktivität, ein Maß für die Verfügbarkeit von Wasser, eine wichtige Rolle (Lindqvist und Lindblad, 2009; Mataragas *et al.*, 2015). Da viele Würste ohne vorheriges Erhitzen verzehrt werden, sollten diese Prozesse so optimiert sein, dass ein Großteil der Bakterien durch die Herstellungsbedingungen inaktiviert oder zumindest in ihrem Wachstum gehemmt werden.

Bei den in dieser Arbeit hergestellten Würsten wurde passend dazu eine deutliche Reduktion der Keimzahlen um 3-4 log-Stufen beobachtet. Bei geräucherten Würsten ist eine noch schnellere Absterbekinetik, wie in dieser Arbeit beobachtet, zu erwarten, da die Räucherung eine einfache und kostengünstige Methode zur Konservierung darstellt. Daher ist es plausibel, dass selbst in den höchsten Belastungsstufen Salmonellen nur in geringen Konzentrationen in den geräucherten Würsten nachweisbar waren.

Vor dem Hintergrund, dass eine Vermehrung der Bakterien in der Wurst vermutlich komplett unterbunden worden ist, verwundert es ebenfalls nicht, dass Bakteriennester, über deren Existenz in der Literatur häufiger spekuliert wird

(Wimpenny *et al.*, 1995), nicht über FISH auffindbar waren. Allerdings gestaltete sich die FISH-Untersuchung an den Wurstschnitten als technisch anspruchsvoll, da durch die hohe Hintergrundfluoreszenz und die oftmals ungünstige räumliche Ausrichtung der Bakterien nur in wenigen Fällen Salmonellen eindeutig identifiziert werden konnten. Die konventionelle einfache Fluoreszenzmikroskopie stößt bei Direktnachweisen im Lebensmittel rasch an ihre Grenzen; bessere Apparate wie konfokale Mikroskope und dreidimensionale Aufnahmen sind für die Bearbeitung dieser Fragestellungen erforderlich.

Zur internen Verteilung von Bakterien in Lebensmitteln, insbesondere in einer Wurstmatrix, existieren bisher wenig gesicherte und häufig widersprüchliche Informationen. Liepe (1987) konnte in Rohwürsten keine relevanten Konzentrationsunterschiede in der natürlichen, meist apathogenen Flora zwischen einzelnen Regionen feststellen, was mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit in Bezug auf die Salami übereinstimmt.

Korkeala und Mäkelä (1989) beschrieben dagegen das Auftreten von verschiedenen Milchsäurebakterien in Würsten und fanden dabei Unterschiede im Auftreten bestimmter Bakteriengruppen zwischen Randbereich und Zentrum der untersuchten Würste. In der Dissertationsarbeit von Paulat (1999) wurden die Gesamtkeimzahlen in der Rand- und Kernzone sowie im Intermediärbereich verglichen und im Kernbereich deutlich höhere Konzentrationen als in der Randzone ermittelt. Teilweise wurden Unterschiede von mehr als zwei Zehnerpotenzen beschrieben, sowohl für die Gesamtkeimzahl als auch für Staphylokokken. In dieser Arbeit wurden für die künstlich kontaminierte Mettwurst ebenfalls beträchtliche Unterschiede in der Keimkonzentration beobachtet, allerdings in geringerem Ausmaß als bei Paulat (1999). Die Keimbelastungen unterschieden sich hier nur um den Faktor 4. Paulat führte diese Unterschiede unter anderem auf einen Trocknungseffekt von außen nach innen zurück. Tatsächlich fanden sich für die in dieser Arbeit verwendete Mettwurst im Querschnitt ebenfalls augenscheinliche (farbliche) Unterschiede zwischen den einzelnen Regionen und die Wurst schien im Inneren weicher und feuchter zu sein. Die farblichen Unterschiede könnten dabei auf Oxidationsprozesse zurückzuführen sein.

Zusammenfassend lässt sich für Salmonellen in Wurstmatrices sagen, dass die Bakterienverteilung keinesfalls *a priori* als homogen aufgefasst werden darf und häufig ein negativer Gradient von innen nach außen vorliegt. Zukünftige

Untersuchungen sollten sich daher mit weiteren verarbeiteten Lebensmitteln beschäftigen und der internen Keimverteilung Beachtung schenken. Die Ergebnisse könnten in Empfehlungen zur verbesserten Probennahme münden. Es ist ebenfalls gut vorstellbar, dass Keimbelastung und Keimverteilung nicht nur von der Matrix, sondern auch von der Erregerspezies bestimmt wird. Für die grampositiven Listerien, ein häufiges Problem in der Lebensmittelverarbeitung, ist beispielsweise ein komplett anderes Verhalten als für die gramnegativen Salmonellen vorstellbar.

4.5 Potenzial von FISH für die Lebensmittelsicherheit

Zur Bewertung der FISH-Technik ist der Vergleich mit dem Goldstandard, also den ISO-Methoden, unerlässlich. In vorangegangenen Untersuchungen war FISH bereits für den Nachweis von Salmonellen, *E. coli* und Listerien mit kulturellen Nachweismethoden verglichen und auch bei sehr geringen Spikingstufen hinsichtlich der Sensitivität als gleichwertig eingestuft worden (Almeida *et al.*, 2013; Fang *et al.*, 2003; Schmid *et al.*, 2003). Dieser Beleg wurde für thermophile *Campylobacter* spp., *Yersinia (enterocolitica)* und Brucellen erst in dieser Arbeit erbracht. Dies verwundert insofern, da insbesondere diese Erreger auf Grund ihres spezifischen Wachstumsverhaltens Schwierigkeiten im kulturellen Nachweis bereiten, was sie für die Detektion mittels alternativer Methoden wie beispielsweise FISH prädestiniert.

Der kulturelle Nachweis von *Yersinia* spp. gilt als besonders schwierig, da sich diese Bakteriengruppe durch ein eher langsames Wachstum auszeichnet und schnell von der Begleitflora überwachsen wird (Gupta *et al.*, 2015). Zudem gibt es zwar eine große Zahl kultureller Anreicherungsmedien, diese unterdrücken aber nicht das Wachstum der gesamten Begleitflora und *Yersinia*-Kolonien können häufig nicht in der Vielzahl von anderen Bakterienkolonien mit ähnlicher Morphologie identifiziert werden (Fukushima *et al.*, 2011; Gupta *et al.*, 2015). Der PCR-Nachweis wiederum wird durch die Existenz von Inhibitoren, die sowohl in den verwendeten Anreicherungsmedien als auch in der Fleischmatrix vorkommen, beeinträchtigt (Lantz *et al.*, 1998) und bietet kaum Möglichkeiten, tote von lebenden Bakterien zu unterscheiden.

Die kulturelle Detektion von *Campylobacter* wird durch den VBNC-Zustand erschwert und durch die allgemeine Empfindlichkeit von *Campylobacter* gegenüber der Umwelt, die die Kultivierungsfähigkeit im Labor herabsetzt (On, 2013; Pitkänen, 2013). Auch für die PCR gilt hier gleichermaßen, dass Inhibitoren und eine mangelhafte

Abgrenzung zu toten Bakterien die Einsatzmöglichkeiten dieser molekularen Methode begrenzen (Pitkänen, 2013). Mit Hilfe der in dieser Arbeit neu entwickelten Sonden waren auch kokkenförmige thermophile *Campylobacter* spp., die sich in einem VBNC-artigen Zustand befinden, nachweisbar. Dieser Befund widerspricht einer vorhergehenden Arbeit, in der mit einer PNA-Sonde Bakterien in diesem Kultivierungszustand nur eingeschränkt detektiert werden konnten (Lehtola *et al.*, 2005).

Für die drei Zoonoseerreger *Campylobacter*, *Yersinia* und *Brucella* erwies sich FISH in Praxisuntersuchungen an künstlich kontaminierten Lebensmitteln als geeignet, obwohl auch hier methodische Schwierigkeiten gelöst werden mussten, die bisher FISH-Arbeiten auf diesem Gebiet beeinträchtigt haben. *Campylobacter* und *Brucella* sind auf Grund ihrer geringen Größe und den damit verbundenen schwächeren Signalen schwierige Zielpathogene für die FISH-Analyse, besonders im Vergleich zu den sehr viel größeren Lebensmittelpathogenen aus den Familien der Enterobacteriaceae und Listeriaceae. Der Nachweis von *Yersinia* wiederum stellte eine Herausforderung dar, da das Sondendesign wegen der nahverwandten Arten ungleich komplexer ist, durch das langsame Wachstum die Anreicherungsverfahren mehr Zeit beanspruchen und das Zielpathogen durch die Begleitflora rasch überwachsen werden kann.

4.5.1 Kostenabschätzung des FISH-Nachweises und Vergleich zu konventionellen Nachweissystemen

Für eine Implementierung von FISH in der Laborroutine spielen die Kosten dieser Methode eine wichtige Rolle. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher auch eine Kostenanalyse (exemplarisch für den *Salmonella*-Nachweis) erstellt, um zu prüfen, ob FISH preislich mit anderen Schnellnachweismethoden oder den konventionellen mikrobiologischen Nachweisen konkurrieren könnte (Tabelle 30).

Unabhängig von der Auswahl der Methode sind alle Nachweistechiken, einschließlich hochsensitiver Methoden wie der real-time PCR, auf eine kulturelle Voranreicherung der Lebensmittelprobe angewiesen, um die amtlich geforderten Sensitivitäten zu erreichen.

Tabelle 30: Kostenschätzung für die Untersuchung auf Salmonellen mittels FISH, PCR und konventioneller Kultivierung (adaptiert von Rohde *et al.*, 2015a)

Kostenfaktor	Kosten je Probe (€)	Berechnungsbasis	Referenz
Arbeitskosten (basierend auf dem Gehalt einer medizinisch-technischen Assistenz (MTA))	6,22	30 Proben/Tag durch MTA, 21,94 €/h (durchschnittlich 17 min pro Probe: 5 min Probenvorbereitung und Anreicherung, 4 min Probenkonzentrierung und Fixierung, 2 min FISH-Färbung (paralleler Probendurchsatz), 5 min mikroskopische Untersuchung, 1 min Dokumentation)	Gehälter im öffentlichen Dienst (TvÖD), einschließlich Lohnnebenkosten
Technische Ausstattung	0,40	Anschaffungskosten von 20.000 € für ein einfaches Fluoreszenzmikroskop und eine Heizplatte, Lebensdauer von 5.000 Arbeitsstunden, Gesamtprobendurchsatz von 50.000	Nikon; Zeiss; Heratherm
Verbrauchsmaterialien:			Stellaris FISH
Anreicherungskultur	0,59		probes, TIB
DNA Sonden (40 pmol)	0,60	Geschätzter Verbrauch auf der Basis von vorhergehenden und eigenen FISH-Studien	MOLBIOL, GeneWorks,
Weitere Chemikalien und Verbrauchsmittel	2,00		Biosearch technologies
Gesamtkosten FISH	9,81		
Gesamtkosten PCR	7,02-7,84	Kommerzielles real-time PCR Kit, Gesamtmaterialekosten von 4,60-5,42 €/Test	Abubakar <i>et al.</i> , 2007; Qiagen, Applied Biosystems
Gesamtkosten Kultivierung	8,27		Abubakar <i>et al.</i> , 2007

Overhead-Kosten (z. B. für den Laborplatz, Mieten für Laborgebäude, Instandhaltung und Wartungsgebühren) wurden für alle drei Methoden als vergleichbar angesehen und nicht in die Kostenkalkulation einbezogen. Kosten für die Ausbildung des Personals sowie für die Testimplementierung und Validierung (sowohl für PCR wie FISH) sind ebenfalls nicht berücksichtigt worden. Der personelle Zeitaufwand für die PCR und die konventionelle Kultivierung/Anreicherung wurden von vorhergehenden Kostenschätzungen übernommen und mit den Arbeitskosten in Deutschland verrechnet (Abubakar *et al.*, 2007; Alexander *et al.*, 2006; Lucore *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2003). Materialkosten für die PCR hängen vom verwendeten real-time PCR Kit ab, weshalb zwei unabhängige Herstellerangebot eingeholt wurden.

FISH-Untersuchungen in der Art und Weise, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt worden sind, sind auf die Einzelprobe berechnet etwas teurer als Vergleichsberechnungen aus der Literatur für andere Techniken (Abubakar *et al.*, 2007); die Preisunterschiede sind aber nicht gravierend.

Alexander *et al.* (2006) untersuchten die Wirtschaftlichkeit eines klinischen PNA-FISH-Testes auf *Candida albicans*, einem Pilz, der insbesondere bei immungeschwächten Personen schwere Infektionen auslösen kann, und kamen zu dem Ergebnis, dass die Verwendung von FISH eine frühzeitige Therapie mit adäquaten Medikamenten ermöglicht, wodurch erhebliche Einsparungen in Krankenhäusern gemacht werden können.

In Tabelle 31 wird abschließend eine Gesamtbewertung der FISH-Technologie für den Lebensmittelbereich vorgenommen (Rohde *et al.*, 2015a). FISH ist eine Brückentechnologie zwischen den rein molekularen PCR-Methoden, die sich als bequeme Screeninginstrumente eignen, und den kulturellen Goldstandardmethoden mit ihrer großen Aussagekraft, aber hohem Zeitaufwand.

Keine der drei Methoden ist grundsätzlich in allen Aspekten überlegen. Insbesondere die relativ niedrige Sensitivität von FISH ohne Anreicherung stellt einen Nachteil gegenüber anderen nukleinsäurebasierten Schnellnachweismethoden wie der PCR dar. Jasson *et al.* (2010) veranschlagten das Detektionslimit von FISH und anderen mikroskopischen Methoden bei 10^4 CFU/ml; durch filter-FISH konnte in dieser Arbeit ein Detektionslimit von ungefähr 10^2 CFU/ml erreicht werden, ein Wert vergleichbar zur Sensitivität der PCR. Dieses für 250 ml kalkulierte Limit ließe sich aber durch größere Probenvolumina weiter verbessern. In großindustriellen Anlagen fallen beispielsweise weit höhere Mengen an Spülwasser an, die sehr einfach für die FISH-Analyse verwendet werden könnten.

Tabelle 31: Zusammenfassung von Stärken und Schwächen der konventionellen mikrobiologischen Techniken, von FISH sowie von PCR-Methoden

Testmerkmal	Konventionelle mikrobielle Detektion	FISH	PCR-Methoden
Zielstruktur und Testprinzip	Teilung der Bakterien, Stoffwechseleigenschaften	Bindung von Sonden an bakterielle rRNA (mRNA, DNA)	Amplifikation von (bakterieller) DNA oder RNA
Geschwindigkeit	--	+	++
Spezifität	+	++	++
Sensitivität (Jasson <i>et al.</i>, 2010)	++ (1 CFU in 25 g)	+(ohne Anreicherung, mikroskopische Auswertung)	++ (real-time PCR)
Ausschluss von toten Bakterien	Ja	Ja	Nein
Erkennung von Bakterien im VBNC-Stadium	Nein	Ja	(Ja)
Abschätzung der Bakterienkonzentration	+	+	+/-
Robustheit/ Matrixabhängigkeit	++	+/-	+/-
Multiplexsysteme	-	+	+
Kosten pro Test	+/-	+/-	+
Testkomplexität	+	+/-	+/-
Potenzial zur Standardisierung	+	+/- (ohne Automatisierung)	+
Gegenwärtiger Stand der Validierung und Implementierung	++	-	+
Potenzial für Hochdurchsatzanalysen	-	+	++
Potenzial für die Routineanwendung und zur Risikobewertung	+	+	+

++: exzellent, +: gut, +/-: mäßig, -: schlecht, --: entscheidender Nachteil

4.6 Ausblick

Tabelle 31 zeigt bestehende Schwächen der FISH-Technologie auf, die es in der Zukunft zu lösen gilt, besonders hinsichtlich der Standardisierung und Automatisierung. Auf dem Gebiet der Standardisierung besteht dabei im Vergleich zu anderen Methoden der größte Aufholbedarf. Wie für jede mikrobiologische Analyseverfahren besteht auch für FISH die Notwendigkeit eines klaren Auswerteschemas, das positive wie negative Kontrollen beinhalten sollte. Im Gegensatz zu anderen Methoden wie z. B. der PCR, in der Leer- oder Negativkontrollen, Positivkontrollen sowie ferner (insbesondere für komplexere PCR-Tests) Matrixkontrollen, Amplifikationskontrollen des Normalisierungsstandards und Verdünnungsreihen für die lineare Quantifizierung zur täglichen Praxis gehören, sind diese standardisierbaren Kontrollen und Auswertungskriterien für FISH noch nicht allgemein definiert. Swidsinki (2006) schlug neben Positiv- und Negativkontrollen weitere Qualitätskriterien für FISH-Untersuchungen vor wie eine erfolgreiche DAPI-Färbung, eine Färbung mit anderen gruppenspezifischen Sonden und der Visualisierung in anderen Fluoreszenzkanälen (wie zum Beispiel in dieser Arbeit für *Yersinia* entwickelt) oder auch das Erkennen einer plausiblen Bakterienmorphologie. Der bisherige Mangel an allgemeingültigen FISH-Qualitätsstandards in der Mikrobiologie ist ein wichtiges Hindernis für die Akzeptanz der FISH-Analyse.

Da die mikroskopische Auswertung außerdem immer der subjektiven Einschätzung der untersuchenden Person unterliegt, ist eine Automatisierung der FISH-Analyse auf lange Sicht wünschenswert. Dies verringert gleichzeitig den vergleichsweise hohen Personalkostenanteil eines FISH-Testes und bietet die Möglichkeit für Hochdurchsatzanwendungen. Die Automatisierung kann dabei einerseits durch die Verwendung der Durchflusszytometrie erreicht werden, erfolgsversprechend erscheinen aber auch motorisierte Mikroskope mit automatischer Bildverarbeitung und computergestützter Auswertung. Integrierte Lösungen, einschließlich vollautomatisierbarer Färbereinrichtungen, wie man sie aus der Pathologie kennt (Wauters *et al.*, 2007) sind zwar noch rar, einzelne Komponenten sind aber bereits entwickelt worden (Daims und Wagner, 2007; Myers, 2004; Myers, 2012; Zeder und Pernthaler, 2009). Die Kombination dieser bereits bestehenden Module und der Nachweis, dass solche automatisierten Analysesysteme ähnlich genau wie geschultes Personal arbeiten können, würden der Implementierung von FISH-Nachweisen in Routineeinrichtungen deutlichen Aufschwung verschaffen.

5 Zusammenfassung

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) ist eine Nachweismethode für Mikroorganismen und stellt eine vielversprechende Alternative zum konventionellen, langsamen Kulturnachweis beziehungsweise zu anderen schnellen molekularen Detektionsmethoden ohne Möglichkeit einer Lebend/Tot-Differenzierung dar. In dieser Arbeit sollte das Potenzial von FISH für den Nachweis lebender pathogener Bakterien in Lebensmitteln evaluiert werden.

Für eine Reihe wichtiger Zoonoseerreger wie *S. enterica*, thermophile *Campylobacter* spp., pathogene Yersinien oder *L. monocytogenes* wurden FISH-Sonden, die auf die 16S oder 23S rRNA gerichtet sind, entworfen und getestet. Die neu entwickelten Sonden waren bereits bekannten FISH-Sonden hinsichtlich ihrer Spezifität und Sensitivität häufig deutlich überlegen. Umfangreiche thermodynamische Anpassungen und der gezielte Einsatz von Kompetitoren und Nukleotidanaloga erlaubten den spezifischen Simultannachweis vieler unterschiedlicher Erregergruppen in Gegenwart nahverwandter Bakterien. Die Kombination von FISH mit dem direct viable count (DVC-FISH) erwies sich als zuverlässige Methode zur Lebend/Tot-Unterscheidung. Mit Hilfe eines FISH-Tests auf mRNA-Ebene, der durch den Einsatz eines Sondengemisches auch Zielsequenzen mit geringer Abundanz erfassen kann, konnte zusätzlich die Transkription von Antibiotikaresistenzgenen auf Einzelzellebene detektiert werden. Die Kugelmühle FastPrep-24 und mit Einschränkungen der Stomacher erwiesen sich als geeignete Homogenisierungssysteme zur Probenvorbereitung, um lebende Bakterien aus einer festen Lebensmittelmatrix herauszulösen. Nach einer ein- bis zweitägigen kulturellen Voranreicherung erreichten die entwickelten FISH-Tests eine vergleichbare Sensitivität wie die deutlich zeitaufwändigeren Goldstandardmethoden. Eine kulturunabhängige Anreicherung gelang durch mehrstufige Vorfiltrationen und nichtfluoreszierende Membranfilter. Die Zugabe eines Markerbakteriums ermöglichte gleichzeitig die Quantifizierung der Bakterienlast.

FISH repräsentiert eine Brückentechnologie, die die Geschwindigkeit anderer Schnelldiagnostik mit der Eigenschaft der kulturellen Methoden zur Unterscheidung von lebenden und toten Bakterien verbindet. Um FISH als eine anerkannte Technik in der Lebensmittelmikrobiologie zu etablieren, müssen jedoch die Automatisierung und Standardisierung dieser Nachweismethode weiter vorangetrieben werden.

6 Summary

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) is a detection method for microorganisms and represents a promising alternative to the slow conventional culture techniques or to other rapid molecular methods without the capacity to distinguish dead from viable bacteria. In this work, the potential of FISH for the detection of viable pathogenic bacteria in food was evaluated.

FISH probes targeting the 16S or 23S rRNA were designed and tested for various important zoonotic agents like *S. enterica*, thermophilic *Campylobacter* spp., pathogenic *Yersinia* spp. and *L. monocytogenes*. In comparison to previously published probes, specificities and sensitivities of the newly developed FISH probes often proved to be superior. Due to thorough thermodynamic adaptations and the accurate use of competitors and nucleotide analogues, the specific simultaneous detection of multiple different pathogens in the presence of closely related bacteria was possible. The combination of FISH with the direct viable count (DVC-FISH) was demonstrated to be a suitable method to differentiate dead from viable bacteria. Furthermore, a FISH assay targeting mRNAs with a low abundance via a probe mixture enabled the detection of the transcription of antibiotic resistance genes. The ball mill FastPrep-24 and the Stomacher, with some limitations, proved to be appropriate homogenization tools for sample preparation to separate and obtain viable bacteria from a solid food matrix. After one or two days of cultural enrichment, the newly developed FISH-assays reached similar sensitivities as the much more time-consuming gold standard methods. Multistage prefiltration procedures and non-fluorescent membrane filters allowed the culture-independent enrichment. The addition of marker bacteria enabled the concurrent quantification of the bacterial load.

FISH is a bridge technology, which combines the test speed of other rapid methods with the ability of the culture methods to differentiate between viable and dead bacteria. However, automation and standardization of this technique have to be promoted to establish FISH as a recognized standard method in food microbiology.

7 Literaturverzeichnis

- Abubakar, I., Irvine, L., Aldus, C. F., Wyatt, G. M., Fordham, R., Schelenz, S., Shepstone, L., Howe, A., Peck, M., Hunter, P. R., 2007. A systematic review of the clinical, public health and cost-effectiveness of rapid diagnostic tests for the detection and identification of bacterial intestinal pathogens in faeces and food. *Health Technol Assess.* 11(36), 1-216.
- Alexander, B. D., Ashley, E. D., Reller, L. B., Reed, S. D., 2006. Cost savings with implementation of PNA FISH testing for identification of *Candida albicans* in blood cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 54(4), 277-82.
- Almeida, C., Azevedo, N. F., Fernandes, R. M., Keevil, C. W., Vieira, M. J., 2010. Fluorescence *in situ* hybridization method using a peptide nucleic acid probe for identification of *Salmonella* spp. in a broad spectrum of samples. *Appl Environ Microbiol.* 76(13), 4476-85.
- Almeida, C., Sousa, J. M., Rocha, R., Cerqueira, L., Fanning, S., Azevedo, N. F., Vieira, M. J., 2013. Detection of *Escherichia coli* O157 by peptide nucleic acid fluorescence *in situ* hybridization (PNA-FISH) and comparison to a standard culture method. *Appl Environ Microbiol.* 79(20), 6293-300.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J., 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215(3), 403-10.
- Amann, R. I., Krumholz, L., Stahl, D. A., 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J Bacteriol.* 172(2), 762-70.
- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., Stahl, D. A., 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol.* 56(6), 1919-25.
- Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K. H., 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.* 59(1), 143-69.
- Amann, R., Fuchs, B. M., 2008. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques. *Nat Rev Microbiol.* 6(5), 339-48.

ARB Silva, 2010. FISH Protocols 2010: Fixation (of different kinds of cell walls); Standard-FISH (fluorescently monolabeled probes). SILVA ribosomal database project.

Battich, N., Stoeger, T., Pelkmans, L., 2013. Image-based transcriptomics in thousands of single human cells at single-molecule resolution. *Nat Methods*. 10(11), 1127-33.

Batz, M. B., 2013. The Foods Most Often Associated with Major Foodborne Pathogens. Attributing Illnesses to Food Sources and Ranking Pathogen/Food Combinations. *Foodborne Infections and Intoxications*, 19-35.

Behnam, F., Vilcinskis, A., Wagner, M., Stoecker, K., 2012. A straightforward DOPE (double labeling of oligonucleotide probes)-FISH (fluorescence *in situ* hybridization) method for simultaneous multicolor detection of six microbial populations. *Appl Environ Microbiol*. 78(15), 5138-42.

Behrens, S., Rühland, C., Inácio, J., Huber, H., Fonseca, A., Spencer-Martins, I., Fuchs, B. M., Amann, R., 2003. *In situ* accessibility of small-subunit rRNA of members of the domains Bacteria, Archaea, and Eucarya to Cy3-labeled oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol*. 69(3), 1748-58.

Bisha, B., 2009. Fluorescence *in situ* hybridization-based detection of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in complex food matrices. Iowa State University, Dissertationsarbeit.

Bisha, B., Brehm-Stecher, B. F., 2009. Flow-through imaging cytometry for characterization of *Salmonella* subpopulations in alfalfa sprouts, a complex food system. *Biotechnol J*. 4(6), 880-7.

Blake, R. D., Delcourt, S. G., 1996. Thermodynamic effects of formamide on DNA stability. *Nucleic Acids Res*. 24(11), 2095-103.

Bohnert, J., Hübner, B., Botzenhart, K., 2000. Rapid identification of Enterobacteriaceae using a novel 23S rRNA-targeted oligonucleotide probe. *Int J Hyg Environ Health*. 203(1), 77-82.

Brehm-Stecher, B. F., 2008. Methods for Whole Cell Detection of Microorganisms. *Microbial Surfaces Kapitel 3*, 29-51.

Brehm-Stecher, B., Young, C., Jaykus, L. A., Tortorello, M. L., 2009. Sample preparation: the forgotten beginning. *J Food Prot*. 72(8), 1774-89.

Buchrieser, C., Kaspar, C. W., 1993. An improved direct viable count for the enumeration of bacteria in milk. *Int J Food Microbiol*. 20(4), 227-37.

Cangelosi, G. A., Meschke, J. S., 2014. Dead or alive: molecular assessment of microbial viability. *Appl Environ Microbiol.* 80(19), 5884-91.

CDC, 2014. Food safety progress report for 2013. FoodNet: American's report card for food safety.

Cenciarini-Borde, C., Courtois, S., La Scola, B., 2009. Nucleic acids as viability markers for bacteria detection using molecular tools. *Future Microbiol.* 4(1), 45-64.

Cerqueira, L., Azevedo, N. F., Almeida, C., Jardim, T., Keevil, C. W., Vieira, M. J., 2008. DNA mimics for the rapid identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Int J Mol Sci.* 9(10), 1944-60.

Covarrubias, L., Cervantes, L., Covarrubias, A., Soberón, X., Vichido, I., Blanco, A., Kupersztoch-Portnoy, Y. M., Bolivar, F., 1981. Construction and characterization of new cloning vehicles. V. Mobilization and coding properties of pBR322 and several deletion derivatives including pBR327 and pBR328. *Gene.* 13(1), 25-35.

Daims, H., Wagner, M., 2007. Quantification of uncultured microorganisms by fluorescence microscopy and digital image analysis. *Appl Microbiol Biotechnol.* 75(2), 237-48.

Das, S., Dash, H. R., Mangwani, N., Chakraborty, J., Kumari, S., 2014. Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. *J Microbiol Methods.* 103, 80-100.

Decatur, W. A., Fournier, M. J., 2002. rRNA modifications and ribosome function. *Trends Biochem Sci.* 27(7), 344-51.

Demanèche, S., Sanguin, H., Poté, J., Navarro, E., Bernillon, D., Mavingui, P., Wildi, W., Vogel, T. M., Simonet, P., 2008. Antibiotic-resistant soil bacteria in transgenic plant fields. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(10), 3957-62.

Dhama, K., Rajagunalan, S., Chakraborty, S., Verma, A. K., Kumar, A., Tiwari, R., Kapoor, S., 2013. Food-borne pathogens of animal origin-diagnosis, prevention, control and their zoonotic significance: a review. *Pak J Biol Sci.* 16(20), 1076-85.

Dwivedi, H. P., Jaykus, L. A., 2011. Detection of pathogens in foods: the current state-of-the-art and future directions. *Crit Rev Microbiol.* 37(1), 40-63.

Elizaquível, P., Aznar, R., Sánchez, G., 2014. Recent developments in the use of viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field. *J Appl Microbiol.* 116(1), 1-13.

Europäische Kommission, 2005. Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel.

European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2015. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. EFSA Journal 13(1).

European Food Safety Authority (EFSA), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2016. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. EFSA Journal 14(2).

Evans, P. D., Cook, S. N., Riggs, P. D., Noren, C. J., 1995. LITMUS: multipurpose cloning vectors with a novel system for bidirectional *in vitro* transcription. Biotechniques. 19(1), 130-5.

Fang, Q., Brockmann, S., Botzenhart, K., Wiedenmann, A., 2003. Improved detection of *Salmonella* spp. in foods by fluorescent *in situ* hybridization with 23S rRNA probes: a comparison with conventional culture methods. J Food Prot. 66(5), 723-31.

Fiksdal, L., Tryland, I., 1999. Effect of u.v. light irradiation, starvation and heat on *Escherichia coli* beta-D-galactosidase activity and other potential viability parameters. J Appl Microbiol. 87(1), 62-71.

FDA, 2012. Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. Second Edition. Silver Spring, USA.

Frickmann, H., Masanta, W. O., Zautner, A. E., 2014. Emerging rapid resistance testing methods for clinical microbiology laboratories and their potential impact on patient management. Biomed Res Int. 2014.

Fuchizawa, I., Shimizu, S., Kawai, Y., Yamazaki, K., 2008. Specific detection and quantitative enumeration of *Listeria* spp. using fluorescent *in situ* hybridization in combination with filter cultivation (FISHFC). J Appl Microbiol. 105(2), 502-9.

Fuchizawa, I., Shimizu, S., Ootsubo, M., Kawai, Y., Yamazaki, K., 2009. Specific and Rapid Quantification of Viable *Listeria monocytogenes* Using Fluorescence *in situ* Hybridization in Combination with Filter Cultivation. Microbes Environ. 24(3), 273-5.

Fuchs, B. M., Wallner, G., Beisker, W., Schwippl, I., Ludwig, W., Amann, R., 1998. Flow cytometric analysis of the *in situ* accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. Appl Environ Microbiol. 64(12), 4973-82.

Fuchs, B. M., Glöckner, F. O., Wulf, J., Amann, R., 2000. Unlabeled helper oligonucleotides increase the *in situ* accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol.* 66(8), 3603-7.

Fuchs, B. M., Syutsubo, K., Ludwig, W., Amann, R., 2001. *In situ* accessibility of *Escherichia coli* 23S rRNA to fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol.* 67(2), 961-8.

Fukushima, H., Shimizu, S., Inatsu, Y., 2011. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* Detection in Foods. *J Pathog.* 2011:735308.

Ge, B., Meng, J., 2009. Advanced technologies for pathogen and toxin detection in foods: current applications and future directions. *Journal of the Association for Laboratory Automation* 14(4), 235-241.

Gunasekera, T. S., Veal, D. A., Attfield, P. V., 2003. Potential for broad applications of flow cytometry and fluorescence techniques in microbiological and somatic cell analyses of milk. *Int J Food Microbiol.* 85(3), 269-79.

Gupta, V., Gulati, P., Bhagat, N., Dhar, M. S., Viridi, J. S., 2015. Detection of *Yersinia enterocolitica* in food: an overview. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 34(4), 641-50.

Haas, M., Essig, A., Bartelt, E., Poppert, S., 2008. Detection of resistance to macrolides in thermotolerant *campylobacter* species by fluorescence *in situ* hybridization. *J Clin Microbiol.* 46(11), 3842-4.

Hammack, T. S., Valentin-Bon, I. E., Jacobson, A. P., Andrews, W. H., 2004. Relative effectiveness of the Bacteriological Analytical Manual method for the recovery of *Salmonella* from whole cantaloupes and cantaloupe rinses with selected preenrichment media and rapid methods. *J Food Prot.* 67(5), 870-7.

Hannah, J. F., Cason, J. A., Richardson, J. R., Cox, N. A., Hinton, A. Jr., Buhr, R. J., Smith, D. P., 2011. Effect of stomaching on numbers of bacteria recovered from chicken skin. *Poult Sci.* 90(2), 491-3.

Hartung, M., Tenhagen, B. A., Käsbohrer, A., 2015. Erreger von Zoonosen in Deutschland im Jahr 2013. Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, BfR-Wissenschaft 02/2015.

Hoorfar, J., 2011. Rapid detection, characterization, and enumeration of foodborne pathogens. *APMIS Suppl.* 133, 1-24.

Hoshino, T., Yilmaz, L. S., Noguera, D. R., Daims, H., Wagner, M., 2008. Quantification of target molecules needed to detect microorganisms by fluorescence

in situ hybridization (FISH) and catalyzed reporter deposition-FISH. *Appl Environ Microbiol.* 74(16), 5068-77.

Hsu, T. T., Lee, J., 2015. Global Distribution and Prevalence of *Arcobacter* in Food and Water. *Zoonoses Public Health.* 62(8), 579-89.

International Organisation for Standardization, 1996. ISO 11290-1: Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1: Detection method. Genf, Schweiz.

International Organisation for Standardization, 2001. ISO 16654: Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs - Horizontal Method for the Detection of *Escherichia coli* O157. Genf, Schweiz.

International Organisation for Standardization, 2002. ISO 6579: Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Genf, Schweiz.

International Organisation for Standardization, 2003. ISO 10273: Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of presumptive pathogenic *Yersinia enterocolitica*. Genf, Schweiz.

International Organisation for Standardization, 2006. ISO 10272-1: Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. Part 1: Detection method. Genf, Schweiz.

Jacobson, A. P., Hammack, T. S, Andrews, W. H., 2008. Evaluation of sample preparation methods for the isolation of *Salmonella* from alfalfa and mung bean seeds with the Bacteriological Analytical Manual's Salmonella culture method. *J AOAC Int.* 91(5), 1083-9.

Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A., Uyttendaele, M., 2010. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiol.* 27(6), 710-30.

Joux, F., Lebaron, P., 1997. Ecological implications of an improved direct viable count method for aquatic bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 63(9), 3643-7.

Kang, D. H., Dougherty, R. H., Fung, D. Y. C., 2001. Comparison of Pulsifier and Stomacher to detach microorganisms from lean meat tissues. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology* 9(1), 27-32.

Kanki, M., Sakata, J., Taguchi, M., Kumeda, Y., Ishibashi, M., Kawai, T., Kawatsu, K., Yamasaki, W., Inoue, K., Miyahara, M., 2009. Effect of sample preparation and bacterial concentration on *Salmonella enterica* detection in poultry meat using culture methods and PCR assaying of preenrichment broths. *Food Microbiol.* 26(1),1-3.

Keer, J. T., Birch, L., 2003. Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *J Microbiol Methods*. 53(2), 175-83.

Kenny, J. H., Zhou, Y., Schriefer, M. E., Bearden, S. W., 2008. Detection of viable *Yersinia pestis* by fluorescence *in situ* hybridization using peptide nucleic acid probes. *J Microbiol Methods*. 75(2), 293-301.

Kibbe, W. A., 2007. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res*. 35, 43-6.

Klappenbach, J. A., Dunbar, J. M., Schmidt, T. M., 2000. rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 66(4),1328-33.

Klevanskaa, K., Bier, N., Stingl, K., Strauch, E., Hertwig, S., 2014. PVv3, a new shuttle vector for gene expression in *Vibrio vulnificus*. *Appl Environ Microbiol*. 80(4), 1477-81.

Koga, R., Tsuchida, T., Fukatsu, T. 2009. Quenching autofluorescence of insect tissues for *in situ* detection of endosymbionts. *Appl Entomol Zool*. 44(2), 281-91.

Korkeala, H., Mäkelä, P., 1989. Characterization of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packed cooked ring sausages. *Int J Food Microbiol*. 9(1), 33-43.

Kubota, K., Ohashi, A., Imachi, H., Harada, H., 2006. Improved *in situ* hybridization efficiency with locked-nucleic-acid-incorporated DNA probes. *Appl Environ Microbiol*. 72(8), 5311-7.

Kubota, K., 2013. CARD-FISH for environmental microorganisms: technical advancement and future applications. *Microbes Environ*. 28(1), 3-12.

Kutter, S., Hartmann, A., Schmid, M., 2006. Colonization of barley (*Hordeum vulgare*) with *Salmonella enterica* and *Listeria* spp. *FEMS Microbiol Ecol*. 56(2), 262-71.

Lantz, P. G., Knutsson, R., Blixt, Y., Al Soud, W. A., Borch, E., Rådström, P., 1998. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in enrichment media and pork by a multiplex PCR: a study of sample preparation and PCR-inhibitory components. *Int J Food Microbiol*. 45(2), 93-105.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Higgins, D. G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23(21), 2947-8.

Lehtola, M. J., Loades, C. J., Keevil, C. W., 2005. Advantages of peptide nucleic acid oligonucleotides for sensitive site directed 16S rRNA fluorescence *in situ*

hybridization (FISH) detection of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari*. J Microbiol Methods. 62(2), 211-9.

Liepe, H. U., 1987. Keimverteilung in einer Rohwurst. Fleischwirtschaft 67(1), 1266-7.

Lindqvist, R., Lindblad, M., 2009. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in fermented sausages during maturation/storage. Int J Food Microbiol. 129(1), 59-67.

López-Campos, G., Martínez-Suárez, J. V., Aguado-Urda, M., López-Alonso, V., 2012. Microarray Detection and Characterization of Bacterial Foodborne Pathogens. Chapter 2: Detection, Identification, and Analysis of Foodborne Pathogens. SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition.

Loy, A., Arnold, R., Tischler, P., Rattei, T., Wagner, M., Horn, M., 2008. probeCheck-- a central resource for evaluating oligonucleotide probe coverage and specificity. Environ Microbiol. 10(10), 2894-8.

Lucore, L. A., Cullison, M. A., Jaykus, L. A., 2000. Immobilization with metal hydroxides as a means to concentrate food-borne bacteria for detection by cultural and molecular methods. Appl Environ Microbiol. 66(5), 1769-76.

Mataragas, M., Rantsioua, K., Alessandria, V., Cocolin, L., 2015. Estimating the non-thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages relative to temperature, pH and water activity. Meat Sci. 100, 171-8.

McMeekin, T. A. (Editor), 2003. Detecting Pathogens in Food. Woodhead Publishing, 1st edition.

Moreno Y., Ballesteros L., García-Hernández, J., Santiago, P., González, A., Ferrús M. A., 2011. Specific detection of viable *Listeria monocytogenes* in Spanish wastewater treatment plants by Fluorescent *In Situ* Hybridization and PCR. Water Res. 45(15), 4634-40.

Moter, A., Göbel, U. B., 2000. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. J Microbiol Methods. 41(2), 85-112.

Musat, N., Foster, R., Vagner, T., Adam, B., Kuypers, M. M., 2012. Detecting metabolic activities in single cells, with emphasis on nanoSIMS. FEMS Microbiol Rev. 36(2), 486-511.

Myers, J., 2004. Automated slide stainers for SS, IHC, and ISH: A review of current technologies and commercially available systems. MLO Med Lab Obs. 36(1), 28-30.

Myers, J., 2012. Automated IHC/ISH slide staining systems: current technologies and other considerations. MLO Med Lab Obs. 44(7), 48-50.

Naiser, T., Kayser, J., Mai, T., Michel, W., Ott, A., 2008. Position dependent mismatch discrimination on DNA microarrays - experiments and model. *BMC Bioinformatics*. 9:509.

National Toxicology Program, 2008. Toxicology and carcinogenesis studies of formamide (Cas No. 75-12-7) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser*. 541, 1-192.

Neubauer, H., Hensel, A., Aleksic, S., Meyer, H., 2000. Identification of *Yersinia enterocolitica* within the genus *Yersinia*. *Syst Appl Microbiol*. 23(1), 58-62.

Newell, D. G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., Opsteegh, M., Langelaar, M., Threlfall, J., Scheutz, F., van der Giessen, J., Kruse, H., 2010. Food-borne diseases - the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *Int J Food Microbiol*. 139 (Suppl 1:S3-15).

Nord, O., Gustrin, A., Nygren, P. A., 2005. Fluorescent detection of beta-lactamase activity in living *Escherichia coli* cells via esterase supplementation. *FEMS Microbiol Lett*. 242(1), 73-9.

Nordentoft, S., Christensen, H., Wegener, H. C., 1997. Evaluation of a fluorescence-labelled oligonucleotide probe targeting 23S rRNA for *in situ* detection of *Salmonella* serovars in paraffin-embedded tissue sections and their rapid identification in bacterial smears. *J Clin Microbiol*. 35(10), 2642-8.

Oliveira, M., Andrade, G., Guerra, M., 2003. Development of a Fluorescent *in situ* Hybridization protocol for the rapid detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in milk. *Revista Portuguesa de Ciencias Veterinarias* 98(547), 119-24.

Oliveira, M., Blasco, L., Ferrer, S., Bernardo, F., 2004. Rapid and simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in milk by fluorescent *in situ* hybridization. *Rev. Port. Ciencias Veterinarias* 99, 215-8.

On, S. L., 2013. Isolation, identification and subtyping of *Campylobacter*: where to from here? *J Microbiol Methods*. 95(1), 3-7.

Ootsubo, M., Shimizu, T., Tanaka, R., Sawabe, T., Tajima, K., Ezura, Y., 2003. Seven-hour fluorescence *in situ* hybridization technique for enumeration of Enterobacteriaceae in food and environmental water sample. *J Appl Microbiol*. 95(6), 1182-90.

Papanicolaou, G. A., Medeiros, A. A., 1990. Discrimination of extended-spectrum beta-lactamases by a novel nitrocefin competition assay. *Antimicrob Agents Chemother.* 34(11), 2184-92.

Parsley, L. C., Newman, M. M., Liles, M. R., 2010. Fluorescence *in situ* hybridization of bacterial cell suspensions. *Cold Spring Harb Protoc.* 2010(9):pdb.prot5493.

Paulat, U., 1999. Einfluss der Probenentnahme auf das Ergebnis der bakteriologischen Analyse am Beispiel des Fleischerzeugnisses Rohwurst. Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertationsarbeit.

Perry-O'Keefe, H., Rigby, S., Oliveira, K., Sørensen, D., Stender, H., Coull, J., Hyldig-Nielsen, J. J., 2001. Identification of indicator microorganisms using a standardized PNA FISH method. *J Microbiol Methods.* 47(3), 281-92.

Pitkänen, T., 2013. Review of *Campylobacter* spp. in drinking and environmental waters. *J Microbiol Methods.* 95(1), 39-47.

Poppert, S., Haas, M., Yildiz, T., Alter, T., Bartel, E., Fricke, U., Essig, A., 2008. Identification of thermotolerant *campylobacter* species by fluorescence *in situ* hybridization. *J Clin Microbiol.* 46(6), 2133-6.

Porter, J., Robinson, J., Pickup, R., Edwards, C., 1998. An evaluation of lectin-mediated magnetic bead cell sorting for the targeted separation of enteric bacteria. *J Appl Microbiol.* 84(5), 722-32.

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F. O., 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, 590-6.

Raj, A., van den Bogaard, P., Rifkin, S. A., van Oudenaarden, A., Tyagi, S., 2008. Imaging individual mRNA molecules using multiple singly labeled probes. *Nat Methods.* 5(10), 877-9.

Robert Koch-Institut, Berlin, 2012. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2011. Berlin, Deutschland.

Robert Koch-Institut, Berlin, 2015. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2014. Berlin, Deutschland.

Rohde, A., Hammerl, J. A., Appel, B., Dieckmann, R., Al Dahouk, S., 2015a. FISHing for bacteria in food--a promising tool for the reliable detection of pathogenic bacteria? *Food Microbiol.* 46, 395-407.

Rohde, A., Hammerl, J. A., Appel, B., Dieckmann, R., Al Dahouk, S., 2015b. Sampling and Homogenization Strategies Significantly Influence the Detection of Foodborne Pathogens in Meat. *BioMed Res Int.* 2015:145437.

Rohde, A., Hammerl, J. A., Al Dahouk, S., 2016a. Detection of foodborne bacterial zoonoses by fluorescence *in situ* hybridization. *Food Control* 69, 297-305.

Rohde, A., Hammerl, J. A., Al Dahouk, S., 2016b. Rapid screening for antibiotic resistance elements on the RNA transcript, protein and enzymatic activity level. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 15(1).

Rönner, S. G. E., Stackebrandt, E., 1994. Development of 23S rRNA oligonucleotide probes for the identification of *Salmonella* species. *Syst Appl Microbiol.* 17, 257-64.

Santos, R. S., Guimarães, N., Madureira, P., Azevedo, N. F., 2014. Optimization of a peptide nucleic acid fluorescence *in situ* hybridization (PNA-FISH) method for the detection of bacteria and disclosure of a formamide effect. *J Biotechnol.* 187, 16-24.

Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., Jones, J. L., Griffin, P. M., 2011. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg Infect Dis.* 17(1), 7-15.

Schielke, A., Rosner, B. M., Stark, K., 2014. Epidemiology of campylobacteriosis in Germany - insights from 10 years of surveillance. *BMC Infect Dis.* 14:30.

Schimak, M. P., Kleiner, M., Wetzel, S., Liebeke, M., Dubilier, N., Fuchs, B. M., 2015. MiL-FISH: Multilabeled Oligonucleotides for Fluorescence *In Situ* Hybridization Improve Visualization of Bacterial Cells. *Appl Environ Microbiol.* 82(1), 62-70.

Schmelcher, M., Loessner, M. J., 2014. Application of bacteriophages for detection of foodborne pathogens. *Bacteriophage* 4(1):e28137.

Schmid, M., Walcher, M., Bubert, A., Wagner, M., Wagner, M., Schleifer, K. H., 2003. Nucleic acid-based, cultivation-independent detection of *Listeria* spp. and genotypes of *L. monocytogenes*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 35(3), 215-25.

Schmid, M.W., Lehner, A., Stephan, R., Schleifer, K. H., Meier, H., 2005. Development and application of oligonucleotide probes for *in situ* detection of thermotolerant *Campylobacter* in chicken faecal and liver samples. *Int J Food Microbiol.* 105(2), 245-55.

Seo, K. H., Brackett, R. E., Valentín-Bon, I. E., Holt, P.S., 2003. Comparison of homogenization methods for recovering *Salmonella* Enteritidis from eggs. *J Food Prot.* 66(9), 1666-9.

Shajani, Z., Sykes, M. T., Williamson, J. R., 2011. Assembly of bacterial ribosomes. *Annu Rev Biochem.* 80, 501-26.

Sharpe, A. N., Kilsby, D. C., 1970. Ultrasound and vortex stirring as bacteriological sampling methods for foods. *J Appl Bacteriol.* 33(2), 351-357.

Sharpe, A. N., Jackson, A. K., 1972. Stomaching: a new concept in bacteriological sample preparation. *Appl Microbiol.* 24(2), 175-8.

Sharpe, A. N., 2003. Separation and concentration of samples. In: *Detecting Pathogens in Food*, T. A. McMeekin, Ed., 52-68. Woodhead Publishing, 1st edition.

Shimizu, S., Aoi, R., Osanai, Y., Kawai, Y., Yamazaki, K., 2013. Rapid Quantitative Detection of *Salmonella enterica* Using Fluorescence *In Situ* Hybridization with Filter-cultivation (FISHFC) Method. *Food Sci Technol Res.* 19(1), 59-67.

Skinner, S. O., Sepúlveda, L. A., Xu, H., Golding, I., 2013. Measuring mRNA copy number in individual *Escherichia coli* cells using single-molecule fluorescent *in situ* hybridization. *Nat Protoc.* 8(6), 1100-13.

Snaidr, J., Amann, R., Huber, I., Ludwig, W., Schleifer, K. H., 1997. Phylogenetic analysis and *in situ* identification of bacteria in activated sludge. *Appl Environ Microbiol.* 63(7), 2884-96.

So, L. H., Ghosh, A., Zong, C., Sepúlveda, L. A., Segev, R., Golding, I., 2011. General properties of transcriptional time series in *Escherichia coli*. *Nat Genet.* 43(6), 554-60.

Stoddard, S. F., Smith, B. J., Hein, R., Roller, B. R., Schmidt, T. M., 2015. rrnDB: improved tools for interpreting rRNA gene abundance in bacteria and archaea and a new foundation for future development. *Nucleic Acids Res.* 43, D593-8.

Swidsinski, A., 2006. Standards for bacterial identification by fluorescence *In situ* hybridization within eukaryotic tissue using ribosomal rRNA-based probes. *Inflamm Bowel Dis.* 12(8), 824-6, 826-7.

Tajbakhsh, S., Hogardt, M., Heesemann, J., Grzonka, C., Adler, K., 2008. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum samples by modified fluorescent *in situ* hybridization. *African Journal of Biotechnology* 7(5), 553-6.

Takada, T., Matsumoto, K., Nomoto, K., 2004. Development of multi-color FISH method for analysis of seven *Bifidobacterium* species in human feces. *J Microbiol Methods.* 58(3), 413-21.

Trebesius, K., Harmsen, D., Rakin, A., Schmelz, J., Heesemann, J., 1998. Development of rRNA-targeted PCR and *in situ* hybridization with fluorescently

labelled oligonucleotides for detection of *Yersinia* species. J Clin Microbiol. 36(9), 2557-64.

Trebesius, K., Panthel, K., Strobel, S., Vogt, K., Faller, G., Kirchner, T., Kist, M., Heesemann, J., Haas, R., 2000. Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent *in situ* hybridisation. Gut 46(5), 608-14.

Valm, A. M., Mark, Welch, J. L., Borisy, G. G., 2012. CLASI-FISH: principles of combinatorial labeling and spectral imaging. Syst Appl Microbiol. 35(8), 496-502.

Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., Adley, C., 2010. An overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors. Biotechnol Adv. 28(2), 232-54.

Vieira, J., Messing, J., 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene. 19(3), 259-68.

Villarino, A., Bouvet, O. M., Regnault, B., Martin-Delautre, S., Grimont, P. A. D., 2000. Exploring the frontier between life and death in *Escherichia coli*: evaluation of different viability markers in live and heat- or UV-killed cells. Res Microbiol. 151(9), 755-68.

Wagner, M., Schmid, M., Juretschko, S., Trebesius, K. H., Bubert, A., Goebel, W., Schleifer, K. H., 1998. *In situ* detection of a virulence factor mRNA and 16S rRNA in *Listeria monocytogenes*. FEMS Microbiol Lett. 160(1), 159-68.

Wagner, M., Horn, M., Daims, H., 2003. Fluorescence *in situ* hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. Curr Opin Microbiol. 6(3), 302-9.

Wang, R. F., Cao, W. W., Johnson, M. G., 1991. Development of a 16S rRNA-based oligomer probe specific for *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol. 57(12), 3666-70.

Wang, R. F., Cao, W. W., Johnson, M. G., 1992. 16S rRNA-based probes and polymerase chain reaction method to detect *Listeria monocytogenes* cells added to foods. Appl Environ Microbiol. 58(9), 2827-31.

Wattam, A. R., Abraham, D., Dalay, O., Disz, T. L., Driscoll, T., Gabbard, J. L., Gillespie, J. J., Gough, R., Hix, D., Kenyon, R., Machi, D., Mao, C., Nordberg, E. K., Olson, R., Overbeek, R., Pusch, G. D., Shukla, M., Schulman, J., Stevens, R. L., Sullivan, D. E., Vonstein, V., Warren, A., Will, R., Wilson, M. J., Yoo, H. S., Zhang,

- C., Zhang, Y., Sobral, B. W., 2014. PATRIC, the bacterial bioinformatics database and analysis resource. *Nucleic Acids Res.* 42, 581-91.
- Wauters, J., Assche, E. V., Antsaklis, A., Tepperberg, J., Sharp, S. M., Kilpatrick, M. W., Tafas, T., Tsipouras, P., 2007. Fully automated FISH examination of amniotic fluid cells. *Prenat Diagn.* 27(10), 951-5.
- Weider, L. J., Elser, J. J., Crease, T. J., Mateos, M., Cotner, J. B., Markow, T. A., 2005. The Functional Significance of Ribosomal (r)DNA Variation: Impacts on the Evolutionary Ecology of Organisms. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36, 219-242.
- Wellinghausen, N., Nöckler, K., Sigge, A., Bartel, M., Essig, A., Poppert, S., 2006. Rapid detection of *Brucella* spp. in blood cultures by fluorescence *in situ* hybridization. *J Clin Microbiol.* 44(5), 1828-30.
- WHO, 2015. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. Foodborne diseases burden epidemiology reference group 2007-2015. Abrufbar unter http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/199350/1/9789241565165_eng.pdf (letzter Zugriff: 26.10.2016)
- Wimpenny, J. W., Leistner, L., Thomas, L. V., Mitchell, A. J., Katsaras, K., Peetz, P., 1995. Submerged bacterial colonies within food and model systems: their growth, distribution and interactions. *Int J Food Microbiol.* 28(2), 299-315.
- Woo, P. C., Lau, S. K., Teng, J. L., Tse, H., Yuen, K. Y., 2008. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect.* 14(10), 908-34.
- Wright, E. S., Yilmaz, L. S., Corcoran, A. M., Ökten, H. E, Noguera, D. R., 2014. Automated design of probes for rRNA-targeted fluorescence *in situ* hybridization reveals the advantages of using dual probes for accurate identification. *Appl Environ Microbiol.* 80(16), 5124-33.
- Wu, V. C. H., Jitareerat, P., Fung, D. Y. C., 2003. Comparison of the pulsifier and the stomacher for recovering microorganisms in vegetables. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology* 11(2), 145-52.
- Xie, X. S., Choi, P. J., Li, G. W., Lee, N. K., Lia, G., 2008. Single-molecule approach to molecular biology in living bacterial cells. *Annu Rev Biophys.* 37, 417-44.
- Yamaguchi, N., Kitaguchi, A., Nasu, M., 2012. Selective enumeration of viable Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. in milk within 7 h by multicolor

fluorescence *in situ* hybridization following microcolony formation. J Biosci Bioeng. 113(6), 746-50.

Yamaguchi, T., Fuchs, B. M., Amann, R., Kawakami, S., Kubota, K., Hatamoto, M., Yamaguchi, T., 2015. Rapid and sensitive identification of marine bacteria by an improved *in situ* DNA hybridization chain reaction (quickHCR-FISH). Syst Appl Microbiol. 38(6), 400-5.

Yilmaz, L. S., Noguera, D. R., 2004. Mechanistic approach to the problem of hybridization efficiency in fluorescent *in situ* hybridization. Appl Environ Microbiol. 70(12), 7126-39.

Yilmaz, L. S., Okten, H. E., Noguera, D. R., 2006. Making all parts of the 16S rRNA of *Escherichia coli* accessible *in situ* to single DNA oligonucleotides. Appl Environ Microbiol. 72(1), 733-44.

Yilmaz, L. S., Noguera, D. R., 2007. Development of thermodynamic models for simulating probe dissociation profiles in fluorescence *in situ* hybridization. Biotechnol Bioeng. 96(2), 349-63.

Yilmaz, L. S., Parnerkar, S., Noguera, D. R., 2011. mathFISH, a web tool that uses thermodynamics-based mathematical models for *in silico* evaluation of oligonucleotide probes for fluorescence *in situ* hybridization. Appl Environ Microbiol. 77(3), 1118-22.

Zeder, M., Pernthaler, J., 2009. Multispot live-image autofocusing for high-throughput microscopy of fluorescently stained bacteria. Cytometry A. 75(9), 781-8.

Zeller, P., Ploux, O., Méjean, A., 2016. A simple protocol for attenuating the auto-fluorescence of cyanobacteria for optimized fluorescence *in situ* hybridization (FISH) imaging. J Microbiol Methods. 122, 16-9.

Zhang, X., Wu, S., Li, K., Shuai, J., Dong, Q., Fang, W., 2012. Peptide nucleic acid fluorescence *in situ* hybridization for identification of *Listeria* genus, *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii*. Int J Food Microbiol. 157(2), 309-13.

8 Veröffentlichungen

8.1 Wissenschaftliche Artikel

Rohde, A., Hammerl, J. A., Appel, B., Dieckmann, R., Al Dahouk, S., 2015. FISHing for bacteria in food--a promising tool for the reliable detection of pathogenic bacteria? Food Microbiology 46, 395-407.

Rohde, A., Hammerl, J. A., Appel, B., Dieckmann, R., Al Dahouk, S., 2015. Sampling and homogenization strategies significantly influence the detection of foodborne pathogens in meat. BioMed Research International 2015:145437.

Rohde, A., Hammerl, J. A., Al Dahouk, S., 2016. Detection of foodborne bacterial zoonoses by fluorescence *in situ* hybridization. Food Control 69, 297-305.

Rohde, A., Hammerl, J. A., Al Dahouk, S., 2016. Rapid screening for antibiotic resistance elements on the RNA transcript, protein and enzymatic activity level. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 15(1):55.

Rohde, A., Hammerl, J. A., Appel, B., Dieckmann, R., Al Dahouk, S., 2017. Differential detection of pathogenic *Yersinia* spp. by fluorescence *in situ* hybridization. Food Microbiology 62, 39-45.

Eingereichte Artikel:

Rohde, A.[†], Hammerl, J. A.[†], Boone, B., Jansen, W., Fohler, S., Klein, G., Dieckmann, R., Al Dahouk, S. Overview of validated alternative methods for the detection of foodborne bacterial pathogens. Eingereicht im Juli 2016 bei: Trends in Food Science & Technology.

[†] Geteilte Erstautorenschaft

8.2 Konferenzbeiträge

8.2.1 Vorträge

Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) zum Erregernachweis in Lebensmitteln. BfR Symposium "Zoonosen und Lebensmittelsicherheit". 11. November 2014. Berlin, Deutschland. Vortragender: **Rohde, A.**

Detection of zoonotic bacteria in food by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). National Symposium on Zoonoses Research 2015. 16. Oktober 2015. Berlin, Deutschland. Vortragender: **Rohde, A.**

Applicability and future challenges of fluorescence *in situ* hybridisation to detect bacterial pathogens in food. RME (Rapid Methods Europe) 2016. 8. November 2016. Amsterdam, Niederlande. Vortragender: **Rohde, A.**

8.2.2 Poster

Rohde, A., Hammerl, J. A., Appel, B., Dieckmann, R., Al Dahouk, S., 2014. Concurrent detection of thermophilic *Campylobacter* spp. and *Salmonella enterica* in meat by fluorescence *in situ* hybridization. SfAM/MVNA Summer Conference 2014. 30. Juni - 3. Juli 2014, Brighton, Vereinigtes Königreich.

Rohde, A., Hammerl, J. A., Appel, B., Dieckmann, R., Al Dahouk, S., 2014. Comparison of sample preparation approaches for reliable detection of zoonotic pathogens in food. German Symposium on Zoonoses Research 2014. 16.-17. Oktober 2014, Berlin, Deutschland.

Rohde, A., Hammerl, J. A., Appel, B., Dieckmann, R., Al Dahouk, S., 2015. Rapid detection of viable pathogenic *Yersinia* spp. by fluorescence *in situ* hybridization. World Congress and Expo on Applied Microbiology. 18.-20. August 2015, Frankfurt am Main, Deutschland.

Rohde, A., Hammerl, J. A., Hauffe, A. L., Sobotta, K., Al Dahouk, S., 2016. Detection of *Brucella* spp. in milk by fluorescence *in situ* hybridization. Brucellosis 2016 International Research Conference. 17.-19. November 2016, Neu-Delhi, Indien.

9 Danksagung

Für die Überlassung des interessanten Themas, die vertrauensvolle Zusammenarbeit und die wertvolle und förderliche Unterstützung und Betreuung meiner Doktorarbeit am Bundesinstitut für Risikobewertung möchte ich herzlich Professor Dr. Sascha Al Dahouk danken.

Ebenfalls herzlich bedanken möchte ich mich bei Professor Dr. Rupert Mutzel für die Bereitschaft zur Betreuung der Dissertation von Seiten der FU Berlin.

Ein besonderer Dank gilt weiterhin Dr. Jens Hammerl, mit dem ich im Rahmen des Drittmittelprojektes ZooGloW eng zusammengearbeitet habe und der stets ein offenes Ohr für Belange jeglicher Form hatte, sei es von der Laborseite, beim Verfassen und Redigieren von Manuskripten oder auch bei der Bewältigung der Bürokratie. Du warst mir eine große und wertvolle Hilfe und dazu noch ein stets sehr angenehmer Bürogenosse und Weggefährte! Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Anna-Louisa Hauffe und Dr. Idesbald Boone, die als meine Bürokollegen und durch den gemeinsamen Start am BfR mir in den letzten Jahren sehr ans Herz gewachsen sind. Vielen Dank euch beiden für die immer sehr humorvolle Begleitung in den letzten Jahren! Auch allen anderen Kolleginnen und Kollegen in der Fachgruppe 47 möchte ich herzlich danken für die freundliche Aufnahme, die gute Arbeitsatmosphäre und Zusammenarbeit, die technische und wissenschaftliche Unterstützung sowie den stets kollegialen Umgang. Ebenso möchte ich der gesamten Abteilung und den vielen Kolleginnen und Kollegen danken, die meine Arbeit maßgeblich unterstützt haben, durch die Bereitstellung von Bakterienstämmen, die Hilfe bei der Wurstherstellung oder durch die großzügige Mitnutzung von Räumlichkeiten und Gerätschaften. Insbesondere Susanne Diescher und den anderen Mitgliedern der Fachgruppe 45 möchte ich danken für das „Asyl“, das mir zeitweilig und bereitwillig in ihren Räumlichkeiten gewährt worden ist. Für das kritische Gegenlesen der Doktorarbeit sowie die vielen konstruktiven und nützlichen Verbesserungsvorschlägen möchte ich mich außerdem noch einmal ganz herzlich bei Professor Dr. Al Dahouk, Dr. Thomas Splettstößer, Dr. Jens Hammerl, Dr. Dr. Josef Ehling und meinen Eltern bedanken. Vielen Dank für die Mühe!

Zu guter Letzt möchte ich natürlich auch meiner Familie danken, die mich in den Jahren des Studiums und während der Zeit als Doktorand stets in allen Belangen unterstützt und mir mit Rat und Tat das Leben sehr erleichtert hat.

10 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

11 Anhang

Tabelle 32: Verwendete Bakterienstämme

Spezies (Serotyp)	Stammbezeichnung	Anzuchtmedium und Kultivierungsbedingungen
<i>C. jejuni</i>	DSM 24115	MHB; 42 °C, mikroaerophil
<i>C. jejuni</i>	DSM 24114	MHB; 42 °C, mikroaerophil
<i>C. jejuni</i>	DSM 24126	MHB; 42 °C, mikroaerophil
<i>C. jejuni</i>	DSM 24219	MHB; 42 °C, mikroaerophil
<i>C. jejuni</i>	DSM 24209	MHB; 42 °C, mikroaerophil
<i>C. jejuni</i>	DSM 24235	MHB; 42 °C, mikroaerophil
<i>C. jejuni</i>	DSM 24217	MHB; 42 °C, mikroaerophil
<i>C. jejuni</i>	DSM 24189	MHB; 42 °C, mikroaerophil
<i>C. jejuni</i>	DSM 4688	MHB; 42 °C, mikroaerophil
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	LMG 8843	MHB; 42 °C, mikroaerophil
<i>C. coli</i>	DSM 24156	MHB; 42 °C, mikroaerophil
<i>C. coli</i>	DSM 24155	MHB; 42 °C, mikroaerophil
<i>C. coli</i>	DSM 24218	MHB; 42 °C, mikroaerophil
<i>C. coli</i>	DSM 24199	MHB; 42 °C, mikroaerophil
<i>C. coli</i>	DSM 4689	MHB; 42 °C, mikroaerophil
<i>C. lari</i>	DSM 11375	MHB; 42 °C, mikroaerophil
<i>C. lari</i> subsp. <i>concheus</i>	LMG 11760	MHB; 42 °C, mikroaerophil
<i>C. upsaliensis</i>	DSM 5365	MHB; 37 °C, mikroaerophil
<i>C. upsaliensis</i>	CCUG 33880	MHB; 37 °C, mikroaerophil
<i>C. sputorum</i> <i>bubulus</i>	DSM 5363	MHB; 37 °C, mikroaerophil
<i>C. peloridis</i>	LMG 23910	MHB; 37 °C, mikroaerophil
<i>C. hyointestinalis</i>	DSM 19053	MHB; 37 °C, mikroaerophil
<i>C. curvus</i>	CCUG 13146	MHB; 37 °C, mikroaerophil
<i>C. concisus</i>	DSM 2716	MHB; 37 °C, mikroaerophil
<i>C. fetus</i>	DSM 5361	MHB; 37 °C, mikroaerophil
<i>C. gracilis</i>	DSM 19528	MHB; 37 °C, mikroaerophil
<i>H. pylori</i>	N6	Anzucht extern
<i>A. butzleri</i>	CCUG 30485	MHB; 37 °C, mikroaerophil
<i>A. butzleri</i>	b47	MHB; 37 °C, mikroaerophil
<i>A. butzleri</i>	b12	MHB; 37 °C, mikroaerophil
<i>A. butzleri</i>	cib20	MHB; 37 °C, mikroaerophil
<i>A. butzleri</i>	b75	MHB; 37 °C, mikroaerophil
<i>A. butzleri</i>	b94	MHB; 37 °C, mikroaerophil
<i>A. butzleri</i>	b89	MHB; 37 °C, mikroaerophil
<i>A. butzleri</i>	b111	MHB; 37 °C, mikroaerophil

<i>A. butzleri</i>	Fo277/10	MHB; 37 °C, mikroaerophil
<i>A. butzleri</i>	A3-H-1	MHB; 37 °C, mikroaerophil
<i>A. butzleri</i>	b106	MHB; 37 °C, mikroaerophil
<i>A. butzleri</i>	b54	MHB; 37 °C, mikroaerophil
<i>A. butzleri</i>	b84	MHB; 37 °C, mikroaerophil
<i>A. butzleri</i>	b97	MHB; 37 °C, mikroaerophil
<i>A. butzleri</i>	C 4 D	MHB; 37 °C, mikroaerophil
<i>A. cryaerophilus</i>	cry11	MHB; 28 °C, mikroaerophil
<i>A. cibarius</i>	CCUG 48482	MHB; 28 °C, mikroaerophil
<i>A. skirrowii</i>	DSM 7302	MHB; 28 °C, mikroaerophil
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	LB; 37 °C, aerob
<i>S. aureus</i>	ATCC 1104	LB; 37 °C, aerob
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	LB; 37 °C, aerob
<i>E. coli</i>	ATCC 35218	LB; 37 °C, aerob
<i>E. coli</i>	GeneHogs	LB; 37 °C, aerob
<i>E. coli</i>	DH5α	LB; 37 °C, aerob
<i>E. coli</i> O157:H7	EDL933	LB; 37 °C, aerob
<i>E. coli</i> O157:H7	CB7433	LB; 37 °C, aerob
<i>E. coli</i> O157:H7	CB8052	LB; 37 °C, aerob
<i>E. coli</i> O157:H7	CB7805	LB; 37 °C, aerob
<i>E. coli</i> O145:H28	CB4973	LB; 37 °C, aerob
<i>E. coli</i> O103:H2	CB6955	LB; 37 °C, aerob
<i>E. coli</i> O26:H11	CB7773	LB; 37 °C, aerob
<i>E. coli</i> O121:H19	CB8124	LB; 37 °C, aerob
<i>E. coli</i> O111:H8	CB7051	LB; 37 °C, aerob
<i>E. coli</i> O104:H21	CB8983	LB; 37 °C, aerob
<i>E. coli</i> O104:H4	CB13353	LB; 37 °C, aerob
<i>E. coli</i> O118:H16	CB7109	LB; 37 °C, aerob
<i>E. coli</i> O118:H16	CB7834	LB; 37 °C, aerob
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 25926	LB; 37 °C, aerob
<i>K. pneumoniae</i>	K2	LB; 37 °C, aerob
<i>K. pneumoniae</i>	My 6107	LB; 37 °C, aerob
<i>K. oxytoca</i>	ATCC 13182	LB; 37 °C, aerob
<i>K. oxytoca</i>	CCUG 15788	LB; 37 °C, aerob
<i>K. oxytoca</i>	Oman 61	LB; 37 °C, aerob
<i>K. oxytoca</i>	CB4063	LB; 37 °C, aerob
<i>K. oxytoca</i>	CB4072	LB; 37 °C, aerob
<i>K. oxytoca</i>	CB4074	LB; 37 °C, aerob
<i>S. enterica</i> Typhimurium	DSM 11320	LB; 37 °C, aerob
<i>S. enterica</i> Abony	SA00325	LB; 37 °C, aerob
<i>S. enterica</i> Dublin	SA02956	LB; 37 °C, aerob

<i>S. enterica</i> Enteritidis	SA03133	LB; 37 °C, aerob
<i>S. enterica</i> Paratyphi B	SA03085	LB; 37 °C, aerob
<i>S. enterica</i> Virchow	SA00014	LB; 37 °C, aerob
<i>L. monocytogenes</i>	SLCC 9579	SBA; 37 °C, aerob
<i>L. monocytogenes</i>	SLCC 9678	SBA; 37 °C, aerob
<i>L. monocytogenes</i>	SLCC 9549	SBA; 37 °C, aerob
<i>L. monocytogenes</i>	SLCC 6190	SBA; 37 °C, aerob
<i>L. monocytogenes</i>	SLCC 6465	SBA; 37 °C, aerob
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 19118	SBA; 37 °C, aerob
<i>L. monocytogenes</i>	NCTC 5348	SBA; 37 °C, aerob
<i>L. monocytogenes</i>	NCTC 5105	SBA; 37 °C, aerob
<i>L. monocytogenes</i>	SLCC 2540	SBA; 37 °C, aerob
<i>L. monocytogenes</i>	SLCC 2479	SBA; 37 °C, aerob
<i>L. monocytogenes</i>	NCTC 5214	SBA; 37 °C, aerob
<i>L. monocytogenes</i>	SLCC 2755	SBA; 37 °C, aerob
<i>L. monocytogenes</i>	NCTC 7973	SBA; 37 °C, aerob
<i>L. monocytogenes</i>	DSM 12464	SBA; 37 °C, aerob
<i>L. innocua</i>	NCTC 11289	SBA; 37 °C, aerob
<i>L. innocua</i>	DSM 20649	SBA; 37 °C, aerob
<i>L. innocua</i>	NCTC 10528	SBA; 37 °C, aerob
<i>L. innocua</i>	ATCC 33090	SBA; 37 °C, aerob
<i>L. innocua</i>	ATCC 33091	SBA; 37 °C, aerob
<i>L. innocua</i>	ATCC 33090	SBA; 37 °C, aerob
<i>L. seeligeri</i>	ATCC 35967	SBA; 37 °C, aerob
<i>L. seeligeri</i>	SCCC 3954	SBA; 37 °C, aerob
<i>L. ivanovii</i>	NCTC 19119	SBA; 37 °C, aerob
<i>L. ivanovii</i>	ATCC19119	SBA; 37 °C, aerob
<i>L. ivanovii</i>	DSM 20750	SBA; 37 °C, aerob
<i>L. welshimeri</i>	ATCC 35897	SBA; 37 °C, aerob
<i>L. marthii</i>	DSM 23813	SBA; 37 °C, aerob
<i>L. grayi</i>	DSM 20596	SBA; 37 °C, aerob
<i>L. grayi</i>	DSM 20601	SBA; 37 °C, aerob
<i>L. rocourtiae</i>	CIP 109804	SBA; 37 °C, aerob
<i>B. melitensis</i>	ATCC 23456	BSA; 37 °C, mikroaerophil
<i>B. neotomae</i>	ATCC 23459	BSA; 37 °C, mikroaerophil
<i>B. suis</i>	ATCC 23444	BSA; 37 °C, mikroaerophil
<i>B. ovis</i>	ATCC 25840	BSA; 37 °C, mikroaerophil
<i>B. inopinata-like</i>	B02	BSA; 37 °C, mikroaerophil
<i>B. abortus</i>	S19	BSA; 37 °C, mikroaerophil
<i>B. abortus</i>	63/75	BSA; 37 °C, mikroaerophil
<i>B. suis</i>	40	BSA; 37 °C, mikroaerophil

<i>B. ceti</i>	B1/94	BSA; 37 °C, mikroaerophil
<i>B. microti</i>	CCM 4915	BSA; 37 °C, mikroaerophil
<i>B. abortus</i>	Tulya	BSA; 37 °C, mikroaerophil
<i>B. abortus</i>	C86	BSA; 37 °C, mikroaerophil
<i>B. suis</i>	686	BSA; 37 °C, mikroaerophil
<i>B. inopinata</i>	B01	BSA; 37 °C, mikroaerophil
<i>B. abortus</i>	544	BSA; 37 °C, mikroaerophil
<i>B. abortus</i>	870	BSA; 37 °C, mikroaerophil
<i>B. melitensis</i>	Ether	BSA; 37 °C, mikroaerophil
<i>B. suis</i>	513	BSA; 37 °C, mikroaerophil
<i>B. melitensis</i>	63/9	BSA; 37 °C, mikroaerophil
<i>B. pyxicephali</i>	NA	BSA; 37 °C, mikroaerophil
<i>B. abortus</i>	B3196	BSA; 37 °C, mikroaerophil
<i>B. pinnipedalis</i>	B2/94	BSA; 37 °C, mikroaerophil
<i>B. melitensis</i>	Rev1	BSA; 37 °C, mikroaerophil
<i>B. suis</i>	Thomsen	BSA; 37 °C, mikroaerophil
<i>B. abortus</i>	86/8/59	BSA; 37 °C, mikroaerophil
<i>B. abortus</i>	292	BSA; 37 °C, mikroaerophil
<i>O. anthropi</i>	CCUG 1047	LB; 37 °C, aerob
<i>O. anthropi</i>	DSM 20150	LB; 37 °C, aerob
<i>O. anthropi</i>	CCUG 772	LB; 37 °C, aerob
<i>O. intermedium</i>	PR 17	LB; 37 °C, aerob
<i>O. intermedium</i>	LMG 3301	LB; 37 °C, aerob
<i>O. intermedium</i>	CCUG 24964	LB; 37 °C, aerob
<i>O. oryzae</i>	DSM 17471	LB; 37 °C, aerob
<i>O. lupini</i>	LUP21	LB; 37 °C, aerob
<i>O. tritici</i>	WS 1830 cp 80	LB; 37 °C, aerob
<i>O. tritici</i>	2134 cp 2134	LB; 37 °C, aerob
<i>T. whipplei</i>	NA	Anzucht extern
<i>Y. enterocolitica</i> O:3/IV	DSM 13030	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. enterocolitica</i> O:8/IB	ATCC 9610	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. enterocolitica</i> O:3/IV	612/79	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. enterocolitica</i> O:9/III	2012/79	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. enterocolitica</i> O:5,27/II	966/89	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. enterocolitica</i> O:9/III	Y18/07	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. enterocolitica</i> O:9/III	Y35/13	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. enterocolitica</i> O:3/IA	Y19/13	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. enterocolitica</i> O:3/IA	Y03/10	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. enterocolitica</i> O:14/IA	Y17/11	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. enterocolitica</i> O:19,8/IA	Y34/11	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. enterocolitica</i> O:3/II	Y56/07	LB; 28 °C, aerob

<i>Y. enterocolitica</i> O:9/III	Y29/07	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. enterocolitica</i> O:5/IA	Y30/09	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. enterocolitica</i> O:8/IA	Y03/13	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. enterocolitica</i> O:7,8/IA	YE179	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. enterocolitica</i> O:5,27/II	ip3235	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. enterocolitica</i> O:6,31/IIA	Y30/12	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. pseudotuberculosis</i> I	ATCC 29833	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. pseudotuberculosis</i> IA	YP33	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. pseudotuberculosis</i> IB	894/88	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. pseudotuberculosis</i> IIA	896/88	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. pseudotuberculosis</i> II	YP34	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. pseudotuberculosis</i> IV	YP36	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. pseudotuberculosis</i> III	YP30	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. pseudotuberculosis</i> V	YP37	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. pseudotuberculosis</i> VI	YP38	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. pseudotuberculosis</i> VII	YP39	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. pestis</i>	CCUG 32133	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. kristensenii</i>	ATCC 33638	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. kristensenii</i> O:46	YK1	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. aldovae</i>	ATCC 35236	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. frederiksenii</i>	ATCC 33641	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. frederiksenii</i> O:44,45	YF2	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. rohdei</i>	ATCC 43380	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. mollaretii</i>	ATCC 43969	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. mollaretii</i> O:59	YM11	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. mollaretii</i> O:15	YM12	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. intermedia</i>	ATCC 29909	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. intermedia</i> O:4,33	YI11	LB; 28 °C, aerob
<i>Y. bercovieri</i>	ATCC 43970	LB; 28 °C, aerob

Tabelle 33: Stämme für den Nachweis einer TEM-Resistenz

Stammbezeichnung	TEM-Variante	Herkunft	FISH	Immunfluoreszenz
BFR-EC0702	TEM-1	Kalb, Kot	+/-	+
BFR-EC0715	TEM-1	Legehennen, Kot	+	+
BFR-EC0716	TEM-1	Mensch	+	+
BFR-EC0766	TEM-52	Legehennen, Kot	+	+
BFR-EC0805	TEM-52	Legehennen, Kot	+	+
BFR-EC0843	TEM-52	Legehennen, Kot	+	+
BFR-EC0883	TEM-52	Legehennen, Kot	+	+

BFR-EC0900	TEM-52	Legehennen, Kot	+	+
BFR-EC0975	TEM-1	Pute, Blinddarm	+	+/-
BFR-EC1347	TEM-1	Kalb, Kot	+	+
BFR-EC1379	TEM-30	Kalb, Kot	-	+
BFR-EC1417	TEM-52	Legehennen, Kot	+	+
BFR-EC1504	TEM-52	Kalb, Kot	+	+
BFR-EC1510	TEM-52	Broiler, Kot	+	+
BFR-EC1727	TEM-52	Broiler, Kot	+	+
BFR-EC1864	TEM-52	Broiler, Kot	+	+
BFR-EC2343	TEM-52	Broiler, Kot	-	+/-
BFR-EC0084	TEM-52	Legehennen, Kot	+	+
BFR-EC0239	TEM-52	Mastschwein, Kot	+/-	+
BFR-EC0389	TEM-1	Broiler, Kot	+	+
BFR-EC0561	TEM-52	Geflügelfleisch	+	+/-
BFR-EC0564	TEM-52	Geflügelfleisch	+	+
BFR-EC0577	TEM-1	Pute, Kot	+/-	+/-
BFR-EC0860	TEM-52	Unbekannt	+	+/-
BFR-EC1240	TEM-1	Geflügelfleisch	+	+/-
BFR-EC1828	TEM-52	Broiler, Kot	+	+/-

+: starke Signale, +/-: schwächere, aber noch ausreichende Signale, -: Signalstärke zu gering für verlässliche Aussagen

Tabelle 34: Sonden für den Antibiotikanachweis

Sondenname	Sequenz (5'→3')	Ziel
Bla-TEM-	ggaaatgttgaataactcat	TEM β -lactamase mRNA
CalFluor610	aaaaggaataagggcgac	
	caggaaggcaaaatgccgc	
	gcgttctgggtgagcaaa	
	cagcatctttactttcac	
	ctcgtgcacccaactgatc	
	gatccagttcgatgaacc	
	caaggatcttaccgctgtt	
	gttcttcgggcgaaaact	
	aagtgctcattggaaa	
	cgccacatagcagaacttt	
	cgtaacacgggataatac	
	gaccgagttgctcttgccc	
	tctgagaatagtgtatgcg	
	gtgagtactcaaccaagtc	
	taagatgctttctgtgac	

ctcttactgtcatgccatc
 ttatggcagcactgcataa
 ccgcagtggtatcactcat
 tcggtgtcagaagtaagtt
 ttagctccttcggtcctcc
 ccatggttgcaaaaaagc
 caaggcgagttacatgatc
 tcagctccggttcccaacg
 cgtcgtttggtatggcttc
 caggcatcgtggtgtcacg
 gcaacggttgccattgc
 gttcgccagttaatagttt
 gccgggaagctagagtaag
 ccatccagtctattaattg
 gtctgcaactttatccgc
 gaagggccgagcgcagaag
 cagcaataaaccagccagc
 gtcaccggctccagattt
 caatgataccgcgagaccc
 taccatctggccccagtg
 taactacgatacgggaggg
 cctgactccccgtcgtgta
 tatttcggtcatccatagt
 cacctatctcagcgatctg
 accaatgcttaatcagtga

Tabelle 35: Vergleich der Sonde EcoliO157 mit EcoPNA1169

Name der Sonde	Sequenz (Position 23S rRNA)	Abdeckung <i>E. coli</i> O157 (TestProbe)	Falsch positive <i>E. coli</i> Sequenzen (probeCheck)
EcoPNA1169 (Almeida <i>et al.</i> , 2013)	CAACACACAGTGTC (1167)	98,4 %	26,7 %
EcoliO157 (diese Arbeit)	CACACAGTGTCGCTGCCG (1160)	98,4 %	26,6 %

Die Sensitivität (Abdeckung der Speziesgruppe) wurde auf Grund mangelnder Datenlage nicht in TestProbe, sondern durch probeCheck-Analyse ermittelt. Der Anteil falsch positiver Genustreffer (Anzahl der falsch positiven Genustreffer geteilt durch die Anzahl der Gesamtreffer) wurde ebenfalls durch eine probeCheck-Analyse ermittelt. Datenstand: 24.03.2016

Tabelle 36: Vergleich der Sonden Arcobul und Arcobull

Name der Sonde	Sequenz (Position 16S rRNA)	Abdeckung <i>A. butzleri</i> (TestProbe)	Falsch positive <i>Arcobacter</i> Sequenzen (probeCheck)
Arcobul (diese Arbeit)	GCAAGCAGACACTAATCTATCTCTAAA TCA (1005)	100 %	0 %
Arcobull (diese Arbeit)	AGTTATGCGTCATCGTCTTGGTAG (267)	88,9 %	0 %

Die Sensitivität (Abdeckung der Speziesgruppe) wurde durch eine TestProbe-Analyse bestimmt, der Anteil falsch positiver Genustreffer (Anzahl der falsch positiven Genustreffer geteilt durch die Anzahl der Gesamttreffer) wurde mittels probeCheck-Analyse ermittelt. Datenstand: 24.03.2016

Tabelle 37: Vergleich der Sonde Listall mit anderen publizierten Sonden zum Nachweis von *Listeria* spp.

Name der Sonde	Sequenz (Position 16S rRNA)	Abdeckung <i>Listeria</i> (TestProbe)	Falsch positive Sequenzen (probeCheck)
Lis-1255 (Wang <i>et al.</i> , 1992, 1998)	ACCTCGCGGCTTCGCGAC (1254)	78,7 %	70,4 %
Lis-1400 (Fuchizawa <i>et al.</i> , 2008)	CGCACATTTCCATTCGTGCGATTCC (Position 1440 in der <u>23S RNA</u>)	96,0 %	0 %
Lis-637 (Schmid <i>et al.</i> , 2003)	CACTCCAGTCTTCCAGTTTCC (637)	80 %	0,3 %
LisUn-11 (Bisha, 2009)	AAGGGACAAGCAGT (465)	95,3 %	0 %
Lis-16S-1 (Zhang <i>et al.</i> , 2012)	ACTGTTGTTAGAGAAG (434)	99,3 %	17,2 %
Listall (diese Arbeit)	GGACAAGCAGTTACTCTTATCCT (453)	90,7 %	0 %

Die Sensitivität (Abdeckung der Genusgruppe) wurde durch eine TestProbe-Analyse bestimmt, der Anteil falsch positiver Genustreffer (Anzahl der falsch positiven Genustreffer geteilt durch die Anzahl der Gesamttreffer) wurde mittels probeCheck-Analyse ermittelt. Datenstand: 24.03.2016

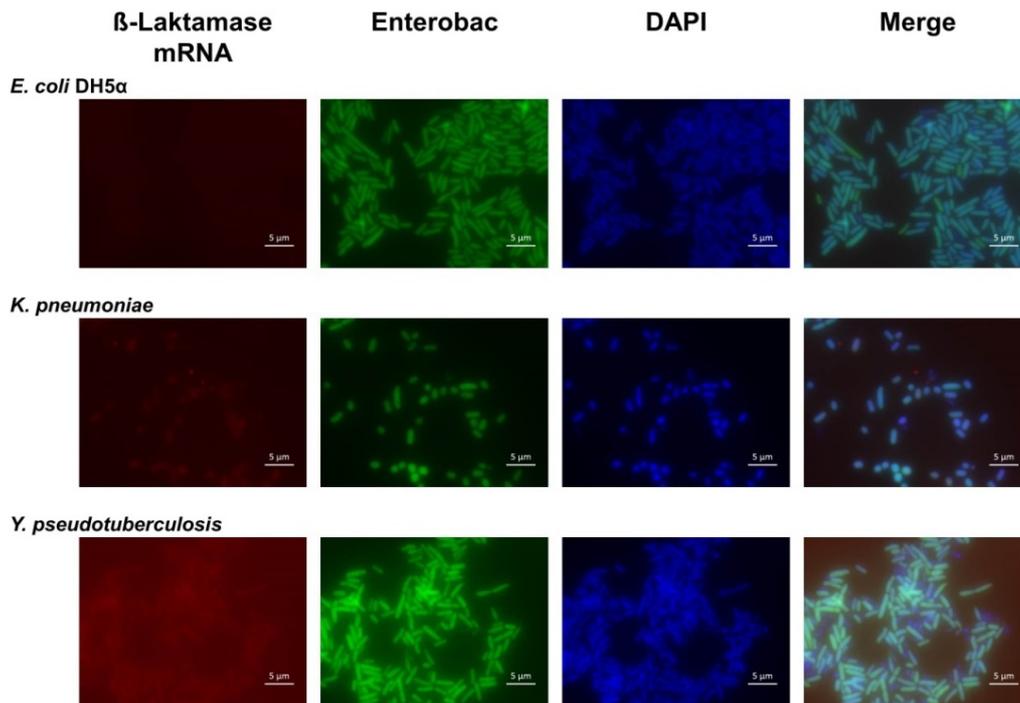


Abbildung 41: Spezifitätsuntersuchungen zur Anfärbung der TEM-1-mRNA: Der mRNA-FISH-Assay erkennt keine Bakterien ohne TEM-Element.

Rot: TEM-1-Sondengemisch-CalFluor610. Grün: Enterobac-Alexa488. Blau: DAPI. Rechts: Merge aus Alexa488-, TexasRed- und DAPI-Signal.

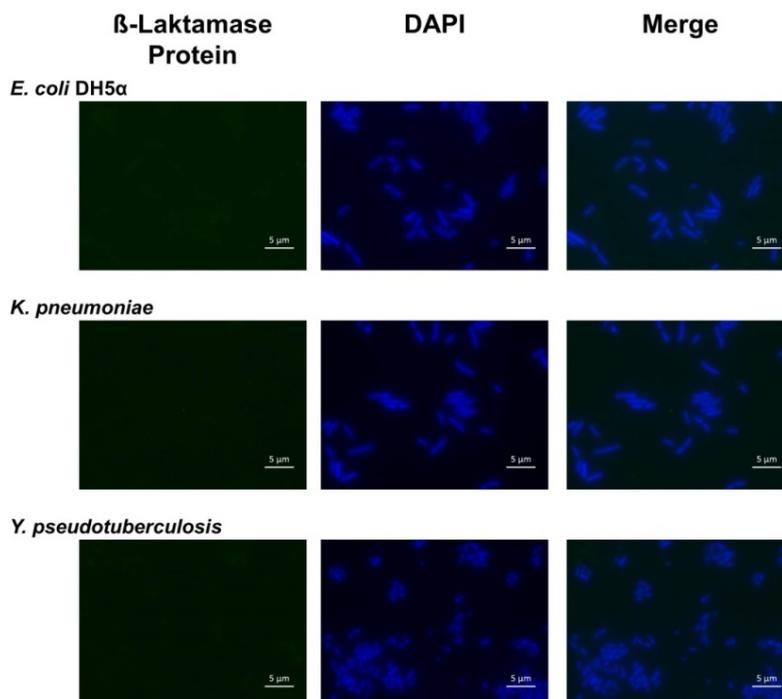


Abbildung 42: Spezifitätsuntersuchungen zur Anfärbung der β -Lactamase auf Proteinebene: Die Antikörperfärbung erkennt keine Bakterien ohne TEM-Element.

Grün: β -Lactamase (Protein)-Alexa488 (zweistufige Antikörperfärbung). Blau: DAPI. Rechts: Merge aus Alexa488- und DAPI-Signal.