

**Abschlussbericht des
Forschungsvorhabens:**

**"Entwicklung eines Schnellscreenings
auf Pathogene in landwirtschaftlich
relevanten Substraten" (K/11/08)**

**Bianca Frösche
Dr. Michael Lebuhn**

Auftraggeber: Bayerisches Staatsministerium für Ernährung,
Landwirtschaft und Forsten
Ludwigstr. 2
86179 München

Projektkennzeichen K/11/08

Projektlaufzeit: 01.10.2011 – 30.06.2015

Projektleitung: Dr. Michael Lebuhn

Bearbeiter: Bianca Fröschle
Elena Madge-Pimentel
Isabella Kinker
Bernhard Munk

Berichtsabschluss: Mai 2016

Berichtsumfang: 195 Seiten

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1	Einleitung/ Stand des Wissens.....17
2	Zielstellung.....19
3	<i>Salmonella</i> spp.21
3.1	Mikrobiologische Analytik21
3.2	Molekularbiologische Analytik22
3.2.1	Bestehende Analytik aus vorangegangenen Projekten.....22
3.2.2	Durchführung: Überprüfung des <i>invA</i> -Alignments24
3.2.3	Ergebnisse und Diskussion: Überprüfung des <i>invA</i> -Alignments.....24
3.3	Schnellscreening-Ansatz zum Nachweis von <i>Salmonella</i> spp.....24
3.3.1	Durchführung: Anpassungen der Analytik24
3.3.2	Ergebnisse und Diskussion: Anpassungen der Analytik.....25
3.4	Keimträgerversuch KT55-181113 mit <i>Salmonella</i> Senftenberg W775 zum Test der Schnellscreening-Methode26
3.4.1	Durchführung/Kurzbeschreibung: Keimträgerversuch26
3.4.2	Ergebnisse und Diskussion: Keimträgerversuch27
3.5	Test eines Kits zur DNA-Extraktion aus großen Probenvolumina29
3.5.1	Erstellung einer Wachstumskurve zur Herstellung einer Zellsuspension mit bekannter Konzentration und Durchführung der DNA-Extraktionen30
3.5.2	Vergleich der Extraktionskits mit <i>invA</i> -qPCR.....31
4	STEC/EHEC/EPEC33
4.1	Mikrobiologische Analytik33
4.2	Molekularbiologische Analytik34
4.2.1	Durchführung: Herangehensweise zur Überprüfung und Testung der qPCR-Nachweissysteme für <i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>eae</i> und <i>uidA</i>35
4.2.2	Ergebnisse und Diskussion: Nachweissystem für das Shigatoxin-Gen 1 (<i>stx1</i>).....37
4.2.3	Alternatives Primer/Sonden-System zum Nachweis von <i>stx1</i> (<i>stx1A</i> - F/ <i>stx1A</i> -R/ <i>stx1A</i> -S (FAM/BHQ-1))38
4.2.4	Ergebnisse und Diskussion: Nachweissystem für das Shigatoxin-Gen 2 (<i>stx2</i>).....40
4.2.5	Alternativer Forward-Primer zum Nachweis des Shigatoxin-Gens 2 (<i>stx2</i>).....45
4.2.6	Ergebnisse und Diskussion: Nachweissystem für das Intimin-Gen (<i>eae</i>).....45
4.2.7	Ergebnisse und Diskussion: Nachweissystem für das <i>E. coli</i> - und <i>Shigella</i> spp.-spezifische β -Glucuronidase- Gen (<i>uidA</i>).....48
4.2.8	Durchführung: Test der qPCR-Systeme im Multiplex (<i>stx1</i> / <i>stx2</i> / <i>eae</i> / <i>uidA</i>).....48

4.2.9	Ergebnisse und Diskussion: Test der qPCR-Systeme im Multiplex (<i>stx1/stx2/eae/uidA</i>)	49
4.2.10	Durchführung: Entwicklung eines qPCR-Primer-/Sonden-Systems zum Nachweis von <i>ehly</i>	52
4.2.11	Ergebnisse und Diskussion: Entwicklung eines qPCR-Primer-/Sonden- Systems zum Nachweis von <i>ehly</i>	53
4.3	Schnellscreening-Ansatz zum Nachweis von EHEC/EPEC	57
4.3.1	Verkürzung der Analytik und Einführung von qPCR-Analysen.....	57
4.3.2	Nachweis der DNA lebensfähiger EHEC/EPEC.....	58
5	<i>Clostridium botulinum</i> bzw. Botulinum-Neurotoxin-bildende <i>Clostridium</i> spp.	62
5.1	Mikrobiologische Analytik	62
5.2	Molekularbiologische Analytik	63
5.2.1	qPCR-Nachweissystem für das Botulinum-Toxin A-Gen (<i>bont/A</i>)	66
5.2.2	qPCR-Nachweissystem für das Botulinum-Toxin B-Gen (<i>bont/B</i>).....	69
5.2.3	qPCR-Nachweissystem für die interne Positivkontrolle (IPC; pUC19- Plasmid).....	72
5.2.4	qPCR-Nachweissystem für das Botulinum-Toxin C-Gen (<i>bont/C</i>).....	77
5.2.5	qPCR-Nachweissystem für das Botulinum-Toxin D-Gen (<i>bont/D</i>)	82
5.2.6	qPCR-Nachweissystem für das Botulinum-Toxin E-Gen (<i>bont/E</i>)	85
5.2.7	qPCR-Nachweissystem für das Botulinum-Toxin F-Gen (<i>bont/F</i>).....	87
5.2.8	Test der Multiplex-qPCR-Nachweissysteme (<i>bont/A/bont/B/IPC</i> und <i>bont/E/bont/F</i>)	89
5.2.9	Singleplex-qPCR-System zum Nachweis des Gens <i>ntnh</i>	106
5.2.10	Interne Amplifikationskontrolle (IAC) zum Ausschluss von PCR- Inhibition	118
5.3	Schnellscreening-Ansatz zum Nachweis von <i>C. botulinum</i>.....	120
5.3.1	Durchführung	120
5.3.2	Ergebnisse und Diskussion.....	120
6	<i>Clostridium difficile</i>.....	122
6.1	Mikrobiologische Analytik	122
6.2	Molekularbiologische Analytik - qPCR zum spezifischen Nachweis des <i>tpi</i>-Gens von <i>Clostridium difficile</i>.....	123
6.2.1	Alignment.....	123
6.2.2	<i>In silico</i> -Tests des <i>tpi</i> -Primer-/Sonden-Systems (CDIF_ <i>tpi_fw</i> /CDIF_ <i>tpi_re</i> / CDIF_ <i>tpi_S</i>)	123
6.2.3	<i>In vitro</i> -Tests des <i>tpi</i> -Primer-/Sonden-Systems (CDIF_ <i>tpi_fw</i> /CDIF_ <i>tpi_re</i> / CDIF_ <i>tpi_S</i>)	124

6.2.4	Überprüfung der <i>C. difficile</i> Kulturen in der Stammsammlung	132
6.3	Schnellscreening-Ansatz zum Nachweis von <i>C. difficile</i>	132
6.3.1	Durchführung	132
6.3.2	Ergebnisse und Diskussion	133
7	<i>Clostridium perfringens</i>	135
7.1	Durchführung	135
7.1.1	Alignment	135
7.1.2	<i>In silico</i> -Tests des <i>plc</i> -Primer-/Sonden-Systems (Cp_plc_840-f/Cp_plc_889-r/Cp_plc_861_S2)	135
7.1.3	<i>In vitro</i> -Tests des <i>plc</i> -Primer-/Sonden-Systems (Cp_plc_840-f/Cp_plc_889-r/Cp_plc_861_S2)	136
8	Pathogene Kryptosporidien	139
8.1	Mikrobiologische Analytik	139
8.2	Molekularbiologische Analytik	139
8.3	Schnellscreening-Ansatz zum Nachweis von pathogenen Kryptosporidien	140
9	<i>Bacillus cereus</i>-Gruppe	141
9.1	Mikrobiologische Analytik	141
9.2	Molekularbiologische Analytik	142
9.3	Schnellscreening-Ansatz zum Nachweis von Mitgliedern der <i>Bacillus-cereus</i> Gruppe	142
10	Zusammenfassung	144
11	Summary	145
12	Literaturverzeichnis	147
13	Anhang	152
13.1	Anhang: Durchführungsprotokolle zur Kultivierung von Krankheitserregern	152
13.1.1	Kultivierung von <i>Salmonella</i> spp.	152
13.1.2	Kultivierung von EHEC/EPEC	155
13.1.3	Kultivierung von <i>Clostridium botulinum</i>	158
13.1.4	Kultivierung von <i>Clostridium difficile</i>	163
13.2	Anhang: Durchführungsprotokolle zur DNA-Extraktion	165
13.2.1	DNA-Extraktion für kleine Probenvolumina (FastDNA™ SPIN Kit for Soil)	165
13.2.2	DNA-Extraktion für große Probenvolumina (FastDNA® 50 ml SPIN Kit for Soil)	166
13.3	Anhang: Accession-Nummern der Sequenz-Datensätze in Alignments	167

13.3.1	Alignment zum <i>invA</i> -Gene von <i>Salmonella</i> spp.	167
13.3.2	Alignments zu Genen von EHEC/EPEC	170
13.3.3	Alignments zu Genen von BoNT-produzierenden <i>Clostridium</i> spp.	176
13.3.4	Alignment des <i>tpi</i> -Gens von <i>Clostridium difficile</i>	184
13.3.5	Alignment des <i>plc</i> -Gens von <i>Clostridium perfringens</i>	186
13.4	Anhang: Veröffentlichungen und Ausbildung im Rahmen dieses Projekts	188
13.4.1	Studien-, Bachelor- und Master-Arbeiten sowie Dissertationen.....	188
13.4.2	Veröffentlichungen und Poster.....	188

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1: ...Ablaufschema und Zielstellung der Schnellscreening-Ansätze	20
Abb. 2: ...Konventioneller Ansatz zur mikrobiologischen Kultivierung von Salmonella spp. (BioAbfV, 2013)	21
Abb. 3: ...Schnellscreening-Ansatz zum Nachweis von Salmonella spp.	24
Abb. 4: ...Beispiel-Amplifikationsplot zu Fall 1: Vergleiche Rot-Grün-Grau (Replikate nach Inkubation „n.I.“) mit Blau: vor Inkubation („v.I.“)	25
Abb. 5: ...Beispiel-Amplifikationsplot zu Fall 2b: Vergleiche Rot-Grün-Grau (Replikate nach Inkubation „n.I.“) mit Blau: vor Inkubation („v.I.“)	26
Abb. 6: ...Auswertung nach Augenschein: Peptonwasser-Voranreicherung, Rappaport-Hauptanreicherung und XLD-Platten	27
Abb. 7: ...Entwicklung der Keimzahlen von S. Senftenberg im Verlauf der Expositionszeit	28
Abb. 8: Wachstumskurve von Salmonella enterica ssp. enterica sv. Senftenberg W775	31
Abb. 9: Ergebnisse der invA-qPCR-Ansätze zur Bestimmung der DNA- Extraktionseffizienz zweier Kits, dargestellt sind die C _q -Werte in Abhängigkeit der dotierten Salmonellen-DNA	31
Abb. 10: Schema des mikrobiologischen Kultivierungsablaufs zum Nachweis von EHEC/EPEC (in Anlehnung an: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB: BVL L 07.18-1:2002-05)	33
Abb. 11: E. coli (EPEC LGL 38122) auf Endo-Agar	34
Abb. 12: Aligierte Sequenzen (5' → 3') mit farblich hervorgehobenen Diskrepanz- Stellen beim Abgleich mit dem Primersystem stx1-VS1 (bzw. stx1- mVS1)/stx1-VS2/stx1-VS3	39
Abb. 13: Aligierte Sequenzen (5' → 3') mit farblich hervorgehobenen Diskrepanz- Stellen beim Abgleich mit dem Primersystem stx2_for4 (bzw. stx2- F)/stx2_rev2/stx2_rev2f/stx2_p1/stx2_p2	41
Abb. 14: Amplifikationsplots und Ergebnisse der stx2-qPCR der Zellsuspensionen von vier EHEC-Stämmen mit dem Primer/Sonden-System (stx2_for4/stx2_rev2/stx2_rev2f/stx2_p1/stx2_p2)	42
Abb. 15: EvaGreen-qPCR-Lauf mit dem Primersystem (stx2_for4/stx2_rev2/stx2_rev2f)	43
Abb. 16: Ergebnisse des stx2-Nachweissystems (stx2_for4/stx2_rev2/stx2_rev2f/stx2_p1/stx2_p2) in einem Duplex- qPCR-Lauf zusammen mit dem stx1-Primer/Sonden-System (vgl. 4.2.3; stx1-Ergebnisse nicht dargestellt)	44
Abb. 17: Vergleich der Primer stx2_for4 und Stx2-F in der stx2-qPCR	45
Abb. 18: eae-qPCR-Amplifikationsplots und Standardkurve der Verdünnungsreihe der Zellsuspension EPEC LGL 110260	47
Abb. 19: Konzentrationsgradienten der Platinum-Taq-Polymerase und der dNTPs; [A] Amplifikationsplots der mTSB-Anreicherung einer Gülleprobe (PB21- Gü; 19.09.2013); [B] Amplifikationsplots der Zellsuspension der Positivkontrolle (EHEC S 6109, O157:H-); blau: 0,75 U PTaq, 200 µM dNTPs; rot: 1,00 U PTaq, 200 µM dNTPs; grün: 1,25 U PTaq, 200 µM dNTPs; grau: 1,00 U PTaq, 300 µM dNTPs; Negativkontrolle jeweils negativ (MQ; nicht gezeigt); (Projekt der qPCR-Läufe vom 15.11.2013)	50

Abb. 20: Amplifikationsplots und Ergebnisse der uidA-qPCR im Rahmen einer Multiplex-Anwendung mit Spiking von E. coli-Zellsuspension.....	51
Abb. 21: Gel-Dokumentation der Produkte (Amplikon 227 bp) einer Annealing-Temperatur-Gradienten-PCR (57-67°C) mit dem ehly-Primersystem (Ehly-F/Ehly-R); 3% Agarosegel, 100 V, 120 min; LR: DNA-Standard (GeneRuler™ Low Range DNA Ladder, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, USA); NTC: Negativkontrolle; ZS: Zellsuspension	54
Abb. 22: Amplifikationsplots der Primer-Matrix mit dem ehly-qPCR-Nachweissystem	55
Abb. 23: Amplifikationsplots der Sonden-Matrix mit dem ehly-qPCR-Nachweissystem	55
Abb. 24: ehly-qPCR-Amplifikationsplots und Standardkurve der Verdünnungsreihe der Zellsuspension EPEC LGL 38122.....	56
Abb. 25: Schnellscreening-Ansatz zum Nachweis von EHEC/EPEC (1,5 d)	57
Abb. 26: Schnellscreening-Ansatz zum Nachweis von EPEC (< 1 d).....	59
Abb. 27: Vergleich der ehly-qPCR-Signale aus Voranreicherungskulturen von EPEC-Bakterien vor (BI) und nach der Inkubation (mTSB+N)	60
Abb. 28: Vergleich der ehly-qPCR-Signale aus Hauptanreicherungskulturen von EPEC-Bakterien vor (mTSB+N) und nach der Inkubation (mTSB).....	61
Abb. 29: Schema des mikrobiologischen Kultivierungsablaufs zum Nachweis von BoNT-produzierenden Clostridium spp. (in Anlehnung an: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB: BVL L 07.18-1:2002-05)	62
Abb. 30: Amplifikationsplots und C _q -Werte des ersten Tests des bont/A-qPCR-Systems im Singleplex	67
Abb. 31: Gel-Dokumentation der Produkte einer Annealing-Temperatur-Gradienten-PCR (50 - 60°C) jeweils im Singleplex mit den Primersystemen bont/A, bont/B, bont/E, bont/F und IPC und bei Einsatz von DNA-Extrakten von C. botulinum der entsprechenden Genotypen; 1,5% Agarose-Gel; 90 V; 90 min; LR: DNA-Standard (GeneRuler™ Low Range DNA Ladder, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, USA); NTC: Negativkontrolle.....	68
Abb. 32: Amplifikationsplots und C _q -Werte des Sondenmatrix-Versuchs mit dem bont/A-qPCR-System im Singleplex	69
Abb. 33: Amplifikationsplots und C _q -Werte des ersten Tests des bont/B-qPCR-Systems im Singleplex	70
Abb. 34: Amplifikationsplots und C _q -Werte der Sondenmatrix mit dem bont/B-qPCR-System im Singleplex	71
Abb. 35: Vergleich der bont/B-qPCR Ergebnisse mit dem publizierten System (CBOT B fw/CBOT B re/CBOT B S) und dem neu entwickelten System (2-CBOT B fw/2-CBOT B re/CBOT B S) für DNA-Extrakte von C. botulinum Typ B	72
Abb. 36: Amplifikationsplot und C _q -Werte der Verdünnungsreihe des pUC19-Plasmids mit dem IPC-qPCR-Nachweissystem	74
Abb. 37: Amplifikationsplot und C _q -Werte der Sondenmatrix des pUC19-Plasmids mit dem IPC-qPCR-Nachweissystem	75
Abb. 38: Amplifikationsplots und C _q -Werte der qPCR mit Sonde (oben) sowie der EvaGreen-qPCR (Mitte) und Dissoziationskurve (unten) einer neuen	

Verdünnungsreihe des pUC19-Plasmids mit dem IPC-qPCR-Nachweissystem	76
Abb. 39: Amplifikationsplot und C _q -Werte von Verdünnungen eines DNA-Extrakts des Stammes <i>C. botulinum</i> Typ C LGL 280514 mit dem bont/C-qPCR-Nachweissystem (CBOT C fw2/CBOT C re3/CBOT C S2).....	79
Abb. 40: Amplifikationsplots bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen (55 und 58°C) in der einer 3-Schritt-qPCR mit dem bont/C-Nachweissystem (CBOT C fw2/CBOT C re3/CBOT C S2)	80
Abb. 41: Gel-Dokumentation des Vergleichs der Produkte einer 2-Schritt- und einer 3-Schritt qPCR mit Annealing bei 58°C mit den Primersystemen bont/C(CBOT C fw2/CBOT C re3/CBOT C S2); 3% High-Resolution-Agarose-Gel;100 V;80 min; DNA-Standard: GeneRuler™ Low Range DNA Ladder, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, USA); NK: Negativkontrolle; spezifisches Produkt: 120 bp.....	81
Abb. 42: Amplifikationsplots und C _q -Werte des ersten Tests der qPCR mit dem bont/D-Nachweissystem (CBOT D fw/CBOT D re/CBOT D S)	83
Abb. 43: Amplifikationsplots des DNA-Extrakts Stamms <i>C. botulinum</i> Typ D LGL 68986 (unverdünnt) rein (oben) und gemischt (Mitte) mit dem <i>C. botulinum</i> -freien DNA-Extrakt einer TPGY-Anreicherung in einer Primermatrix-qPCR mit dem bont/D-Nachweissystem und C _q -Werte (unter).....	84
Abb. 44: Amplifikationsplots und C _q -Werte der Test-qPCR des DNA-Extrakts von <i>C. botulinum</i> LGL REB 1718 mit dem bont/E-qPCR-System im Singleplex.....	86
Abb. 45: Amplifikationsplots und C _q -Werte des Sondenmatrix-Versuchs mit dem bont/E-qPCR-System im Singleplex	86
Abb. 46: Amplifikationsplots und C _q -Werte der Test-qPCR mit dem bont/F-qPCR-System im Singleplex.....	88
Abb. 47: Amplifikationsplots und C _q -Werte der Sondenmatrix mit dem bont/F-qPCR-System im Singleplex.....	89
Abb. 48 Amplifikationsplots und C _q -Werte der Multiplex-qPCR der Variante Ia vom 25.05.2012 (s. Tab. 17)	92
Abb. 49 Amplifikationsplots und C _q -Werte des IPC-Systems in der Multiplex-qPCR der Variante Ib vom 20.07.2012 (s. Tab. 17).....	93
Abb. 50 Amplifikationsplots und C _q -Werte der Multiplex-qPCR der Variante Ib vom 04.09.2012 (s. Tab. 17)	94
Abb. 51: Amplifikationsplots und C _q -Werte des bont/A-Primer/Sonden-Systems in der Multiplex-qPCR der Variante IIa vom 20.07.2012 im Vergleich zur Variante Ia vom 20.07.2012 (s. Tab. 17)	95
Abb. 52: Amplifikationsplots und C _q -Werte des bont/B-Primer/Sonden-Systems in der Multiplex-qPCR der Variante IIa vom 20.07.2012 im Vergleich zur Variante Ia vom 20.07.2012 (s. Tab. 17)	96
Abb. 53: Amplifikationsplots und C _q -Werte der Multiplex-qPCR der Variante IIB vom 06.08.2012 (s. Tab. 17)	97
Abb. 54: Amplifikationsplots und C _q -Werte der Multiplex-qPCR der Variante IIB vom 04.09.2012 (s. Tab. 17)	98
Abb. 55: Amplifikationsplots und C _q -Werte der Multiplex-qPCR der Varianten IIIa und IIIb vom 19.05.2014 im Vergleich (s. Tab. 17) – Auswertung bezüglich bont/A	99

Abb. 56: Amplifikationsplots und C _q -Werte der Multiplex-qPCR der Varianten IIIa und IIIb vom 19.05.2014 im Vergleich (s. Tab. 17) – Auswertung bezüglich bont/B	100
Abb. 57: Amplifikationsplots und C _q -Werte der Multiplex-qPCR der Variante IIIb vom 04.06.2014 (s. Tab. 17) – Testung verschiedener C. botulinum-Stämme.....	101
Abb. 58: Amplifikationsplots und C _q -Werte der Multiplex-qPCR der Variante IVa vom 15.05.2012 (s. Tab. 17)	102
Abb. 59: Amplifikationsplots und C _q -Werte der Multiplex-qPCR der Variante IVb vom 04.06.2014 (s. Tab. 17)	103
Abb. 60: Amplifikationsplots und C _q -Werte des bont/B-Nachweissystems in der Multiplex-qPCR mit selbst gemischtem Mastermix, mit Quanta-Mastermix und im Singleplex vom 19.05.2014	105
Abb. 61: Amplifikationsplots und C _q -Werte eines Tests des ntnh-Nachweissystems nach Raphael und Andreadis.....	107
Abb. 62: Amplifikationsplots und C _q -Werte eines Tests des selbst entwickelten ntnh-Nachweissystems (ntnH-9a-F/ntnH-2d-S/ntnH-2c-R).....	109
Abb. 63: Geldokumentation der Annealing-Temperatur-Gradienten-PCR des selbst entwickelten ntnh-Nachweissystems (ntnH-9a-F/ntnH-2d-S/ntnH-2c-R)	110
Abb. 64: Amplifikationsplots und C _q -Werte der Primermatrix-qPCR des selbst entwickelten ntnh-Nachweissystems (ntnH-9a-F/ntnH-2d-S/ntnH-2c-R)	111
Abb. 65: Amplifikationsplots und C _q -Werte der Sondenmatrix-qPCR des selbst entwickelten ntnh-Nachweissystems (ntnH-9a-F/ntnH-2d-S/ntnH-2c-R)	112
Abb. 66: Amplifikationsplots, Dissoziationskurve und C _q -Werte der EvaGreen-qPCR des selbst entwickelten ntnh-Nachweissystems (ntnH-9a-F/ntnH-2d-S/ntnH-2c-R).....	114
Abb. 67: Amplifikationsplots, Standardkurve und C _q -Werte der qPCR einer Zellsuspensions-Verdünnungsreihe des Stammes C. botulinum LGL E2625 mit dem ntnh-Nachweissystem ntnH-9a-F/ntnH-2d-S/ntnH-2c-R.....	115
Abb. 68: Amplifikationsplots, Standardkurve und C _q -Werte der qPCR einer Zellsuspensions-Verdünnungsreihe eines transformierten E. coli-Stammes mit dem ntnh-Nachweissystem ntnH-9a-F/ntnH-2d-S/ntnH-2c-R	116
Abb. 69: Amplifikationsplots und C _q -Werte einer qPCR zur IAC mit dem ehly-Primer-/Sondensystem (Ehly-F/Ehly-R/Ehly-S).....	118
Abb. 70: Amplifikationsplots einer qPCR zur internen Amplifikationskontrolle mit dem selbst entwickelten ntnh-Nachweissystem (ntnH-9a-F/ntnH-2d-S/ntnH-2c-R)	119
Abb. 71: Schnellscreening-Ansatz zum Nachweis von C. botulinum	120
Abb. 72: Ergebnisse der internen Amplifikationskontrolle (IAC) von 1:10-verdünnten TPGY-Anreicherungskulturen	121
Abb. 73: Schema des mikrobiologischen Kultivierungsablaufs zum Nachweis von C. difficile.....	122
Abb. 74: Amplifikationsplots und C _q -Werte des ersten Tests des tpi-qPCR-Systems zum Nachweis von C. difficile (CDIF_tpi_fw/CDIF_tpi_re/CDIF_tpi_S)	125
Abb. 75: Amplifikationsplots und C _q -Werte der Primergradienten-qPCR mit dem tpi-System zum Nachweis von C. difficile (CDIF_tpi_fw/CDIF_tpi_re/CDIF_tpi_S)	126
Abb. 76: Amplifikationsplots und C _q -Werte der Annealing-Temperatur Gradienten-qPCR mit dem tpi-System zum Nachweis von C. difficile	

	(CDIF_tpi_fw/CDIF_tpi_re/CDIF_tpi_S) – unter Einsatz einer unverdünnten CDIF-Zellsuspension	127
Abb. 77:	Amplifikationsplots und C _q -Werte der Annealing-Temperatur Gradienten-qPCR mit dem tpi-System zum Nachweis von <i>C. difficile</i> (CDIF_tpi_fw/CDIF_tpi_re/CDIF_tpi_S) – unter Einsatz einer 1:100-verdünnten CDIF-Zellsuspension	128
Abb. 78:	Amplifikationsplots und C _q -Werte der Sondengradienten-qPCR mit dem tpi-System zum Nachweis von <i>C. difficile</i> (CDIF_tpi_fw/CDIF_tpi_re/CDIF_tpi_S)	129
Abb. 79:	Amplifikationsplots (oben), C _q -Werte (Mitte) und Dissoziationskurve (unten) der EvaGreen-qPCR mit den tpi-Primern zum Nachweis von <i>C. difficile</i> (CDIF_tpi_fw/CDIF_tpi_re)	130
Abb. 80:	Amplifikationsplots und C _q -Werte der qPCR zur Überprüfung der <i>C. difficile</i> -Kryokulturen in der Stammsammlung mit dem tpi-System zum Nachweis von <i>C. difficile</i> (CDIF_tpi_fw/CDIF_tpi_re/CDIF_tpi_S)	132
Abb. 81:	Schnellscreening-Ansatz zum Nachweis von <i>C. difficile</i>	133
Abb. 82:	Amplifikationsplots (oben), C _q -Werte (Mitte) und Dissoziationskurve (unten) der EvaGreen-qPCR aus mTPGY-Zellsuspensionen mit den tpi-Primern zum Nachweis von <i>C. difficile</i> (CDIF_tpi_fw/CDIF_tpi_re)	134
Abb. 83:	Amplifikationsplots und C _q -Werte der qPCR zur Überprüfung eines <i>C. perfringens</i> -Stammes in der Stammsammlung mit dem <i>C. perfringens</i> -spezifischen plc-System (Cp_plc_840-f/Cp_plc_889-r/Cp_plc_861_S2)	138

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tab. 1: ..Kandidaten für Schnellscreening-Nachweissysteme: in landwirtschaftlichen Substraten relevante Krankheitserreger.....	19
Tab. 2: ...Sequenz-Datensatz als Basis für die Entwicklung des invA-qPCR-Nachweissystems	23
Tab. 3: ...Ausgangssituationen und korrespondierende qPCR-Ergebnisse	25
Tab. 4: ...Auswertung des Keimträgerversuchs KT55-181113 S. Senftenberg W775 mittels qPCR-Ergebnisvergleich vor und nach Inkubation.....	28
Tab. 5: ...qPCR-Nachweissysteme für die Erregergruppe EHEC/EPEC	36
Tab. 6: ...Eingesetzte Reagenzien und Reaktionsbedingungen für die Singleplex-qPCR mit dem stx2-Nachweissystem	42
Tab. 7: ...Prozentualer Anteil der durch die Primer/Sonden gebundenen Sequenzen im eae-Alignment.....	46
Tab. 8: ...Eingesetzte Reagenzien und Reaktionsbedingungen für die Multiplex-qPCR zum Nachweis von stx1/stx2/eae/uidA (stx1-mVS1-F/stx1-VS2-R/stx1-VS3-S; stx2_for4/stx2_rev2/stx2_rev2f/stx2_p1/stx2_p2; eae_t_for1/eae_t_rev/eae_t_p1/eae_t_p2; uidA-784F/uidA-866R/uidA-SEC807)	48
Tab. 9: ...Charakterisierung einer Reihe von Stämmen in der Stammsammlung.....	52
Tab. 10: .Eingesetzte Reagenzien und Reaktionsbedingungen für die Singleplex-qPCR zum Nachweis des Enterohämolysin-Gens (Ehly-F/Ehly-R/Ehly-S).....	53
Tab. 11: .Gegenüberstellung der qualitativen PCR-Ergebnisse aus den verschiedenen Kultivierungsschritten (Probenahme am Pilotbetrieb PB21) und daraus resultierende Einstufung	58
Tab. 12: .qPCR-Nachweissysteme für die Erregergruppe BoNT-produzierende Clostridium spp./Clostridium botulinum.....	64
Tab. 13: .Eingesetzte Reagenzien und Reaktionsbedingungen für die Singleplex-qPCR zum Nachweis des bont/A-Gens (CBOT A fw/CBOT A re/CBOT A S)	66
Tab. 14: .Eingesetzte Reagenzien und Reaktionsbedingungen für die Singleplex-qPCR zum Nachweis des pUC19-Plasmids(IPC fw/IPC re/IPC S).....	73
Tab. 15: .Eingesetzte Reagenzien und Reaktionsbedingungen für die Singleplex-qPCR zum Nachweis von bont/C (CBOT C fw2/CBOT C re3/CBOT C S2)	78
Tab. 16: .Temperaturprogramm mit einem 3-Schritt-PCR-Protokoll für die bont/C-qPCR (CBOT C fw2/CBOT C re3/CBOT C S2).....	79
Tab. 17: .Getestete Kombinationen der qPCR-Systeme bont/A, bont/B, IPC, bont/E und bont/F und unterschiedliche Mastermix-Varianten.....	90
Tab. 18: .Eingesetzte Reagenzien für die Multiplex-qPCR mit einem selbst gemischten Mastermix zum Nachweis von bont/A, bont/B und IPC bzw. bont/E und bont/F vom 15.05.2012.....	90
Tab. 19: .Eingesetztes Temperaturprogramm für die Multiplex-qPCR mit einem selbst gemischten Mastermix zum Nachweis von bont/A, bont/B und IPC bzw. bont/E und bont/F vom 15.05.2012	91
Tab. 20: Temperaturprogramm der Multiplex-qPCR mit dem kommerziell erhältlichen qPCR-Mastermix Brilliant Multiplex qPCR Mastermix (Agilent Technologies, USA) zum Nachweis von bont/A, bont/B und IPC vom 04.09.2012.....	94

Tab. 21: .Anteile der durch das Primer-/Sondensystem nach Raphael und Andreadis (2007) erfassten Sequenzen im Alignment (vgl. Tab. 44)	106
Tab. 22: . Reaktionsbedingungen der ntnh-qPCR nach Raphael und Andreadis (2007)	108
Tab. 23: .Anteile der durch das selbst entwickelte ntnh-Primer-/Sondensystem (ntnH-9a-F/ntnH-2d-S/ntnH-2c-R) erfassten Sequenzen im Alignment (vgl. Tab. 44).....	108
Tab. 24: .Standard-Reaktionsbedingungen der ntnh-qPCR mit dem selbst entwickelten Primer-/Sondensystem	112
Tab. 25: . Überprüfung der Stammsammlung von <i>C. botulinum</i> auf das Vorkommen von ntnh mittels des selbst entwickelten ntnh-qPCR-Nachweissystems (ntnH-9a-F/ntnH-2d-S/ntnH-2c-R).....	117
Tab. 26: qPCR-Nachweissystem für das <i>Clostridium difficile</i> -spezifische tpi-Gen (Amplikon: 135 bp; Referenz: Ziegler, 2013).....	123
Tab. 27: Reaktionsbedingungen für die Singleplex-qPCR zum Nachweis des tpi-Gens von <i>C. difficile</i>	131
Tab. 28: .qPCR-Nachweissystem für das <i>Clostridium perfringens</i> -spezifische plc-Gen (Amplikon: 96 bp; Lebuhn et al., 2004)	135
Tab. 29: .Anzahl der <i>Clostridium perfringens</i> -plc-Sequenzen im Alignment (n = 427) mit Mismatches	136
Tab. 30: .Anzahl der plc-ähnlichen Sequenzen anderer Clostridien im Alignment (n = 20) ohne Mismatches	136
Tab. 31: Beispiel-Protokoll für die Durchführung einer plc-qPCR	137
Tab. 32: Primer- und Sondensequenzen des hsp70-(RT)qPCR-Systems 1PS für <i>C. parvum</i> / <i>C. hominis</i>	140
Tab. 33: Primer- und Sondensequenzen des rpoB-qPCR-Systeme für die „klassischen“ Species der <i>Bacillus-cereus</i> Gruppe	142
Tab. 34: .Sequenz-Datensatz zur Aktualisierung des invA-qPCR-Nachweissystems	167
Tab. 35: .Accession-Nummern der im Alignment vom qPCR-System stx1-VS1-F (bzw. stx1-mVS1-F)/stx1-VS2-R/stx1-VS3-S abgedeckten stx1-Sequenzen (n=139).....	170
Tab. 36: .Accession-Nummern der im Alignment vom qPCR-System stx2 (stx2_for4/stx2_rev2/stx2_rev2f/stx2_p1/stx2_p2) abgedeckten stx2-Sequenzen (n=360).....	171
Tab. 37: .Accession-Nummern der im Alignment vom qPCR-System eae (eae_t_for1/eae_t_rev1/eae_t_p1/eae_t_p2) abgedeckten eae-Sequenzen (n=384).....	173
Tab. 38: .Accession-Nummern der im Alignment (07.03.2013) vom qPCR-System ehly (Ehly-F/Ehly-S/Ehly-R) abgedeckten Hämolysin-Gen-Sequenzen	175
Tab. 39: .Accession-Nummern der im Alignment vom qPCR-System CBOT A fw/CBOT A re/CBOT A S abgedeckten bont/A-Sequenzen (n=94)	176
Tab. 40: .Accession-Nummern der im Alignment vom qPCR-System CBOT B fw/CBOT B re/CBOT B S abgedeckten bont/B-Sequenzen (n=52).....	178
Tab. 41: .Accession-Nummern der im Alignment von den qPCR-Systemen für bont/C und bont/D abgedeckten bont/C bzw. bont/D-Sequenzen und ihre Erfassung durch die jeweiligen Primer/Sonden	179

Tab. 42: .Accession-Nummern der im Alignment vom qPCR-System CBOT E fw/CBOT E re/CBOT E S abgedeckten bont/E-Sequenzen von C. botulinum und C. butyricum (n=61).....	180
Tab. 43: .Accession-Nummern der im Alignment vom qPCR-System CBOT F fw/CBOT F re/CBOT F S abgedeckten bont/F-Sequenzen von C. botulinum und C. baratii(n=46).....	181
Tab. 44: .Accession-Nummern der im Alignment von den ntnh-Primer- /Sondensystemen nach Raphael und Andreadis (2007) und ntnH-9a- F/ntnH-2c-R/ntnH-2d-S (selbst entwickelt) abgedeckten ntnh-Sequenzen von C. botulinum, C. baratii und C. butyricum (n=88).....	182
Tab. 45: .Accession-Nummern der im Alignment von den tpi-Primer- /Sondensystemen (CDIF_tpi_fw/CDIF_tpi_re/CDIF_tpi_S) abgedeckten tpi-Sequenzen von C. difficile (grau), anderen Clostridium spp. und weiteren Spezies (n=163).....	184
Tab. 46: .Accession-Nummern der im Alignment von den plc-Primer- /Sondensystemen (Cp_plc_840-f/Cp_plc_889-r/Cp_plc_861_S2) abgedeckten plc-Sequenzen von C. perfringens anderen Clostridium spp. (n=455, Stand: Juli 2013, grau: bereits im Alignment vom Sept. 2001 enthaltene Sequenzen).....	186

Abkürzungsverzeichnis

AQU	Abteilung für Qualitätssicherung und Untersuchungswesen
AQU1c	Sachgebiet 1 (Analytik von Nährstoffen, Wirkstoffen und biologischen Systemen) Aufgabenbereich 1c (Mikro- und Molekularbiologie)
BHQ	Black Hole Quencher [®]
BioAbfV	Bioabfall-Verordnung
bp	Basenpaare
BPLS	Brilliantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose (-Agar)
cfu	colony forming units (dt.: KBE)
D-Wert	Dezimale Reduktionszeit, Zeit, die zur Reduktion um eine $10\log$ -Stufe erforderlich ist
FAM	Fluorescein
FFS	Flüchtige Fettsäuren
FI	Fermenterinhalt (engl.: fc)
FM	Frischmasse
FOS	Flüchtige organische Säuren
HA	Hauptanreicherung
HEX	Hexachlorfluorescein
IAC	Interne Amplifikationskontrolle (engl.: internal amplification control)
ILT	Institut für Landtechnik und Tierhaltung der LfL
<i>invA</i>	Gen der Untereinheit A des Invasionsproteins
KBE	Kolonie-bildende Einheiten (engl.: cfu, colony forming units)
KT	Keimträger
KT38	Keimträgerversuch in mesophilem Fermenter (38°C)
KT55/KT60	Keimträgerversuch in thermophilem Fermenter (55 bzw. 60°C)
LC-MS	Liquid chromatography – mass spectrometry
LfL	Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft
LN	Liter normiert
LNA	Locked nucleic acid (bases)
MALDI-TOF-MS	matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight – mass spectrometry
<i>mcrA/mrtA</i>	Gen der Untereinheit A des Schlüsselenzyms der Methanbildung
MG	Methangehalt [%]
MP	Methanproduktion [$LN_{CH_4} * kg_{OTS}^{-1}$]
MPN	most probable number; die wahrscheinlichste Anzahl
nt	Nukleotide

NTC, NK	No-template-control, Negativkontrolle (Wasser)
OD _{430/600}	Optische Dichte gemessen bei 430 nm bzw. 600 nm
<i>ompC</i>	Gen der Untereinheit C des äußeren Membranproteins (ein Porin)
oTS	organische Trockensubstanz
PCR	polymerase chain reaction; Polymerase-Kettenreaktion
pH (-Wert)	dekadischer Logarithmus der Konzentrationen der Oxonium-Ionen (Pufferfähigkeit)
PTaq	Platinum-Taq-Polymerase (Invitrogen TM Inc., USA)
PW+N	Peptonwasser mit Novobiocin (22 µg * mL ⁻¹)
qPCR	quantitative (Real-Time) PCR
RB _{org} (OLR)	organische Raumbelastung (organic loading rate) [kg _{oTS} * (m ³ * d) ⁻¹]
ROX	X-Rhodamin
RT	Reverse Transkription
RTqPCR	qPCR mit vorgeschalteter Reverser Transkription
RV	Rappaport-Vassiliadis (-Medium)
RV37	bei 37°C inkubierte Kultur in Rappaport-Vassiliadis Medium
RV42	bei 42°C inkubierte Kultur in Rappaport-Vassiliadis Medium
StMELF	Bayerisches Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten
sv.	Serovar
TAC	total anorganic carbon; Gehalt an Carbonatpuffer (Pufferkapazität)
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TS	Trockensubstanz
unv.	unverdünnt
VA	Voranreicherung
VBNC	Viable but non-culturable; lebensfähig aber nicht kultivierbar
XLD	Xylose-Lysin-Desoxycholat (-Agar)

1 Einleitung/ Stand des Wissens

In landwirtschaftlichen Substraten, Produkten und Reststoffen können Krankheitserreger enthalten sein und unter Umständen bei Pflanzen, Tier und Menschen Krankheiten auslösen. Wirtschaftsdünger aus tierischen Ausscheidungen wie Gülle, Mist oder Trockenkot können verschiedene bakterielle, virale und parasitäre Krankheitserreger enthalten (Strauch, 1996). Auch pflanzliche, landwirtschaftliche Erzeugnisse wie Silagen können kontaminiert sein. Von Belastungen mit *C. botulinum* wurde z.B. berichtet, wenn Kleintierkadaver versehentlich bei der Ernte in das Silo gelangten (Myllykoski et al., 2009). In Gärprodukten aus landwirtschaftlichen Biogasanlagen besteht ebenfalls die Möglichkeit Krankheitserreger anzutreffen, wenn kontaminiertes Substrat wie Gülle oder Silagen eingesetzt werden, die Wahrscheinlichkeit ist durch die hygienisierende Wirkung des Biogasprozesses allerdings teilweise stark verringert (Fröschle et al., 2015a, 2015b; Fröschle und Lebuhn, 2012; Messelhäuser et al., 2015).

Eine Verbreitung der Krankheitserreger mit landwirtschaftlichen Reststoffen in die Umwelt ist damit nicht auszuschließen, insbesondere, wenn durch außergewöhnliche Ereignisse Sicherheitssysteme außer Kraft treten oder wenn unsachgemäß praktiziert wird. Solche Fälle sind beispielsweise in der Vergangenheit durch Überflutungen oder durch technische Unfälle an Gülle- oder Gärbehältern aufgetreten (Anonymus, 2006; Sauer, 2012; Wittl, 2013).

Wenn Material mit einem gewissen Risikopotenzial in Verkehr gebracht wird, können Infektionsketten durch rechtzeitige Kontrollen unterbrochen werden. Teilweise sind solche Kontrollen gesetzlich verankert, wie z.B. im Pflanzenschutz zur Vermeidung der Verbreitung von Quarantäne-Schadorganismen oder in der Bioabfallverordnung (BioAbfV, 2013) bzw. auch in der Düngemittelverordnung (DüMV, 2012), nach denen bei geplantem Inverkehrbringen und Befall mit Salmonellen dies zumindest angezeigt werden muss.

Eine Reihe von Krankheitserregern, die in der landwirtschaftlichen Produktion auftreten können, sind nicht als Parameter in gesetzlichen Vorgaben aufgeführt. Darunter fallen z.B. Pathovaren von *Escherichia coli* (EHEC/STEC/VTEC/EPEC/EIEC u.a.), pathogene Clostridien, pathogene Kryptosporidien, *Campylobacter*-Arten, Vertreter der *Bacillus cereus*-Gruppe aber auch Viren wie z.B. *Norovirus* und *Enterovirus*. Durch die fehlende Reglementierung existiert keine einheitliche Nachweismethodik für dieselben Krankheitserreger zwischen verschiedenen Labors, so dass ein Vergleich von Ergebnissen häufig nicht möglich ist.

Weiterhin kann die Analytik sehr zeitraubend sein, besonders, wenn sie Kultivierungsschritte zum Nachweis lebens- und infektiösfähiger Krankheitserreger beinhaltet. Dieser teilweise sehr große Zeitaufwand, der für manche Parameter mehrere Wochen betragen kann, stellt für den Landwirt, Produzenten oder Lieferanten ein Hemmnis dar, das auch finanzielle Einbußen zur Folge haben kann – selbst wenn das Ergebnis schließlich negativ ausfällt, die untersuchten Krankheitserreger also nicht vorhanden waren.

Moderne molekularbiologische Verfahren wie die quantitative Real-Time PCR (qPCR) eröffnen die Möglichkeit, Proben schnell und hochspezifisch auf die Gegenwart bestimmter Organismen zu untersuchen. Die schnellste Anwendung, bei der eine qPCR nach DNA-Extraktion durchgeführt wird, nimmt in der Regel weniger als 6 h in Anspruch.

Die DNA des Krankheitserregers ist dabei das Zielmolekül, dessen Gegenwart pro g Frischprobe gemessen wird. Vor- und Nachteile der Methode sind:

- (-) Die Untersuchung von DNA lässt keinen Schluss auf die Lebensfähigkeit der untersuchten Organismen zu. Deshalb sollte bei positivem Ergebnis mit kultivierungsbasierten Verfahren nachuntersucht werden, um die Wachstums- bzw. Vermehrungsfähigkeit des Erregers zu verifizieren.
- (+) Es kann sehr schnell festgestellt werden, ob eine Probe frei von den untersuchten Krankheitserregern ist und damit freigegeben werden kann, oder ob sie als „verdächtig“ klassifiziert werden muss und Untersuchungen auf Lebensfähigkeit bzw. Infektiosität nachzuschalten sind.
- (+) Ist eine Probe frei vom untersuchten Erreger, können Arbeitszeit und Materialaufwand in beträchtlichem Umfang eingespart werden, da die meist sehr aufwändige konventionelle Analytik nicht mehr durchgeführt werden muss.
- (+) Es besteht bei dieser Anwendung die Möglichkeit, einen DNA-Extrakt mittels qPCR oder auch mittels Multiplex-qPCR auf viele verschiedene Erreger hin zu untersuchen. Dadurch wird weiter Analysezeit eingespart.
- (-) Für DNA-Extraktion und qPCR können nur relativ geringe Probenmengen eingesetzt werden, so dass die Detektionsgrenze entsprechend hoch ist. Deshalb sollte genau abgewogen werden, für welche Erreger die Methode sensitiv genug ist.
- (-) Es bestehen methodische Schwierigkeiten der DNA-Extraktion bei schwer zu extrahierender DNA, z.B. in Dauerformen wie bakteriellen Sporen oder Oozysten. Die Extraktionsmethode sollte deshalb auf den untersuchten Organismus abgestimmt werden.

Um die oben genannten Nachteile zu umgehen, wird häufig ein kultureller Anreicherungsschritt vor die qPCR-Analyse eingebaut. Diese Methode gibt direkt Aufschluss über die Lebensfähigkeit des Erregers, ermöglicht den Einsatz relativ großer Probenmengen und ist meist immer noch deutlich schneller als der konventionelle Kultivierungsablauf. Da die Anreicherung in der Regel selektiv wirkt, ist dieser Nachweis limitiert auf einen Erreger oder eine Erregergruppe mit ähnlichen Ansprüchen an das Kulturmedium.

Im Einzelfall sollte die Methode der Wahl speziell für den untersuchten Krankheitserreger ausgelegt und optimiert sein.

2 Zielstellung

Im Rahmen dieses Vorhabens sollten qPCR-basierte Schnellscreening-Systeme für relevante Pathogene in landwirtschaftlichen Substraten und in Proben aus Biogasanlagen entwickelt und getestet werden.

In Tab. 1 ist die Auswahl von in landwirtschaftlichen Substraten relevanten Pathogenen zusammengetragen, für die im vorliegenden Vorhaben analytische Systeme entwickelt, weiterentwickelt oder adaptiert/überprüft wurden. Tab. 1 gibt zudem die primär durch diese Krankheitserreger ausgelösten Krankheiten sowie deren Vorkommen an.

Tab. 1: Kandidaten für Schnellscreening-Nachweissysteme: in landwirtschaftlichen Substraten relevante Krankheitserreger

Krankheits- erreger	ausgelöste Krankheiten, u.a.	Vorkommen	Referenz
<i>Salmonella</i> spp.	Typhus/Paratyphus	Darmflora (auch) gesunder Menschen und Tiere	(RKI, 2009a)
STEC/EHEC/ EPEC	Hämorrhagische Colitis (HC), Hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS)	ubiquitär, auch in der Darmflora gesunder Menschen und Tiere, Hauptreservoir: asymptomatisch in Rindern	(Karch et al., 2015)
<i>Bacillus cereus</i> - Gruppe	Milzbrand (<i>B. anthracis</i>), Lebensmittelvergiftung	ubiquitär (z.B. Boden, Kot, Wasser, Fleisch, Reis und andere Lebensmittel)	(Hau- macher et al., 2012)
Pathogene Kryptosporidien	auch: Kälberdurchfall	Darmflora der Wiederkäuer, auch in anderen Tieren	(Robert- son, 2015)
<i>Clostridium</i> <i>perfringens</i>	Gasbrand	ubiquitär, auch in der Darmflora gesunder Menschen und Tiere	(RKI, 2011)
<i>Clostridium</i> <i>difficile</i>	Pseudomembranöse Colitis (PMC)	ubiquitär, z.B. im Boden; Darmtrakt von Tier und Mensch, überwiegend asymptomatisch; Krankenhauskeim	(RKI, 2009b)
<i>Clostridium</i> <i>botulinum</i>	Botulismus	ubiquitär, z.B. im Boden	(RKI, 2011)

Folgende Zielsetzungen sollten teils chronologisch, teils parallel für jeden einzelnen Zielorganismus zur Entwicklung einer Schnellscreening-Methode bearbeitet werden:

- 1) Recherche nach bereits in wissenschaftlichen Untersuchungen beschriebenen qPCR-Systemen zum Nachweis des Erregers
- 2) Überprüfung der qPCR-Systeme auf ihre Aktualität und Spezifität mittels bioinformatischer Routinen

- a) bei positiver Überprüfung: Einsatz (ggf. nach Optimierung des Assays) für das Schnellscreening
- b) bei negativer Überprüfung: Neuentwicklung von qPCR-Systemen zum spezifischen Nachweis; Suche nach geeigneten Genen und nach geeigneten Oligonukleotid-Sets zum spezifischen Nachweis der jeweiligen Krankheitserreger in qPCR-Anwendungen
- 3) *in vitro*-Überprüfung von Referenzkulturen mit den übernommenen oder konstruierten qPCR-Systemen
- 4) Optimierung der mikrobiologischen und molekularbiologischen Nachweismethoden (d.h. Kultivierungsmethodik und Nukleinsäure-Extraktion bzw. qPCR-Analytik) bzgl. der untersuchten Matrices. Hierzu zählten z.B. landwirtschaftliche Substrate wie Silagen, Gülle, Festmist, Gärgemische und -produkte aus landwirtschaftlichen Biogasanlagen und aus Technikums-Versuchsfermentern
- 5) Überprüfung der Möglichkeit des Einsatzes von Multiplex-qPCR-Anwendungen mit vielen Zielgenen für bestimmte Parameter, wenn die Analytik einzeln viel Zeit erfordert
- 6) Parallele Untersuchung von Proben von ausgewählten Biogasanlagen (u.a. Ebertseder et al., 2012; Kissel et al., 2015; Buschmann et al., 2015) und anderen Quellen mit der entwickelten qPCR-Analytik und der etablierten konventionellen, mikrobiologischen Nachweismethodik
- 7) Überprüfung der Möglichkeiten zur Integration der entwickelten qPCR-Analytik in den Ablauf der konventionellen, mikrobiologischen Nachweismethodik zur Einsparung von Kultivierungsschritten und damit von Analyse- und Arbeitszeit sowie von Materialkosten

Abb. 1 stellt die Grundidee hinter der Entwicklung der Schnellscreening Systeme schematisch dar.



Abb. 1: Ablaufschema und Zielstellung der Schnellscreening-Ansätze

3 *Salmonella* spp.

Die kultivierungsbasierte mikrobiologische und die molekularbiologische Analytik zum Nachweis von *Salmonella* spp. wurden im Projekt „Prozessbeschleunigung und Hygienisierung in Biogasanlagen durch Vorschaltung einer Hydrolysephase/-stufe“ (Förderung: Bayerisches Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten; K/08/07; Laufzeit: 2008 - 2011) entwickelt, etabliert und erfolgreich eingesetzt. Die Methodik ist im Detail im Abschlussbericht und in einer Veröffentlichung als LfL-Information dargestellt (Fröschele und Lebuhn, 2012; Marin Pérez et al., 2013). Im Folgenden wird ein Überblick über die etablierte mikro- und molekularbiologische Analytik gegeben und die Vorzüge und Schwächen als Schnellscreening-System diskutiert.

3.1 Mikrobiologische Analytik

Die Kultivierung von *Salmonella* spp. wurde angepasst nach der Methode der Bioabfallverordnung (BioAbfV, 2013) durchgeführt (Abb. 2). Ein detailliertes Durchführungsprotokoll ist in Anhang 13.1.3 gegeben.

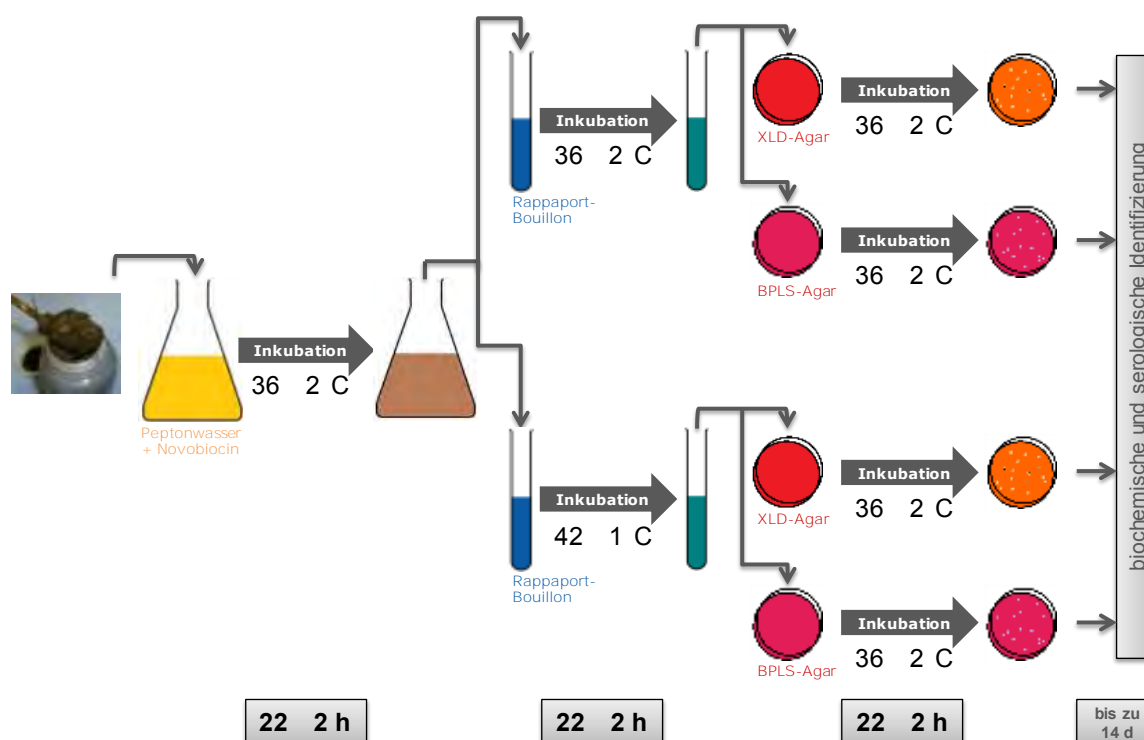


Abb. 2: Konventioneller Ansatz zur mikrobiologischen Kultivierung von *Salmonella* spp. (BioAbfV, 2013)

Die Methodik beinhaltet drei Kultivierungsschritte in unterschiedlichen Nähr-Lösungen (Medien) bzw. Nähr-Agar-Böden: zunächst erfolgt eine durch Zugabe des Antibiotikums Novobiocin ($22 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, vgl. Jensen, 2003) leicht selektive Voranreicherung (VA) der Salmonellen in Peptonwasser (PW+N). Es folgt eine selektive Hauptanreicherung (HA) in Anreicherungsbouillon nach Rappaport (RM) bei $36 \pm 2^\circ\text{C}$ und bei $42 \pm 1^\circ\text{C}$ und ein

Parallel-Ausstrich auf Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD-Agar) und einem weiteren Salmonella-Differenzial-Nährboden, der andere biochemische Eigenschaften als XLD-Agar nachweisen kann. In dieser Studie wurde Brillantgrün-Phenolrot-Saccharose-Agar (BPLS-Agar) gewählt, da dieser in der Fassung der Bioabfallverordnung im Jahr 2010 vorgeschlagen wurde. Gewachsene Keime müssen anschließend biochemisch oder serologisch als Salmonellen identifiziert werden. Die klassische Nachweisprozedur für Salmonellen dauert meist deutlich mehr als drei Tage und weist vor allem bei höheren Probenzahlen einen erheblichen Arbeitsaufwand auf (Abb. 2). An Stelle der in der Bioabfallverordnung vorgeschlagenen biochemischen oder serologischen Identifizierung wurde in dieser Studie das qPCR-Nachweisverfahren angewendet (s. 3.2).

3.2 Molekularbiologische Analytik

3.2.1 Bestehende Analytik aus vorangegangenen Projekten

Im Projekt „Prozessbeschleunigung und Hygienisierung in Biogasanlagen durch Vorschaltung einer Hydrolysephase/-stufe“ (K/08/07) wurden zwei qPCR-Nachweissysteme entwickelt und evaluiert, die spezifisch (Pathogenitätsfaktoren von) *Salmonella* spp. nachweisen: „SalInvA“ und „SalOmpC“ (Marín Pérez et al., 2013). Als Zielsequenzen wurden die Gene *invA* und *ompC* identifiziert, die beide folgende Kriterien erfüllten:

- chromosomal lokalisiert
- in nur einer Kopie im Genom vorliegend (engl. „single copy gene“)
- in allen Vertretern von *Salmonella* spp. vorhanden
- in Zusammenhang mit der Pathogenität stehend.

Das Gen *invA* codiert für ein Protein des Typ III-Sekretionssystems, das bei der Invasion in intestinale Epithel-Zellen benötigt wird (Galán et al., 1992; Galán und Collmer, 1999; Galán und Curtiss, 1991; Roblin et al., 2015). *InvA* gehört zu einer Genfamilie, die im chromosomalen Genom in einer transkriptionellen Einheit (*invABC*) lokalisiert ist. Es wurde gezeigt, dass Mutanten, die diese transkriptionelle Einheit nicht exprimieren können, die Fähigkeit zur Invasion in kultivierte Epithelzellen und damit zur Pathogenität verloren haben (Galán und Curtiss, 1991). Diese Autoren fanden, dass die transkriptionelle Einheit *invABC* in allen 91 untersuchten *Salmonella*-Stämmen vorhanden und zudem hoch konserviert war, da Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLPs) nur in Stämmen von *Salmonella arizonae* gefunden wurden. Sequenzen mit einer gewissen Ähnlichkeit zu *invA* existieren auch in anderen Gattungen, sie lassen sich aber analytisch leicht voneinander trennen (Tab. 2).

Das Gen *ompC* codiert für die Untereinheit C eines Proteins der äußeren Membran, ein Pathogenitäts-assoziiertes Porin (Chatfield et al., 1991). Im Vergleich zu *invA* ist die noch weitere Verbreitung von *ompC* in verschiedenen Organismen für die Gestaltung einer spezifischen Analytik nachteiliger. Es tragen auch andere Genera wie z.B. *Escherichia coli* und *Yersinia enterocolitica ompC* Gene (Brzostek et al., 1989; Kwang et al., 1996), jedoch können die Sequenzen von *ompC* spezifisch für *Salmonella* spp. von anderen *ompC*-Sequenzen abgegrenzt werden.

Beide Gene haben in PCR-basierten Anwendungen zur Detektion von *Salmonella* spp. weite Verbreitung gefunden (Alves et al., 2015; Amavisit et al., 2001; Gonzalez-Escalona et al., 2009; Kwang et al., 1996; Schrank et al., 2001). Mit den beiden im

vorangegangenen Projekt K/08/07 entwickelten Systemen lagen quantitative Real-Time PCR-Nachweissysteme bestehend aus Primer-Paaren und 5'-Hydrolysesonden vor, die im vorliegenden Projekt auf Aktualität überprüft und evaluiert wurden.

Die Ableitung von Primer- oder Sonden-Sequenzen zum spezifischen Nachweis von bestimmten Organismen oder Organismen-Gruppen erfolgte anhand von Sequenz-Einträgen, die in Datenbanken (z.B. Nukleotid-Datenbank des NCBI) hinterlegt sind. Diese wurden aligniert, und Bereiche zielspezifischer Signaturen wurden als potenzielle Primer- oder Sonden-Sequenzen identifiziert. In Tab. 2 ist der zum Zeitpunkt der Entwicklung herangezogene Sequenzdatensatz von *Salmonella* spp. und Außengruppen (Nicht-Ziel) -Organismen gelistet.

Tab. 2: Sequenz-Datensatz als Basis für die Entwicklung des *invA*-qPCR-Nachweissystems

Accession Nummer	Organismus	Stamm	Genlocus	ersetzt durch:
U43237	<i>Salmonella enterica</i>		<i>invA</i>	
M90846	<i>Salmonella typhimurium</i>		<i>invA</i>	
AE008832	<i>Salmonella typhimurium</i>	LT2	<i>invA</i>	AE006468
AL627276	<i>Salmonella enterica</i>	sv. Typhi	<i>invA</i>	
U43273	<i>Salmonella gallinarum</i>		<i>invA</i>	
U43238	<i>Salmonella enterica</i>		<i>invA</i>	
U43272	<i>Salmonella enterica</i>		<i>invA</i>	
U43271	<i>Salmonella enterica</i>		<i>invA</i>	
U43247	<i>Salmonella enterica</i>		<i>invA</i>	
U43248	<i>Salmonella enterica</i>		<i>invA</i>	
U43239	<i>Salmonella enterica</i>		<i>invA</i>	
U43246	<i>Salmonella enterica</i>		<i>invA</i>	
U43252	<i>Salmonella enterica</i>		<i>invA</i>	
U43251	<i>Salmonella enterica</i>		<i>invA</i>	
U43242	<i>Salmonella enterica</i>		<i>invA</i>	
U43243	<i>Salmonella enterica</i>		<i>invA</i>	
U43244	<i>Salmonella enterica</i>		<i>invA</i>	
U43250	<i>Salmonella enterica</i>		<i>invA</i>	
U43249	<i>Salmonella enterica</i>		<i>invA</i>	
U43245	<i>Salmonella enterica</i>		<i>invA</i>	
U43240	<i>Salmonella enterica</i>		<i>invA</i>	
U43241	<i>Salmonella enterica</i>		<i>invA</i>	
AF306649	<i>Sodalis glossinidius</i>	M1	<i>invA</i>	
AE005515	<i>Escherichia coli</i>	O157:H7 EDL933	Gen für ein Protein des Typ-III- Sekretionsapparats	AE005174
AP002563	<i>Escherichia coli</i>	O157:H7	Gen für ein Protein des Typ-III- Sekretionsapparats	BA000007
AY029126	<i>Escherichia coli</i>	isolate M520 EIEC	<i>mxiA</i>	
AY029116	<i>Escherichia coli</i>	isolate M1367 D10	<i>mxiA</i>	
AY029115	<i>Escherichia coli</i>	isolate M1372 D1	<i>mxiA</i>	
D50601	<i>Shigella sonnei</i>		homolog zu <i>mxiA</i> of <i>S. flexneri</i>	
M91664	<i>Shigella flexneri</i>		<i>mxiA</i>	
D10999	<i>Shigella flexneri</i>		<i>virH</i>	
AL391753	<i>Shigella flexneri</i>		<i>mxiA</i>	
AF348706	<i>Shigella flexneri</i>		<i>mxiA</i>	
AF369954	<i>Yersinia enterocolitica</i>	A127	<i>ysaV</i>	
AF005744	<i>Yersinia enterocolitica</i>		<i>ysaV</i>	

3.2.2 Durchführung: Überprüfung des *invA*-Alignments

Durch die fortschreitende Forschung wächst die Anzahl und Vielfalt der in den Datenbanken hinterlegten Sequenzdaten immer weiter an. Deshalb sollten bestehende Nukleinsäuresequenz-basierte Nachweissysteme in regelmäßigen Abständen auf ihre Aktualität und Spezifität hin überprüft werden. Im vorliegenden Projekt wurde das *invA*-qPCR-Nachweissystem „SalInvA“ auf Aktualität überprüft. Dazu wurde systematisch „geblastet“, d.h. die Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) wurde mit dem Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) durchsucht.

3.2.3 Ergebnisse und Diskussion: Überprüfung des *invA*-Alignments

Das Alignment wurde um Sequenzen mit Ähnlichkeit zu denen, die sich bereits im Alignment befanden (Tab. 2) erweitert (Tab. 34 in Anhang 13.1.3).

Das Primerpaar SalInvAFP – SalInvARPb erfasst zusammen mit der Sonde SalInvASb die *Salmonella-invA*-Sequenzen U43249, U43250, DQ644619, DQ644620, DQ644621 und DQ644622, während das Primerpaar SalInvAFP – SalInvARPa zusammen mit der Sonde SalInvASa die übrigen *Salmonella-invA*-Sequenzen in Tab. 2 und Tab. 34 (Anhang 13.1.3) erfasst. Die Nicht-*Salmonella*-Sequenzen mit Ähnlichkeit zur *invA*-Sequenz werden von keinem der beiden Primer-Sonden-Kombinationen erfasst. Das qPCR-Nachweissystem ist demnach auch nach der Erweiterung des Alignments als *in silico* spezifisch für *invA* von *Salmonella* spp. anzusehen.

3.3 Schnellscreening-Ansatz zum Nachweis von *Salmonella* spp.

3.3.1 Durchführung: Anpassungen der Analytik

Um ein Schnellscreening-Nachweissystem umzusetzen, wurde nur der erste Inkubationsschritt in gepuffertem Peptonwasser mit Novobiocin durchgeführt (schematisch in Abb. 3).

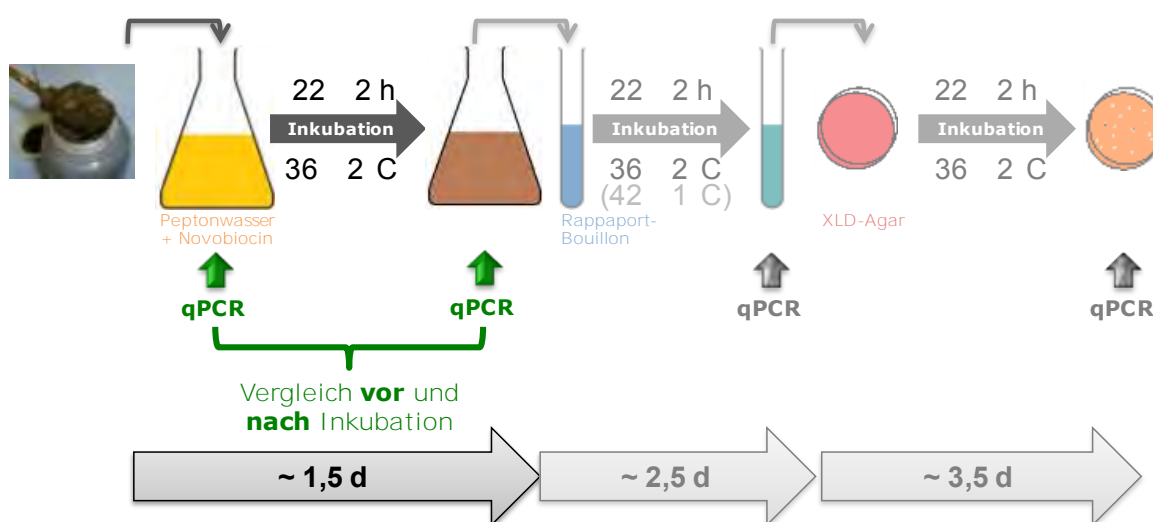


Abb. 3: Schnellscreening-Ansatz zum Nachweis von *Salmonella* spp.

Vor und nach Inkubation wurden qPCR-Analysen gemacht. Das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit lebensfähiger Salmonellen im Ansatz kann anhand des qPCR-Ergebnis-Vergleichs vor und nach Inkubation bestimmt werden (Tab. 3). Bei Unsicherheiten in den Ergebnissen kann die Inkubation weitergeführt werden und auch die Ergebnisse vor und nach Inkubation des Rappaport-Mediums können verglichen werden (in Abb. 3 blass dargestellt).

Tab. 3: Ausgangssituationen und korrespondierende qPCR-Ergebnisse

Fall	Ausgangssituation	Entwicklung während Inkubation	C _q -Wert (qPCR)
1	lebensfähige Salmonellen	Zunahme der Zellzahlen und damit der DNA-Konzentration	C _q (n.I.) < C _q (v.I.)
2a	tote bzw. inaktivierte Salmonellen	gleichbleibende Zellzahlen und damit DNA-Konzentration	C _q (n.I.) = C _q (v.I.)
2b	tote bzw. inaktivierte Salmonellen	durch Degradation rückläufige Zellzahlen und damit DNA-Konzentration	C _q (n.I.) > C _q (v.I.)

3.3.2 Ergebnisse und Diskussion: Anpassungen der Analytik

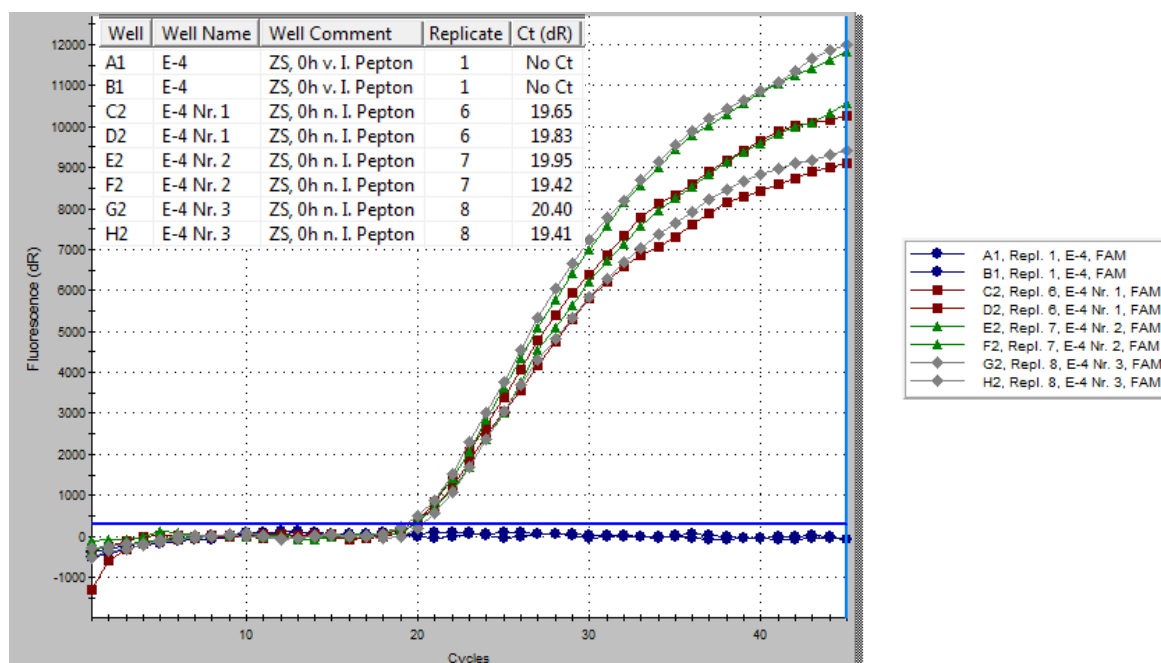


Abb. 4: Beispiel-Amplifikationsplot zu Fall 1: Vergleiche Rot-Grün-Grau (Replikate nach Inkubation „n.I.“) mit Blau: vor Inkubation („v.I.“)

Beispiele für die Fälle 1 und 2b (Tab. 3) sind in den Abbildungen Abb. 4 und Abb. 5 gezeigt. In Beispiel-Amplifikationsplot zu Fall 1 war die DNA lebensfähiger Salmonellen vor Inkubation („v.I.“) so gering konzentriert, dass sie im qPCR-Ansatz kein Signal mehr ergab, d.h. unter der Detektionsgrenze war (blaue Kurve, Abb. 4). Der C_q-Wert ist

dementsprechend größer als die im qPCR-Lauf durchgeführte Anzahl an Zyklen ($C_q > 45$). Nach Inkubation („n.I.“) wurden in allen Replikaten (3) in beiden qPCR-Wiederholungen ein vergleichbarer Anstieg der Fluoreszenz-Signale über den Threshold mit C_q -Werten um ca. 20 Zyklen gemessen (rote, grüne und graue Kurven, Abb. 4). C_q (n.I.) $<$ C_q (v.I.) trifft zu, d.h. es lagen lebensfähige Salmonellen vor und der Ansatz wird als *Salmonella*-positiv gewertet.

Im Beispiel-Amplifikationsplot zu Fall 2b lagen die C_q -Werte vor Inkubation bei ca. 38,5 Zyklen (blaue Kurve, Abb. 5), nach Inkubation dagegen bei höheren Werten oder unter der Detektionsgrenze ($C_q = \infty$). C_q (n.I.) $>$ C_q (v.I.) trifft zu, d.h. es lagen nur tote oder nicht vermehrungsfähige Zellen im Ansatz vor. Er wird somit als *Salmonella*-negativ eingestuft.

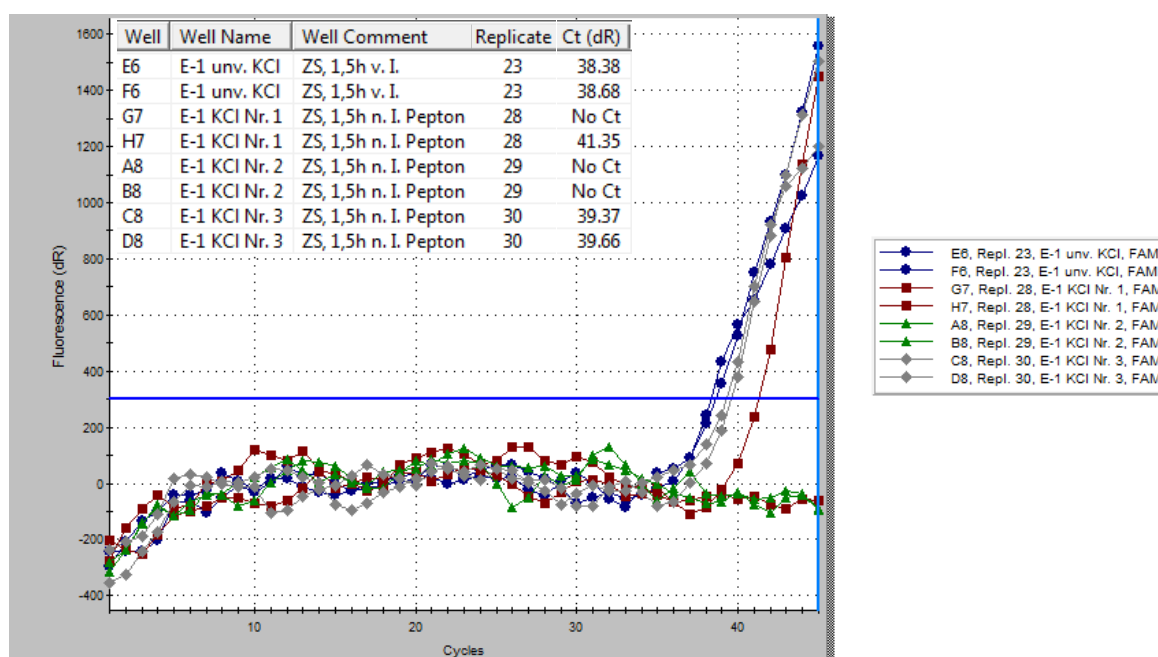


Abb. 5: Beispiel-Amplifikationsplot zu Fall 2b: Vergleiche Rot-Grün-Grau (Replikate nach Inkubation „n.I.“) mit Blau: vor Inkubation („v.I.“)

3.4 Keimträgerversuch KT55-181113 mit *Salmonella* Senftenberg W775 zum Test der Schnellscreening-Methode

3.4.1 Durchführung/Kurzbeschreibung: Keimträgerversuch

Mit dem Stamm *Salmonella enterica* ssp. *enterica* sv. Senftenberg W775 wurde ein Keimträgerversuch durchgeführt. Die Vorgehensweise hierzu kann im Abschlussbericht des Projekts „Prozessbeschleunigung und Hygienisierung in Biogasanlagen durch Vorschaltung einer Hydrolysephase/-stufe“ (K/08/07) und in der LfL-Information „Abtötung von Salmonellen im Biogasprozess“ im Detail nachgelesen werden (Fröschle und Leuhn, 2012; Marín Pérez et al., 2013).

In diesem Keimträgerversuch wurden ca. 10^7 MPN * mL⁻¹ Salmonellen vermischt mit Fermenterinhalt in einen Keimträger gefüllt und in einen bei 55°C betriebenen Labor-Biogasfermenter eingebracht. Zum Startzeitpunkt („0 h“) sowie nach 1,5 h und 4 h wurde der Keimträgerinhalt mit der in Kapitel 3.3 beschriebenen Methodik untersucht. Zur

Quantifizierung wurde die Peptonwasser-Anreicherung in log-Stufen verdünnt und 1 mL für die Überprüfung mittels qPCR vor Inkubation entnommen. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Unverdünnte bzw. 1:10 und 1:100 verdünnte Ansätze wurden weitere 2 Male in 0,85% KCl-Lösung gewaschen und anschließend in Ultra-Pure-Wasser (Milli-Q Plus Ultra-Pure Water System von Millipore™, USA) aufgenommen. Alle höheren Verdünnungen wurden ohne Waschschrift in steriles Ultra-Pure-Wasser aufgenommen. Die log-Verdünnungen wurden in Triplikate zu je 10 mL aufgeteilt und inkubiert (0 h: 10^{-4} bis 10^{-10} ; 1,5 h und 4 h: 10^0 bis 10^{-5}). Nach Inkubation wurde 1 mL jedes Replikats jeder Verdünnung für die qPCR aufbereitet, wie oben beschrieben. Die Entscheidung, ob Replikate als *Salmonella*-positiv oder *Salmonella*-negativ gewertet wurden, wurde durch qPCR-Ergebnis-Vergleich vor und nach Inkubation der Peptonwasser-Anreicherung getroffen. Zur quantitativen Auswertung wurde MPN-Statistik herangezogen. Zum Überprüfung der Schnellscreening-Ergebnisse wurde der Kultivierungsablauf bis zum Ausstrich auf XLD-Agar fortgeführt (vgl. Abb. 3). Präsumtive *Salmonella*-Kolonien wurden stichprobenartig mittels *invA*-qPCR überprüft.

3.4.2 Ergebnisse und Diskussion: Keimträgerversuch

Im Verlauf der Kultivierung kann anhand einer Auswertung nach Augenschein (trüb/klar bzw. Kolonie-Wachstum/ kein Kolonie-Wachstum) nach Inkubation der Peptonwasser-Voranreicherung (PW) noch nicht entschieden werden, ob der Ansatz negativ für *Salmonella* ist, da das zugegebene Gärgemisch besonders in niedrigen Verdünnungsstufen eine „Schein“-Trübung verursachen kann (Abb. 6; +*). Erst in weiteren Kultivierungsschritten wird in solchen Fällen eindeutig, wenn kein Wachstum/ keine Trübung auftritt. Mittels des Vergleichs der C_q -Werte vor und nach Inkubation können schon nach der PW-Voranreicherung Ergebnisse erzielt werden. Die Auswertungen der XLD-Platten und der C_q -Werte-Vergleich vor und nach Inkubation führten zu identischen Ergebnissen (Tab. 4 und. Abb. 7).

Verdünnungsstufe	0h PW	0h RB	0h XLD	Verdünnungsstufe	1,4/4 h PW	1,5/4 h RB	1,5/4 h XLD										
10^{-4}	+	+	+	+	+	+	+	10^0	+	+	+	-	-	-	-	-	-
10^{-5}	+	+	+	+	+	+	+	10^{-1}	+	+	+	-	-	-	-	-	-
10^{-6}	+	+	+	+	+	+	+	10^{-2}	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-7}	+	-	+	+	-	+	+	10^{-3}	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	-	-	-	-	-	-	-	10^{-4}	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	-	-	-	-	-	-	-	10^{-5}	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-10}	-	-	-	-	-	-	-										

PW Peptonwasser-Voranreicherung; **RB** Rappaport-Hauptanreicherung; **XLD** Ausstrich auf XLD-Agar; **+** Trübung/ Kolonie-Wachstum; **-** keine Trübung/ kein Wachstum; **+*** erscheint trüb, Trübung kann aber auch vom zugegebenen Gärgemisch hervorgerufen worden sein

Abb. 6: Auswertung nach Augenschein: Peptonwasser-Voranreicherung, Rappaport-Hauptanreicherung und XLD-Platten

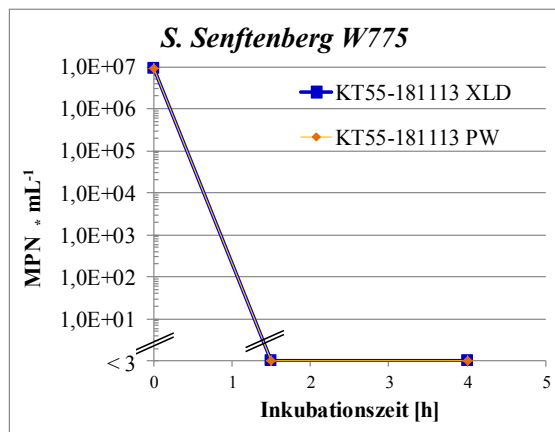


Abb. 7: Entwicklung der Keimzahlen von *S. Senftenberg* im Verlauf der Expositionszeit

Tab. 4: Auswertung des Keimträgerversuchs KT55-181113 *S. Senftenberg* W775 mittels qPCR-Ergebnisvergleich vor und nach Inkubation

Ansatz	Verdünnung und Replik	qPCR-Wertung				C _q				qPCR-Vergleich v.L. vs. n.L.	Auswertung	Anzahl positiv	MPN-Index	MPN * mL ⁻¹
		v.L.		n.L.		v.L.		n.L.						
		qPCR- Repl. 1	qPCR- Repl. 2	qPCR- Repl. 1	qPCR- Repl. 2	qPCR- Repl. 1	qPCR- Repl. 2	qPCR- Repl. 1	qPCR- Repl. 2					
0 h PW	10 ⁻⁴ Nr. 1			pos.	pos.			19,65	19,83	C _q (n.L.) < C _q (v.L.)	pos.	3	320	9,3 * 10 ⁶
	10 ⁻⁴ Nr. 2	neg.	neg.	pos.	pos.	> 45	> 45	19,95	19,42	C _q (n.L.) < C _q (v.L.)	pos.			
	10 ⁻⁴ Nr. 3			pos.	pos.			20,4	19,41	C _q (n.L.) < C _q (v.L.)	pos.			
	10 ⁻⁵ Nr. 1			pos.	pos.			19,25	19,28	C _q (n.L.) < C _q (v.L.)	pos.	3		
	10 ⁻⁵ Nr. 2	neg.	neg.	pos.	pos.	> 45	> 45	19,99	19,51	C _q (n.L.) < C _q (v.L.)	pos.			
	10 ⁻⁵ Nr. 3			pos.	pos.			20,03	19,4	C _q (n.L.) < C _q (v.L.)	pos.			
	10 ⁻⁶ Nr. 1			pos.	pos.			19,7	19,5	C _q (n.L.) < C _q (v.L.)	pos.	3		
	10 ⁻⁶ Nr. 2	neg.	neg.	pos.	pos.	> 45	> 45	19,98	19,44	C _q (n.L.) < C _q (v.L.)	pos.			
	10 ⁻⁶ Nr. 3			pos.	pos.			19,25	19,49	C _q (n.L.) < C _q (v.L.)	pos.			
	10 ⁻⁷ Nr. 1			pos.	pos.			19,9	19,53	C _q (n.L.) < C _q (v.L.)	pos.	2		
	10 ⁻⁷ Nr. 2	neg.	neg.	neg.	neg.	> 45	> 45	> 45	> 45	C _q (n.L.) = C _q (v.L.)	neg.			
	10 ⁻⁷ Nr. 3			pos.	pos.			20,22	19,56	C _q (n.L.) < C _q (v.L.)	pos.			
10 ⁻⁸ Nr. 1			neg.	neg.			> 45	> 45	C _q (n.L.) = C _q (v.L.)	neg.	0			
10 ⁻⁸ Nr. 2	neg.	neg.	neg.	neg.	> 45	> 45	> 45	> 45	C _q (n.L.) = C _q (v.L.)	neg.				
10 ⁻⁸ Nr. 3			neg.	neg.			> 45	> 45	C _q (n.L.) = C _q (v.L.)	neg.				
1,5 h PW	unv. Nr. 1			neg.	neg.			> 45	> 45	C _q (n.L.) = C _q (v.L.)	neg.	0	000	< 3
	unv. Nr. 2	neg.	neg.	neg.	neg.	> 45	> 45	> 45	> 45	C _q (n.L.) = C _q (v.L.)	neg.			
	unv. Nr. 3			neg.	neg.			> 45	> 45	C _q (n.L.) = C _q (v.L.)	neg.			
	10 ⁻¹ Nr. 1			pos.	neg.			41,35	> 45	C _q (n.L.) > C _q (v.L.)	neg.	0		
	10 ⁻¹ Nr. 2	pos	pos	neg.	neg.	38,38	38,68	> 45	> 45	C _q (n.L.) > C _q (v.L.)	neg.			
10 ⁻¹ Nr. 3			pos.	pos.			39,37	39,66	C _q (n.L.) > C _q (v.L.)	neg.				
4 h PW	unv. Nr. 1			neg.	neg.			> 45	> 45	C _q (n.L.) = C _q (v.L.)	neg.	0	000	< 3
	unv. Nr. 2	neg.	neg.	neg.	neg.	> 45	> 45	> 45	> 45	C _q (n.L.) = C _q (v.L.)	neg.			
	unv. Nr. 3			neg.	neg.			> 45	> 45	C _q (n.L.) = C _q (v.L.)	neg.			
	10 ⁻¹ Nr. 1			neg.	neg.			> 45	> 45	C _q (n.L.) = C _q (v.L.)	neg.	0		
	10 ⁻¹ Nr. 2	neg.	neg.	neg.	neg.	> 45	> 45	> 45	> 45	C _q (n.L.) = C _q (v.L.)	neg.			
10 ⁻¹ Nr. 3			neg.	neg.			39,35	> 45	C _q (n.L.) = C _q (v.L.)	neg.				

MPN Most Probable Number, wahrscheinlichste Anzahl; **neg.** negativ; **n.L.** nach Inkubation; **pos.** positiv; **Repl.** Replik; **unv.** unverdünnt; **v.L.** vor Inkubation; **PW** Peptonwasser-Voranreicherung, > 45 C_q-Wert > 45 Zyklen bei einem Threshold von 300
Anmerkung: C_q-Werte > 36 können auf unspezifischen Signalen beruhen (siehe Marín-Pérez et al., 2013)

In Tab. 4 sind jeweils die qPCR-Ergebnisse vor und nach Inkubation gegenüber gestellt. Die Auswertung erfolgte anhand der Kriterien in Tab. 3. Aus der Anzahl der positiv/negativ-Einstufungen wurde eine MPN-Indexzahl abgeleitet, anhand der über MPN-Tabellen die wahrscheinlichste Konzentration von *S. Senftenberg* im Keimträgerinhalt bestimmt wurde. Die korrespondierenden qPCR-Signale des Triplikats der Verdünnung 10^{-4} des 0 h-Ansatzes (Tab. 4) ist auch Abb. 4 gezeigt und die des Triplikats der Verdünnung 10^{-1} des 1,5 h-Ansatzes in Abb. 5.

Die im 1,5 h-Ansatz gemessenen C_q -Werte sind auf Grund relativ geringer nachzuweisender DNA-Konzentrationen relativ hoch. Die Entscheidung über die Vergleichsmethode stimmt zwar mit dem aus der weiteren Kultivierung erhaltenen Ergebnis überein, da aber beim *invA*-Nachweissystem „SalInvA“ C_q -Werte > 36 auf unspezifischen Signalen beruhen können (Marín Pérez et al., 2013), kann die Auswertung des 1,5 h-Ansatzes mit der qPCR-Ergebnis-Vergleich vor und nach Inkubation nur bedingt belegen, dass diese Methode für das *invA*-qPCR System funktioniert. Da jedoch ein vergleichbarer Ansatz mittels *ehly*-qPCR zum Nachweis lebensfähiger EPEC-Bakterien erfolgreich eingesetzt wurde (siehe 4.3.2), konnte davon ausgegangen werden, dass die Methode auch beim *invA*-Nachweis von Salmonellen funktioniert. Weitere Versuche sollten dies belegen.

Generell ist ein qPCR-Nachweis aus niedrigen Verdünnungsstufen in der Anreicherung dadurch mit Problemen verbunden, dass Hemmstoffe in inhibierender Konzentration über das Gärgemisch eingebracht werden oder u.U auch in den Medien zur Kultivierung vorhanden sind. Es sollte deshalb auf die Verdünnungsstufen 10^{-1} der Kultivierung zurückgegriffen werden und auch im qPCR-Lauf neben unverdünnten auch mit mindestens 1:10-verdünnten Zellsuspensionen gearbeitet werden. Durch das Arbeiten mit Verdünnungen wird allerdings die Methoden-Detektionsgrenze angehoben und es besteht die Gefahr, niedrige Ziel-DNA-Konzentrationen nicht mehr wahrzunehmen.

Das Problem geringer Ziel-DNA-Konzentrationen tritt allerdings nicht auf, wenn die DNA von lebensfähigen Zellen stammt und in einem Anreicherungsschritt vermehrt wurde. Dann liegen die C_q -Werte i.d.R. beim *invA*-qPCR-Nachweissystem für Salmonellen bei ca. Zyklus 20 (vgl. Tab. 4, 0h-Ansatz, 10^{-4} bis 10^{-7}). Die Quantifizierung (Bestimmung der Konzentration in der Originalprobe) muss dann allerdings mit einer anderen Methode, z.B. über einen MPN-Ansatz, erfolgen.

3.5 Test eines Kits zur DNA-Extraktion aus großen Probenvolumina

Mikrobiologische Analysen in umweltrechtlichen Verordnungen (u.a. BioAbfV, 2013; DüMV, 2012) schreiben zum Ausschluss der Anwesenheit bestimmter Indikatorkeime wie z.B. Salmonellen die Analyse großer Probenvolumina vor (25 - 50 g). Kurzweiligere molekularbiologische Herangehensweisen dagegen befassen sich nicht zuletzt auf Grund der hohen Materialkosten mit sehr kleinen Probevolumina (z.B. Einsatz von 5 μ L Ziel-DNA in eine einzelne qPCR-Reaktion).

Sollen mikrobiologische Analysen großer Probenvolumina im Zuge eines Schnellscreening-Ansatzes komplett durch molekularbiologische Analysevarianten ersetzt werden, muss deshalb eine Möglichkeit gefunden werden große Probevolumina so aufzubereiten, dass sie mit angemessenem Materialaufwand für molekularbiologische Methoden wie die qPCR einsetzbar sind.

Eine mögliche Lösung hierfür ist der Einsatz von Nukleinsäure-Extraktionskits für große Probenvolumina. Eine vor eine (q)PCR vorgeschaltete DNA Extraktion hat daneben den Vorteil, das Problem des Einbringens inhibierender Stoffe in den PCR- oder qPCR-Nachweis zu minimieren

Die meisten Nukleinsäure-Extraktionskits erlauben allerdings nur den Einsatz geringer Probemengen (meist < 1 g), da es bei Einsatz größerer als der empfohlenen Probenvolumina wegen einer Koelution von Störstoffen häufig zur Inhibition der Polymerasekettenreaktion kommt. Da der FastDNA[®] 50 mL SPIN Kit for Soil laut Hersteller den Einsatz großer Probenvolumina gestattet, sollte die DNA-Extraktionseffizienz der folgenden kommerziell erhältlichen Kits miteinander verglichen werden:

1. FastDNA[™] SPIN Kit for Soil, der für kleine Probenvolumina routinemäßig in den molekularbiologischen Analysen von AQU1c eingesetzt wird, und
2. FastDNA[®] 50 mL SPIN Kit for Soil, der die gleiche Technologie aber umgesetzt für große Probenvolumina (25 g) benutzt.

3.5.1 Erstellung einer Wachstumskurve zur Herstellung einer Zellsuspension mit bekannter Konzentration und Durchführung der DNA-Extraktionen

Zur Beurteilung der DNA-Extraktionseffizienz der zwei verschiedenen Kits wurde zunächst eine Zellsuspension von *Salmonella enterica* ssp. *enterica* sv. Senftenberg W775 mit einer bekannten Konzentration als Probenmaterial für die DNA-Extraktion hergestellt. Zunächst wurde eine Wachstumskurve mit diesem Stamm aufgenommen. Zur Herstellung der Übernachtskultur wurde eine Kolonie *S. Senftenberg* von einer LB-Agarplatte gepickt, in 100 mL LB-Medium überführt und bei 37°C im Schüttelinkubator bei einer Frequenz von 100 min⁻¹ inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1 mL der Übernachtskultur zu 100 mL frischem LB-Medium gegeben und bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. In Abständen von einer halben Stunde wurde die Absorption bei den Wellenlängen 600 nm und 430 nm gemessen (Abb. 8). Aus der Aufnahme der Wachstumskurve ergab sich eine minimale Verdoppelungszeit von *S. Senftenberg* von 24 min.

Zur Herstellung der Zellsuspension mit bekannter Konzentration wurde wie zuvor 1 mL einer Übernachtskultur von *S. Senftenberg* in 100 mL frisches LB-Medium überführt und für zwei Stunden bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Von der 2-Stunden-Kultur wurde ohne Verzug eine Verdünnungsreihe von 10⁰ - 10⁻⁹ hergestellt. Für die 10⁻¹ Verdünnung wurden 100 µL der 10⁰ Verdünnung in 900 µL LB-Medium pipettiert und gut durchmischt. Für die restlichen Verdünnungen wurde analog verfahren. Für jede Verdünnung (10⁻⁴ - 10⁻⁹) wurden Duplikate von 100 µL auf LB-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C im Brutschrank bis zum nächsten Tag inkubiert. Von der Zellsuspension (2-Stunden-Kultur) wurden 8 mal 1600 µL Kultur abzentrifugiert und das Pellet wurde in ein Gesamtvolumen von 400 µL mit MQ-Wasser resuspendiert. Somit erfolgte eine Aufkonzentration um den Faktor 4. Diese Aliquote wurden 5 min bei 95°C im Heizblock inaktiviert und eingefroren. Das Auszählen der Agarplatten lieferte für die Ausgangskonzentration (10⁰) der Salmonellenkultur einen Wert von 6,0 * 10⁷ KBE * mL⁻¹, dies entspricht einer Konzentration von 2,4 * 10⁸ KBE * mL⁻¹ in den aufkonzentrierten und inaktivierten Rückstellproben.

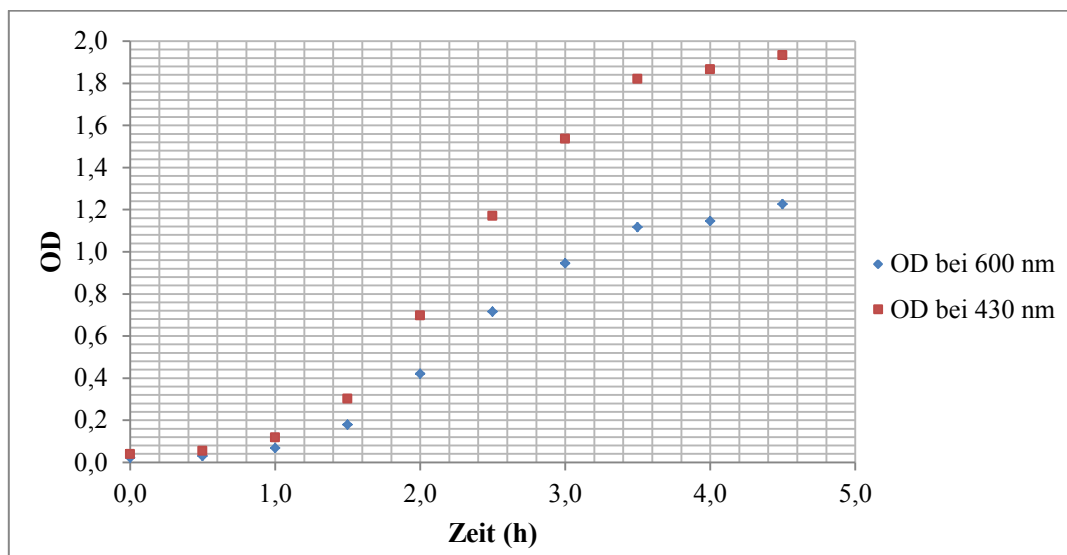


Abb. 8: Wachstumskurve von *Salmonella enterica ssp. enterica sv. Senftenberg W775*

3.5.2 Vergleich der Extraktionskits mit *invA*-qPCR

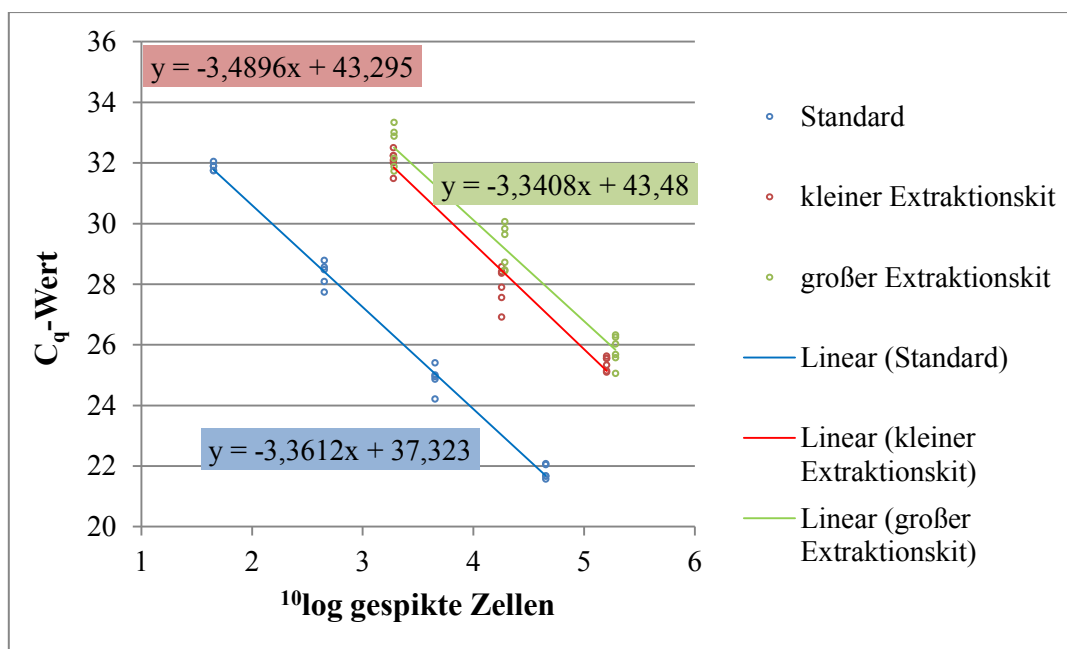


Abb. 9: Ergebnisse der *invA*-qPCR-Ansätze zur Bestimmung der DNA-Extraktionseffizienz zweier Kits, dargestellt sind die C_q-Werte in Abhängigkeit der dotierten Salmonellen-DNA

Für die DNA-Extraktion mit dem Extraktionskit für kleine Probenvolumina wurden 40 µL der mit der aufkonzentrierten Zellsuspension der Salmonellenkultur gespickten Fermenterprobe verwendet. Insgesamt wurden acht Fermenterproben (500 µL) mit Zellsuspension von *S. Senftenberg* gespickt. Das Spiking erfolgte an jeweils zwei Fermenterproben mit jeweils 100 µL, 10 µL und 1 µL Salmonellenzellsuspension. Daneben wurden zwei ungespickte Fermenterproben als Negativkontrollen geführt. Der Versuchsablauf zur DNA-Isolierung ist im Protokoll im Anhang unter 13.2.1 wiedergegeben.

Für die DNA-Extraktion mit großen Probenvolumina wurden vier Fermenterproben (10 g) mit Zellsuspension von *S. Senftenberg* gespickt. Das Spiking erfolgte mit jeweils 1000 µL, 100 µL und 10 µL Salmonellenzellsuspension. Es wurde ebenfalls eine ungespickte Fermenterprobe als Negativkontrolle mitgeführt. Bei der Extraktion wurde nach dem Protokoll im Anhang unter 13.2.2 vorgegangen.

Die DNA-Extrakte der beiden Kits wurden mittels *Salmonella*-spezifischer *invA*-qPCR (s. Abschnitt 3.2) vermessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 9 dargestellt. Je niedriger der C_q -Wert der verglichenen Varianten ist, desto höher ist die Konzentration der Ziel-DNA im Extrakt und umso besser die Wiederfindungsrate.

Die Extraktionseffizienz des FastDNA™ SPIN Kit for Soil für kleine Probenvolumina betrug im vorliegenden Experiment 29%, wohingegen die Extraktionseffizienz des FastDNA® 50 mL SPIN Kit for Soil für große Probenvolumina nur bei 8% lag.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Extraktion mit dem FastDNA™ SPIN Kit for Soil mit einer besseren Extraktionseffizienz verlief als mit dem FastDNA® 50 mL SPIN Kit for Soil, allerdings im vorliegenden Versuch mit einer ungewöhnlich niedrigen Wiederfindungsrate (vgl. Lebuhn et al., 2016).

Bei der Extraktion mit dem FastDNA® 50 mL SPIN Kit for Soil traten wiederholt Undichtigkeiten der Reaktionsgefäße bei den einzelnen Reaktionsschritten auf, was sicher zum schlechteren Extraktionsergebnis beigetragen hatte. Je besser die Wiederfindungsrate ist, desto höher ist auch die Konzentration der Ziel-DNA in einem PCR-Ansatz. Da bei geringen Ziel-DNA-Konzentrationen die Wahrscheinlichkeit sinkt, ein Molekül zu erfassen, steigt die Fehlerrate (falsch negative Nachweise) besonders im Niedrigkonzentrationsbereich an (Lebuhn et al., 2004). Weiterhin treten vermehrt falsch negative Nachweise auf, wenn PCR-Inhibitoren mitextrahiert werden, was aber in der vorliegenden Untersuchung über „Dilution-PCR“ (Verdünnungsansätze) für beide Varianten ausgeschlossen werden konnte. Die Maximierung der Extraktionseffizienz bei gleichzeitiger Minimierung coeluerter PCR-Inhibitoren ist eine entscheidende Voraussetzung für einen optimalen (q)PCR-Assay (Lebuhn et al., 2016). Aufgrund der schlechten Extraktionseffizienz und der benutzerunfreundlichen Handhabung kann das FastDNA® 50 mL SPIN Kit for Soil nicht für die Extraktion aus großen Probenvolumina empfohlen werden. Für den Umgang mit Krankheitserregern ist es bei den beobachteten Undichtigkeiten völlig ungeeignet.

Für die Entwicklung von Schnellscreening-Nachweissystemen kann daher weiterhin auf mikrobiologische Methoden mit Kultivierung bzw. Vermehrung der Zielorganismen nicht verzichtet werden, auch weil sie die Analyse von großen Probenvolumina in kulturellen Anreicherungs-schritten ermöglichen. Allerdings erlaubt eine Kombination von z.T. abgekürzten mikrobiologischen Verfahren mit schnellen molekularbiologischen Nachweissystemen (vgl. Kapitel 3.3) eine deutlich verkürzte Nachweiszeit im Vergleich zu rein mikrobiologischen Nachweismethoden.

Zur Identifizierung von Krankheitserregern (nicht nur von Salmonellen) werden neuerdings auch MALDI-TOF-MS, LC-MS sowie Genom- oder Metagenomsequenzierungen (MGS) eingesetzt (Bell et al., 2016). Allerdings ist die erforderliche Ausrüstung sehr teuer, und es müssen außer für den bioinformatisch sehr anspruchsvollen MGS-Ansatz auch Reinkulturen vorliegen. Für eine Quantifizierung eignen sich diese Methoden nicht oder nur sehr bedingt. Auch deswegen sind die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Methoden für die genannten Zielsetzungen (s. Kapitel 2) aktuell zu bevorzugen.

4 STEC/EHEC/EPEC

Escherichia coli ist eine äußerst heterogene Bakterien-Species. Viele *E. coli*-Stämme besiedeln den Darm von Mensch und Tier und liefern dem Körper wichtige Stoffwechselprodukte. Verschiedene *E. coli*-Stämme können allerdings auch für den Menschen gefährlich werden, wobei das Spektrum der Erkrankungen von einer harmlosen Reisediarrhöe bis zu lebensgefährlichen Krankheitsbildern wie dem hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) reicht. Je nach Ausstattung der Stämme mit Pathogenitätsfaktoren, z.B. zur Toxinbildung oder zur Virulenz, wurden Subtypen beschrieben wie z.B. enterotoxische *E. coli* (ETEC), enteropathogene *E. coli* (EPEC), enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC) und diffus adhärente *E. coli* (DAEC). Weitere, detailliertere Information hierzu findet sich bei Fröschle et al. (2015b, 2015c). Typischerweise sind die entsprechenden Pathogenitätsfaktoren bzw. deren Gene das Ziel der spezifischen ausgelegten molekularbiologischen Analytik.

Die im vorliegenden Vorhaben eingesetzten kultivierungsbasierten mikrobiologischen Methoden sowie die molekularbiologische Analytik wurden teilweise von entsprechenden Methoden des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) abgeleitet. Die hier vorgestellten Methoden kamen im Verbund-Projekt „Verhalten von EHEC und krankheitserregenden Clostridien in Biogasanlagen“ (N/11/30; Fröschle et al., 2015c) zur Anwendung.

4.1 Mikrobiologische Analytik

Die Kultivierung von EHEC/EPEC wurde in Anlehnung an die Methode in der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB: BVL L 07.18-1:2002-05 durchgeführt (Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren, 2002). Eine Übersicht über den Kultivierungsablauf ist in Abb. 10 gezeigt. Ein detailliertes Durchführungsprotokoll ist in Anhang 13.1.2 enthalten.

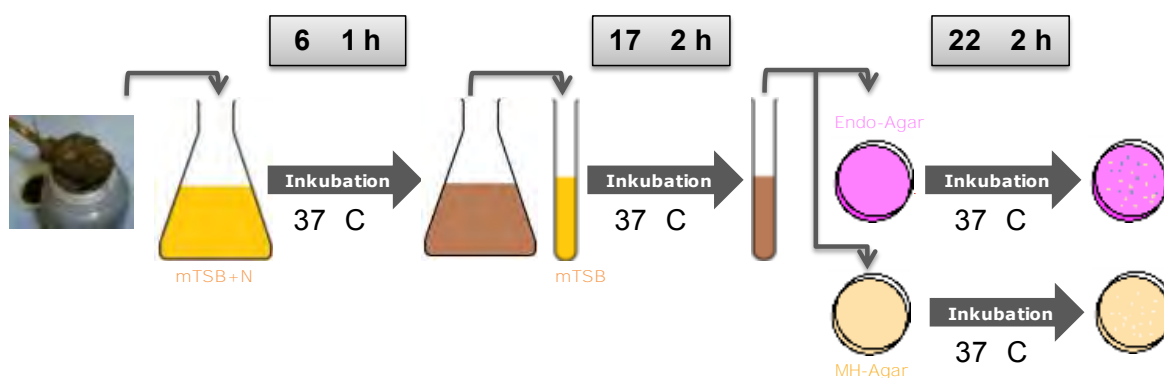


Abb. 10: Schema des mikrobiologischen Kultivierungsablaufs zum Nachweis von EHEC/EPEC (in Anlehnung an: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB: BVL L 07.18-1:2002-05)

Der konventionelle mikrobiologische Kultivierungsablauf zum Nachweis von EHEC/EPEC beinhaltet drei Schritte (Abb. 10). Zunächst erfolgt eine Voranreicherung in modifizierter Tryptose-Soja-Bouillon (mTSB) mit dem Antibiotikum Novobiocin (20 µg *

mL⁻¹; „mTSB+N“). Es folgt eine Anreicherung in mTSB ohne Zusatz von Novobiocin und im Anschluss ein Parallel-Ausstrich auf kommerziell erhältlichen Nährböden (Endo-Agar und Müller-Hinton (MH)-Agar).

Endo-Agar ist ein selektiver Nährboden zur Isolation von *Escherichia coli* und coliformen Bakterien. *E. coli* wächst auf diesem Nährboden tiefrot mit grünem, metallischem Glanz (Abb. 11). Auf MH-Agar sind die Kolonien durchsichtig bis elfenbeinfarben und glänzend.

Die Durchführung des gesamten Kultivierungsablaufes bis zu einem abschließenden Ergebnis (qPCR der Zellsuspensionen von Agar-Platten, siehe auch Kapitel 4.2) dauerte etwa 2,5 bis 3 d.

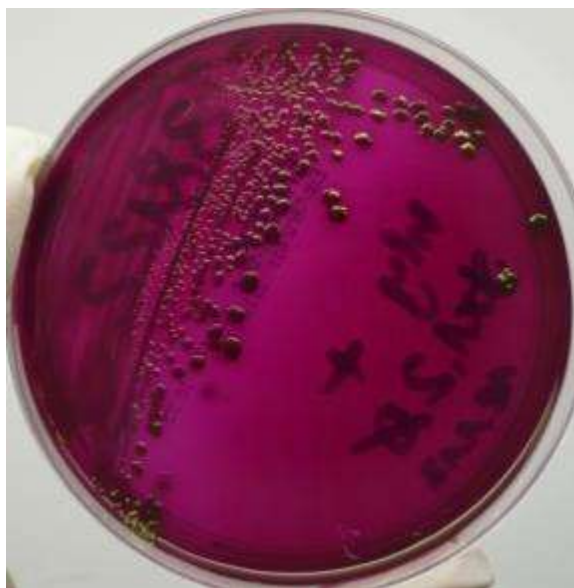


Abb. 11: *E. coli* (EPEC LGL 38122) auf Endo-Agar

4.2 Molekularbiologische Analytik

Die molekularbiologischen qPCR-Analysen wurden mittels eines Mx3005P-real-time-PCR-Cyclers (Agilent Technologies, USA) durchgeführt.

Um die Erregergruppe EHEC/EPEC molekularbiologisch nachzuweisen, wurden zwei verschiedene Real-time PCR-Systeme eingesetzt (Tab. 5):

I) Ein publiziertes Multiplex-qPCR-System (Pavlovic et al., 2010) wurde für den simultanen Nachweis der Gene für die Shigatoxine 1 (*stx1*) und 2 (*stx2*), des Intimins (*eae*) und der *E. coli*- und *Shigella* spp.-spezifischen β -Glucuronidase (*uidA*) im Rahmen von Screening-Untersuchungen nach mikrobiologischer Anreicherung getestet, angepasst und angewendet.

II) Zum Nachweis von EHEC bzw. EPEC-Stämmen, die das Enterohämolysin-Gen besitzen (z.B. der für Keimträgerversuche eingesetzte EPEC-Stamm LGL 38122, siehe auch: Abschlussbericht des Verbund-Projekts „Verhalten von EHEC und krankheitserregenden Clostridien in Biogasanlagen“, N/11/30; Fröschle et al., 2015c) wurde ein Singleplex-qPCR-System für das Enterohämolysin-Gen (*ehly*) neu entwickelt, evaluiert und angewendet.

4.2.1 Durchführung: Herangehensweise zur Überprüfung und Testung der qPCR-Nachweissysteme für *stx1*, *stx2*, *eae* und *uidA*

Zunächst wurden alle im NCBI zu diesem Zeitpunkt hinterlegten Sequenzdatensätze des jeweiligen Gens aligniert. Die Primer- bzw. Sonden-Oligonukleotide zum Nachweis der Gene für die Shigatoxine 1 (*stx1*) und 2 (*stx2*), des Intimins (*eae*) und der *E. coli*- und *Shigella* spp.-spezifischen β -Glucuronidase (*uidA*) (Pavlovic et al., 2010) wurden mit den alignierten Sequenzen abgeglichen. Die Sequenzen wurden mit der Formel

$$T_m = 69,3 + (0,41 \times GC - \text{Gehalt}) - \frac{650}{\text{Anzahl der Nukleotide}}$$

auf adäquate Schmelztemperaturen (T_m ; Tab. 5) und mit Hilfe der Online-Anwendung „Oligo-Analyzer 3.1“ (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) auf die Möglichkeit zur Bildung von Sekundärstrukturen (Eigenannealing und Heterodimere sowie Hairpin-Strukturen) überprüft. Ggf. wurden Optimierungen der Oligonukleotide vorgenommen. Konservierte Positionen für alternative Primer bzw. Sonden wurden abgeleitet und *in silico* durch BLAST-Analysen auf ihre Spezifität hin getestet. Anschließend folgten Tests der Systeme *in vitro* (im Single- bzw. Multiplex).

Tab. 5: *qPCR-Nachweissysteme für die Erregergruppe EHEC/EPEC*

Bezeichnung	Amplikon [bp]	Sequenz (5'→3')	Länge [nt]	GC [%]	T _m [°C]	Quelle
stx1-VS1-F	87	CAT AGT GGA ACC TCA CG ACG CAG T	24	54,2	64,4	Sharma et al. (1999)
stx1-mVS1-F	87	CAT AGY GGA ACC TCA CTG ACG CAG T	25	min. 52,0 max. 56,0	min. 64,6 max. 66,3	LfL - dieses Projekt (modifiziert nach Sharma et al. (1999))
stx1-VS2-R		TTT GCC GAA AAC GTA AAG CTT CA	23	39,1	57,1	Sharma et al. (1999)
stx1-VS3-S		FAM - TGT GGC AAG AGC GAT GTT ACG GTT TG - BBQ	26	50,0	64,8	Sharma et al. (1999)
stx2_for4	114	GTT TCC ATG ACA ACG GAC AGC AG	23	52,2	62,4	Pavlovic et al. (2010)
stx2_rev2		GTG ACG ACT GAT TTG CAT TCC GG	23	52,2	62,4	Pavlovic et al. (2010)
stx2_rev2f		ACG CCC AAT CTG CAT CCC T	19	57,9	58,8	Pavlovic et al. (2010)
stx2_t_p1		TEX - CAA CGT GTC GCA GCG CTG GAA C - BBQ	22	63,6	65,8	Pavlovic et al. (2010)
stx2_t_p2		TEX - ACA GCG AAT CGC AGA TCT GGA AC - BBQ	23	52,2	62,4	Pavlovic et al. (2010)
eae_t_for1	107	TCG TGT CTG CTA AAA CCG CCG AG	23	56,5	64,2	Pavlovic et al. (2010)
eae_t_rev1		TTG TCT TAT CAG CCT TAA TCT CAG	24	37,5	57,6	Pavlovic et al. (2010)
eae_t_p1		YAK - TTG TTG ATC AAA CCA AGG CCA GCA - BBQ	24	45,8	61,0	Pavlovic et al. (2010)
eae_t_p2		YAK - TTG TTG ATC AAA GCA AGG CTA GTA - BBQ	24	37,5	57,6	Pavlovic et al. (2010)
uidA-784F	82	GIG TGA TAT CTA CCC GCT TCG C	22	54,5	62,1	Frahm und Obst (2003)
uidA-866R		AGA ACG GTT TGT GGT TAA TCA GGA	24	41,7	59,3	Frahm und Obst (2003)
uidA-S-EC807		LC670 - TCG GCA TCC GGT CAG TGG CAG T - BBQ	22	63,6	65,8	Frahm und Obst (2003)
Ehly-F	227	AAT AAT CTG GGA AAA GCC GGA ACA GT	26	42,3	61,6	LfL - dieses Projekt
Ehly-R		AAA TGA GCC AAG CTG GTT AAG CTG	24	45,8	61,0	LfL - dieses Projekt
Ehly-S		FAM - TTC TCA GCA ATT CAT CAA GAG CCA TGC C - BHQ-1	28	46,4	65,1	LfL - dieses Projekt

BBQ: BlackBerry[®] Quencer[®] 1, FAM: 6-Carboxyfluorescein, LC670: LightCycler[®] Red 670, TEX: Texas Red[®], YAK: Yakima Yellow[®]

4.2.2 Ergebnisse und Diskussion: Nachweissystem für das Shigatoxin-Gen 1 (*stx1*)

4.2.2.1 Alignment

Alle in der NCBI-Nukleotid-Datenbank hinterlegten Sequenzen des *stx1*-Gens, die vom Primer/Sonden-System *stx1*-VS1-F/*stx1*-VS2-R/*stx1*-VS3-S (Pavlovic et al., 2010; Sharma et al., 1999) zum Zeitpunkt des Abrufs (April 2013) abgedeckt wurden, sind anhand ihrer Accession-Nummern in Tab. 35 in Anhang 13.3.2 aufgelistet.

Beim Abgleich des Primers *stx1*-VS1 wurde *in silico* eine „Lücke“ bzw. ein fehlendes Nukleotid festgestellt (17. Position vom 5'-Ende des Primers; Tab. 5 und Abb. 12). Diese Lücke war bei allen Sequenzen im Alignment mit dem Nukleotid Thymin besetzt. Es wurde davon ausgegangen, dass diese Auffälligkeit auf einen Tippfehler in der Publikation zurückgehen muss. Der Forward-Primer *stx1*-VS1-F wurde deshalb in dieser Form nicht für *in vitro* Tests herangezogen, sondern es wurde das fehlende Thymin in der Primer-Oligonukleotid-Sequenz *stx1*-mVS1 ergänzt (Tab. 5 und Abb. 12).

Weiterhin wurde eine degenerierte Base (Y = C, T) an 6. Position in Bezug zum 5'-Ende eingeführt um auch Sequenzen mit Cytosin an dieser Position optimal zu erfassen.

Neben diesen Mismatches wurden bei 6 Sequenzen Diskrepanzen in jeweils einem weiteren Nukleotid festgestellt, die aber auf Grund der Position (1. Position vom 5'-Ende) die Bindung des Primers nicht beeinträchtigen sollten.

Vereinzelte weitere Mismatches wurden nicht berücksichtigt, da auf Grund ihres seltenen Auftretens (in gesamt 139 Sequenzen; siehe Anhang: Tab. 35) nicht ausgeschlossen werden konnte, dass hier Sequenzier- bzw. Editierfehler vorliegen. Da sie aber keine für die Amplifikation kritischen Positionen betrafen, wird selbst bei Vorliegen von Mismatches noch eine (zwar weniger starke) Bindung und damit eine Erfassung der Sequenz in der qPCR erreicht. Hier wird abgewogen zwischen der größer werden Komplexität des Primer-Gemisches beim Einfügen weiterer Degenerationen und der zu erwartenden Erhöhung der Bindungswahrscheinlichkeit. Auch durch Anpassung der Reaktionsbedingungen (z.B. etwas niedrigere Annealing-Temperatur) kann die Wahrscheinlichkeit der Bindung des Primers an einer Sequenz mit einer Diskrepanz erhöht werden, wobei aber die Reaktions-Stringenz (Spezifität des Assays) gewahrt bleiben muss..

Die Oligonukleotid-Sequenzen des Reverse-Primers *stx1*-VS2-R und der Sonde *stx1*-VS3-S wurden unverändert übernommen (Pavlovic et al., 2010; Sharma et al., 1999). Zwar wiesen auch diese im Abgleich mit den hinterlegten Sequenzen einzelne Diskrepanzen auf (Abb. 12), die für die Primerbindung an die Sequenz besonders Ausschlag gebende Region am 3'-Ende war aber konserviert.

4.2.2.2 *In vitro*-Test des *stx1*-Primer/Sonden-Systems (*stx1*-mVS1-F/*stx1*-VS2-R/*stx1*-VS3-S)

Da das Nachweis-System Bestandteil eines 4-fach Multiplex-qPCR-Nachweissystems ist, wurde es direkt im Multiplex getestet und optimiert. Die entsprechenden Ergebnisse werden in den Kapiteln 4.2.8 und 4.2.9 vorgestellt.

4.2.3 Alternatives Primer/Sonden-System zum Nachweis von *stx1* (stx1A-F/stx1A-R/stx1A-S (FAM/BHQ-1))

Zum Nachweis bzw. zur Quantifizierung des Toxingens *stx1* wurde ein alternatives Primer/Sonden-System entwickelt. Es umfasst 202 nt und erwies optimale Stringenz bei einer Annealing-Temperatur von knapp 58°C (nicht dargestellt).

Der Forward-Primer (F), der Reverse-Primer (R) und die 5'-Hydrolysesonde (S) hatten vom 5'-Ende her folgende Basenzusammensetzung:

stx1A-F: GATGATCTCAGTGGRCGTTCT

stx1A-R: GCAACTCGYGATGCATGATGA

stx1A-S: FAM-TGTAATGACTGCTGAAGATGTTGATCTTAC-BHQ-1

Im Singleplex, also als Einzelassay, ließen sich mit dem Primer/Sonden-System stx1A-F/stx1A-R/stx1A-S hervorragende Ergebnisse erzielen, das System kann also für den Einsatz empfohlen werden. Allerdings zeigte sich in Versuchen zur Einbindung in Multiplex-qPCR-Assays, dass das System in der aktuellen Form für diesen Einsatz nicht geeignet war. Die entsprechenden Arbeiten wurden daher zunächst eingestellt. Die besondere Leistungsfähigkeit des Systems stx1A-F/stx1A-R/stx1A-S im Singleplex sollte allerdings hier festgehalten werden, das System kann für einen entsprechenden Einsatz in der Praxis durchaus empfohlen werden.

Abb. 12: Aligierte Sequenzen (5' → 3') mit farblich hervorgehobenen Diskrepanz-Stellen beim Abgleich mit dem Primersystemstx1-VS1 (bzw. stx1-mVS1)/stx1-VS2/stx1-VS3

Species/Abbrv	Sequence
1. stx1-VS1 f	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGT-----ICTGGCAGAGCATGTTACGGTTTG-----TACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
2. stx1 mVS1 fw - mit Deg. und ohne Luecke	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGT-----TACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
3. stx1-VS2 r	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGT-----TACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
4. stx1-VS3 S	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGT-----TACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
5. AB071619 Escherichia coli stx1A gene for Shiga toxin 1 A subunit	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
6. EF415777 Escherichia coli strain 3007-85 Shiga toxin 1 A subunit	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
7. AP010960 Escherichia coli O111:H- str. 11128 DNA stx1 subunit	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
8. FR875155 Escherichia coli partial stx1 gene for shiga toxin 1A	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
9. FR875150 Escherichia coli partial stx1 gene for shiga toxin 1A	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
10. FR875153 Escherichia coli partial stx1 gene for shiga toxin 1A	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
11. FR875151 Escherichia coli partial stx1 gene for shiga toxin 1A	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
12. FR875152 Escherichia coli partial stx1 gene for shiga toxin 1A	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
13. FR875154 Escherichia coli partial stx1 gene for shiga toxin 1A	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
14. CQ429160 Escherichia coli strain N15018 Shiga toxin 1 A subunit	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
15. EU473279 Escherichia coli strain O6E01767 Shiga toxin 1 A subunit	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
16. AY135685 Escherichia coli O5:H- Stx1A (stx1A) and Stx1B (stx1B) genes	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
17. DQ449666 Escherichia coli strain BCN26 shiga toxin 1c subunit	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
18. JN641298 Escherichia coli strain W Shiga toxin 1A subunit	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
19. JN578679 Escherichia coli strain 50 Shiga toxin 1A subunit	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
20. HM387099 Escherichia coli strain APNVKVC-21 Stx1c gene	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
21. AJ312232 Escherichia coli stx1VA gene for Shiga-like toxin 1A	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
22. AB048231 Escherichia coli genes for Shiga toxin 1 A-subunit	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
23. AB048234 Escherichia coli genes for Shiga toxin 1 A-subunit	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
24. AB048237 Escherichia coli genes for Shiga toxin 1 A-subunit	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
25. AJ314839 Escherichia coli stx1VA gene for Shiga-like toxin 1A	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
26. AJ314838 Escherichia coli stx1VA gene for shiga-like toxin 1A	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
27. AB071623 Escherichia coli stx1A gene for Shiga toxin 1 A subunit	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
28. AB048235 Escherichia coli genes for Shiga toxin 1 A-subunit	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
29. AB071621 Escherichia coli stx1A gene for Shiga toxin 1 A subunit	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
30. AY986982 Escherichia coli strain IF Ec L82 shiga-like toxin 1A	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
31. AY986981 Escherichia coli strain IF Ec AB8Hb shiga-like toxin 1A	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
32. AY986980 Escherichia coli strain IF Ec AB8SF shiga-like toxin 1A	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
33. AY170851 Escherichia coli strain MH1813 shiga-like toxin 1A	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
34. AB050959 Escherichia coli stx1V52A stx1V52B genes for Shiga toxin 1 A-subunit	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
35. AB050958 Escherichia coli stx1V51A stx1V51B genes for Shiga toxin 1 A-subunit	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
36. AM230662 Escherichia coli O111:NM stx1A gene for shiga toxin 1A	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
37. AM230663 Escherichia coli O111:NM stx1A gene for shiga toxin 1A	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
38. L04539 ECOS111 Escherichia coli Shiga-like toxin type-1A	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
39. X07903 Shigella dysenteriae gene for toxin A- and B-subunit	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
40. Z36901 E. coli (serotype OX3:H9) SLT-I A and SLT-I B subunit	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC
41. AJ413986 Bacteriophage 6220 stx1A-OMX3 gene for shiga toxin 1A	ATAGTGGAACTTCAAGACGCGAGTCTGTCGACAGCATGTTACGGTTTGTTACTGTACAGCTGAAGCTTTACGTTTCGC

4.2.4 Ergebnisse und Diskussion: Nachweissystem für das Shigatoxin-Gen 2 (*stx2*)

4.2.4.1 Alignment

Das Alignment enthält alle zum Zeitpunkt der Erstellung (Mai 2013) in der NCBI-Datenbank hinterlegten *stx2*-Sequenzen bzw. Teilsequenzen. In Tab. 36 in Anhang 13.3.2 ist der Teil dieser Sequenzen anhand der Accession-Nummern aufgeführt, der das Amplikon des qPCR-Systems für *stx2* (*stx2_for4/stx2_rev2/stx2_rev2f/stx2_p1/stx2_p2*) (Pavlovic et al., 2010) abdeckt.

In Abb. 13 sind Sequenz-Ausschnitte mit Mismatches mit den Primer-/Sondensequenzen des *stx2*-Nachweissystems gezeigt. Weitere 37 mit Sequenz 6 (Accession-Nummer: AB119457) identische Sequenzen mit einem Mismatch in Position 1 vom 5'-Ende des Forward-Primers sind in Abb. 13 nicht dargestellt (AB119458, AB252836, AJ249351, AJ298298, AJ313016, AJ567998, AJ567999, AM904726, AM937001, AM939641, AM939642, AM939643, AY368993, DQ449665, FM998838, FM998844, FM998845, FM998846, FM998847, FM998849, FN182284, FN182285, FN182286, FN252457, GU363957, GU459254, GU945538, GU945539, GU945540, KC339670, M21534, M36727, U72191, X81415, X81416, X81417, X81418).

Es fällt auf, dass ein Datensatz von 5 Sequenzen (Nr. 34-38, Abb. 13) deutliche Unterschiede im Vergleich zu den übrigen Sequenzen aufweist. Dies sind Sequenzen der Toxinvariante *stx2f*. Um diese ebenfalls zu erfassen, verwendet das qPCR-Nachweissystem den zusätzlichen Reverse-Primer *stx2_rev2f* sowie die zusätzliche Sonde *stx2_p2*, die in gleicher Konzentration wie die restlichen Oligonukleotide eingesetzt werden.

Der Forward-Primer beinhaltet zwar Mismatches zu einigen Zielsequenzen, diese liegen aber nicht am für die Bindung wichtigen 3'-Ende, und es liegen nie mehr als zwei Diskrepanz-Stellen pro Sequenz vor. Ähnliches gilt für den Reverse-Primer *stx2_rev2* und auch für die Sonde *stx2_p1* mit der Ausnahme von zwei Sequenzen (Nr. 24 und 29; Abb. 13) mit Diskrepanz in Positionen nahe am 3'-Ende. Es ist aber auch hier zu berücksichtigen, dass Sequenzier-Artefakte oder Editierfehler vorliegen können.

4.2.4.2 *In vitro*-Test des *stx2*-Primer/Sonden-Systems (*stx2_for4/stx2_rev2/stx2_rev2f/stx2_p1/stx2_p2*)

Das System wurde im Singleplex mit hitzeinaktivierten Zellsuspensionen einer Reihe von EHEC-Stämmen getestet. Die verwendeten Reaktionsbedingungen sind in Tab. 6 zusammengestellt. Die Ergebnisse sind beispielhaft in Abb. 14 dargestellt. In diesem Lauf wurden unter Verwendung des ROX-Filters zur Detektion der Sonden *stx2_p1* und *stx2_p2* mit dem Farbstoff Texas Red für zwei der vier getesteten Stämme Signale erhalten.

Abb. 13: Aligierte Sequenzen (5' → 3') mit farblich hervorgehobenen Diskrepanz-Stellen beim Abgleich mit dem Primersystem stx2_for4 (bzw. stx2-F)/stx2_rev2f/stx2_p1/stx2_p2

Species/Abbrv	Sequence
1. stx2_for4 - Pavlovic et al.	5' TTTCCATGACAAACGGACAGCAG
2. stx2_rev2 - Pavlovic et al.	-----CCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
3. stx2_rev2f - Pavlovic et al.	-----GGATGCAATGGCGT---
4. stx2 t p1 - Pavlovic et al.	-----CAACGTTCGACGGCTGGAAAC
5. stx2 t p2 - Pavlovic et al.	-----GCAAGTCGACGTCIGGAAAC
6. AB119457 Escherichia coli	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
7. AY332411 Escherichia coli	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
8. GU126552 Escherichia coli	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
9. GU244510 Escherichia coli	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
10. GU228505 Escherichia coli	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
11. GQ995452 Escherichia coli	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
12. GQ919289 Escherichia coli	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
13. AB048236 Escherichia coli	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
14. AB048227 Escherichia coli	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
15. AJ966782 Escherichia coli	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
16. AY286000 Escherichia coli	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
17. AY443060 Escherichia coli	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
18. FM998843 Escherichia coli	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
19. AY966783 Escherichia coli	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
20. FR851897 Escherichia coli	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
21. FR851896 Escherichia coli	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
22. AB168108 Escherichia coli	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
23. AY443059 Escherichia coli	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
24. AB168105 Escherichia coli	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
25. AB048238 Escherichia coli	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
26. AB048224 Escherichia coli	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
27. AB048228 Escherichia coli	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
28. AB012102 Escherichia coli	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
29. AJ277135 Escherichia coli	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
30. AF461173 Escherichia coli	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
31. U41236 Escherichia coli	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
32. U41237 Escherichia coli	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
33. U41244 Escherichia coli	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
34. M9153 Escherichia coli	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
35. AB472687 Escherichia coli	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
36. AB270998 Escherichia coli	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
37. AB232172 Escherichia coli	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
38. AJ010730 Escherichia coli	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
39. DQ491342 Uncultured bacterium	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
40. JN193429 Enterobacteriaceae phage	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
41. AJ251231 Bacteriophage	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC
42. AV739670 Bacteriophage	TTTCCATGACAAACGGACACAGTTTACCACCTTGCAACGTTCGACGGCTGGAAACGTTCCGGAAATGCAAAATCAGTCCTCAC

Tab. 6: Eingesetzte Reagenzien und Reaktionsbedingungen für die Singleplex-qPCR mit dem *stx2*-Nachweissystem

Reagenz	Konzentration
PCR-Puffer (ohne MgCl ₂ , Invitrogen™ Inc., USA)	1x
MgCl ₂ (Invitrogen™ Inc., USA)	6 mM
dNTPs (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)	200 μM
Primer, jeweils	400 nM
Sonden, jeweils	400 nM
Platinum-Taq-Polymerase (Invitrogen™ Inc., USA)	0,75 U
DNA/ Zellsuspension (verschiedene Verdünnungen)	2,5μL
Ultra reines, DNase/RNase-freies, destilliertes Wasser (Invitrogen™ Inc., USA)	ad. 25 μL

PCR-Programm:	Phase	Dauer	Temperatur	
	Aktivierung	3 min	95°C	
	Denaturierung	15 s	95°C	} 40 Zyklen
	Annealing/Extension	60 s	58°C	

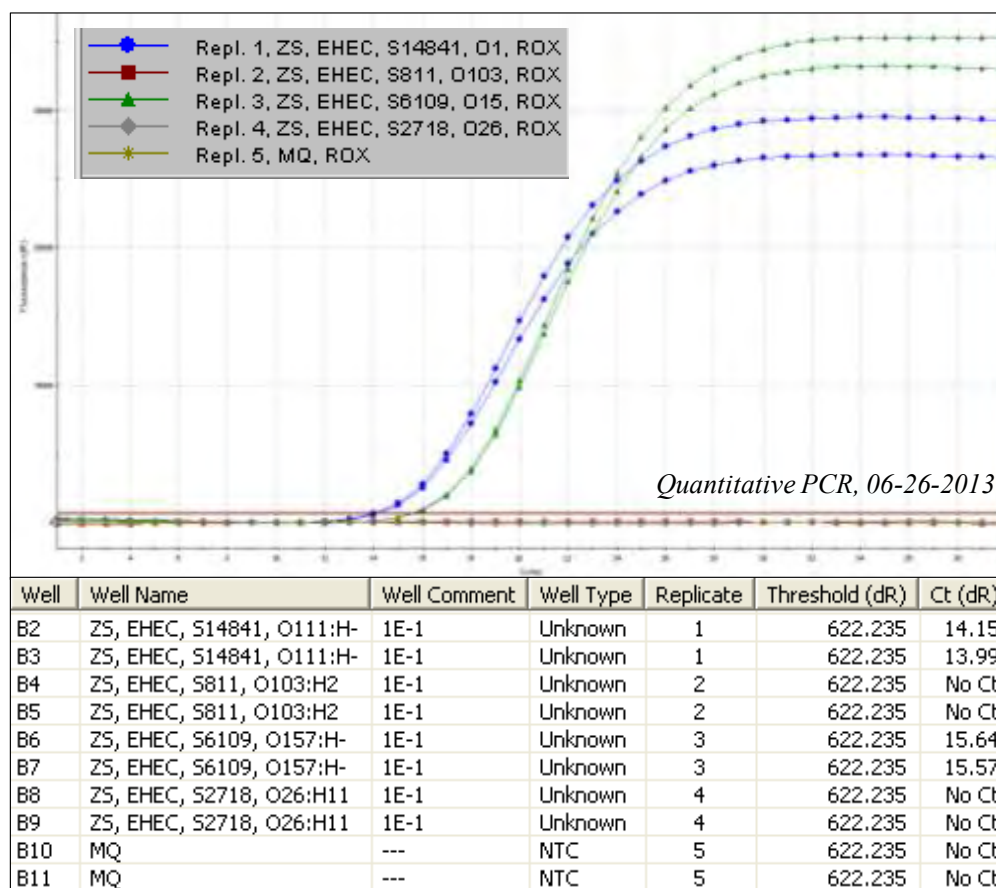


Abb. 14: Amplifikationsplots und Ergebnisse der *stx2*-qPCR der Zellsuspensionen von vier EHEC-Stämmen mit dem Primer/Sonden-System (*stx2_for4/stx2_rev2/stx2_rev2f/stx2_p1/stx2_p2*)

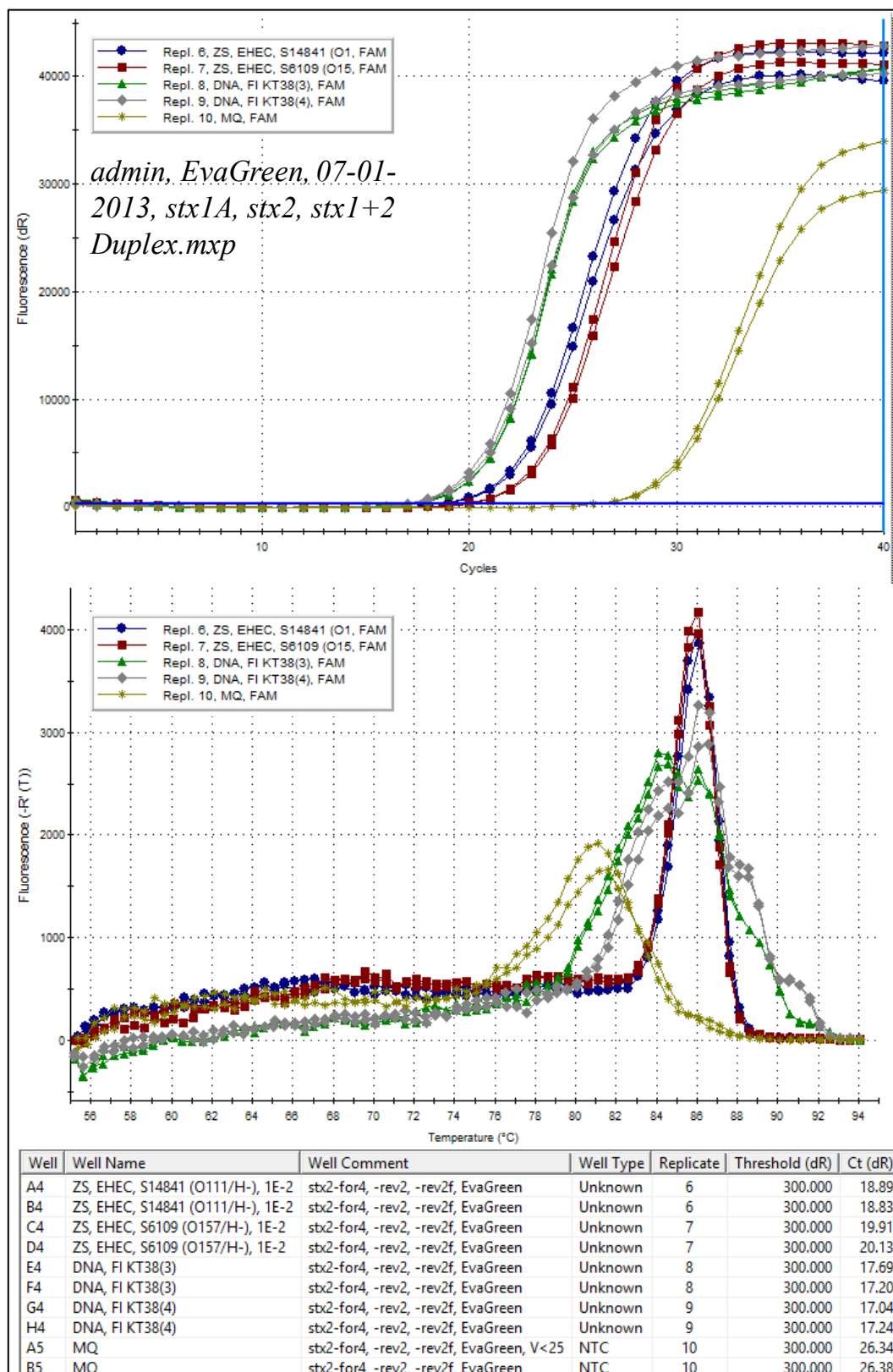


Abb. 15: EvaGreen-qPCR-Lauf mit dem Primersystem (stx2_for4/stx2_rev2/stx2_rev2f)

Eine EvaGreen-qPCR mit dem stx2-Primersystem (stx2_for4/stx2_rev2/stx2_rev2f) lieferte Aufschluss über das Verhalten der gebildeten Amplifikationsprodukte in einer Dissoziationskurve (Abb. 15). Die Replikate 3 und 4 führten als Ziel-DNA DNA-Extrakte

aus Gärgemischen von Labor-Biogasfermentern. In diesen Replikaten wurden Amplifikationsplots mit relativ frühen C_q-Werten erhalten, die aber in den Dissoziationskurven kein einzelnes PCR-Produkt, sondern mehrere verschiedene Produkte erkennen ließen. In einer Hydrolyse-Sonden-qPCR (*stx2_for4/stx2_rev2/stx2_rev2f/stx2_p1/stx2_p2*) war *stx2* mit denselben DNA-Extrakten nicht nachweisbar (Abb. 16). Die Amplifikation nur mit dem Primersystem (*stx2_for4/stx2_rev2/stx2_rev2f*) war daher nicht zufriedenstellend spezifisch. Die erwünschte Spezifität wurde jedoch durch die zusätzliche Verwendung der Sonde hergestellt. Auch in der Negativkontrolle konnte eine ähnliche Reaktion festgestellt werden (vgl. Abb. 15 und Abb. 16).

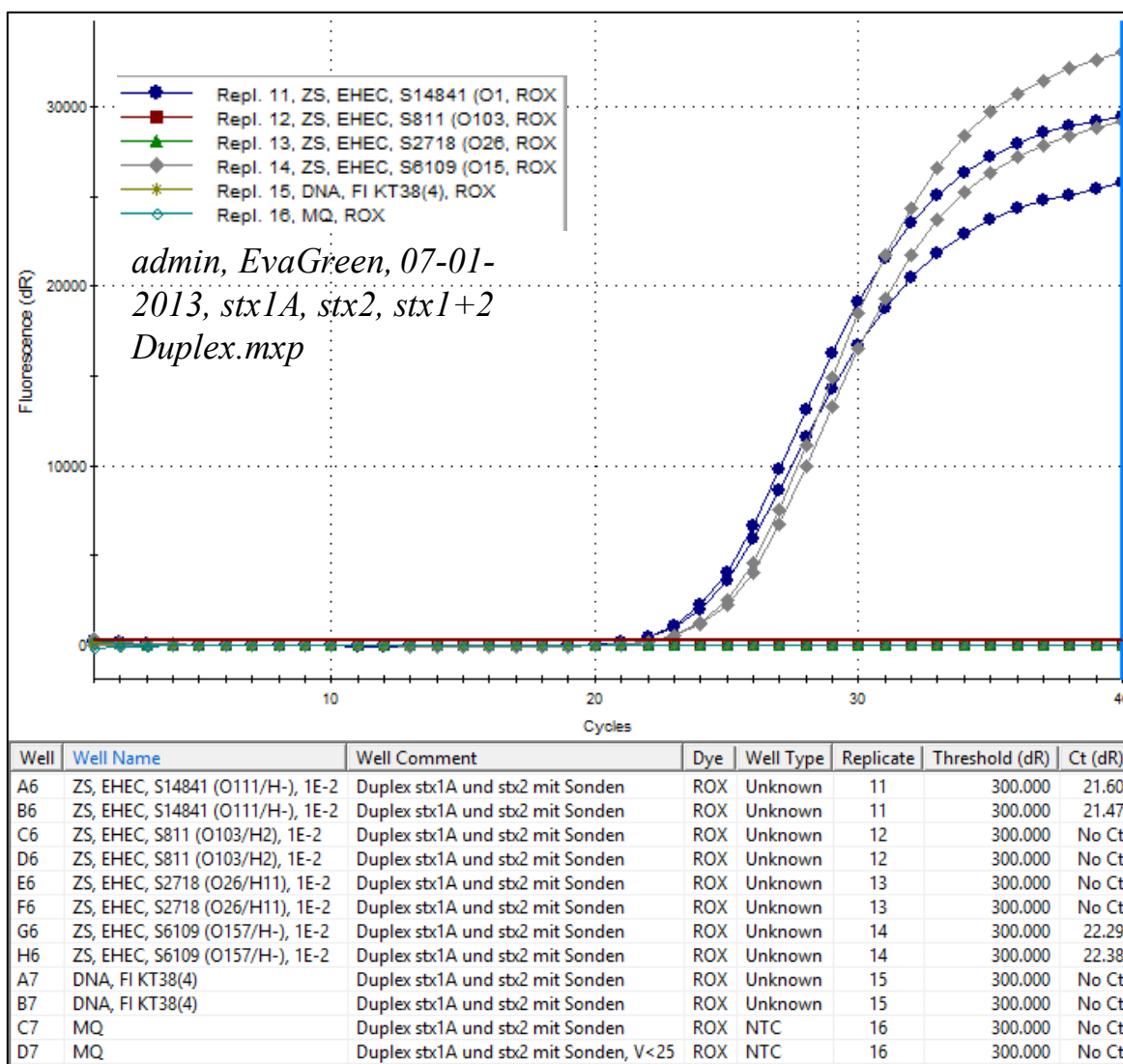


Abb. 16: Ergebnisse des *stx2*-Nachweissystems (*stx2_for4/stx2_rev2/stx2_rev2f/stx2_p1/stx2_p2*) in einem Duplex-qPCR-Lauf zusammen mit dem *stx1*-Primer/Sonden-System (vgl. 4.2.3; *stx1*-Ergebnisse nicht dargestellt)

Da das Nachweis-System Bestandteil eines 4-fach Multiplex-qPCR-Nachweissystems ist, wurde es anschließend im Multiplex getestet und optimiert (siehe 4.2.8 und 4.2.9).

4.2.5 Alternativer Forward-Primer zum Nachweis des Shigatoxin-Gen 2 (*stx2*)

Um die Zahl der Mismatches des Forward-Primers *stx2_for4* zu minimieren und (zumindest theoretisch) seine Spezifität zu verbessern, wurde der Forwardprimer Stx2-F entworfen. Er war am 5' und 3' Ende jeweils um eine Base kürzer als *stx2_for4*, und an Position 12 ausgehend vom 5'-Ende wurde eine degenerierte Base eingeführt. Dieser Forwardprimer Stx2-F hybridisierte mit fast allen im *stx2*-Alignment enthaltenen Sequenzen an praktisch allen Positionen perfekt. Im Vergleich der Forwardprimer in der *stx2*-qPCR waren die C_q-Werte für zwei Referenzstämme jeweils gleich, allerdings war die Amplifikation mit Stx2-F weniger effizient (Abb. 17).

Der Versuch, die Reaktionseffizienz (Fluoreszenzausbeute) über eine Optimierung der Primerkonzentrationen (Primermatrix) zu verbessern, führte zu keiner deutlichen Verbesserung. Daher wurde insbesondere im Hinblick auf die Verwendung im Multiplex für künftige Tests der bereits im Multiplex-getestete und bewährte Forward-Primer *stx2_for4* beibehalten. Arbeiten mit dem Forwardprimer Stx2-F wurden vorerst eingestellt.

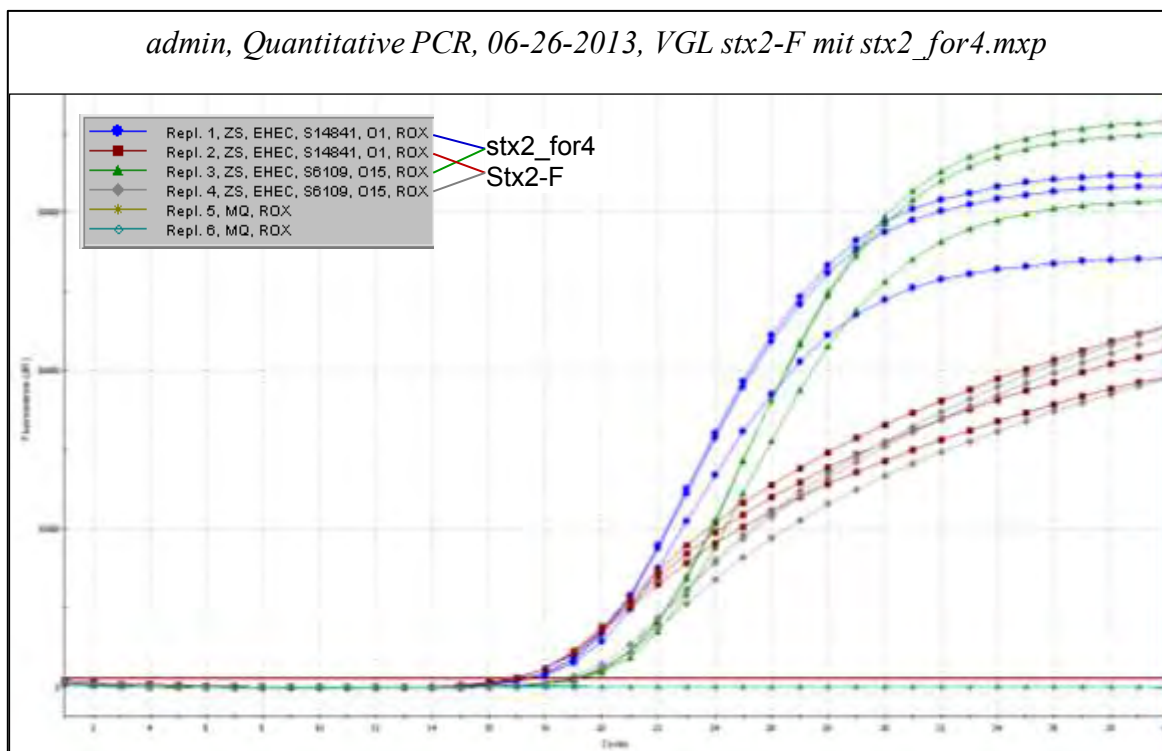


Abb. 17: Vergleich der Primer *stx2_for4* und Stx2-F in der *stx2*-qPCR

4.2.6 Ergebnisse und Diskussion: Nachweissystem für das Intimin-Gen (*eae*)

4.2.6.1 *In vitro*-Test des *eae*-Primer/Sonden-Systems (*eae_t_for1/eae_t_rev/eae_t_p1/eae_t_p2*)

Beim Test der *eae*-qPCR war die Herangehensweise folgende: Nach BLAST-Analysen der Oligonukleotid-Sequenzen und Feststellung des Passens auf *Escherichia* spp.-*eae*-Sequenzen wurden diese zuerst *in vitro* getestet. Die Reaktionsbedingungen und das gewählte Temperaturprogramm entsprachen den in Tab. 6 aufgeführten mit Ausnahme des an Zellsuspension eingesetzten Volumens von 5 μ L. Abb. 18 zeigt die Amplifikationsplots und die aus den C_q-Werten der einzelnen Verdünnungsstufen erhaltene Standardgerade.

Die aufeinanderfolgenden log-Verdünnungen überschritten den Threshold im Abstand von ca. 3,3 Zyklen, annähernd so wie dies theoretisch erwartet wird ($2^{3,322} = 10$). Die Kopien-Anzahl der Standard-Verdünnungen wurden mittels Most-Probable-Number (MPN)-Tabellen aus dem qPCR-Lauf bestimmt.

4.2.6.2 Alignment

Das *eae*-Alignment wurde nach dem erfolgreichen Testen der qPCR-*in vitro* aufgebaut. Aus der Datenbank wurden 384 Sequenzen aufgenommen, die das Amplikon abdeckten (Tab. 37 in Anhang 13.3.2). Bei einer beträchtlichen Anzahl dieser Sequenzen wurden *in silico* Diskrepanzen festgestellt, so dass nur ein Anteil der im Alignment enthaltenen Sequenzen in seiner Gesamtheit bzw. am 3'-Ende durch die Oligonukleotide optimal gebunden wird (Tab. 7). Das *eae*-Alignment wird in diesem Bericht aus Gründen der Unübersichtlichkeit durch die große Anzahl Sequenzen (n = 384) nicht dargestellt. Bei Interesse kann es beim Projektleiter (Dr. Michael Lebuhn) eingesehen werden. Hier können sowohl die Accession-Nummern der Sequenzen mit Diskrepanzen sowie die Positionen der einzelnen Diskrepanz-Stellen nachvollzogen werden.

Eine trotz Mismatches ausreichende Bindung der Primer an die Zielsequenz könnte auch durch die zum Annealing bzw. zur Extension verwendete Temperatur von 58°C begünstigt worden sein, da diese z.T. etwas unter den berechneten Schmelztemperaturen der einzelnen Oligonukleotide liegt (Tab. 5). Die somit herabgesetzte Stringenz des Systems birgt allerdings die Gefahr, Nicht-Zielsequenzen falsch-positiv zu binden und nachzuweisen. Dennoch wurden den Ergebnissen der Entwickler des Nachweissystems (Pavlovic et al., 2010) gute Nachweis-Ergebnisse erzielt. Die *eae*-qPCR wurde u.a. erfolgreich sowohl an einer großen Auswahl von *E. coli* Stämmen mit und ohne *eae*-Gen, als auch an anderen Spezies ohne *eae*-Gen getestet (Pavlovic et al., 2010). Deshalb wurde die *eae*-qPCR unverändert wie in (Pavlovic et al., 2010) für die Versuche innerhalb dieses Projekts eingesetzt. Ein positiver *eae*-qPCR-Nachweis führt zur Einstufung als „EPEC-positiv“, wenn gleichzeitig keine Shigatoxin-Gene nachgewiesen wurden. Wenn Shigatoxin-Gene vorhanden sind, erfolgt unabhängig von der Anwesenheit des *eae*-Gens eine Einstufung als „EHEC-positiv“.

Tab. 7: Prozentualer Anteil der durch die Primer/Sonden gebundenen Sequenzen im *eae*-Alignment

Bindung der nt in Relation zum 3'-Ende	<i>eae</i> t for1	<i>eae</i> t rev	<i>eae</i> t p1	<i>eae</i> t p2	<i>eae</i> t p1 + <i>eae</i> t p2
gesamt	58,9%	38,5%	36,2%	0,0%	36,2%
letzte 10	66,4%	83,9%	50,3%	3,1%	50,8%
letzte 5	75,8%	90,9%	51,6%	4,9%	56,5%

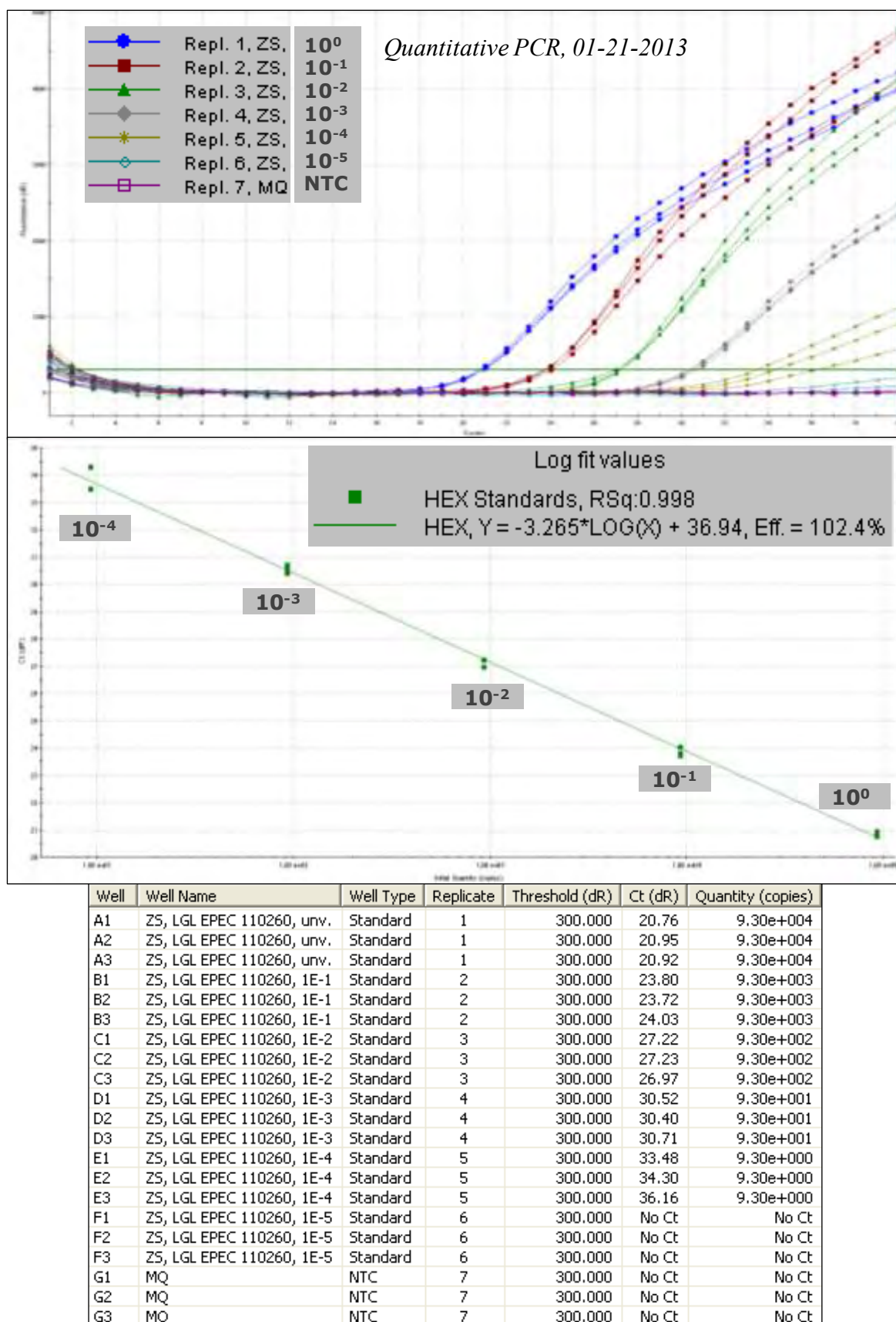


Abb. 18: eae-qPCR-Amplifikationsplots und Standardkurve der Verdünnungsreihe der Zellsuspension EPEC LGL 110260

4.2.7 Ergebnisse und Diskussion: Nachweissystem für das *E. coli*- und *Shigella* spp.-spezifische β -Glucuronidase-Gen (*uidA*)

Das *uidA*-Nachweissystem (Tab. 5) stammt ursprünglich aus einer Veröffentlichung von (Frahm und Obst, 2003). Das System wurde nach bioinformatischer und in-vitro-Überprüfung ohne Veränderung aus der Literatur entnommen und *in vitro* in Multiplex-Assays eingesetzt (siehe 4.2.8 und 4.2.9).

4.2.8 Durchführung: Test der qPCR-Systeme im Multiplex (*stx1/stx2/eae/uidA*)

Für den Einsatz im Multiplex wurden die in 4.2.2, 4.2.4, 4.2.6 und 4.2.7 dargestellten qPCR-Nachweissysteme zu einem 4-fach-Multiplex-Nachweissystem kombiniert. Es wurden folgende qPCR-Läufe zum Testen und zur Optimierung der Multiplex-qPCR durchgeführt:

4.2.8.1 Konzentrationen der Reagenzien

Da das Multiplex-System in der Literaturstelle mit einem kommerziell erhältlichen Multiplex-qPCR-Mastermix mit unbekanntenen Konzentrationen der enthaltenen Reagenzien verwendet wurde, wurden in einer ersten Testreihe unterschiedliche Konzentrationen der Platinum-Taq-Polymerase (0,75 U/1,0 U/1,25 U) sowie der dNTPs (200 μ M/300 μ M) eingesetzt, um die Reaktionsbedingungen zu optimieren. In Tab. 8 ist ein Beispielprotokoll wiedergegeben.

Tab. 8: *Eingesetzte Reagenzien und Reaktionsbedingungen für die Multiplex-qPCR zum Nachweis von stx1/stx2/eae/uidA (stx1-mVS1-F/stx1-VS2-R/stx1-VS3-S; stx2_for4/stx2_rev2/stx2_rev2f/stx2_p1/stx2_p2; eae_t_for1/eae_t_rev/eae_t_p1/eae_t_p2; uidA-784F/uidA-866R/uidA-S-EC807)*

Reagenz	Konzentration
PCR-Puffer (ohne MgCl ₂ , Invitrogen™ Inc., USA)	1x
MgCl ₂ (Invitrogen™ Inc., USA)	6 mM
dNTPs (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)	200 μ M
Primer <i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>eae</i> , jeweils	400 nM
Sonden <i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>eae</i> , jeweils	400 nM
Primer <i>uidA</i> , jeweils	100 nM
Sonde <i>uidA</i>	100 nM
Platinum-Taq-Polymerase (Invitrogen™ Inc., USA)	1,0 U
[Spiking-DNA: Verdünnung einer <i>E. coli</i> -Zellsuspension]	[1 μ L]
Ziel-DNA/ Zellsuspension (verschiedene Verdünnungen)	2,5 μ L
Ultra reines, DNase/RNase-freies, destilliertes Wasser (Invitrogen™ Inc., USA)	ad. 25 μ L

PCR-Programm:	Phase	Dauer	Temperatur
	Aktivierung	2 min	94°C
	Denaturierung	15 s	94°C
	Annealing/Extension	60 s	58°C
			} 45 Zyklen

4.2.8.2 Zusatz von *E. coli*-DNA für die interne Amplifikationskontrolle (IAC)

Das *uidA*-Nachweissystem dient als interne Amplifikationskontrolle (IAC) (Pavlovic et al., 2010). In der genannten Veröffentlichung wurde aus menschlichen Stuhl-Proben angereichert. Hier ist *E. coli* i.d.R. immer präsent, während die an AQU untersuchten

Probenmatrices auch frei von *E. coli* sein können (z.B. Silagen, reine NawaRo-Gärgemische, etc.). Um eine funktionierende Positiv-Kontrolle zu führen, wurde in solchen Fällen ein verdünntes Lysat eines *E. coli*-Stammes (z.B. DSM 4509) zur qPCR-Reaktion in geringer Konzentration zugesetzt (Spiking; siehe Tab. 8).

4.2.8.3 Überprüfung der Stämme in der eigenen Stammsammlung

Eine Reihe von *E. coli*-Stämmen der eigenen Stammsammlung wurde mit dem System auf das Vorhandensein von *stx1*, *stx2*, *eae* und *uidA* überprüft und konnte anhand der Ergebnisse besser charakterisiert werden (Tab. 9). Diese Stämme dienten in den entsprechenden Assays teilweise als Referenzen.

4.2.9 Ergebnisse und Diskussion: Test der qPCR-Systeme im Multiplex (*stx1/stx2/eae/uidA*)

4.2.9.1 Konzentrationen der Reagenzien

qPCR-Läufe bei mehreren Konzentrationen der Platinum-Taq-Polymerase sowie der dNTPs sind in Abb. 19 beispielhaft für eine mTSB-Anreicherung aus einer Gülleprobe (PB21-Gü) und für die Zellsuspension einer Reinkultur des Stammes EHEC S 6109 (O157:H-) dargestellt. Daneben wurden die mTSB-Anreicherungen von zwei von zwei parallel geschalteten Biogasfermentern und des Nachgärbehälters desselben landwirtschaftlichen Betriebs bei diesem Test mituntersucht.

Als Ergebnis aus diesem Versuch lässt sich ableiten, dass eine erhöhte dNTP-Konzentration von 300 μ M (grau in Abb. 19) gegenüber 200 μ M (rot) gleichbleibende C_q -Werte aber in den meisten Fällen eine etwas geringere Fluoreszenz-Ausbeute bzw. Konzentration der jeweiligen dsDNA im Verlauf der Amplifikation mit sich bringt. Deshalb wurde in weiteren Versuchen eine dNTP-Konzentration von 200 μ M beibehalten.

Beim Vergleich der Platinum-Taq-Polymerase-Konzentrationen wurde für die EHEC-Reinkultur (B; Abb. 19) bei etwa gleichbleibenden C_q -Werten eine umso höhere Fluoreszenz-Ausbeute erzielt, je höher die Polymerase-Konzentration lag. Bei mTSB-Anreicherungen aus Umweltproben (z.B. A, Abb. 19) dagegen brachte der Einsatz von 1,0 U eine verbesserte Fluoreszenzausbeute gegenüber 0,75 U. Jedoch blieb die Fluoreszenzausbeute in den meisten Fällen nahezu unverändert, wenn noch mehr Polymerase (1,25 U) eingesetzt wurde. Eine Ausnahme stellt das *uidA*-System dar. Hier lag die Fluoreszenz-Ausbeute bei Einsatz von 1,0 U in den meisten Fällen geringer als bei Einsatz von 1,25 U oder 0,75 U und brachte sogar leicht nach hinten verschobene C_q -Werte mit sich. In folgenden Läufen wurde dennoch eine Platinum-Taq-Konzentration von 1,0 U eingesetzt, da sie in den entscheidenden Parametern *stx1*, *stx2* und *eae* verbesserte Ergebnisse erzielte.

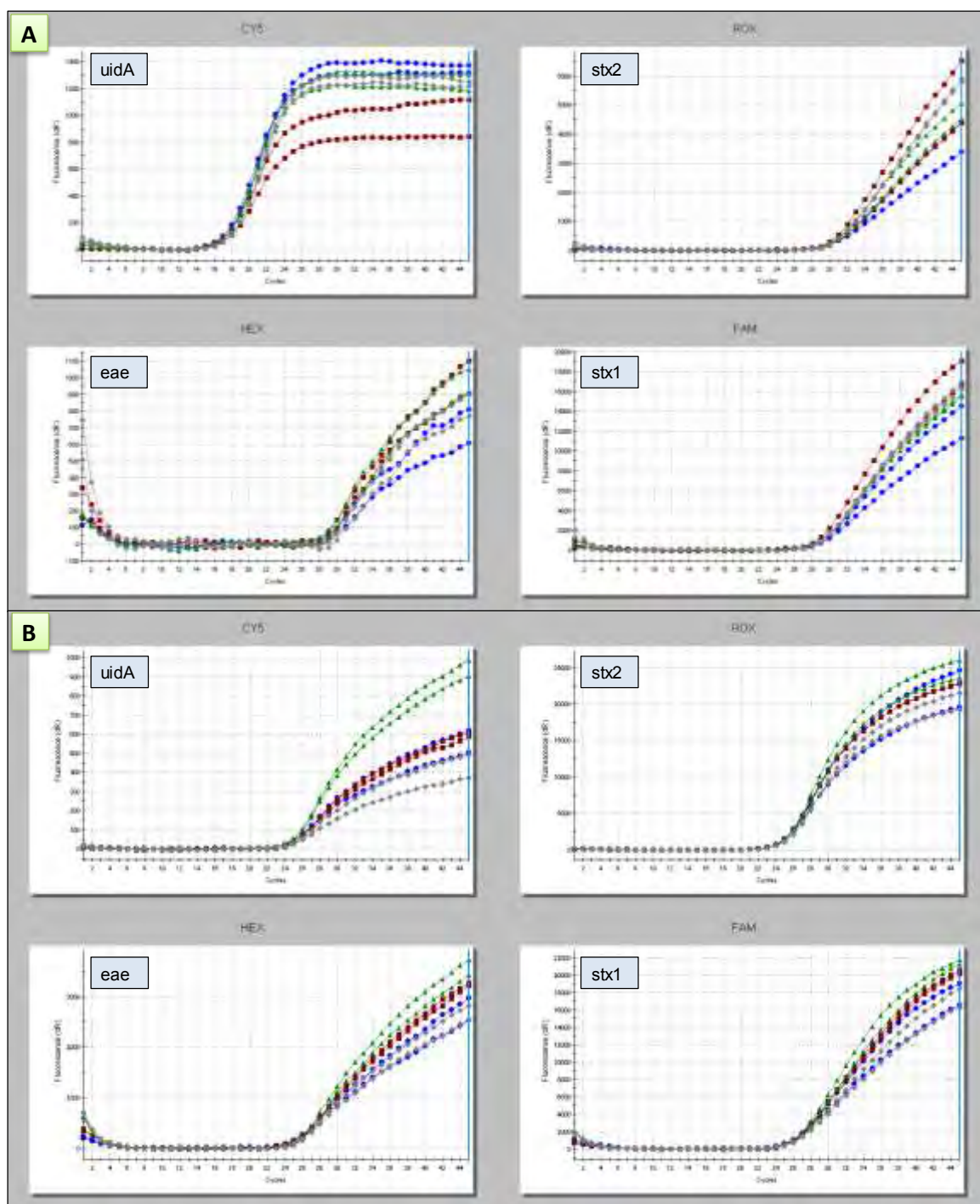
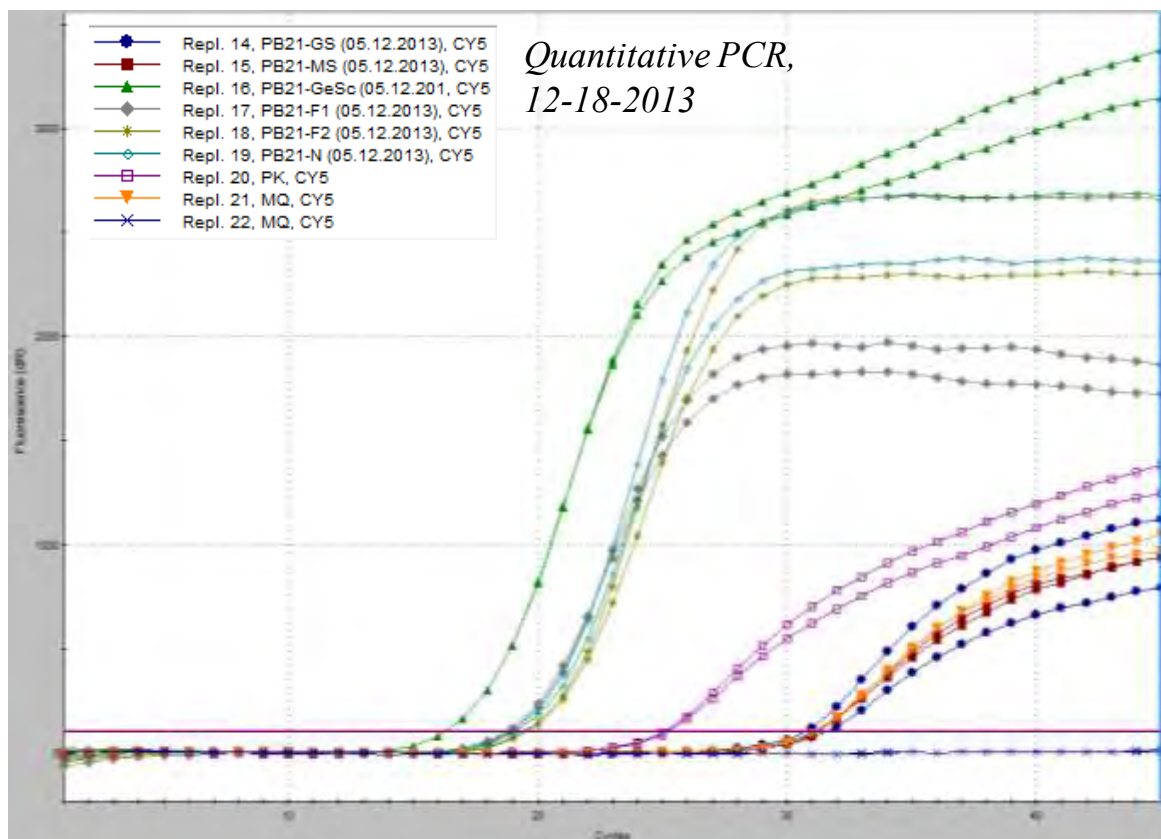


Abb. 19: Konzentrationsgradienten der Platinum-Taq-Polymerase und der dNTPs; [A] Amplifikationsplots der mTSB-Anreicherung einer Gülleprobe (PB21-Gü; 19.09.2013); [B] Amplifikationsplots der Zellsuspension der Positivkontrolle (EHEC S 6109, O157:H-); blau: 0,75 U PtTaq, 200 μ M dNTPs; rot: 1,00 U PtTaq, 200 μ M dNTPs; grün: 1,25 U PtTaq, 200 μ M dNTPs; grau: 1,00 U PtTaq, 300 μ M dNTPs; Negativkontrolle jeweils negativ (MQ; nicht gezeigt); (Projekt der qPCR-Läufe vom 15.11.2013)

4.2.9.2 Zusatz von *E. coli*-DNA für die interne Amplifikationskontrolle (IAC)

Beispielhaft sind in Abb. 20 die Ergebnisse eines qPCR-Laufs gezeigt, bei dem 1 µL einer stark verdünnten (1:10.000) Zellsuspension eines *E. coli*-Stammes („EC27“ = DSM 4509) zu den Ansätzen zugegeben wurde (Spiking). Untersucht wurden die mTSB-Anreicherungen von Proben einer landwirtschaftlichen Biogasanlage (PB21 Grassilage (GS), Maissilage (MS), Getreideschrot (GeSc), Inhalt der parallel geschalteten Hauptgärer (F1+F2) und des Nachgärbehälters (N)). Außerdem wurden eine Negativkontrolle (Wasser) mit Spiking und eine ohne Spiking sowie eine Positivkontrolle (EHEC-Stamm) mit Spiking untersucht.



Well	Well Name	Well Comment	Dye	Well Type	Replicate	Threshold (dR)	Ct (dR)
A8	PB21-GS (05.12.2013)	ZS, mTSB, unv. + 1µL IAC: <i>E. coli</i> EC27	CY5	Unknown	14	100.000	31.59
A9	PB21-GS (05.12.2013)	ZS, mTSB, unv. + 1µL IAC: <i>E. coli</i> EC27	CY5	Unknown	14	100.000	30.72
B8	PB21-MS (05.12.2013)	ZS, mTSB, unv. + 1µL IAC: <i>E. coli</i> EC27	CY5	Unknown	15	100.000	31.10
B9	PB21-MS (05.12.2013)	ZS, mTSB, unv. + 1µL IAC: <i>E. coli</i> EC27	CY5	Unknown	15	100.000	31.25
C8	PB21-GeSc (05.12.2013)	ZS, mTSB, unv. + 1µL IAC: <i>E. coli</i> EC27	CY5	Unknown	16	100.000	16.32
C9	PB21-GeSc (05.12.2013)	ZS, mTSB, unv. + 1µL IAC: <i>E. coli</i> EC27	CY5	Unknown	16	100.000	16.33
D8	PB21-F1 (05.12.2013)	ZS, mTSB, unv. + 1µL IAC: <i>E. coli</i> EC27	CY5	Unknown	17	100.000	18.95
D9	PB21-F1 (05.12.2013)	ZS, mTSB, unv. + 1µL IAC: <i>E. coli</i> EC27	CY5	Unknown	17	100.000	18.77
E8	PB21-F2 (05.12.2013)	ZS, mTSB, unv. + 1µL IAC: <i>E. coli</i> EC27	CY5	Unknown	18	100.000	19.59
E9	PB21-F2 (05.12.2013)	ZS, mTSB, unv. + 1µL IAC: <i>E. coli</i> EC27	CY5	Unknown	18	100.000	19.47
F8	PB21-N (05.12.2013)	ZS, mTSB, unv. + 1µL IAC: <i>E. coli</i> EC27	CY5	Unknown	19	100.000	19.10
F9	PB21-N (05.12.2013)	ZS, mTSB, unv. + 1µL IAC: <i>E. coli</i> EC27	CY5	Unknown	19	100.000	18.92
H6	PK	ZS, EHEC 6901, O157:H-; + 1µL IAC: <i>E. coli</i> EC27	CY5	Unknown	20	100.000	25.05
H7	PK	ZS, EHEC 6901, O157:H-; + 1µL IAC: <i>E. coli</i> EC27	CY5	Unknown	20	100.000	25.24
G8	MQ	+ 1µL IAC: <i>E. coli</i> EC27	CY5	NTC	21	100.000	31.14
G9	MQ	+ 1µL IAC: <i>E. coli</i> EC27	CY5	NTC	21	100.000	31.22
H8	MQ	---	CY5	NTC	22	100.000	No Ct
H9	MQ	---	CY5	NTC	22	100.000	No Ct

Abb. 20: Amplifikationsplots und Ergebnisse der *uidA*-qPCR im Rahmen einer Multiplex-Anwendung mit Spiking von *E. coli*-Zellsuspension

Bei der Negativkontrolle ohne Spiking (Replikat 22, Abb. 20) wurde kein Signal gemessen. Bei der Negativkontrolle mit Spiking (Replikat 22) wurde ein C_q -Wert von ca. 31 gemessen. Bei Zellsuspensionen, die keine inhärente *E. coli*-Besiedelung vorweisen, steigt der Amplifikationsplot etwa beim selben Zyklus über den Threshold wie die gespikete Negativkontrolle (Replikat 1 und 2). Alle Proben mit C_q -Werten kleiner der gespikten Negativkontrolle weisen dagegen eine inhärente *E. coli*-Besiedelung auf (Replikate 16-20).

4.2.9.3 Überprüfung der Stämme in der eigenen Stammsammlung

Die in Tab. 9 aufgelisteten *E. coli* Stämme sind mittels der Multiplex-qPCR bezüglich der Gene *stx1*, *stx2*, *eae* und *uidA* charakterisiert worden. Weiterhin wurde die Anwesenheit des Enterohämolysin-Gens (*ehly*) mit einer Singleplex-qPCR bestimmt (siehe auch 4.2.10).

Tab. 9: Charakterisierung einer Reihe von Stämmen in der Stammsammlung

Spezies	Typ	Stamm	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ehly</i>	<i>uidA</i>
<i>Escherichia coli</i>	EHEC	S 14841/00 (Sv: O111:H-)	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	EHEC	S 6109/01 (Sv: O157:H-)	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	EHEC	S 811/01 (Sv: O103:H2)	+	-	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	EHEC	S 2718/01 (Sv: O26:H11)	+	-	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	EAEC	LGL 4140-86	+	-	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	EPEC	LGL 38122	-	-	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	EPEC	LGL K110/1	-	-	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	EPEC	LGL 38122	-	-	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	EPEC	LGL 110260	-	-	+	-	+
<i>Escherichia coli</i>	EPEC	LGL 112575	-	-	+	-	+
<i>Escherichia coli</i>	wt	EC27 (DSM 4509)	-	-	-	-	+

4.2.10 Durchführung: Entwicklung eines qPCR-Primer-/Sonden-Systems zum Nachweis von *ehly*

Zur Entwicklung des Primer-/Sonden-Systems zum Nachweis des Enterohämolysin-Gens wurde ähnlich vorgegangen wie in Kapitel 4.2.1 für die Systeme *stx1*, *stx2*, *eae* und *uidA* beschrieben. Zunächst wurden alle im NCBI zu diesem Zeitpunkt hinterlegten Sequenzdatensätze des Enterohämolysin-Gens aligniert.

Publizierte Primer- bzw. Sonden-Oligonukleotide zum Nachweis des Gens wurden mit den alignierten Sequenzen abgeglichen (Eggert et al., 2013; Kerenyi et al., 2005; Reischl et al., 2002; Schmidt et al., 1995). Diese Oligonukleotid-Positionen wurden an den aktuellen Informationsstand in den Datenbanken angepasst und zusammen mit neuen Oligonukleotiden zu einem neuen *ehly*-Primer-/Sonden-System zusammengefügt. Die Sequenzen wurden auf adäquate Schmelztemperaturen (T_m ; Tab. 5; Berechnung siehe 4.2.1) und auf die Möglichkeit zur Bildung von Sekundärstrukturen (Self- und Heterodimere sowie Hairpin-Strukturen) überprüft und optimiert. Die abgeleiteten Oligonukleotide (Ehly-F/Ehly-R/Ehly-S) wurden *in silico* durch BLAST-Analysen auf ihre Spezifität getestet. Anschließend folgten Tests *in vitro*. Dabei wurde ein Standard-qPCR-Protokoll abgeleitet (Tab. 10).

Tab. 10: Eingesetzte Reagenzien und Reaktionsbedingungen für die Singleplex-qPCR zum Nachweis des Enterohämolysin-Gens (Ehly-F/Ehly-R/Ehly-S)

Reagenz		Konzentration	
PCR-Puffer (ohne MgCl ₂ , Invitrogen™ Inc., USA)		1x	
MgCl ₂ (Invitrogen™ Inc., USA)		6 mM	
dNTPs (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)		200 μM	
Primer Ehly-F/Ehly-R, jeweils		400 nM	
Sonde Ehly-S		200 nM	
Platinum-Taq-Polymerase (Invitrogen™ Inc., USA)		0,75 U	
Ziel-DNA/ Zellsuspension (verschiedene Verdünnungen)		2,5 μL	
Ultra reines, DNase/RNase-freies, destilliertes Wasser (Invitrogen™ Inc., USA)		ad. 25 μL	
PCR-Programm:	Phase	Dauer	Temperatur
	Aktivierung	3 min	95°C
	Denaturierung	15 s	95°C
	Annealing/Extension	60 s	64°C
			} 40Zyklen

4.2.11 Ergebnisse und Diskussion: Entwicklung eines qPCR-Primer-/Sonden-Systems zum Nachweis von *ehly*

4.2.11.1 *ehly*-Alignment

Die im Alignment vom Primer/Sonden-System Ehly-F/Ehly-R/Ehly-S abgedeckten Ziel- oder Ingroup- sowie die ausgegrenzten Nicht-Ziel- oder Outgroup-Hämolysin-Gensequenzen sind in Tab. 38 im Anhang 13.3.2 mit ihren Accession-Nummern aufgelistet. Den Analysen zufolge werden alle als Enterohämolysin annotierte Sequenzen, die zum Zeitpunkt der Aktualisierung des Alignments (Juni 2015) in der NCBI-Datenbank gefunden werden konnten, *in silico* vom System erfasst.

4.2.11.2 *In vitro*-Test des *ehly*-Primer/Sonden-Systems (Ehly-F/Ehly-R/Ehly-S): Optimierung der Annealing-Temperatur

Um die optimale Annealing-Temperatur des Primersystems zu bestimmen, wurde zunächst eine Temperatur-Gradienten-PCR durchgeführt, bei der die Annealing-Temperatur auf Werte zwischen 57 und 67°C eingestellt wurde. Als Ziel-DNA wurde die Zellsuspension (ZS) von *E. coli*-Reinkulturen verwendet (LGL K110/1 bzw. LGL 38122; Abb. 21; LGL 4140-86, nicht gezeigt). Zellsuspensionen aus kultureller Anreicherung komplexer Umweltproben waren zu diesem Zeitpunkt noch nicht zugänglich. Nach anschließender Gelelektrophorese und Gel-Dokumentation wurden umso stärkere Banden erhalten, desto höher die Annealing Temperatur lag, der Unterschied in der Bandenstärke zwischen 65 und 67°C war dabei nur noch geringfügig (Abb. 21). Um die berechnete T_m der Primer (ca. 61°C, Tab. 5) nicht zu weit zu überschreiten wurde eine Annealing-Temperatur von 64°C für weitere Versuche beibehalten und in das Standard-qPCR-Protokoll übernommen (Tab. 10).

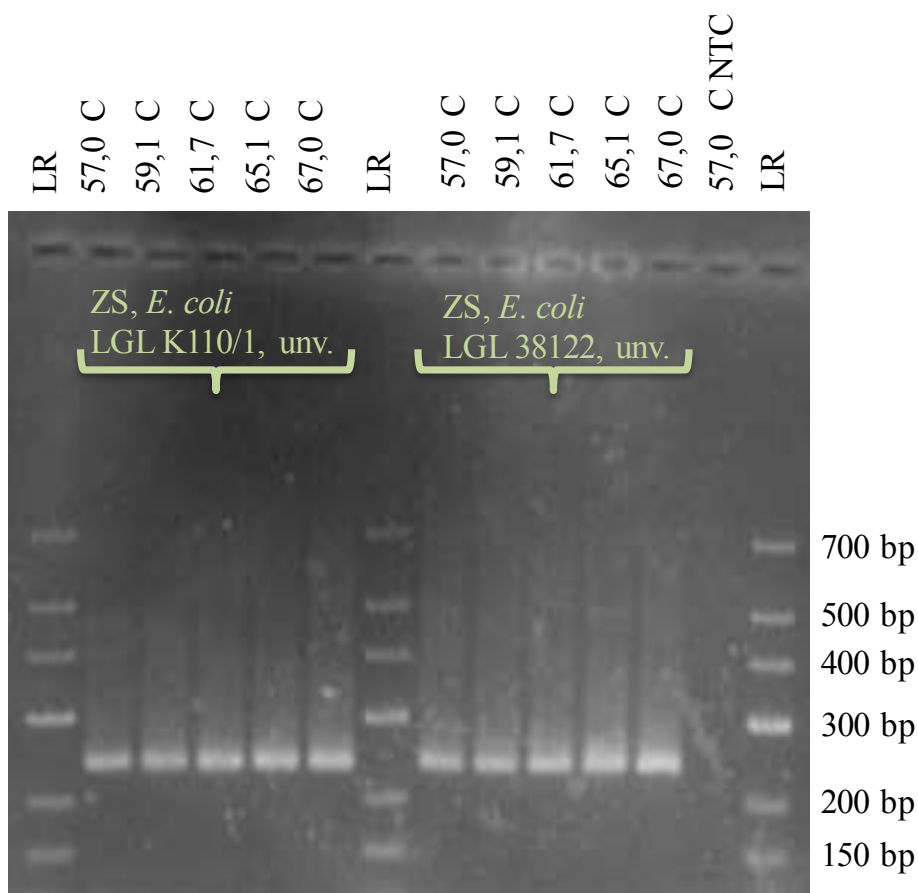


Abb. 21: Gel-Dokumentation der Produkte (Amplikon 227 bp) einer Annealing-Temperatur-Gradienten-PCR (57-67°C) mit dem *ehly*-Primersystem (*Ehly-F/Ehly-R*); 3% Agarosegel, 100 V, 120 min; LR: DNA-Standard (*GeneRuler™ Low Range DNA Ladder*, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, USA); NTC: Negativkontrolle; ZS: Zellsuspension

4.2.11.3 *In vitro*-Test des *ehly*-Primer/Sonden-Systems (*Ehly-F/Ehly-R/Ehly-S*): Optimierung der Primer- und Sondenkonzentrationen

Es wurden die Primerkonzentrationen 200 nM, 400 nM und 600 nM (Primer-Matrix) in Verbindung mit einer Sondenkonzentration von 400 nM getestet (Abb. 22). Als Ziel-DNA wurde die Zellsuspension (ZS) von *E. coli*-Reinkulturen verwendet (LGL K110/1 bzw. LGL 38122), da Anreicherungen mit *ehly*-tragenden *E. coli*-Stämmen zu diesem Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung standen. Die besten Ergebnisse bezüglich C_q -Wert und Fluoreszenz-Ausbeute wurden bei einer Primerkonzentration von 400 nM erzielt. Die Unterschiede waren dabei marginal. Mit dieser Primerkonzentration wurde im Anschluss eine Sonden-Matrix mit Konzentrationen von 100 nM, 200 nM, 300 nM und 400 nM durchgeführt (Abb. 23). Die besten Ergebnisse bezüglich C_q -Wert und Fluoreszenz-Ausbeute wurden bei einer Sondenkonzentration von 200 nM erzielt. Diese Werte wurden für das Standard-qPCR-Protokoll übernommen (Tab. 10).

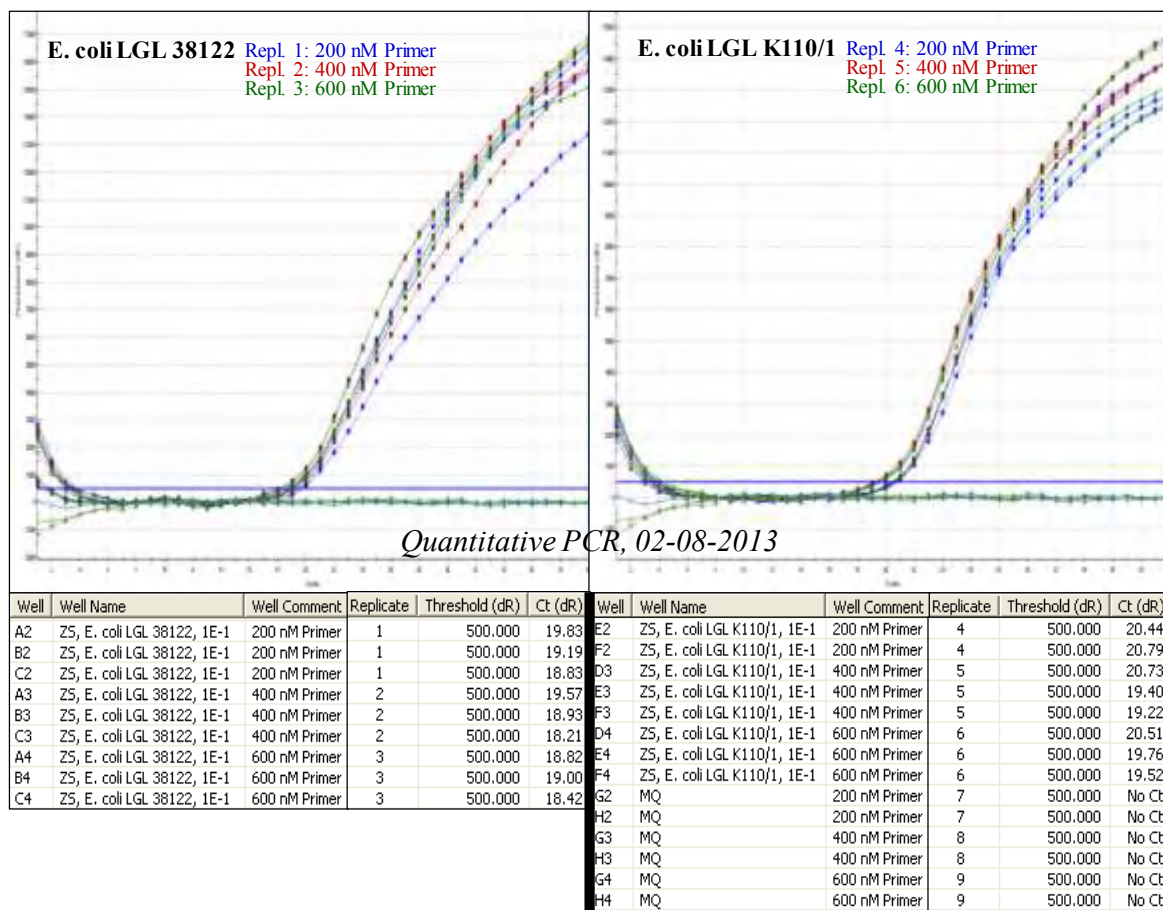


Abb. 22: Amplifikationsplots der Primer-Matrix mit dem ehly-qPCR-Nachweissystem

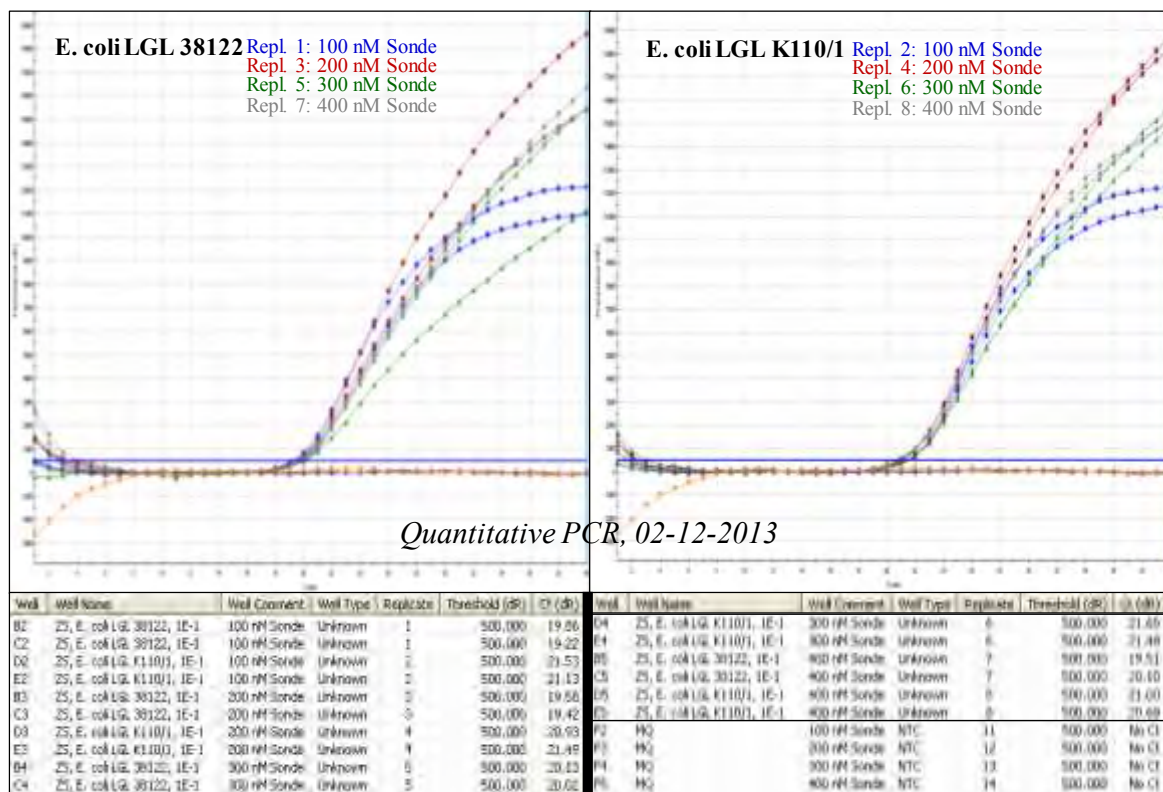


Abb. 23: Amplifikationsplots der Sonden-Matrix mit dem ehly-qPCR-Nachweissystem

4.2.11.4 *In vitro*-Test des *ehly*-Primer/Sonden-Systems (*Ehly*-F/*Ehly*-R/*Ehly*-S):
Herstellung eines Standards

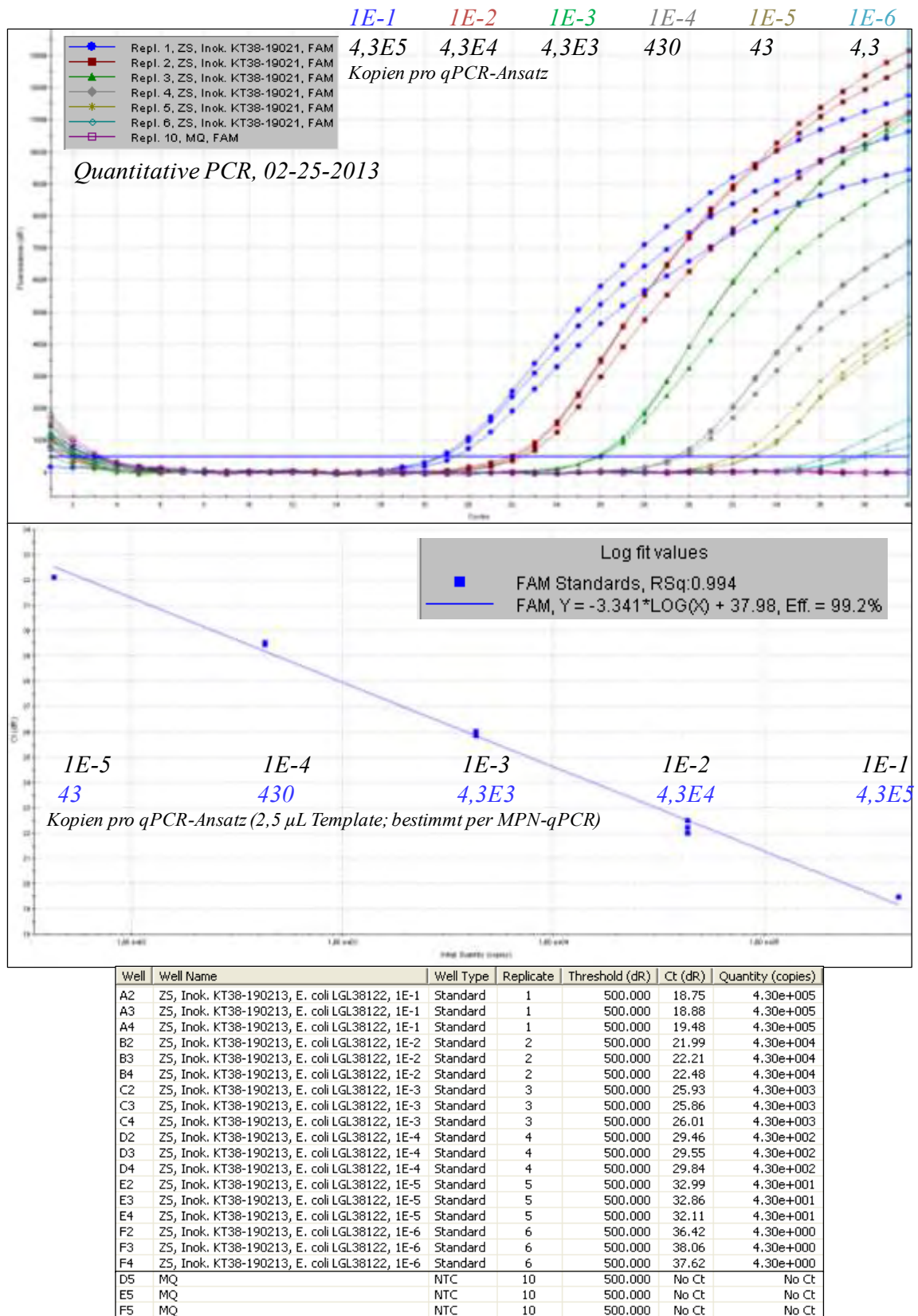


Abb. 24: *ehly*-qPCR-Amplifikationsplots und Standardkurve der Verdünnungsreihe der Zellsuspension EPEC LGL 38122

In Abb. 24 (oben) sind die Amplifikationsplots der *ehly*-qPCR der log-Verdünnungsreihe einer Zellsuspension des EPEC-Stammes LGL 38122 gezeigt. Mittels MPN-Statistik wurde in einem vorangegangenen qPCR-Lauf, bei der noch höhere Verdünnungsstufen (bis 10^{-10}) gemessen wurden, über MPN-Statistik eine *ehly*-Kopien-Anzahl von $4,3 \cdot 10^6$ MPN \cdot qPCR-Ansatz $^{-1}$ bei Einsatz von 2,5 μ L der unverdünnten Zellsuspension kalkuliert. Das entspricht $1,72 \cdot 10^9$ MPN \cdot mL $^{-1}$. Die daraus ermittelte Standardgerade ist ebenfalls in Abb. 24 (Mitte) gezeigt. Die Geradengleichung hat eine Steigung von ca. -3,3 und einen y-Achsen-Abschnitt von ca. 38. Der Standard war somit sehr gut zur Quantifizierung unbekannter Proben geeignet und wurde für weitere Quantifizierungen aliquotiert und eingefroren.

4.2.11.5 *In vitro*-Test des *ehly*-Primer/Sonden-Systems (Ehly-F/Ehly-R/Ehly-S):

Charakterisierung der Stämme in der Stammsammlung

Wie für die Gene *stx1*, *stx2*, *eae* und *uidA*, wurden die in aufgelisteten *E. coli* Stämme mittels der *ehly*-qPCR bezüglich der Anwesenheit des Enterohämolysin-Gens (*ehly*) charakterisiert (siehe Tab. 9).

4.3 Schnellscreening-Ansatz zum Nachweis von EHEC/EPEC

4.3.1 Verkürzung der Analytik und Einführung von qPCR-Analysen

4.3.1.1 Durchführung

Um ein Schnellscreening-Nachweissystem umzusetzen, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten im Kultivierungsablauf (Kapitel 4.1, Abb. 10) qPCR-Analysen integriert mit dem Ziel die Analysezeit zu verkürzen. Beim Nachweis von EHEC aus Umweltproben wurde jeweils nach den Flüssiganreicherungsstufen molekularbiologisch untersucht (Abb. 25).

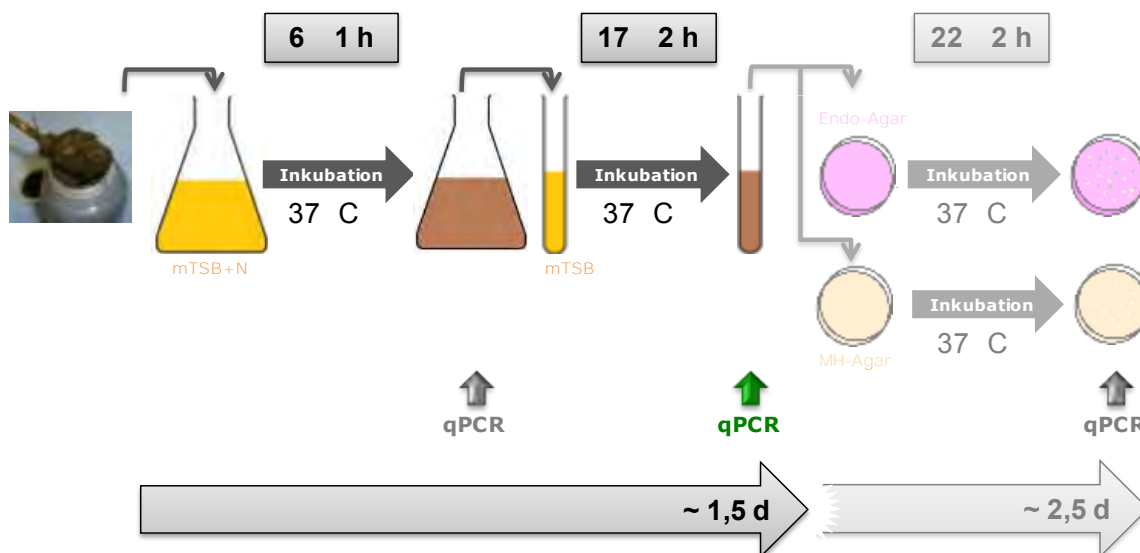


Abb. 25: Schnellscreening-Ansatz zum Nachweis von EHEC/EPEC (1,5 d)

Die qPCR-Analyse von Zellsuspensionen, die vom Zellrasen auf den Agarplatten gewonnen wurden, diente zur Überprüfung des Ergebnisses. Zum Einsatz kamen hier das Multiplex-qPCR-System zum Nachweis der Gene *stx1*, *stx2*, *eae* und *uidA* (4.2.8 und

4.2.9) bei der Untersuchung von Umweltproben (z.B. Gärgemische, Gülle) oder das *ehly*-qPCR-System (4.2.10 und 4.2.11) z.B. in Keimträgerversuchen (siehe Abschlussbericht des Projektes „Verhalten von EHEC und krankheitserregenden Clostridien in Biogasanlagen“ N/11/30 (Fröschle et al., 2015c).

4.3.1.2 Ergebnisse und Diskussion

Bei der qPCR aus der inkubierten Voranreicherung (mTSB+N) konnten bei Umweltproben wie Gärgemischen auf Grund von qPCR-Inhibition keine Signale erhalten werden (Tab. 11). Bei Analysen nach der Hauptanreicherung (mTSB) dagegen wurden für eine Einstufung als EHEC/EPEC bzw. EPEC vergleichbare Ergebnisse wie in den jeweiligen Kontrollen nach Ausplattierung (Endo/MH) erhalten.

Aus der mTSB-Hauptanreicherung resultierten mehr positive qPCR-Einzelergebnisse. Das kann daran liegen, dass eine Entnahme hier aus einer gut durchmischten Probenmatrix stattfand (flüssige, bereits einmal überpipettierte Zellsuspension). Im Vergleich dazu besteht bei der Abnahme Kolonien/ Rasen von einer Agarplatte immer die Gefahr zufällig keine der gesuchten Zellen zu erhalten, obwohl sie möglicherweise an anderer Stelle auf der Platte wachsen. Auch das Wachstum auf halbfestem Medium stellt möglicherweise einen einschränkenden Faktor dar. Viele Mikroorganismen können in Flüssigkultur besser wachsen als auf Agar. Auf Agar kann unter Umständen die Konkurrenz-Mikroflora das Wachstum der gesuchten Mikroorganismen stärker einschränken („Überwuchern“). Die qPCR aus der mTSB-Anreicherung lieferte demnach verlässliche und konsistentere Ergebnisse und wurde als Methode für zukünftige Untersuchungen beibehalten.

Tab. 11: Gegenüberstellung der qualitativen PCR-Ergebnisse aus den verschiedenen Kultivierungsschritten (Probenahme am Pilotbetrieb PB21) und daraus resultierende Einstufung

Proben- name	Voranreicherung				Anreicherung				Platten										
	mTSB +N		qPCR		mTSB		qPCR		Einstufung	MH		qPCR		Einstufung	Endo		qPCR		Einstufung
	nach Augen- schein	stx1 stx2 eae uidA	nach Augen- schein	stx1 stx2 eae uidA	nach Augen- schein	stx1 stx2 eae uidA	nach Augen- schein	stx1 stx2 eae uidA		nach Augen- schein	stx1 stx2 eae uidA	nach Augen- schein	stx1 stx2 eae uidA		nach Augen- schein	stx1 stx2 eae uidA			
PB21-GS	?	-* -* -* -*	?	- - - -	neg.	-	/	/	/	/	neg.	-	/	/	/	/	neg.		
PB21-Ge	?	-* -* -* -*	?	- - + +	EPEC	+	-	-	+ +	EPEC	+	-	-	- +	+	EPEC			
PB21-RiGü	?	-* -* -* -*	?	+ + + +	EHEC	+	+	-	- +	EHEC	+	+	+/-	- +	+	EHEC			
PB21-F1	?	-* -* -* -*	?	+ + + +	EHEC	+	+	+	+	EHEC	+	-	+/-	- +	+	EHEC			
PB21-F2	?	-* -* -* -*	?	+ + + +	EHEC	+	-	+/-	- +	EHEC	+	-	+	+	+	EHEC			
PB21-N	?	-* -* -* -*	?	+ + + +	EHEC	+	-	-	- +	neg.	+	-	+	+	+	EHEC			

PB21 Pilotbetrieb 21; **GS** Grassilage; **Ge**: Getreide; **RiGü**: Rindergülle; **F**: Fermenter; **?**: nicht auswertbar, da getrübt durch Probenmaterial; **-*** negativ durch qPCR-Inhibition; **- bzw. +** negativ bzw. positiv in allen Replikaten; **+/-** ein Replikat positiv und eines negativ; **neg.** EHEC/EPEC-negativ; **EPEC** EPEC-positiv; **EHEC** EHEC/EPEC-positiv; **/** nicht analysiert, da kein Wachstum

4.3.2 Nachweis der DNA lebensfähiger EHEC/EPEC

4.3.2.1 Prinzip

Die DNA-basierte, molekularbiologische Methode der qPCR ermöglicht hoch spezifische, sensitive und äußerst schnelle Analysen. Beim Vorliegen abgetöteter Mikroorganismen überschätzt sie allerdings um diesen Anteil, wenn nur die lebende Fraktion nachgewiesen

werden soll. Sind Angaben zum Anteil lebensfähiger Mikroorganismen gefordert bzw. soll die Abwesenheit dieser nachgewiesen werden, ist es wichtig, mit molekularbiologischen Methoden nur die DNA von lebenden, vermehrungsfähigen Keimen zu erfassen.

Im Rahmen des Projektes wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, schnell zwischen qPCR-Signalen der DNA lebensfähiger und nicht lebensfähiger enterohämorrhagischer/enteropathogener *E. coli* Bakterien (EHEC/EPEC) zu unterscheiden und nur den Anteil lebensfähiger Keime zu quantifizieren.

Außerdem wurde durch die Methode eine weitere Verkürzung der Analysezeit erreicht, da nur ein einziger Kultivierungsschritt, eine leicht verlängerte Voranreicherung in mTSB mit Novobiocin, durchgeführt wurde (Abb. 26).

Vor und nach Inkubation wurden bei diesem zweiten Ansatz qPCR-Analysen gemacht. Das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit lebensfähiger EPEC im Ansatz kann analog zum Vorgehen beim Salmonellen-Schnellscreening-Ansatz anhand des qPCR-Ergebnis-Vergleichs vor und nach Inkubation bestimmt werden (vgl. 3.3, Tab. 3). Bei Unsicherheiten in den Ergebnissen kann die Inkubation weitergeführt werden und auch die Ergebnisse vor und nach Inkubation des Hauptanreicherungs-schrittes in mTSB-Medium können verglichen werden (Abb. 26).

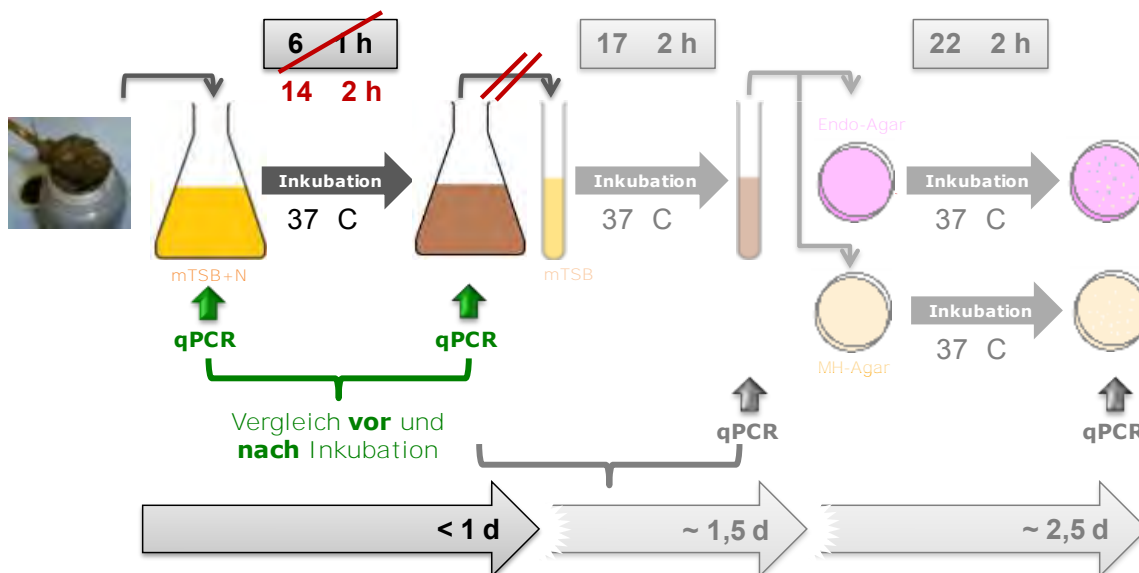


Abb. 26: Schnellscreening-Ansatz zum Nachweis von EPEC (< 1 d)

4.3.2.2 Durchführung

In Biogas-Gärgemisch wurde eine definierte Konzentration an EPEC-Bakterien des Stammes LGL 38122 aus einer exponentiell wachsenden Kultur eingestellt. Das Gemisch wurde in Keimträger gefüllt und den Bedingungen in Labor-Biogasfermentern ausgesetzt. Nach definierten Expositionszeiten wurden EHEC/EPEC in den Keimträgerinhalten kultivierungsbasiert angereichert. Die Kultivierung wurde in Log-Verdünnungsreihen und in Triplikaten durchgeführt, um eine Quantifizierung über MPN-Statistik zu gewährleisten. qPCR-Analysen erfolgten vor und nach der Voranreicherung, nach der Hauptanreicherung und von Zellsuspensionen der Kolonien auf Endo-Agar in sterilem Wasser. Der Nachweis des EPEC-Stammes LGL 38122 erfolgte mit dem qPCR-System für das Gen Enterohämolyisin (*ehly*). Zu beachten war, dass in der Voranreicherung

(mTSB+N) von verschiedenen Proben (z.B. Gülle, Gärgemisch) bei niedrigen Verdünnungsstufen ($< 10^{-2}$) mit qPCR-Inhibition gerechnet werden muss. Das Auftreten von Inhibition ging dabei mit einer stark braunen bzw. grünen Färbung der kulturellen Anreicherung einher.

4.3.2.3 Ergebnisse

Die Exposition gegenüber den Bedingungen in Labor-Biogasanlagen bewirkte eine Reduktion der lebensfähigen EPEC-Bakterien in unterschiedlichem Ausmaß. Dadurch standen drei verschiedene Ausgangssituationen für die Analysen zur Verfügung: Untersuchungsmaterial mit der DNA (I) von ausschließlich lebensfähigen, (II) von lebensfähigen und nicht lebensfähigen und (III) ausschließlich von nicht lebensfähigen Zellen.

Verdünnungen der Voranreicherungskulturen ohne lebensfähige Zellen (III) ergaben in der qPCR entweder kein Signal ($C_q > 40$), wenn die DNA durch die Verdünnung oder durch mikrobiellen Abbau im Fermenter eliminiert wurde, oder ein Signal, das durch die Anwesenheit von DNA inaktivierter Zellen hervorgerufen wurde. Durch die Anwendung der neuen Methodik konnten solche qPCR-Signale von Signalen lebensfähiger Zellen (I oder II) unterschieden werden, indem die C_q -Werte nach Inkubation ($C_q[\text{mTSB+N}]$) mit den C_q -Werten der analogen Verdünnung vor Inkubation ($C_q[\text{BI}]$) verglichen wurden. Wenn $C_q[\text{mTSB+N}] \geq C_q[\text{BI}]$ zutraf, stammte die nachgewiesene DNA von toten EPEC-Zellen. Wenn $C_q[\text{mTSB+N}] < C_q[\text{BI}]$ zutraf, hatten sich lebensfähige EPEC-Zellen vermehrt und eine Zunahme der im Ansatz vorhandenen DNA verursacht (vgl. auch Tab. 3).

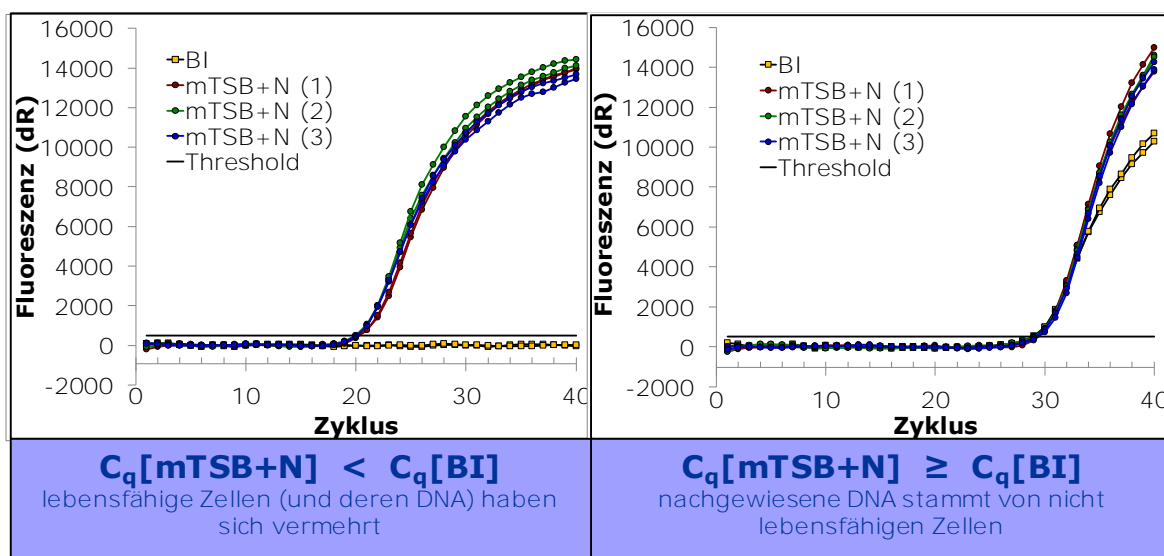


Abb. 27: Vergleich der *ehly*-qPCR-Signale aus Voranreicherungskulturen von EPEC-Bakterien vor (BI) und nach der Inkubation (mTSB+N)

Ein ähnlicher Ansatz wurde zum Vergleich der qPCR-Signale vor und nach der Inkubation der Hauptanreicherung erfolgreich angewendet (Abb. 28). Dabei wurde der Verdünnungsschritt (1:5) bei der Inokulation der Hauptanreicherungskultur berücksichtigt, indem eine Verschiebung des C_q -Werts um 2,3 Zyklen nach hinten einberechnet wurde. Die Ergebnisse wurden mittels qPCR-Analyse der Zellsuspensionen überprüft, die auf Endo-Agar gewachsen waren.

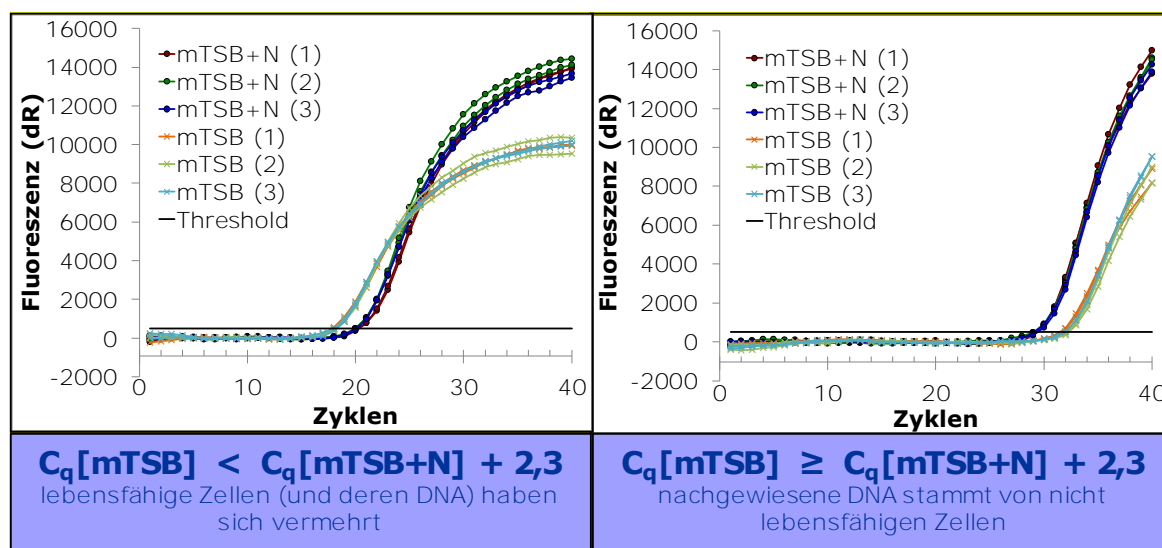


Abb. 28: Vergleich der *ehly*-qPCR-Signale aus Hauptanreicherungskulturen von EPEC-Bakterien vor (mTSB+N) und nach der Inkubation (mTSB)

Die hier vorgestellte neue Methode ermöglicht es, zwischen qPCR-Signalen der DNA lebensfähiger und nicht lebensfähiger EHEC/EPEC-Zellen zu unterscheiden und mittels MPN-Statistik ausschließlich den Anteil lebensfähiger Zellen zu quantifizieren. Die Quantifizierung dauerte weniger als 24 h, wodurch die Analyse-Dauer um ca. 1,5 d im Vergleich zur Referenzmethode gekürzt werden konnte.

Die Methodik wurde mit einer Posterpräsentation auf der internationalen Konferenz Biogas Science vorgestellt (13.4.2.1 und 13.4.2.4 im Anhang).

5 Clostridium botulinum bzw. Botulinum-Neurotoxin-bildende Clostridium spp.

Clostridium botulinum ist ein sporenbildendes, obligat anaerob wachsendes, stäbchenförmiges Bakterium, welches ubiquitär z.B. im Erdboden verbreitet ist. Die Gruppe der Botulinum-Neurotoxin (BoNT)-bildende *Clostridium* spp. ist durch die Fähigkeit zur Bildung von BoNT charakterisiert und umfasst neben *C. botulinum* auch *Clostridium*-Isolate anderer Spezies. Eine ausführliche Beschreibung dieser Gruppe findet sich im Abschlussbericht des Projektes „Verhalten von EHEC und krankheitserregenden Clostridien in Biogasanlagen“ (Fröschle et al., 2015c) sowie bei Fröschle et al. (2015b).

Die kultivierungsbasierte, mikrobiologische und die molekularbiologische Analytik wurden zu großem Teil von entsprechenden Methoden des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) abgeleitet. Die hier vorgestellten Methoden kamen im Verbund-Projekt „Verhalten von EHEC und krankheitserregenden Clostridien in Biogasanlagen“ (N/11/30; Laufzeit: 2011 – 2014; Fröschle et al., 2015c) zur Anwendung.

5.1 Mikrobiologische Analytik

Zur Kultivierung von Botulinum-Neurotoxin (BoNT-) produzierenden Clostridien wie *C. botulinum* wurde die Methode des LGL übernommen, das sich an die Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB: BVL L 06.00-26:1988-12 bzw. DIN 10102:1988-06 (D) bzw. ISO/TS 17919:2013 anlehnt (Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren, 1988) und für die Anwendung an der LfL (z.B. Quantifizierung) erweitert und angepasst.

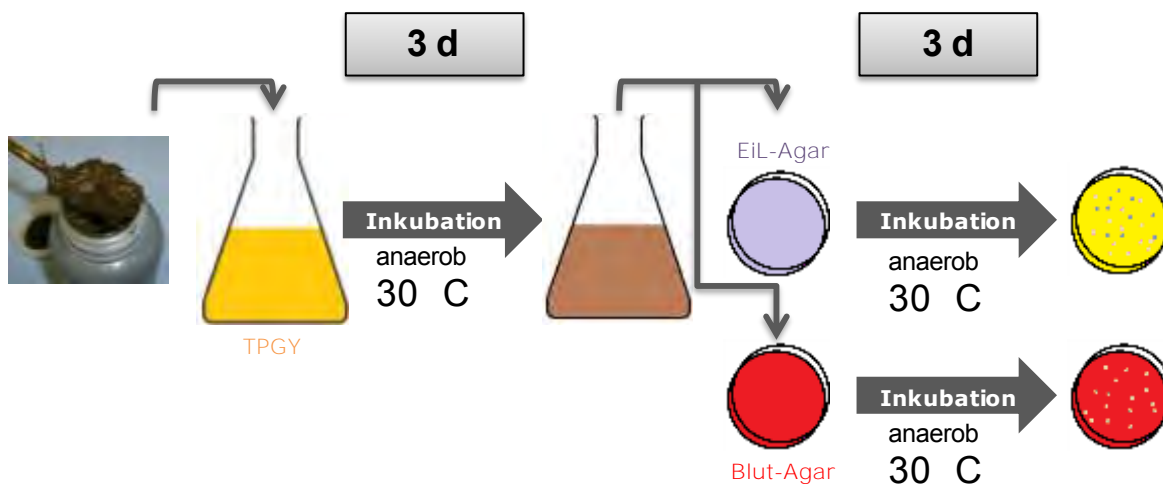


Abb. 29: Schema des mikrobiologischen Kultivierungsablaufs zum Nachweis von BoNT-produzierenden *Clostridium* spp. (in Anlehnung an: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §64 LFGB: BVL L 07.18-1:2002-05)

Der zweistufige Kultivierungsablauf besteht aus einer Anreicherung in Flüssigmedium (TPGY: Trypticase-Phosphat-Glucose-Hefeextrakt-Bouillon) gefolgt von einem Parallelausstrich auf Eigelb-Laktose-(EiL)-Agar (Heipha Dr. Müller GmbH, Deutschland)

und Blut-Agar (Merck KGaA, Deutschland) (Abb. 29). Ein Durchführungsprotokoll zur Kultivierung von *Clostridium botulinum* ist in Anhang 13.1.3 enthalten.

5.2 Molekularbiologische Analytik

Die molekularbiologischen qPCR-Analysen wurden mit Hilfe eines Mx3005P-real-time-PCR-Cyclers (Agilent Technologies, USA) durchgeführt.

Um die Erregergruppe BoNT-produzierende *Clostridium* spp. molekularbiologisch nachzuweisen, wurden verschiedene Real-time (q)PCR-Systeme eingesetzt (Tab. 12):

I) Zum Nachweis dieser Erregergruppe eignet sich insbesondere das Gen *ntnh*, da es in allen von BoNT-produzierenden *Clostridium* spp. vorkommt. Das von ihm gebildete Protein NTNH (nontoxic nonhemagglutinin H) bildet zusammen mit dem eigentlichen Botulinum-Neurotoxin und weiteren Komponenten den Vorläufer-Toxinkomplex und ist als stark konserviertes Gen in allen BoNT-bildenden Stämmen vorhanden (East und Collins, 1994; Inoue et al., 1996; Nakamura et al., 2013). Für *ntnh* wurde ein Singleplex-qPCR-Nachweissystem entwickelt und evaluiert. Die Anwendung erfolgte sowohl für das Screening von Umweltproben als auch für den Nachweis eines Spiking-Stammes in Keimträgerversuchen (*C. botulinum* LGL E2625, siehe auch: Abschlussbericht des Verbund-Projekts „Verhalten von EHEC und krankheitserregenden Clostridien in Biogasanlagen“, N/11/30).

II) Ein publiziertes Multiplex-qPCR-System zum Nachweis von *bont/A*, *bont/B*, *bont/E* und *bont/F* mit einer auf dem pUC-19-Plasmid basierenden, internen Amplifikationskontrolle (IAC, IPC; Messelhäusser et al., 2007) sowie ein weiteres System zum simultanen Nachweis von *bont/C* und *bont/D* (Ziegler, 2013), die am LGL zum Nachweis der Toxingene aus Lebensmitteln verwendet werden, wurden für ihre Eignung zum Einsatz an Proben aus dem Umfeld von landwirtschaftlichen Biogasanlagen überprüft. Die Einzelsysteme wurden getestet, ggf. optimiert und als Singleplex-qPCR angewendet.

Tab. 12: qPCR-Nachweissysteme für die Erregergruppe BoNT-produzierende Clostridium spp./Clostridium botulinum

Bezeichnung	Amplikon [bp]	Sequenz (5'→3')	Länge [nt]	GC [%]	T _m [°C]	Quelle (abgewandelt nach)
ntmH-9a-F	219	AAT TTC WCT TAT YAR TAA AAA AGA HAA THT AA	32	min. 9,4 max. 21,9	min. 52,8 max. 58,0	LfL - dieses Projekt
ntmH-2c-R		GCC ATA CAA ATY ARW TCR AAA TAY TG	26	min. 23,1 max. 38,5	min. 53,8 max. 60,1	LfL - dieses Projekt
ntmH-2d-S		FAM - TAG ATC ART GGT GGA CWS AAT ATT ATA G - BHQ-1	28	min. 32,1 max. 35,7	min. 59,3 max. 60,7	LfL - dieses Projekt
CBOT A fw	112	TCT TAC GCG AAA TGG TTA TGG	21	42,9	55,9	Messelhäußer et al. (2007)
CBOT A re		TGC CTG CAC CTA AAA GAG GA	20	50,0	57,3	Messelhäußer et al. (2007)
CBOT A S		HEX - TGG TTT TGA GGA GTC ACT TGA A - BHQ-1	22	40,9	56,5	Messelhäußer et al. (2007)
CBOT B fw	119	GGA GAA GTG GAG CGA AAA A	19	47,4	54,5	Messelhäußer et al. (2007)
CBOT B re		TTC CCT TGA TGC AAA ATG AT	20	35,0	51,2	Messelhäußer et al. (2007)
2-CBOT B fw	128	TAA TCC AGG AGA AGT GGA GC	20	50,0	57,3	LfL - dieses Projekt
2-CBOT B re		CCT TCC CTT GAT GCA AAA TGA T	22	40,9	56,5	LfL - dieses Projekt
CBOT B S		FAM - CCT GGG CCA GTT TTA AAT GA - BHQ-1	20	45,0	55,3	Messelhäußer et al. (2007)
CBOT E fw	102	TCA GCA CCT GGA CTT TCA GA	20	50,0	57,3	Messelhäußer et al. (2007)
CBOT E re		CAT GTT GTT CTA TAT CAC TTG TTC CA	26	34,6	58,5	Messelhäußer et al. (2007)
CBOT E S		FAM - TCC AAA ATG ATG CTT ATA TAC CAA AA - BHQ-1	26	26,9	55,3	Messelhäußer et al. (2007)
CBOT F fw	116	ATA CGG GGC TAG GGG AGT TA	20	55,0	59,4	Messelhäußer et al. (2007)
CBOT F re		AAA TCC TGA CCT CCA AAG GTT	21	42,9	55,9	Messelhäußer et al. (2007)
CBOT F S		HEX - CCG AAA AAC CCA TAA GGC TA - BHQ-1	20	45,0	55,3	Messelhäußer et al. (2007)
IPC fw	118	TGT GAA ATA CCG CAC AGA TG	20	45,0	55,3	Messelhäußer et al. (2007)
IPC_re		AGC TGG CGT AAT AGC GAA G	19	52,6	56,7	Messelhäußer et al. (2007)
IPC_S		ROX - GAG AAA ATA CCG CAT CAG GC - BHQ-2	20	50,0	57,3	Messelhäußer et al. (2007)

BHQ-1 und -2: Black Hole Quencher[®] 1 und 2, FAM: 6-Carboxyfluorescein, HEX: Hexachloro-6-carboxyfluorescein, ROX: 6-Carboxyl-X-Rhodamine

Fortsetzung umseitig

Tab. 12 qPCR-Nachweissysteme für die Erregergruppe BoNT-produzierende Clostridium spp./Clostridium botulinum (Fortsetzung)

Bezeichnung	Amplikon [bp]	Sequenz (5'→3')	Länge [nt]	GC [%]	T _m [°C]	Quelle
CBOT C fw	128	GGC ACA AGA AGG ATT TGG TG	20	50,0	57,3	Ziegler, 2013
CBOT C re		TTG GAT CCA TGC AAA ATT CA	20	35,0	51,2	Ziegler, 2013
CBOT C S		FAM - TGC AAC TAA TAA TGT AGG AGA GGG - TAMRA	24	41,7	59,3	Ziegler, 2013
CBOT_C_fw2	120	CAC AAG AAG GAT TTG GTG CTT	21	42,9	55,9	LfL - dieses Projekt
CBOT_C_re3		CCA TGC AAA ATT CAG ACT TAG AAA	24	33,3	55,9	LfL - dieses Projekt
CBOT_C_S2		FAM - TCA CCT AGA TTT ATG CTA ACA TAT AG - BHQ-1	26	30,8	56,9	LfL - dieses Projekt
CBOT D fw	103	TGG TTC ACC TTT TAT GGG AGA	21	42,9	55,9	Ziegler, 2013
CBOT D re		CCA ACT ACC ATT TTC AAA CTT TTC	24	33,3	55,9	Ziegler, 2013
CBOT D S		HEX - CGC CTG AAG ATA CAT TTG ATT TT - TAMRA (LfL: BHQ-1)	23	34,8	55,3	Ziegler, 2013

BHQ-1: Black Hole Quencer[®] 1, FAM: 6-Carboxyfluorescein, HEX: Hexachloro-6-carboxyfluorescein

5.2.1 qPCR-Nachweissystem für das Botulinum-Toxin A-Gen (*bont/A*)

5.2.1.1 Alignment

Zuerst wurde ein Alignment mit allen zu diesem Zeitpunkt (März 2013) in der NCBI-Datenbank hinterlegten *bont/A*-Sequenzen aufgebaut. Alle Sequenzen, die den Bereich des Amplikons des *bont/A*-Primer-/Sonden-Systems (CBOT A fw/CBOT A re/CBOT A S, Tab. 12) abdeckten, sind anhand ihrer Accession-Nummern in Tab. 39 im Anhang 13.3.3 aufgelistet.

5.2.1.2 *In silico*-Tests des *bont/A*-Primer-/Sonden-Systems (CBOT A fw/CBOT A re/CBOT A S)

Der Forward-Primer CBOT A fw sowie die Sonde CBOT A S waren identisch mit den entsprechenden Abschnitten aller im Alignment enthaltenen Sequenzen. Der Reverse-Primer erfasste 93 von gesamt 94 Sequenzen vollständig. Für eine Sequenz (HM135956) bestand eine Diskrepanz-Stelle. Eine korrekte Bindung im Verlauf der qPCR dürfte aber auf Grund der Mismatch-Position (Position 1 vom 5'-Ende des Primers) dennoch gewährleistet sein.

Anhand von Nukleotid-BLAST-Analysen wurden die Primer- und Sonden-Sequenzen auf ihre Spezifität hin überprüft und gebilligt. Eine Überprüfung der Schmelztemperaturen T_m (Berechnung siehe 4.2.1) ergab stringente Annealing-Werte von etwas über 55°C (Tab. 12). Da das System mit anderen in einer Multiplex-Anwendung eingesetzt werden sollte, wurde die Annealing-Temperatur von 55°C beibehalten, wie in der Publikation beschrieben (Messelhäusser et al., 2007). Mit Hilfe der Online-Anwendung „Oligo-Analyzer 3.1“ (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) wurden keine nennenswerte Hinweise auf die Bildung von Sekundärstrukturen der Oligonukleotide (Self- und Heterodimere sowie Hairpin-Strukturen) gefunden.

5.2.1.3 *In vitro*-Tests des *bont/A*-Primer-/Sonden-Systems (CBOT A fw/CBOT A re/CBOT A S)

Tab. 13: Eingesetzte Reagenzien und Reaktionsbedingungen für die Singleplex-qPCR zum Nachweis des *bont/A*-Gens (CBOT A fw/CBOT A re/CBOT A S)

Reagenz		Konzentration	
PCR-Puffer (ohne MgCl ₂ , Invitrogen™ Inc., USA)		1x	
MgCl ₂ (Invitrogen™ Inc., USA)		6 mM	
dNTPs (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)		200 µM	
Primer, jeweils		300 nM	
Sonde, jeweils		200 nM	
Platinum-Taq-Polymerase (Invitrogen™ Inc., USA)		0,75 U	
Ziel-DNA/ Zellsuspension (verschiedene Verdünnungen)		5 µL	
Ultra reines, DNase/RNase-freies, destilliertes Wasser (Invitrogen™ Inc., USA)		ad. 25 µL	
PCR-Programm:	Phase	Dauer	Temperatur
	Aktivierung	3 min	95°C
	Denaturierung	15 s	95°C
	Annealing/Extension	60 s	55°C
			} 40 Zyklen

Zunächst wurde das System mit den bei seiner Publikation für Multiplex-Anwendungen vorgestellten Bedingungen im Singleplex getestet. Ein Beispiel-qPCR-Protokoll ist in Tab. 13 wiedergegeben. Als Ziel-DNA wurde ein DNA-Extrakt des Stammes LGL REB 1750 in den Verdünnungsstufen 10^0 bis 10^{-2} eingesetzt, für die jeweils Signale mit hohen Fluoreszenz-Ausbeuten erhalten wurden.

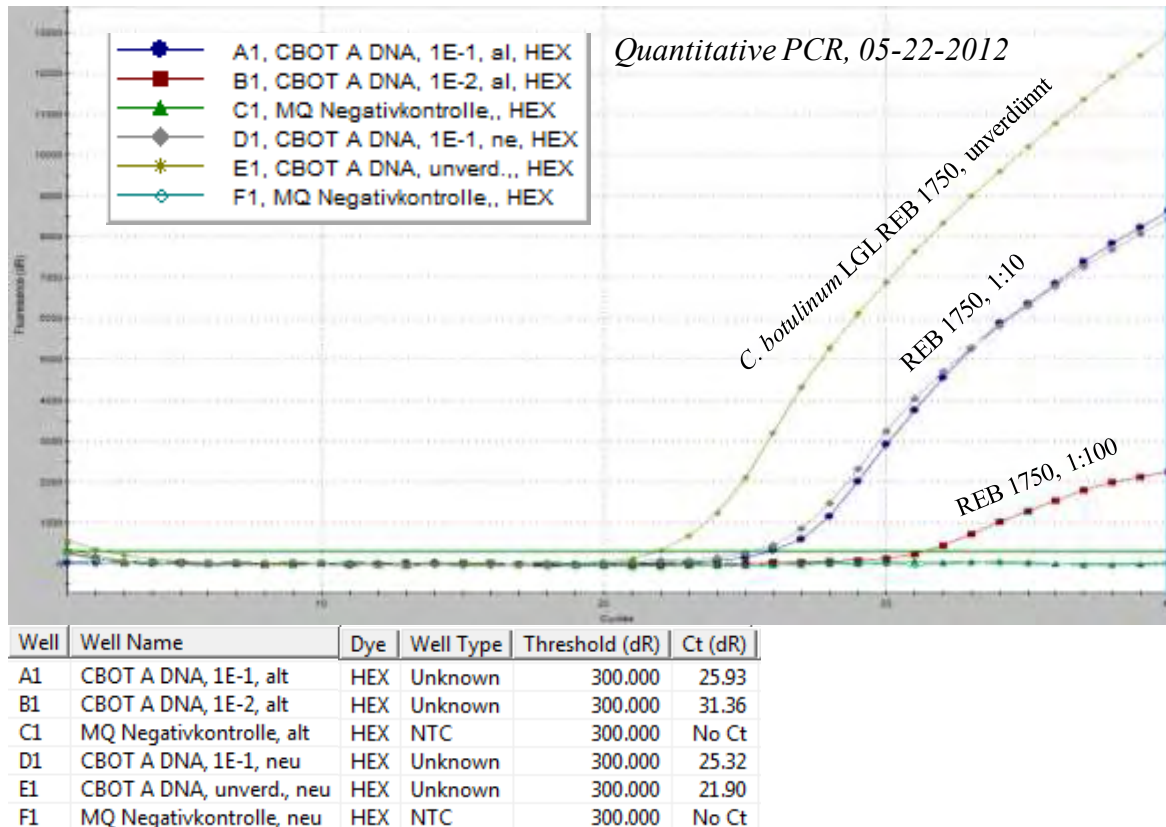


Abb. 30: Amplifikationsplots und C_q -Werte des ersten Tests des *bont/A*-qPCR-Systems im Singleplex

Weiterhin wurde das System *bont/A* (neben anderen Systemen) im Singleplex in einer konventionellen PCR mit Annealing-Temperaturen zwischen 50°C und 60°C getestet (Abb. 31). Das resultierende PCR-Produkt bildete bei allen getesteten Temperaturen relativ schwache Banden aus, die jedoch umso schwächer waren, je niedriger die Temperatur gewählt wurde. Bei $50,1^\circ\text{C}$ wurde keine Bande mehr sichtbar. Das Gel war mit 1,5% Agarose relativ gering konzentriert und erlaubte somit keine ordentliche Auftrennung im niedrigen Längenbereich, in dem auch das *bont/A*-Amplikon lag (112 bp). Eine bessere Auftrennung hätte z.B. mit einem 3%-igen Gel erreicht werden können.

Auf Grund dieses Ergebnisses wurde eine Test-Singleplex-qPCR (ohne Replikate) mit einer Annealing-Temperatur von 60°C durchgeführt. Als Ziel-DNA wurde hier wie beim ersten Test (mit 55°C Annealing-Temperatur) der DNA-Extrakt des Stammes *C. botulinum* LGL REB 1750 in einer 1:10-Verdünnung eingesetzt. Im Vergleich dazu (Abb. 30) wurde bei 60°C ein nahezu unveränderter qPCR-Amplifikationsplot erhalten (C_q -Wert: 26,1; Fluoreszenzausbeute (dR): ca. 9000; nicht dargestellt).

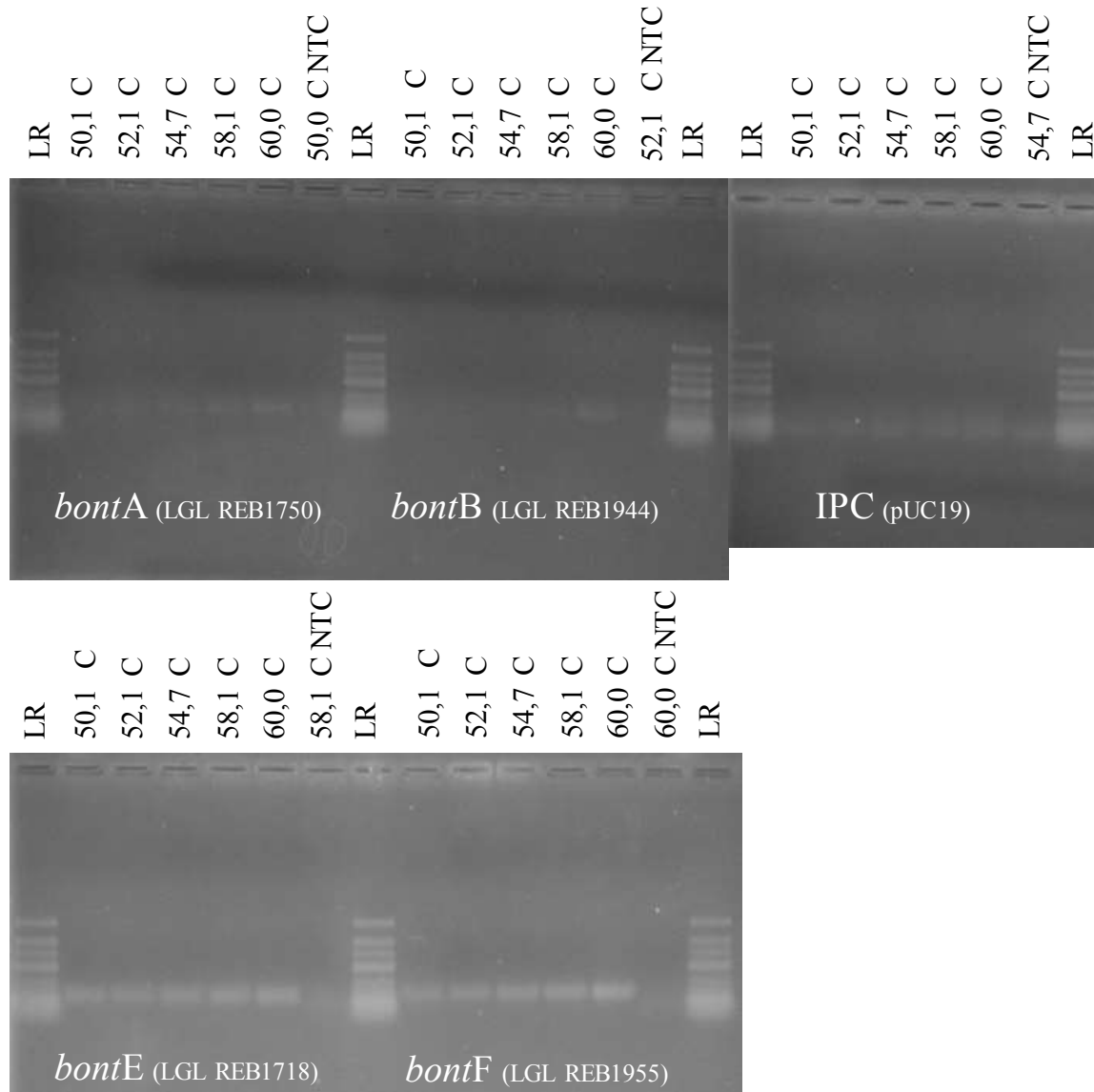


Abb. 31: Gel-Dokumentation der Produkte einer Annealing-Temperatur-Gradienten-PCR (50 - 60°C) jeweils im Singleplex mit den Primersystemen *bontA*, *bontB*, *bontE*, *bontF* und IPC und bei Einsatz von DNA-Extrakten von *C. botulinum* der entsprechenden Genotypen; 1,5% Agarose-Gel; 90 V; 90 min; LR: DNA-Standard (GeneRuler™ Low Range DNA Ladder, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, USA); NTC: Negativkontrolle

Anschließend wurde ein „Sondenmatrix“-Assay mit Sondenkonzentrationen von 100, 200 und 300 nM durchgeführt. Die unterschiedlichen Sondenkonzentrationen wirkten sich nur marginal auf die Signale aus (Abb. 32).

Weitere Tests erfolgten in Multiplex-Assays (siehe 5.2.8).

Das Amplikon des Primer/Sonden-Systems *bontA* (CBOT A fw/CBOT A re/CBOT A S) wurde in einen *E. coli*-Stamm kloniert, um den Klon als Positivkontrolle kryokonserviert aufzubewahren, und das Amplikon wurde sequenziert.

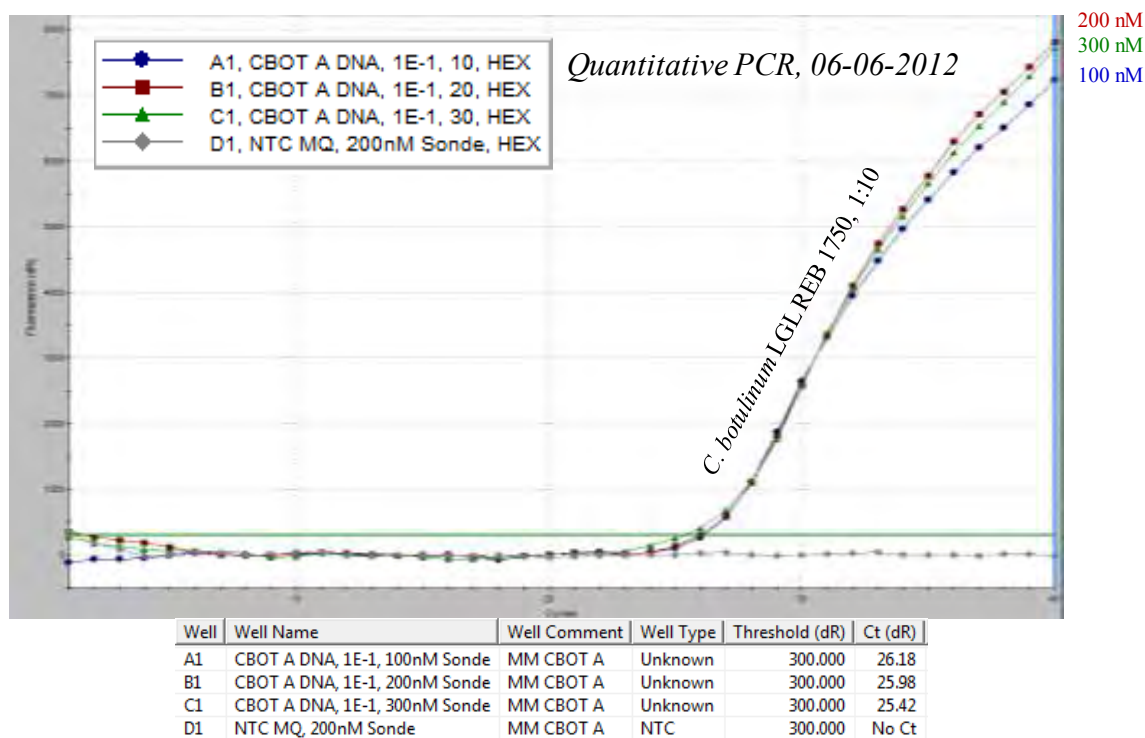


Abb. 32: Amplifikationsplots und C_q -Werte des Sondenmatrix-Versuchs mit dem *bont/A-qPCR*-System im Singleplex

5.2.2 qPCR-Nachweissystem für das Botulinum-Toxin B-Gen (*bont/B*)

5.2.2.1 Alignment

Es wurde ein Alignment mit allen zu diesem Zeitpunkt (Juli 2012) in der NCBI-Datenbank hinterlegten *bont/B*-Gen-Sequenzen gebildet. Alle Sequenzen davon, die das Amplikon des *bont/B*-Primer-/Sonden-Systems (CBOT B fw/CBOT B re/CBOT B S) enthielten, sind in Tab. 40 in Anhang 13.3.3 wiedergegeben.

5.2.2.2 *In silico*-Tests des *bont/B*-Primer-/Sonden-Systems (CBOT B fw/CBOT B re/CBOT B S)

Der Reverse-Primer sowie die Sonde waren identisch mit den im Alignment enthaltenen *bont/B*-Sequenzen. Der Forward-Primer wies bei 4 von gesamt 52 Sequenzen eine Diskrepanz-Stelle an Position 6 bzgl. des 3'-Endes auf (gekennzeichnet in Tab. 40 in Anhang 13.3.3).

Die Schmelztemperaturen der Oligonukleotide lagen insbesondere beim Reverse-Primer CBOT B re (51,2°C, Tab. 12) deutlich unter der in der zu Grunde liegenden Publikation des Multiplex-Primer/Sonden-Systems verwendeten Annealing-Temperatur von 55°C (Messelhäuser et al., 2007) und wichen voneinander ab. Mittels des „Oligo-Analyzer 3.1“ (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) wurden keine Sekundärstrukturen identifiziert, die die Reaktion nennenswert beeinträchtigen könnten.

5.2.2.3 *In vitro*-Tests des *bont/B*-Primer-/Sonden-Systems (CBOT B fw/CBOT B re/CBOT B S)

Die Tests mit dem Primer-/Sondensystem *bont/B* wurden analog zu den Tests mit *bont/A* im Singleplex durchgeführt. Abb. 33 zeigt den Ersten Test, der mit denselben Konzentrationen der Reagenzien und nach demselben qPCR-Temperaturprogramm durchgeführt wurde wie in Tab. 13 für die *bont/A*-qPCR dargestellt. Als Ziel-DNA wurde ein DNA-Extrakt des *C. botulinum* Stammes Typ B LGL REB 1944 in unterschiedlichen Verdünnungsstufen eingesetzt. Die Fluoreszenz-Ausbeute war bei diesem Test im Vergleich zu den Signalen des *bont/A*-Systems (Abb. 30) vergleichsweise gering und überstieg im unverdünnten Ansatz ca. 6000 Einheiten. Bei Einsatz der DNA-Verdünnung 1:100 lieferte die qPCR kein Signal mehr. Dies war ein Hinweis darauf, dass der Nachweis mit dem *bont/B*-Primer-/Sonden-Systems (CBOT B fw/CBOT B re/CBOT B S) ineffizient verlief.

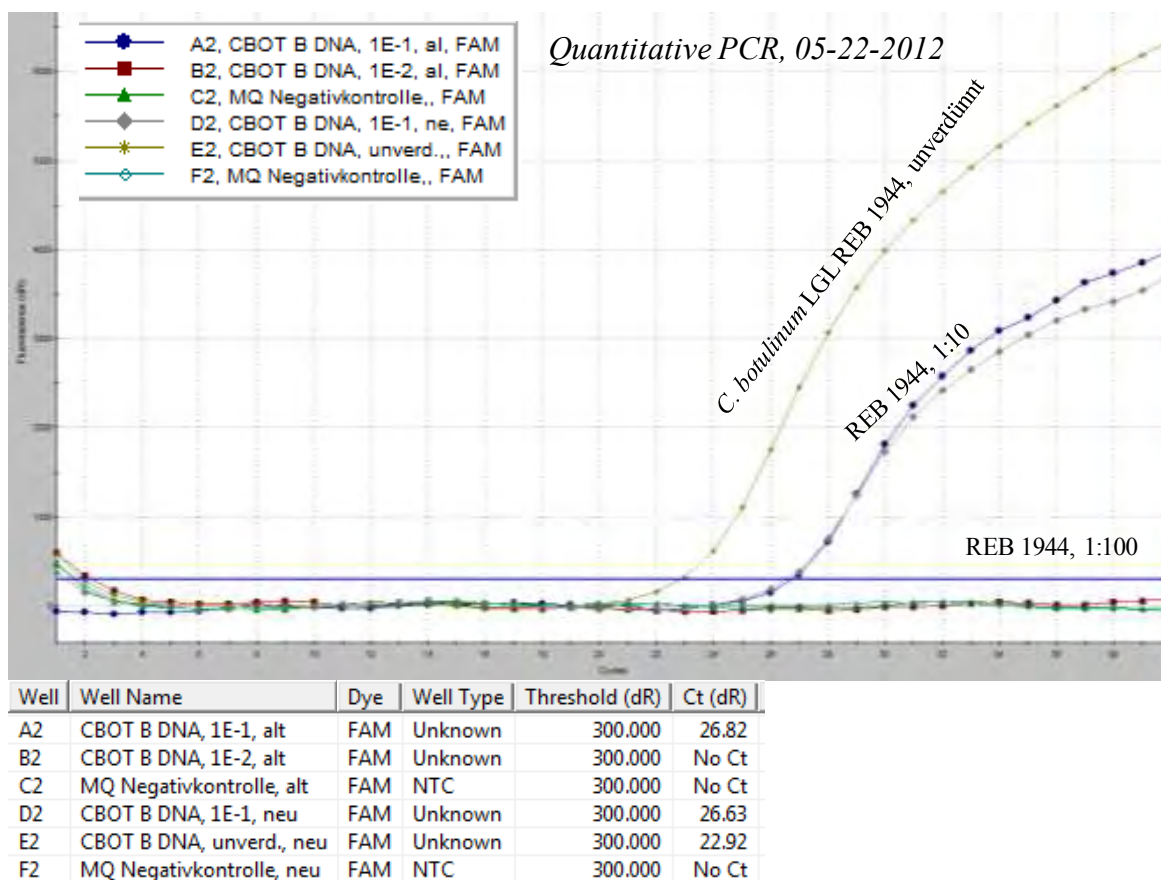


Abb. 33: Amplifikationsplots und C_q -Werte des ersten Tests des *bont/B*-qPCR-Systems im Singleplex

Es wurde ein Annealing-Temperatur-Gradient (50 - 60°C) durchgeführt (siehe auch 5.2.1.3). Das Ergebnis der Gelelektrophorese ist in Abb. 31 gezeigt. Als Ziel-DNA wurde der DNA-Extrakt *C. botulinum* LGL REB 1944 in einer 1:10-Verdünnung eingesetzt. Je niedriger die Annealing-Temperatur im getesteten Bereich war, desto schwächer erschienen die Banden. Bei Annealing-Temperaturen von 54,7°C und geringer waren keine Banden mehr sichtbar. Dies war ein weiterer Hinweis, dass die Amplifikation bei der in der zu Grunde liegenden Publikation des Multiplex-Primer/Sonden-Systems verwendeten Annealing-Temperatur von 55°C (Messelhäuser et al., 2007) nicht optimal ablief.

Ein Test der qPCR in einem kleinen Ansatz (ohne Replikate, Singleplex, Ziel-DNA: Stamm *C. botulinum* LGL REB 1750, 1:10) mit einer Annealing-Temperatur von 60°C brachte verbesserte Ergebnisse. Im Vergleich zum Lauf mit Annealing bei 55°C (Abb. 33) wurde bei 60°C bei einem verschobenen C_q -Wert (ca. 28,8) eine nahezu doppelt so hohe Fluoreszenz- und damit dsDNA-Ausbeute erreicht (nicht dargestellt).

Diese Verschiebung des C_q -Werts kann allerdings auch auf Abnahme der Ziel-DNA im verwendeten Aliquot der 1:10-Verdünnung durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen zurückzuführen sein. Ein Hinweis darauf fand sich auch in der anschließend durchgeführten Sondenmatrix, die wiederum bei einer Annealing-Temperatur von 55°C durchgeführt wurde, da das *bont/B*-System mit den anderen (*bont/A*, IPC) in einem Multiplex-Ansatz eingesetzt wurde. Hier lieferte dieselbe 1:10-Verdünnung des DNA-Extrakts ebenfalls C_q -Werte um 28,5. Das beste Signal bzgl. C_q -Wert und Fluoreszenzausbeute wurde hier bei einer Sondenkonzentration von 300 nM erzielt (Abb. 47).

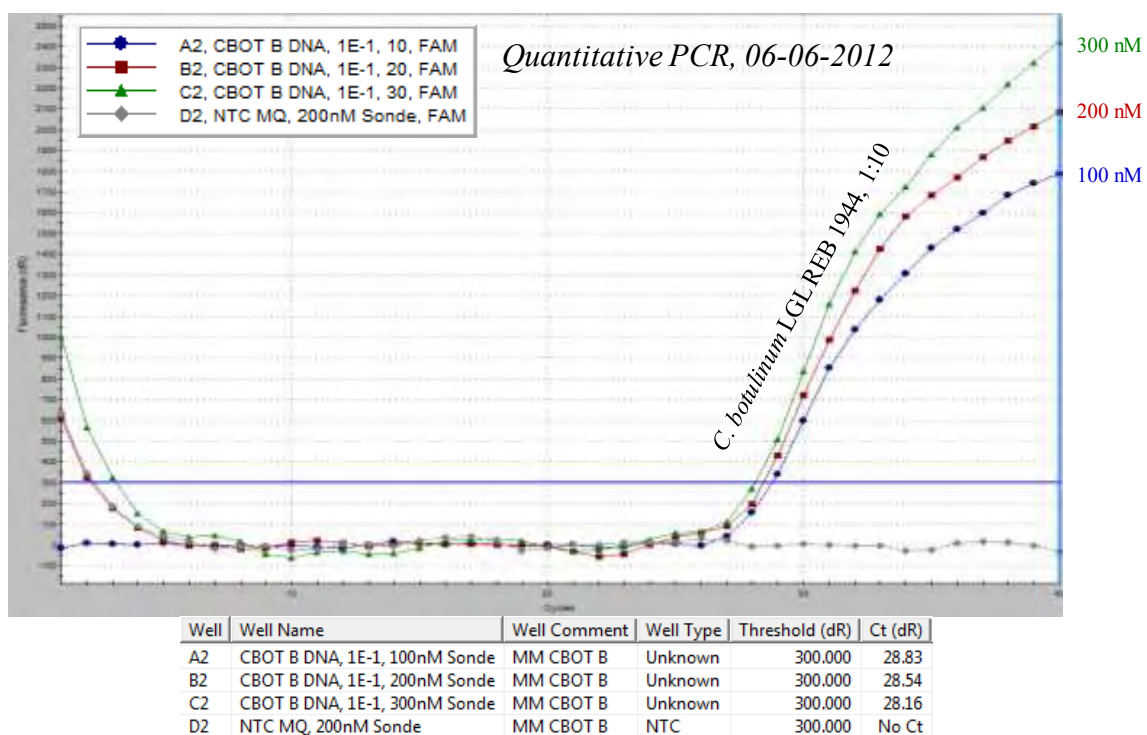


Abb. 34: Amplifikationsplots und C_q -Werte der Sondenmatrix mit dem *bont/B*-qPCR-System im Singleplex

Weitere Tests erfolgten im Multiplex (siehe 5.2.8.1).

5.2.2.4 *In silico*-Tests des *bont/B*-Primer-/Sonden-Systems (2-CBOT B fw/2-CBOT B re/CBOT B S)

Da die Amplifikation bei mit dem ursprünglichen *bont/B*-Primer/Sonden-System (CBOT B fw/CBOT B re/CBOT B S) generell und insbesondere bei der Annealing-Temperatur von 55°C für den Einsatz im Multiplex nicht optimal verlief, wurde das System *in silico* optimiert. Es wurden die abgewandelten Primersequenzen 2-CBOT B fw und 2-CBOT B re abgeleitet (Tab. 12), die deutlich höhere Schmelztemperaturen aufwiesen. Diese kamen zusammen mit der Sonde CBOT B S als qPCR-System zum Einsatz. Auch hier bestanden

anhand des Tests mit dem „Oligo-Analyzer 3.1“ keine Hinweise auf die Bildung beeinträchtigender Sekundärstrukturen.

5.2.2.5 *In vitro*-Tests des *bont*/B-Primer-/Sonden-Systems (2-CBOT B fw/2-CBOT B re/CBOT B S)

In einem ersten Test wurde das neu entwickelte und *in vitro* optimierte *bont*/B-qPCR-System analog zu den in Tab. 13 dargestellten Bedingungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 35 im direkten Vergleich zur qPCR mit dem publizierten Primer-/Sondensatz (CBOT B fw/CBOT B re/CBOT B S) dargestellt. Es wurden bei etwa gleichbleibenden C_q -Werten deutlich verbesserte Signal-Verläufe und Fluoreszenzausbeuten gemessen (z.B. blaue Kurve: ca. 15.000 im Vergleich zu 4000 Fluoreszenz-Einheiten beim alten System).

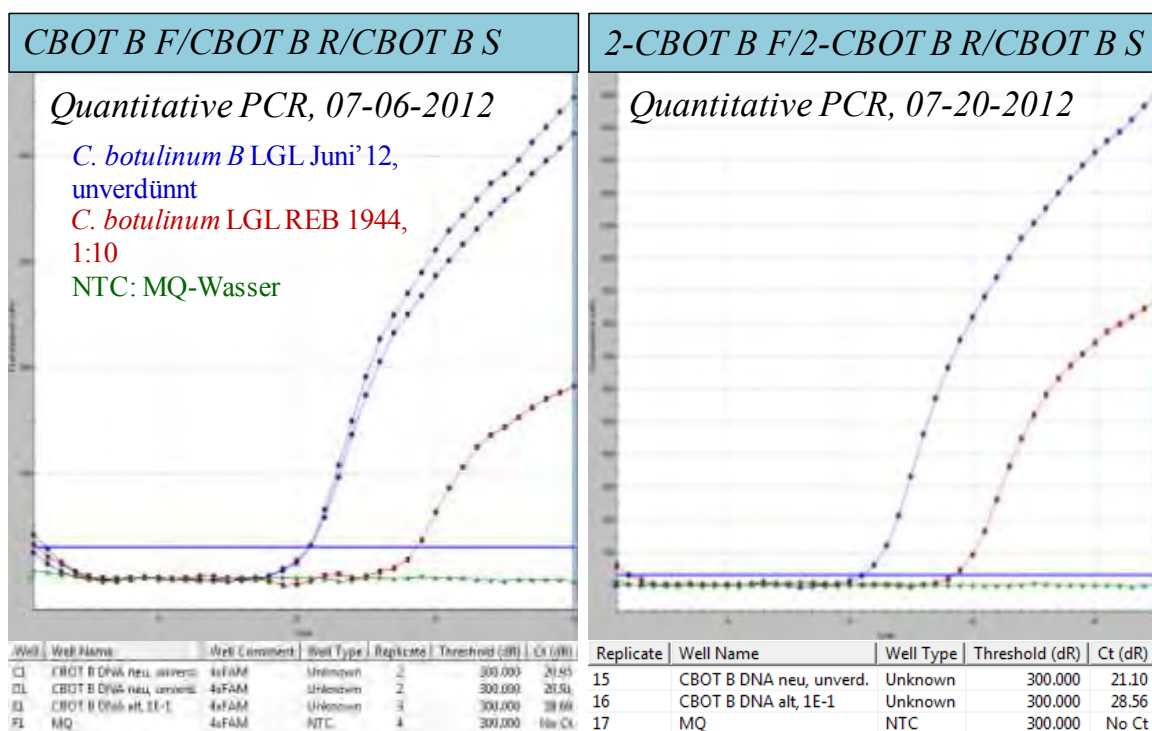


Abb. 35: Vergleich der *bont*/B-qPCR Ergebnisse mit dem publizierten System (CBOT B fw/CBOT B re/CBOT B S) und dem neu entwickelten System (2-CBOT B fw/2-CBOT B re/CBOT B S) für DNA-Extrakte von *C. botulinum* Typ B

Weitere Tests für mit dem Primer-/Sondensystem 2-CBOT B fw/2-CBOT B re/CBOT B S wurden im Multiplex durchgeführt (siehe 5.2.8.2).

Das Amplikon des Primer/Sonden-Systems *bont*/B (2-CBOT B fw/2-CBOT B re/CBOT B S) wurde in einen *E. coli*-Stamm kloniert, um den Klon als Positivkontrolle kryokonserviert aufzubewahren, und das Amplikon wurde sequenziert.

5.2.3 qPCR-Nachweissystem für die interne Positivkontrolle (IPC; pUC19-Plasmid)

5.2.3.1 Alignment und *in silico*-Tests des IPC-Primer-/Sonden-Systems (IPC fw/IPC re/IPC S)

Die Sequenz des Klonierungsvektors pUC19 ist in der NCBI-Datenbank mit der Accession-Nummer L09137 hinterlegt. Die publizierten Primer IPC fw, IPC re und IPC S

(Messelhäusser et al., 2007)grenzen ein Amplikon von 118 nt Länge ab (Tab. 12). Die Primersequenzen sind identisch mit der hinterlegten pUC19-Sequenz.

Nach Überprüfung mit dem „Oligo-Analyzer 3.1“ zeigte sich, dass die Oligonukleotide keine für die Bindung während der qPCR relevanten Sekundärstrukturen ausbilden. Die Schmelztemperaturen der drei Oligonukleotide wichen nicht stark voneinander ab (Tab. 12) und waren etwas höher als 55°C, der in der Publikation verwendeten Annealing-Temperatur des Multiplex-Ansatzes (Messelhäusser et al., 2007).

5.2.3.2 *In vitro*-Tests des IPC-Primer-/Sonden-Systems (IPC fw/IPC re/IPC S)

Als erster Test des IPC-Primer-/Sonden-Systems wurden verschiedene Verdünnungen des pUC19-Plasmids mit dem in Tab. 34 beispielhaft gezeigten Protokoll in die qPCR eingesetzt.

Tab. 14: *Eingesetzte Reagenzien und Reaktionsbedingungen für die Singleplex-qPCR zum Nachweis des pUC19-Plasmids (IPC fw/IPC re/IPC S)*

Reagenz		Konzentration	
PCR-Puffer (ohne MgCl ₂ , Invitrogen™ Inc., USA)		1x	
MgCl ₂ (Invitrogen™ Inc., USA)		6 mM	
dNTPs (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)		200 µM	
Primer, jeweils		300 nM	
Sonde, jeweils		200 nM	
Platinum-Taq-Polymerase (Invitrogen™ Inc., USA)		0,75 U	
pUC19-Pasmid-DNA (verschiedene Verdünnungen)		1 µL	
Ultra reines, DNase/RNase-freies, destilliertes Wasser (Invitrogen™ Inc., USA)		ad. 25 µL	
PCR-Programm:	Phase	Dauer	Temperatur
	Aktivierung	3 min	95°C
	Denaturierung	15 s	95°C
	Annealing/Extension	60 s	55°C
			} 40 Zyklen

Die Ergebnisse der qPCR sind als Amplifikationsplot in Abb. 35 dargestellt. In der publizierten Fassung wird 1 fg pUC19 DNA in die qPCR eingesetzt. Diese Konzentration wurde anhand der Hersteller-Konzentrationsangaben (Thermo Scientific, USA) in den ersten Test der qPCR als geringste Konzentration eingesetzt, ergab jedoch kein qPCR-Signal, obwohl anhand der Verdünnungsstufe und des C_q-Werts der 100 fg/µL-Kurve ein C_q-Wert von ca. 27,7 (21,13+6,6 Zyklen) zu erwarten gewesen wäre. Dieses Ergebnis wies darauf hin, dass die Amplifikation ineffizient ablief oder die Verdünnung 1 fg/µL möglicherweise durch Pipettierfehler beim Erstellen der Verdünnungsreihe nicht mehr ausreichend DNA enthielt.

Die IPC-qPCR wurde weiterhin mittels eines Annealing-Temperatur-Gradienten in einer konventionellen PCR bei Einsatz der 100 fg/µL-Verdünnung untersucht. Die Gelelektrophorese zeigte keine ordentliche Auftrennung, da die Konzentration der Agarose für eine gute Auftrennung von kurzen Amplikons zu gering war (Abb. 31). Unscharfe Banden waren aber bei allen Annealing-Temperaturen zu erkennen und waren umso stärker, je höher die Temperatur stieg. Auch die Positiv-Kontrolle zeigte eine unscharfe Bande. Diese kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass das pUC19-Plasmid ein universelles Klonierungsplasmid ist und von anderen universellen Klonierungsplasmiden abgeleitet ist. Unter Umständen wurde eines dieser auch bei der

Herstellung der Platinum-Taq-Polymerase in *E. coli* verwendet und könnte so in den Mastermix eingetragen worden sein. In diesem Fall fällt aber auf, dass die Negativkontrolle in Abb. 36 kein Signal ergab. Der zusätzliche Einsatz der Sonde könnte in diesem Fall die Spezifität für das eingesetzte pUC19-Plasmid ergeben haben. Dennoch würde dies bedeuten, dass in jeder qPCR das IPC „im Hintergrund“ arbeitet und unnötig Amplifikationskapazität der Polymerase sowie weiterer Reagenzien in Anspruch nimmt, die den eigentlich gewünschten Amplifikationen dann nicht mehr zur Verfügung steht.

Die Durchführung einer qPCR bei einer Annealing Temperatur von 60°C brachte ein verbessertes qPCR-Signal im Hinblick auf einen früheren C_q -Wert und eine verbesserte Fluoreszenzausbeute (nicht dargestellt).

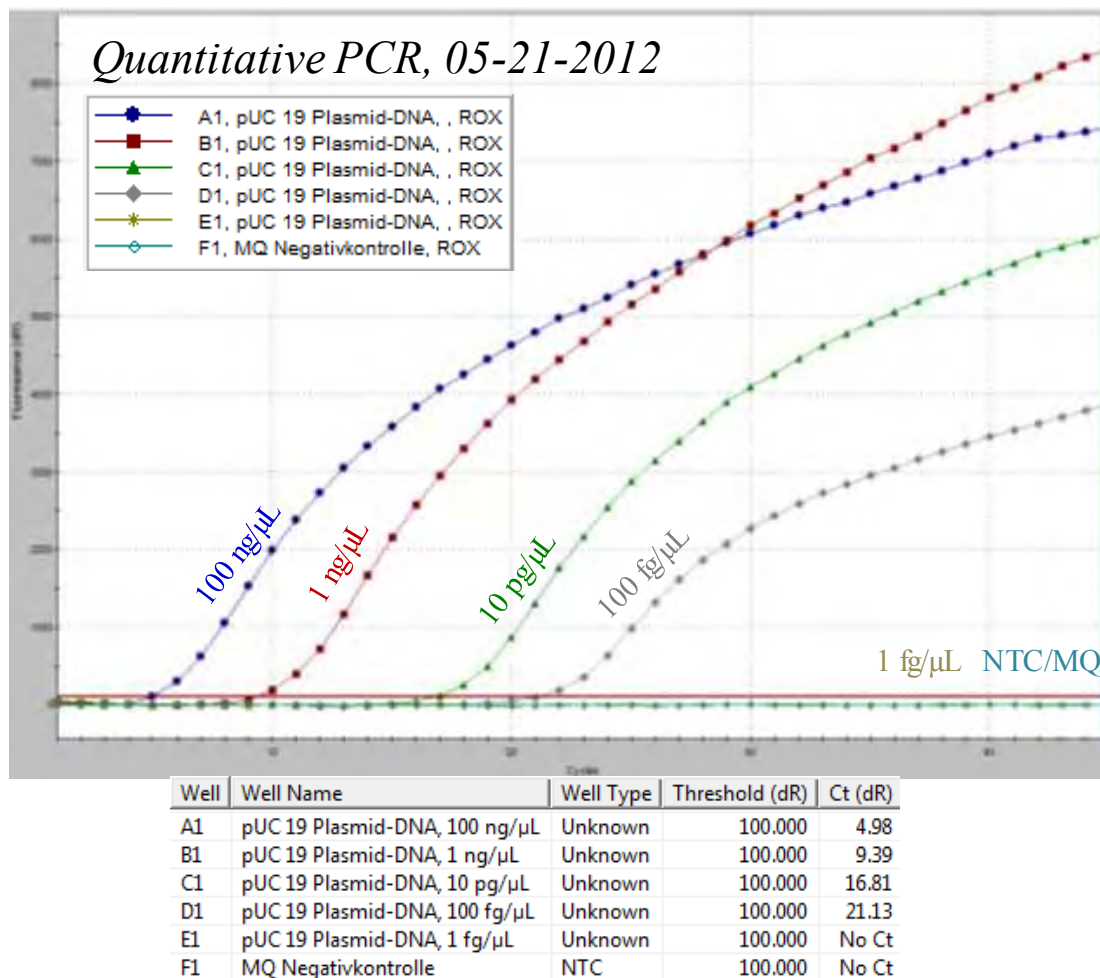


Abb. 36: Amplifikationsplot und C_q -Werte der Verdünnungsreihe des pUC19-Plasmids mit dem IPC-qPCR-Nachweissystem

Die Ergebnisse eines Sondengradientens in kleinem Ansatz (ohne Replikate) ist in Abb. 37 dargestellt. Die Sondenkonzentration 200 nM ergab das beste qPCR-Signal. Deutlich wurde hier auch, dass es offensichtlich relativ schnell zu einer Abnahme der Plasmid-DNA in der Verdünnungsstufe 100 fg/μL gekommen war, da ein Shift von ca. 4 Zyklen vorlag (Vgl. C_q -Werte in Abb. 36 und Abb. 37).

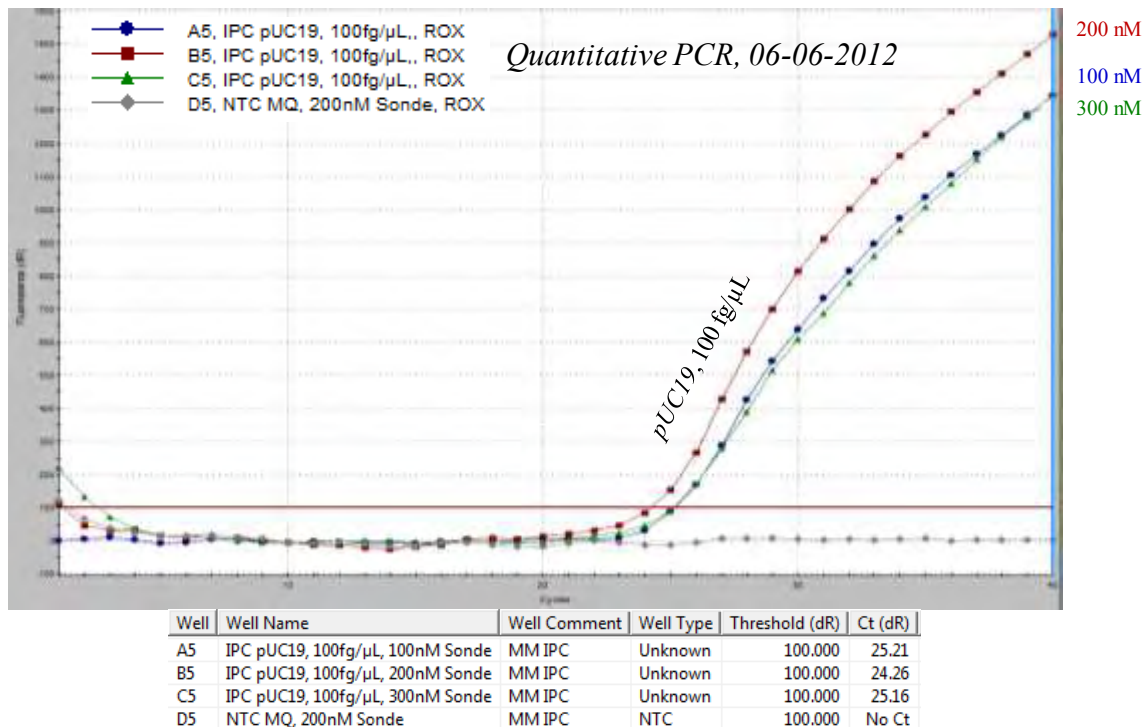


Abb. 37: Amplifikationsplot und C_q -Werte der Sondenmatrix des pUC19-Plasmids mit dem IPC-qPCR-Nachweissystem

Es wurde eine neue Verdünnungsreihe pipettiert. In einem qPCR-Lauf wurde diese parallel mit Einsatz von EvaGreen-DNA-Farbstoff und mit Einsatz von Sonde getestet (Abb. 38). Im obersten Amplifikationsplot sind die Ergebnisse der qPCR mit der Sonde IPC S gezeigt. Die C_q -Werte nahmen auch mit zunehmender Verdünnung zu, allerdings wurde bei höheren Verdünnungsstufen bzw. geringeren DNA-Konzentrationen wie bereits bei der qPCR in Abb. 36 deutlich, dass die qPCR ineffizient ablief. Noch deutlicher wird dies bei den Amplifikationsplots der EvaGreen-qPCR (Abb. 38, Mitte). Offensichtlich fand die Amplifikation mittels der Primer IPC fw/IPC re in allen Ansätzen (inkl. der Negativkontrolle) unabhängig von der hinzu pipettierten pUC19-Konzentration etwa in gleichem Maße statt. Diese Feststellung ist auch stimmig mit dem bei der Annealing-Temperatur-Gradienten-PCR festgestellten Ergebnis (Bande der Negativkontrolle). In der Dissoziationskurve in Abb. 38 (unten) wird zudem deutlich, dass das spezifische Produkt (T_m bei knapp 90°C) umso weniger gebildet wurde, desto geringer die hinzu pipettierte Konzentration war. Demgegenüber wurde aber die Amplifikation der unspezifischen Produkte (T_m bei knapp 80°C) umso größer. In der qPCR mit dem IPC-Primer-/Sonden-System wurde demnach vorwiegend ein unspezifisches Produkt einer DNA gebildet, das auf Grund der immer gleichen Konzentration im Mastermix vorliegen musste. Hier könnte es sich z.B. Reste des unbekanntes Klonierungsplasmids aus *E. coli*, mit dem die Platinum-Taq-Polymerase hergestellt wurde, gehandelt haben.

Obwohl die Sonde die Amplifikation insofern beeinflusst hat, dass nur die tatsächlich gespikten Proben positiv erschienen, war die Amplifikation bei geringen Ziel-DNA-Konzentrationen durch die Amplifikation unspezifischer DNA nur ineffizient möglich. Weitere Tests erfolgten im Multiplex, auf Grund der beschriebenen Probleme bei der Amplifikation musste für eine erfolgreiche Amplifikation und damit eine erfolgreiche interne Amplifikationskontrolle mit dem IPC-System jedoch eine hohe Konzentration von pUC19-Plasmid-DNA gespikt werden. Für eine optimale interne Amplifikationskontrolle

sollte dagegen möglichst wenig Ziel-DNA zugegeben werden müssen, da sonst ggf. Wechselwirkungen auch mit den anderen im Multiplex eingesetzten qPCR-Systemen nicht ausgeschlossen werden können. Die Arbeiten mit diesem System wurden daher sowohl im Singleplex als auch im Multiplex als nicht sinnvoll betrachtet und eingestellt. Das Vorliegen von qPCR-Inhibition konnte auch mit Hilfe anderer qPCR-Systeme ausgeschlossen werden (siehe 5.2.10).

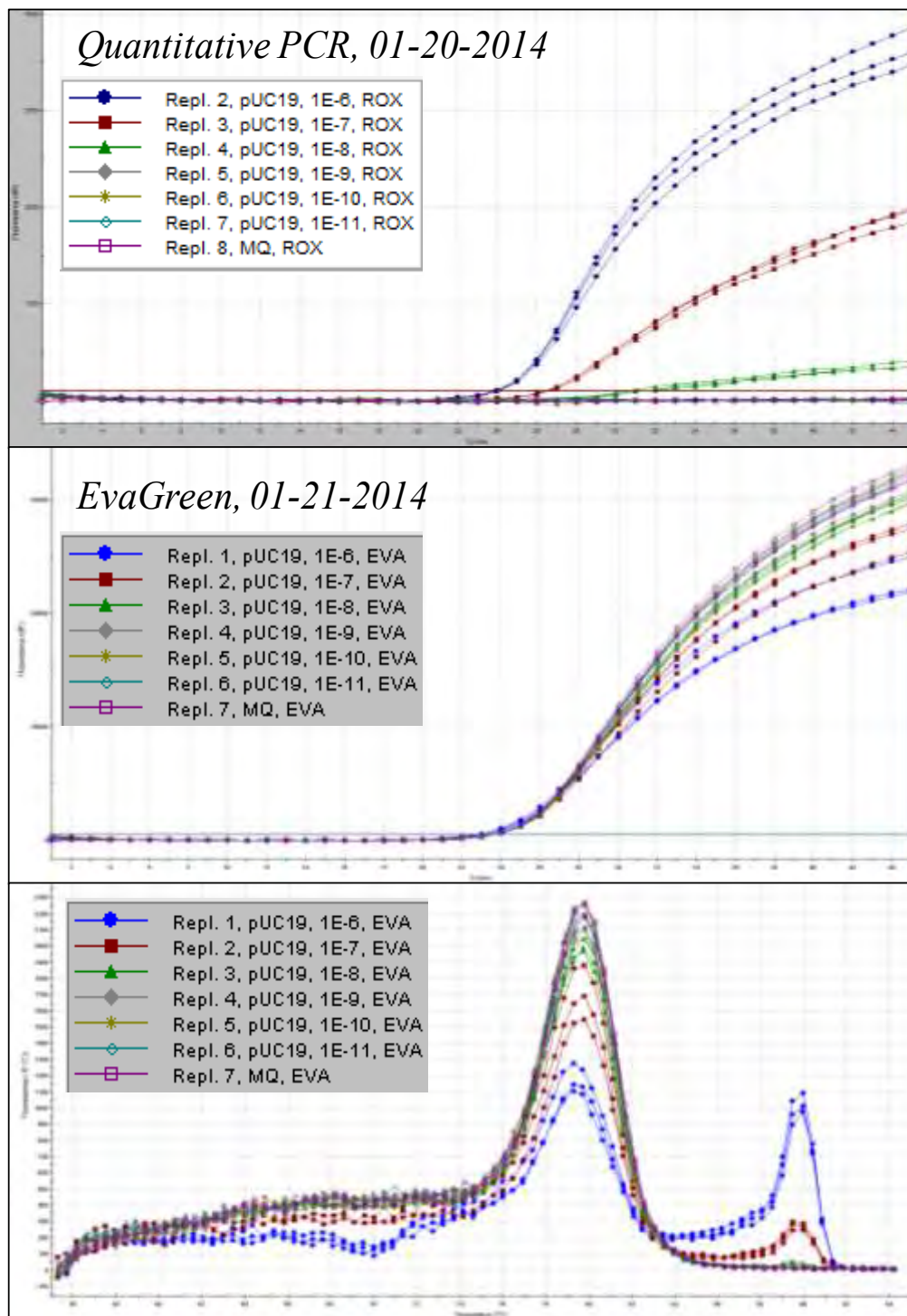


Abb. 38: Amplifikationsplots und C_q -Werte der qPCR mit Sonde (oben) sowie der EvaGreen-qPCR (Mitte) und Dissoziationskurve (unten) einer neuen Verdünnungsreihe des pUC19-Plasmids mit dem IPC-qPCR-Nachweissystem

5.2.4 qPCR-Nachweissystem für das Botulinum-Toxin C-Gen (*bont/C*)

5.2.4.1 Alignment

Alle zu diesem Zeitpunkt (Sept. 2014) in der NCBI-Datenbank von den qPCR-Systemen *bont/C* und *bont/D* abgedeckten *bont/C* und *bont/D*-Sequenzen sowie die Mosaikvarianten *bont/CD* und *bont/DC* wurden zusammen aligniert. Die im Alignment enthaltenen Sequenzen sind in Tab. 41 im Anhang 13.3.3 mit ihrer Übereinstimmung mit den jeweiligen Primern (siehe Tab. 12) dargestellt.

Das publizierte qPCR-System zum Nachweis von *bont/C* (Ziegler, 2013) wurde neben anderen publizierten Oligonukleotid-Sequenzen auf Spezifität überprüft.

5.2.4.2 *In silico*-Tests des *bont/C*-Primer-/Sonden-Systems (CBOT C fw/CBOT C re/CBOT C S)

Die Primer CBOT C fw und CBOT C re erfassten alle im Alignment enthaltenen *bont/C* und *bont/CD*-Sequenzen (Tab. 41; Anhang 13.3.3). Dagegen deckte die Sonde CBOT C S nur die im Alignment enthaltenen *bont/CD*-Sequenzen mit Ausnahme der Sequenz ABDQ0100029 und erfasste keine der *bont/C*-Sequenzen, da eine Diskrepanz-Stelle an Position 13 bezogen auf das 3'-Ende des Primers vorlag.

Die alignierten *bont/D* und *bont/DC*-Sequenzen wurden vom Primer-/Sondensystem CBOT C fw/CBOT C re/CBOT C S ausgeschlossen.

Bei einer Überprüfung der Primer mit dem „Oligo-Analyzer 3.1“ wurde festgestellt, dass der Primer CBOT C re ein Homo-Dimer mit sich selbst bilden kann, so dass eine Überschneidung von 8 Basenpaaren (ΔG : -14,67 kcal pro Mol) entsteht. Dies könnte möglicherweise die Zugänglichkeit des Primers für die Reaktion beeinflussen.

Weiterhin wichen die Schmelztemperaturen der Oligonukleotide CBOT C fw, CBOT C re und CBOT C S mit Werten zwischen 51,2 und 59,3°C stark voneinander ab (Tab. 12) und hatten damit auch eine große Abweichung gegenüber den in der Publikation vorgeschlagenen 55°C zum Annealing-Schritt (Ziegler, 2013)

Auf Grund anhand der Bewertung *in silico* nicht optimal gewählten Oligonukleotid-Sequenzen wurden diese nicht *in vitro* getestet, sondern es wurden andere Sequenzen mit besseren Eigenschaften abgeleitet

5.2.4.3 *In silico*-Tests des *bont/C*-Primer-/Sonden-Systems (CBOT C fw2/CBOT C re3/CBOT C S2)

Das Primer-/Sondensystem CBOT C fw2/CBOT C re3/CBOT C S2 (Tab. 12) wurde anhand der im Alignment enthaltenen *bont/C*- und *bont/CD*-sowie der *bont/D*- und *bont/DC*-Sequenzen (Tab. 41) abgeleitet. Die Schmelztemperaturen wurden durch Anpassen der Oligonukleotid-Länge so eingestellt, dass sie untereinander ähnlich waren und nahe bei 55°C lagen (Tab. 12). Die Sonden-Schmelztemperatur wurde etwas höher gelegt.

Mittels „Oligo-Analyzer 3.1“ wurde die Bildung relevanter Sekundärstrukturen ausgeschlossen.

5.2.4.4 *In vitro*-Tests des *bont/C*-Primer-/Sonden-Systems (CBOT C fw2/CBOT C re3/CBOT C S2)

Mit den in Tab. 14 wiedergegebenen qPCR-Protokoll wurde ein erster Test des Systems *in vitro* durchgeführt. Als Ziel-DNA wurde der DNA-Extrakt eines *C. botulinum*-Stammes Typ C (LGL 280514) eingesetzt, der vom LGL zur Verfügung gestellt wurde. Es wurde sowohl der unverdünnte Extrakt sowie die Verdünnungen 1:10 und 1:100 eingesetzt. (Abb. 39). Nur für den unverdünnten Ansatz wurde ein qPCR-Signal erhalten, die Signale der beiden Verdünnungen waren identisch mit der Negativkontrolle, obwohl anhand des Verdünnungsfaktors Signale bei C_q -Werten von ca. 32,5 bzw. 35,8 erwartet wurden. Dies war ein Hinweis, dass die qPCR mit den zu diesem Lauf verwendeten Bedingungen nicht optimal verlief.

Daher wurden die Verdünnungen des DNA-Extrakts mit den für die Singleplex normalerweise eingesetzten 0,75 U aber unter sonst gleichen Bedingungen bei einer Annealing-Temperatur von 57°C untersucht. Es ergab sich ebenfalls nur ein Signal für den unverdünnten DNA-Extrakt, das zudem einen späteren C_q -Wert von 30,6 hatte und eine geringere Fluoreszenzausbeute (nicht dargestellt) als bei 55°C Annealing-Temperatur.

Tab. 15: Eingesetzte Reagenzien und Reaktionsbedingungen für die Singleplex-qPCR zum Nachweis von *bont/C* (CBOT C fw2/CBOT C re3/CBOT C S2)

Reagenz		Konzentration	
PCR-Puffer (ohne MgCl ₂ , Invitrogen™ Inc., USA)		1x	
MgCl ₂ (Invitrogen™ Inc., USA)		6 mM	
dNTPs (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)		200 μM	
Primer, jeweils		600 nM	
Sonde, jeweils		400 nM	
Platinum-Taq-Polymerase (Invitrogen™ Inc., USA)		1 U	
Ziel-DNA/Zellsuspension (verschiedene Verdünnungen)		5 μL	
Ultra reines, DNase/RNase-freies, destilliertes Wasser (Invitrogen™ Inc., USA)		ad. 25 μL	
PCR-Programm:	Phase	Dauer	Temperatur
	Aktivierung	2 min	94°C
	Denaturierung	15 s	94°C
	Annealing/Extension	60 s	55°C
			} 45 Zyklen

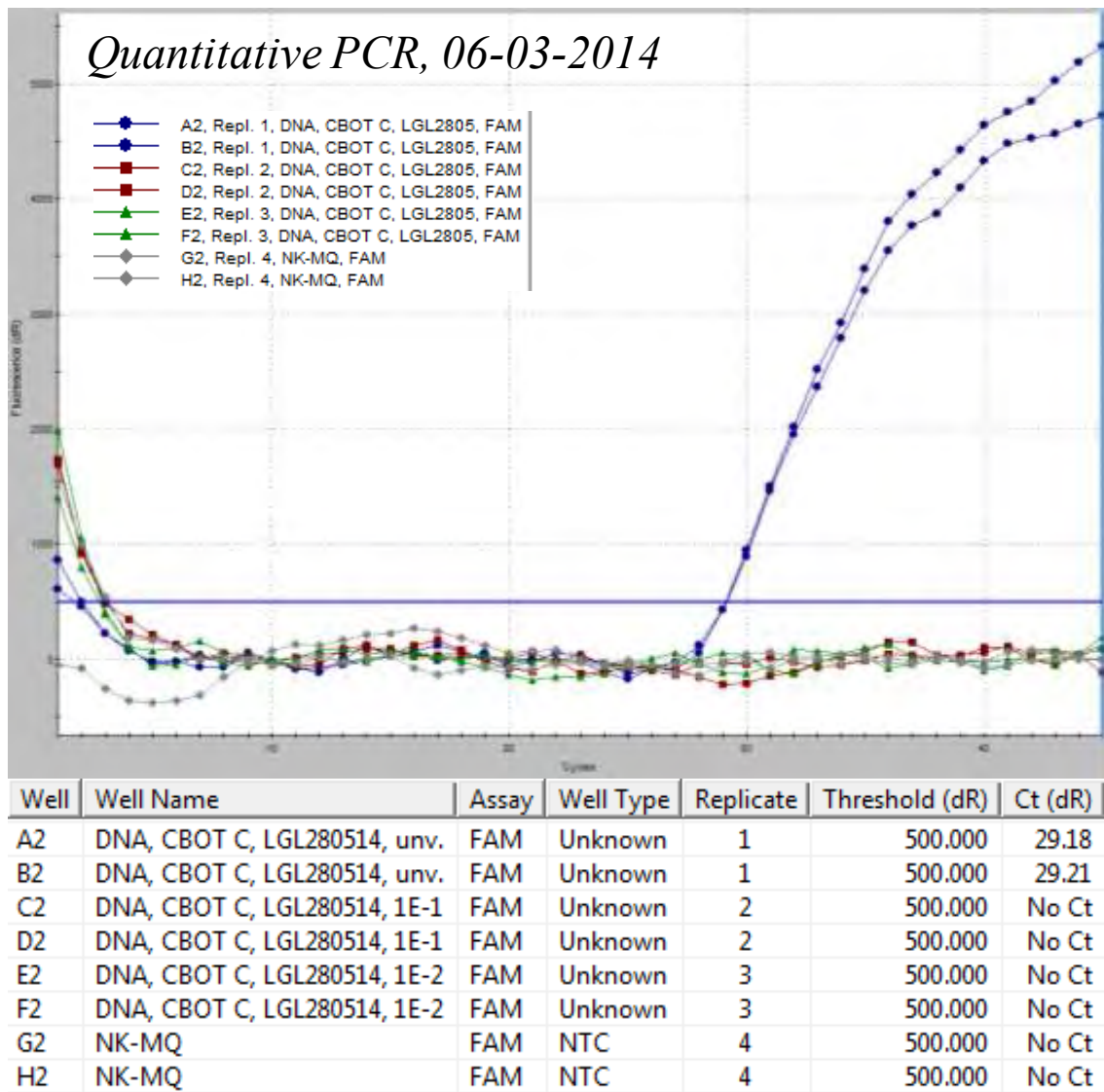


Abb. 39: Amplifikationsplot und C_q -Werte von Verdünnungen eines DNA-Extrakts des Stammes *C. botulinum* Typ C LGL 280514 mit dem bont/C-qPCR-Nachweissystem (CBOT C fw2/CBOT C re3/CBOT C S2)

Tab. 16: Temperaturprogramm mit einem 3-Schritt-PCR-Protokoll für die bont/C-qPCR (CBOT C fw2/CBOT C re3/CBOT C S2)

PCR-Programm:	Phase	Dauer	Temperatur
	Aktivierung	2 min	94°C
	Denaturierung	15 s	94°C
	Annealing	45 s	55°C
	Extension	45 s	72°C
			} 45 Zyklen

Weiterhin wurde versucht, die Amplifikation durch die Anwendung eines 3-Schritt-Protokolls (Tab. 16) zu optimieren. Dabei wurden jeweils 10 μ L, 5 μ L und 2,5 μ L des bereits zuvor eingesetzten, unverdünnten DNA-Extrakts als Ziel-DNA verwendet und jeweils 55 und 58°C Annealing-Temperatur (Abb. 40).

Die Signale der qPCR waren im 3-Schritt-Protokoll bei 55°C deutlich verbessert bzgl. C_q -Wert und Fluoreszenz-Ausbeute gegenüber dem 2-Schritt-Protokoll bei 55°C Annealing-

Temperatur (Vgl. Abb. 39 und Abb. 40, rote Kurve). Ebenfalls verbesserte Signale wurden beim 3-Schritt-Protokoll erhalten, wenn 58°C Annealing-Temperatur statt 55°C verwendet wurden (Abb. 40).

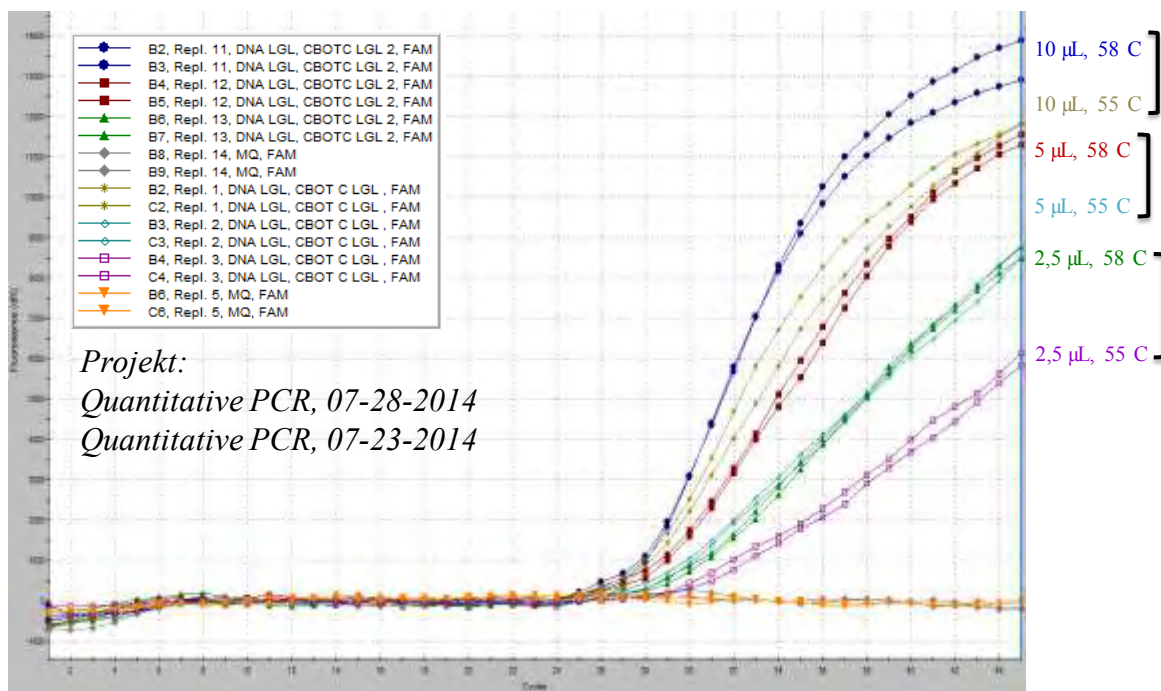


Abb. 40: Amplifikationsplots bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen (55 und 58°C) in der einer 3-Schritt-qPCR mit dem *bont/C*-Nachweissystem (CBOT C fw2/CBOT C re3/CBOT C S2)

Wurden jedoch die Produkte einer Amplifikation aus dem DNA-Extrakt der Positivkontrolle (*C. botulinum* Typ C Stamm LGL 280514) bei 2-Schritt- bzw. 3-Schritt-PCR durch Gelelektrophorese aufgetrennt (Spur 3 und 8 in Abb. 41), wurde deutlich, dass beim 3-Schritt-Protokoll neben dem spezifischen Produkt von 120 bp ein unspezifisches Produkt von ca. 330 bp bevorzugt gebildet wurde, während dieses unspezifische Produkt beim 2-Schritt-Protokoll nicht amplifiziert wurde.

Offen bleibt die Frage, ob das unspezifische Produkt in der 3-Schritt-PCR auch die verbesserte Fluoreszenz- bzw. DNA-Ausbeute erklärt, die in der qPCR gemessen wurde (Abb. 40). Wäre dies der Fall, müsste die Sonde auch das unspezifische Produkt binden. Das ist unwahrscheinlich, so dass die verbesserten Amplifikationsplots vermutlich auf die ebenfalls durch das 3-Schritt-Protokoll verbesserte Amplifikation des spezifischen Amplikons zurückgehen.

Das spezifische Amplikon des Primer/Sonden-Systems *bont/C* (CBOT C fw2/CBOT C re3/ CBOT C S2) wurde aus einem Gel eluiert und in einen *E. coli*-Stamm kloniert, um den Klon als Positivkontrolle kryokonserviert aufzubewahren, und das Amplikon wurde sequenziert. Die PCR-Produkte mit den Primern CBOT C fw2 und CBOT Cre3 eines aus den Klonen isolierten Plasmids sind ebenfalls mittels Gelelektrophorese aufgetrennt worden (Spuren 1,2, 6 und 7 in Abb. 41). Hier wurde nur das spezifische Amplikon von 120 bp gebildet.

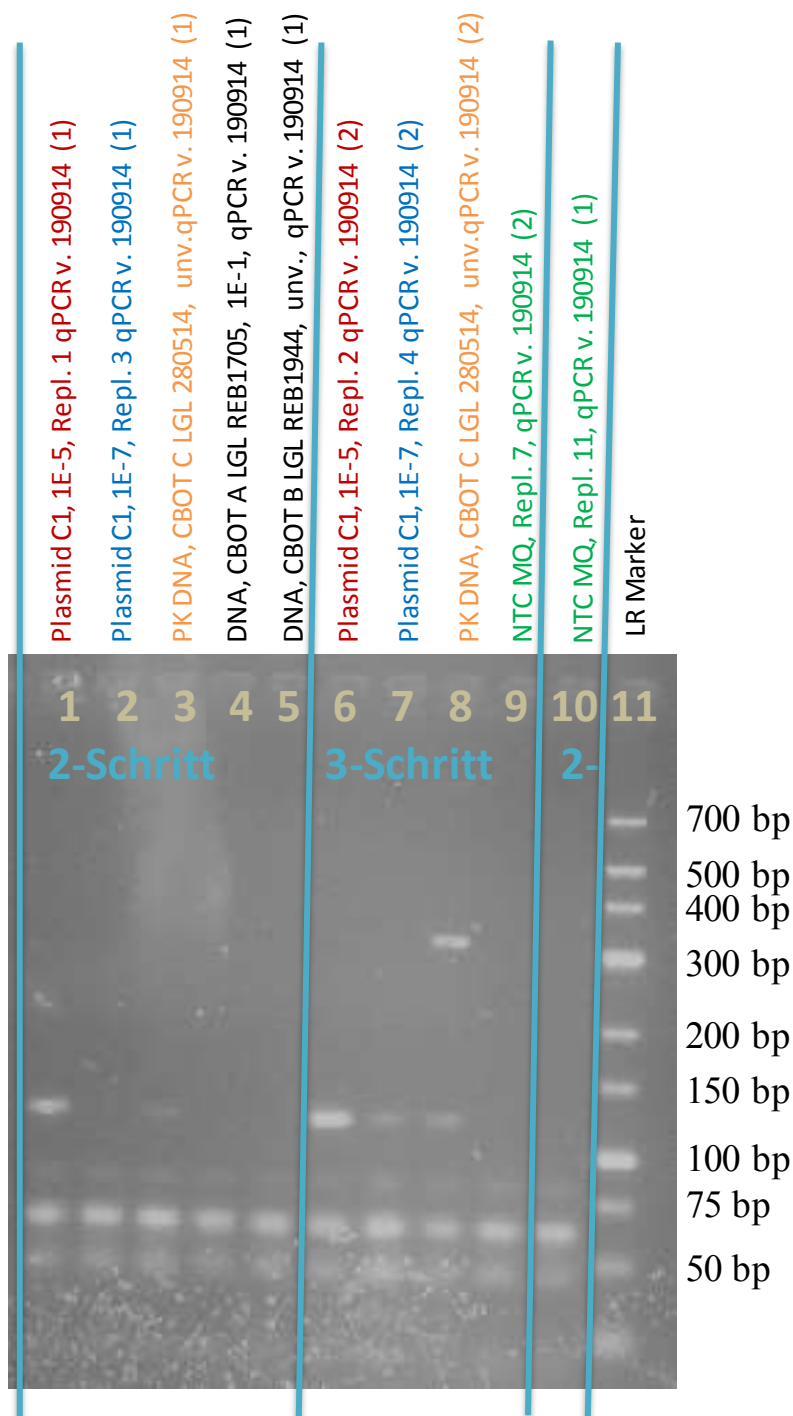


Abb. 41: Gel-Dokumentation des Vergleichs der Produkte einer 2-Schritt- und einer 3-Schritt qPCR mit Annealing bei 58°C mit den Primersystemen bont/C(CBOT C fw2/CBOT C re3/CBOT C S2); 3% High-Resolution-Agarose-Gel; 100 V; 80 min; DNA-Standard: GeneRuler™ Low Range DNA Ladder, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, USA); NK: Negativkontrolle; spezifisches Produkt: 120 bp

Insgesamt lieferte das bont/C-qPCR-Nachweissystem (CBOT C fw2/CBOT C re3/CBOT C S2) damit keinen zufriedenstellenden Nachweis von *C. botulinum* Typ C bzw. Mosaik-Typ CD-Stämmen.

5.2.5 qPCR-Nachweissystem für das Botulinum-Toxin D-Gen (*bont/D*)

5.2.5.1 Alignment

Alle zu diesem Zeitpunkt (Sept. 2014) in der NCBI-Datenbank von den qPCR-Systemen *bont/C* und *bont/D* abgedeckten *bont/C* und *bont/D*-Sequenzen sowie die Mosaikvarianten *bont/CD* und *bont/DC* wurden zusammen aligniert (5.2.4.1). Die im Alignment enthaltenen Sequenzen sind in Tab. 41 im Anhang 13.3.3 mit ihrer Übereinstimmung mit den jeweiligen Primern (siehe Tab. 12) dargestellt.

5.2.5.2 *In silico*-Tests des *bont/D*-Primer-/Sonden-Systems (CBOT D fw/CBOT D re/CBOT D S)

Die publizierten Primer CBOT D fw und CBOT D re und die Sonde CBOT D S (Ziegler, 2013) erfassten alle im Alignment enthaltenen *bont/D* und *bont/DC*-Sequenzen (Tab. 41; Anhang 13.3.3). Die alignierten *bont/C* und *bont/CD*-Sequenzen wurden vom Primer-/Sondensystem CBOT D fw/CBOT D re/ CBOT D S ausgeschlossen.

Die Schmelztemperaturen der Primer und der Sonde waren mit Werten zwischen 55,3 und 55,9°C relativ ähnlich und lagen nahe bei der in der Publikation vorgeschlagenen Annealing-Temperatur von 55°C (Ziegler, 2013).

Durch eine Überprüfung mit dem „Oligo-Analyzer 3.1“ wurden keine relevanten Sekundärstrukturen der Oligonukleotide festgestellt.

5.2.5.3 *In vitro*-Tests des *bont/D*-Primer-/Sonden-Systems (CBOT D fw/CBOT D re/CBOT D S)

In einem ersten Test mit dem Primer-/Sonden-Nachweissystem CBOT D fw/CBOT D re/CBOT D S wurden dieselben Reaktionsbedingungen gewählt wie in Tab. 15 für das *bont/C*-System dargestellt. Als Ziel-DNA kam ein DNA-Extrakt des LGL vom Stamm *C. botulinum* Typ D LGL 68986 im unverdünnten und 1:10-verdünnten Zustand zum Einsatz. Die resultierenden Amplifikationsplots sind in Abb. 42 dargestellt.

Derselbe DNA-Extrakt (unverdünnt) wurde in einer Primermatrix-qPCR mit Konzentrationen von 200, 400 und 600 nM bei einer verringerten Konzentration der Platinum-Taq-Polymerase von 0,75 U und der Sonde von 200 nM eingesetzt (Abb. 43). Dabei wurde in einem parallelen Ansatz der DNA-Extrakt einer *C. botulinum*-freien TPGY-Anreicherung aus Material des Nachgärers der Pilot-Biogasanlage PB17 (siehe Abschlussbericht des Projekts „Verhalten von EHEC und krankheitserregenden Clostridien in Biogasanlagen“ (N/11/30; Laufzeit: 2011 – 2014) (Fröschle et al., 2015c)) zugegeben, um die optimale Sondenkonzentration in Anwesenheit der DNA der in TPGY-Anreicherung vorhandenen Mikroflora zu bestimmen (Abb. 43, Mitte). In beiden Fällen erzielte eine Primerkonzentration von 400 nM die beste Fluoreszenz- bzw. DNA-Ausbeute. Der C_q -Wert war bei Zugabe der DNA einer Reinkultur bei 600 nM Primer und bei DNA einer Mischkultur bei 400 nM etwas geringer als bei anderen Konzentrationen.

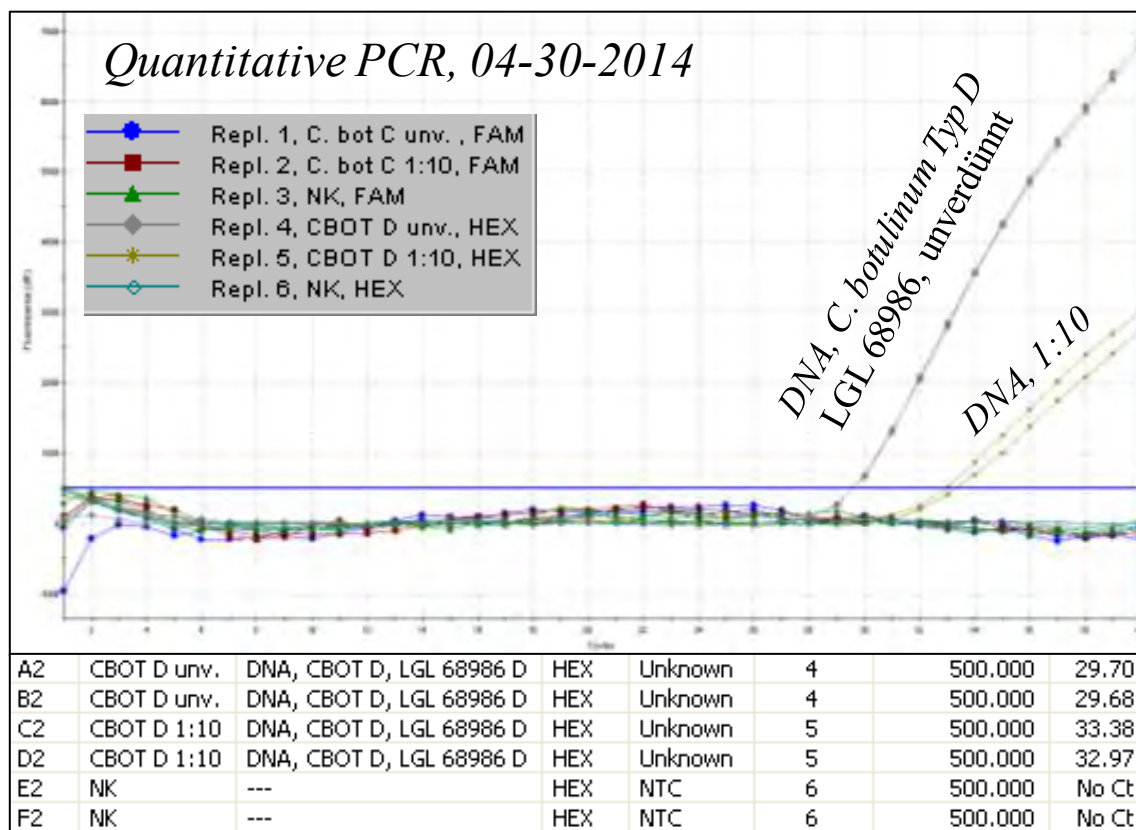


Abb. 42: Amplifikationsplots und C_q -Werte des ersten Tests der qPCR mit dem *bont/D*-Nachweissystem (*CBOT D fw/CBOT D re/CBOT D S*)

Weitere qPCR-Läufe wurden mit einer Primer- und Sondenkonzentration von 400 nM durchgeführt. Das System wurde ausschließlich als Singleplex eingesetzt.

Das Amplikon des Primersystems *bont/D* (*CBOT D fw/CBOT D re/CBOT D S*) wurde in einen *E. coli*-Stamm kloniert, um den Klon als Positivkontrolle kryokonserviert aufzubewahren, und das Amplikon wurde sequenziert.

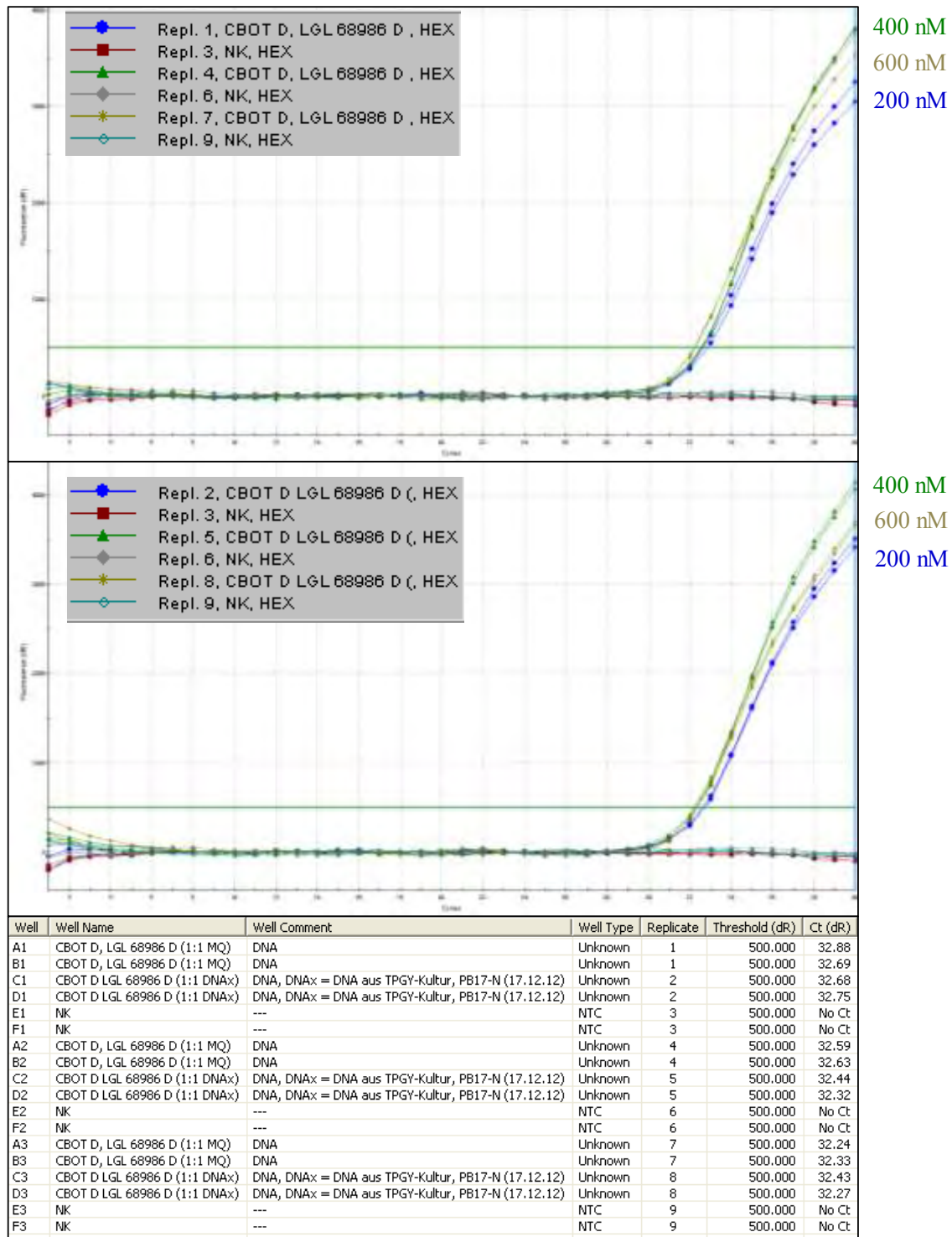


Abb. 43: Amplifikationsplots des DNA-Extrakts Stamms *C. botulinum* Typ D LGL 68986 (unverdünn) rein (oben) und gemischt (Mitte) mit dem *C. botulinum*-freien DNA-Extrakt einer TPGY-Anreicherung in einer Primermatrix-qPCR mit dem bont/D-Nachweissystem und Cq-Werte (unter)

5.2.6 qPCR-Nachweissystem für das Botulinum-Toxin E-Gen (*bont/E*)

5.2.6.1 Alignment

Alle zu diesem Zeitpunkt (Mai 2012) in der NCBI-Datenbank vom Primersystem *bont/E* abgedeckten *bont/E*-Sequenzen wurden aligniert. Die im Alignment enthaltenen Sequenzen sind in Tab. 42 im Anhang 13.3.3 dargestellt.

5.2.6.2 *In silico*-Tests des *bont/E*-Primer-/Sonden-Systems (CBOT E fw/CBOT E re/CBOT E S)

Die publizierten Primer CBOT E fw und CBOT E re und die Sonde CBOT E S (Messelhäusser et al., 2007) erfassten den Großteil aller im Alignment enthaltenen *bont/E*-Sequenzen (Tab. 42; Anhang 13.3.3). Der Forward-Primer CBOT E fw erfasste alle Sequenzen im Alignment, die Sonde CBOT E S schloss zwei von 61 Sequenzen durch Diskrepanz-Stellen an den Positionen 11, 21 und 22 vom 3'-Ende der Sonde (AB040123 und AB040124) und eine von 61 Sequenzen an den Positionen 21 und 22 vom 3'-Ende der Sonde (AB040128) aus. Der Reverse-Primer erfasste 60 von 61 Sequenzen. Bei einer Sequenz lag eine Diskrepanz-Stelle an Position 11 vom 3'-Ende des Oligonukleotids vor.

Insgesamt wurde die Bindung als ausreichend eingestuft da die Bereiche sehr nahe am 3'-Ende der Oligonukleotide alle übereinstimmende Sequenzen aufwiesen.

Mittels BLAST-Suchen wurde überprüft, ob die Oligonukleotide nur die gesuchten Sequenzen erfassten und nicht gesuchte ausschlossen.

Die Schmelztemperaturen der Primer und der Sonde waren mit Werten zwischen 55,3 und 58,7°C nahe genug aneinander und lagen nahe bei der in der Publikation vorgeschlagenen Annealing-Temperatur von 55°C (Messelhäusser et al., 2007).

Durch eine Überprüfung mit dem „Oligo-Analyzer 3.1“ wurde zwar eine Hairpin-Struktur des Forward-Primers CBOT E fw mit einer relativ hohen Schmelztemperatur von ca. 46°C identifiziert, bei Verwendung der vorgeschlagen Annealing-Temperatur von 55°C sollten diese aber dennoch aufgeschmolzen vorliegen. Ansonsten wurden aber keine relevanten Sekundärstrukturen der Oligonukleotide festgestellt.

5.2.6.3 *In vitro*-Tests des *bont/E*-Primer-/Sonden-Systems (CBOT E fw/CBOT E re/CBOT E S)

Mit denselben Reaktionsbedingungen wie in Tab. 13 für das *bont/A*-System dargestellt wurde eine Test-qPCR durchgeführt. Als Ziel-DNA wurde ein DNA-Extrakt des LGL des *C. botulinum*-Stammes LGL REB 1718 in den Verdünnungsstufen 1:10 und 1.100 eingesetzt. Die qPCR ergab gute Amplifikationsplots (Abb. 44).

Die 1:10-Verdünnung des DNA-Extrakts diente auch als Ziel-DNA für einen kleinen Ansatz (ohne Replikate) einer Sondengradienten-qPCR mit Sondenkonzentrationen von 100, 200 und 300 nM (Abb. 45). Die Amplifikationsplots unterschieden sich zwar in ihrer Fluoreszenz-Ausbeute mit bestem Ergebnis bei 200 nM, die C_q -Werte waren aber bei allen getesteten Sondenkonzentrationen identisch.

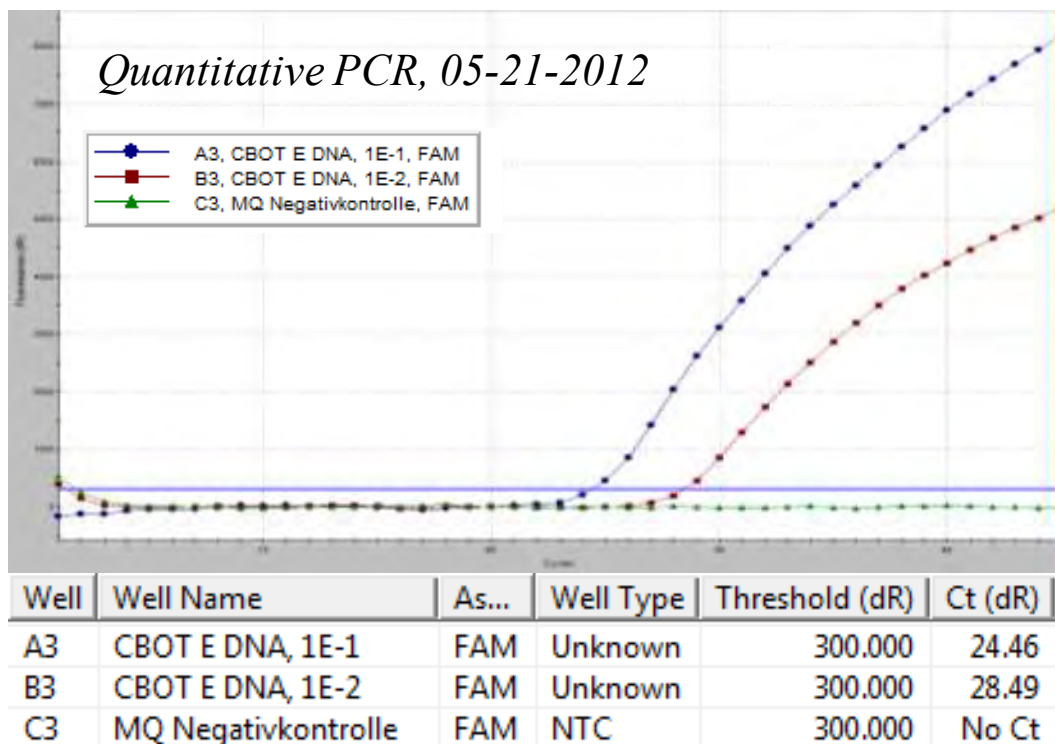


Abb. 44: Amplifikationsplots und C_q -Werte der Test-qPCR des DNA-Extrakts von *C. botulinum* LGL REB 1718 mit dem bont/E-qPCR-System im Singleplex

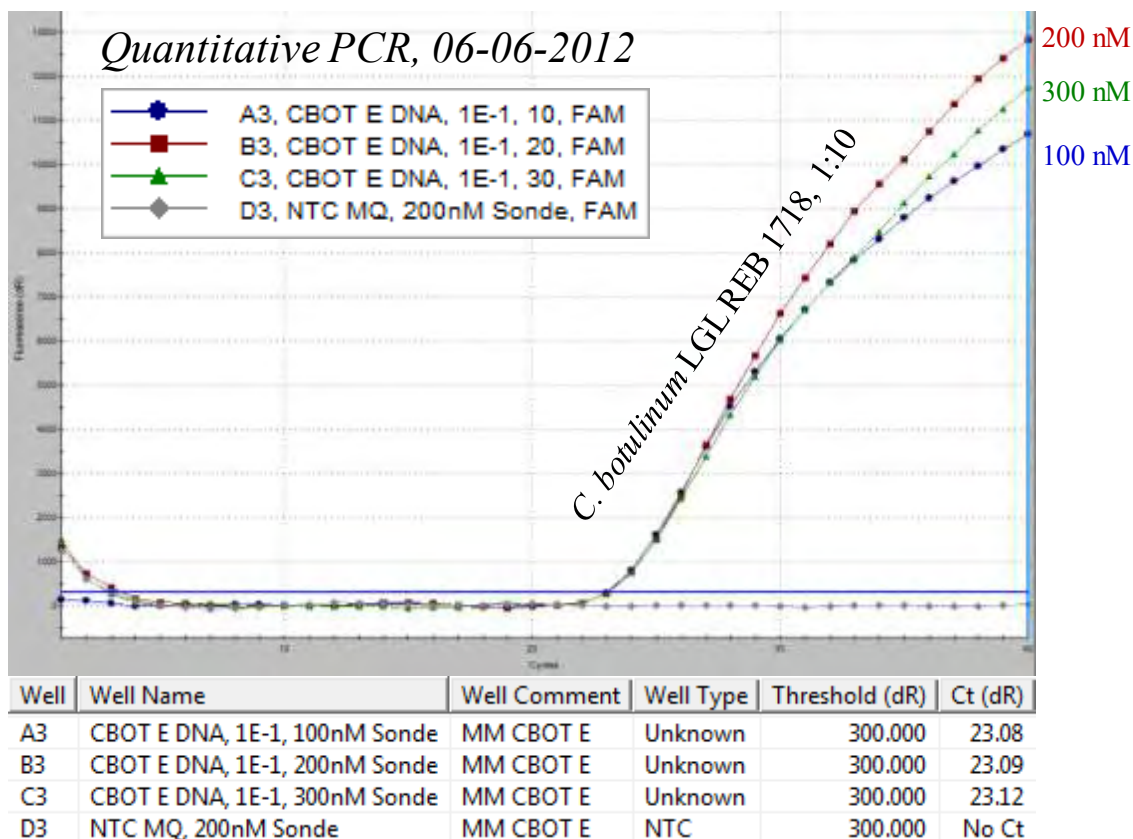


Abb. 45: Amplifikationsplots und C_q -Werte des Sondenmatrix-Versuchs mit dem bont/E-qPCR-System im Singleplex

Um die optimale Annealing-Temperatur herauszufinden, wurde eine konventionelle PCR mit Annealing-Temperaturgradient von 50 bis 60°C durchgeführt (Abb. 31). Die Auftrennung war auf Grund einer zu gering gewählten Agarose-Konzentration nicht optimal, man kann jedoch erkennen, dass nur eine Bande vorlag, die umso schwächer ausgeprägt war, je geringer die Annealing-Temperatur gewählt wurde. Bei den in der Publikation vorgeschlagenen 55°C (Messelhäusser et al., 2007) die auch für den Einsatz im Multiplex vorgesehen waren, wurde eine ausreichend starke Bande gebildet. Da auch Annealing Temperatur von 60°C, die in der qPCR in einem kleinen Ansatz (ohne Replikate) getestet wurde, keine Verbesserungen im Verlauf des Amplifikationsplots brachte (nicht dargestellt), wurde für alle folgenden Läufe eine Annealing-Temperatur von 55°C verwendet.

Weitere Tests erfolgten im Multiplex (siehe 5.2.8).

Das Amplikon des Primer/Sonden-Systems *bont/E* (CBOT E fw/CBOT E re/CBOT E S) wurde in einen *E. coli*-Stamm kloniert, um den Klon als Positivkontrolle kryokonserviert aufzubewahren, und das Amplikon wurde sequenziert.

5.2.7 qPCR-Nachweissystem für das Botulinum-Toxin F-Gen (*bont/F*)

5.2.7.1 Alignment

Alle zu diesem Zeitpunkt (Mai 2012) in der NCBI-Datenbank vom Primersystem *bont/F* abgedeckten *bont/F*-Sequenzen wurden aligniert. Die im Alignment enthaltenen Sequenzen sind in Tab. 43 im Anhang 13.3.3 dargestellt.

5.2.7.2 *In silico*-Tests des *bont/F*-Primer-/Sonden-Systems (CBOT F fw/CBOT F re/CBOT F S)

Das publizierte Primer-/Sondensystem CBOT F fw/CBOT F re/ CBOT F S (Messelhäusser et al., 2007) erfasst optimal (mit allen Positionen) nur einen Teil der im Alignment enthaltenen *bont/F*-Sequenzen (Tab. 43; Anhang 13.3.3). Von den nicht erfassten Sequenzen in dieser Tabelle erfasst:

- die Sonde CBOT F S mit den letzten 11 Nukleotiden am 3'-Ende weitere 4 Sequenzen (GU213209, GU213218, GU213227, Y13631) und
- der Primer CBOT F re mit den letzten 15 Nukleotiden am 3'-Ende die *C. baratii*-*bont/F*-Sequenzen (GU223231, GU223232, GU223233, GU223234, GU223235, HM746655, HM746656),

so dass diese möglicherweise noch gebunden werden könnten, eine Amplifikation des gewünschten Amplikons ist damit aber nicht wahrscheinlich.

Die Schmelztemperaturen der Primer und der Sonde waren mit Werten zwischen 55,3 und 59,4°C nahe genug aneinander und lagen relativ nahe bei der in der Publikation vorgeschlagenen Annealing-Temperatur von 55°C (Messelhäusser et al., 2007).

Durch eine Überprüfung mit dem „Oligo-Analyzer 3.1“ wurde eine Hairpin-Struktur des Revers-Primers mit einer hohen Schmelztemperatur von ca. 65°C identifiziert, diese könnte bei einer Annealing-Temperatur von 55°C ebenfalls gebildet werden und damit den Primer weniger zugänglich für eine Bindung an die Ziel-DNA machen. Weitere relevante Sekundärstrukturen der Oligonukleotide wurden nicht festgestellt.

Eine Blast-Suche der Oligonukleotide bestätigte *in silico* deren Inklusivität bzw. Exklusivität.

5.2.7.3 *In vitro*-Tests des *bont/F*-Primer-/Sonden-Systems (CBOT F fw/CBOT F re/CBOT F S)

Im ersten Test wurden dieselben Reaktionsbedingungen verwendet, wie in Tab. 13 für das *bont/A*-System dargestellt. Als Ziel-DNA diente ebenfalls ein DNA-Extrakt des LGL des *C. botulinum*-Stammes LGL REB 1955 in den Verdünnungsstufen 1:10 und 1:100. Für beide Verdünnungen wurde Amplifikation gemessen (Abb. 46).

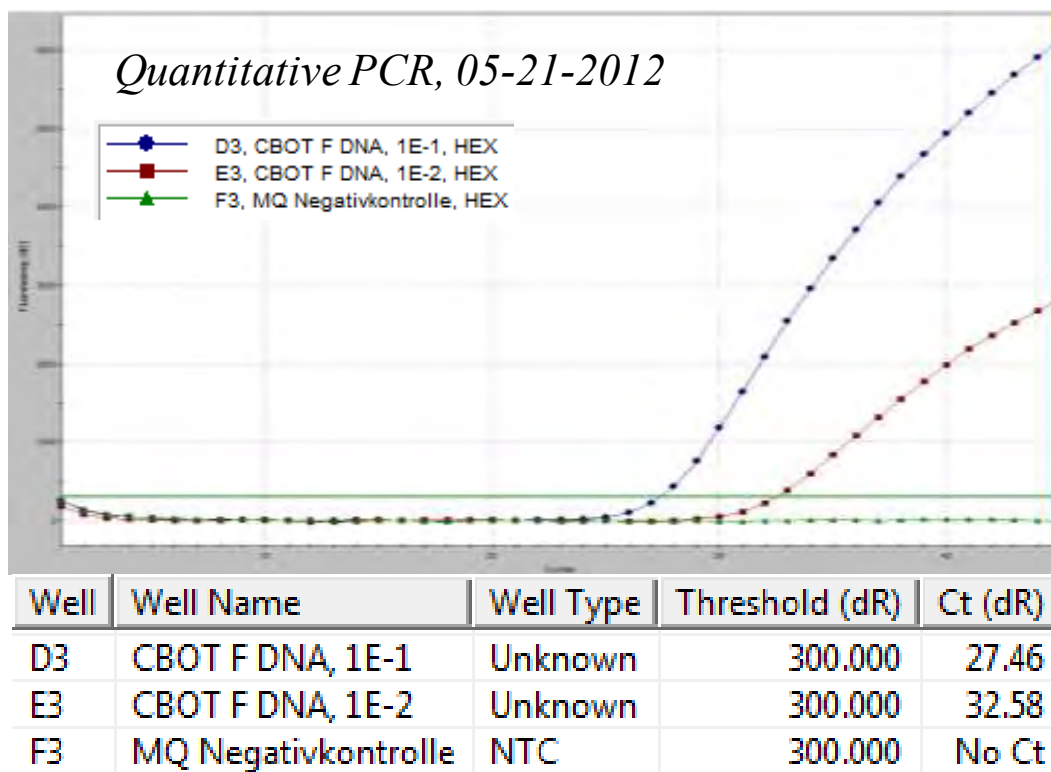


Abb. 46: Amplifikationsplots und C_q -Werte der Test-qPCR mit dem *bont/F*-qPCR-System im Singleplex

Der in einem kleinen Ansatz (ohne Replikate) durchgeführte Sondenmatrix-Assay ist in Abb. 47 dargestellt. Es gab kaum Unterschiede im C_q -Wert. Die Fluoreszenzausbeute variierte unwesentlich. Deshalb wurde eine Sondenkonzentration von 200 nM beibehalten. Ein in einer konventionellen PCR durchgeführter Temperaturgradient (50 bis 60°C) ergab mit steigender Temperatur steigende Amplifikat-Mengen bis zu einer Temperatur von knapp 55°C, bei noch höheren Temperaturen blieb die Bande gleich stark. Die in der Publikation vorgeschlagene Annealing-Temperatur von 55°C (Messelhäuser et al., 2007) wurde damit als passend bewertet. Ein Test einer qPCR bei 60°C Annealing-Temperatur statt 55°C wurde ebenfalls keine Veränderung im Amplifikationsplot gemessen (nicht dargestellt).

Weitere Tests erfolgten im Multiplex (siehe 5.2.8).

Das Amplikon des qPCR-Systems *bont/E* (CBOT E fw/CBOT E re/CBOT E S) wurde in einen *E. coli*-Stamm kloniert, um den Klon als Positivkontrolle kryokonserviert aufzubewahren, und das Amplikon wurde sequenziert.

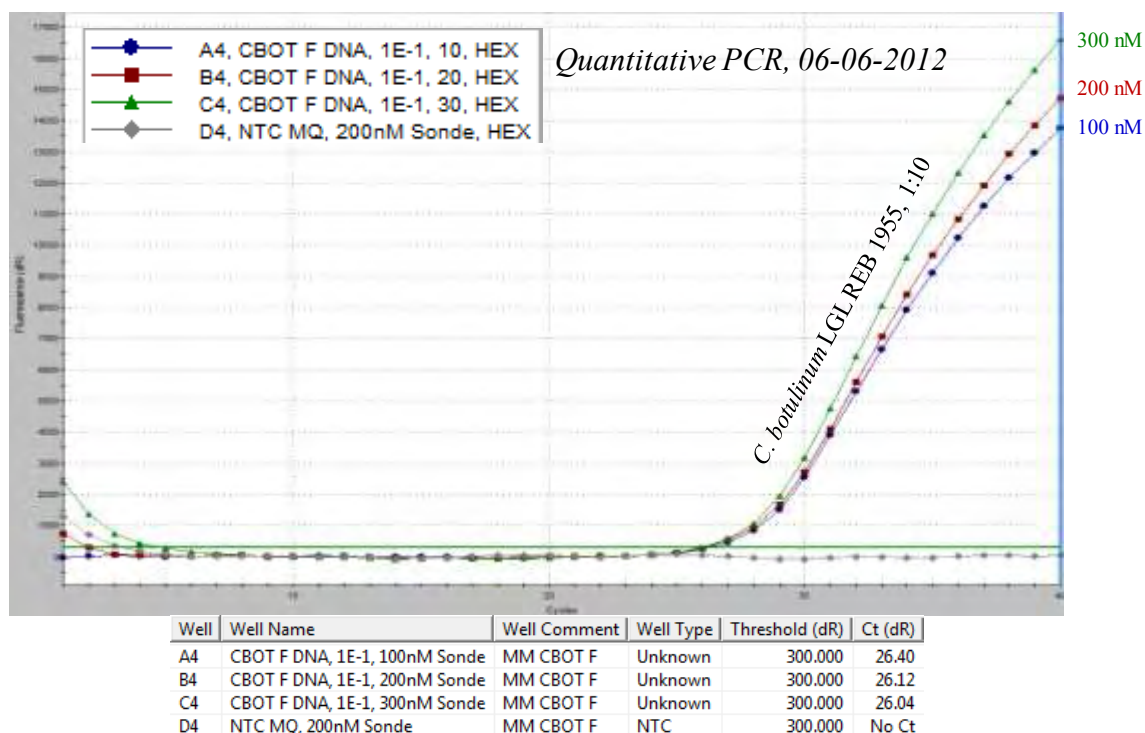


Abb. 47: Amplifikationsplots und C_q -Werte der Sondenmatrix mit dem *bont/F*-qPCR-System im Singleplex

5.2.8 Test der Multiplex-qPCR-Nachweissysteme (*bont/A/bont/B/IPC* und *bont/E/bont/F*)

Für die Multiplex-qPCR wurden zunächst parallel zu den Singleplex-Tests in vitro der einzelnen Systeme *bont/A*, *bont/B*, IPC, *bont/E* und *bont/F* (siehe 5.2.1, 5.2.2, 5.2.3, 5.2.6, 5.2.7) jeweils die Systeme in den in dargestellten Verbindungen im Multiplex getestet (Tab. 17).

Die Systeme *bont/A* und IPC (Messelhäusser et al., 2007) wurden zum einen mit dem unveränderten *bont/B*-System CBOT B fw/CBOT B re/CBOT B S (Messelhäusser et al., 2007), zum anderen mit dem abgewandelten *bont/B*-System 2-CBOT B fw/ 2-CBOT B re/CBOT B S kombiniert. Ebenso wurden die Systeme *bont/E* mit *bont/F* (Messelhäusser et al., 2007) in Duplex-Ansätzen getestet. Die Systeme für den Nachweis von *bont/C* und *bont/D* (Ziegler, 2013) wurden ausschließlich im Singleplex eingesetzt.

Tab. 17: Getestete Kombinationen der qPCR-Systeme bont/A, bont/B, IPC, bont/E und bont/F und unterschiedliche Mastermix-Varianten

Variante	qPCR-System 1	qPCR-System 2	qPCR-System 3	Datum qPCR-Lauf	Mastermix	siehe
Ia	CBOT A fw/	CBOT B fw/	IPC fw/	15.05.2012	selbst gemischt	5.2.8.1
	CBOT A re/	CBOT B re/	IPC re/	25.05.2012		
	CBOT A S	CBOT B S	IPC S	29.05.2012		
				20.07.2012		
Ib	wie Ia			04.09.2012	MM1	
IIa	CBOT A fw/	2-CBOT B fw/	IPC fw/	20.07.2012	selbst gemischt	5.2.8.2
	CBOT A re/	2-CBOT B re/	IPC re/			
	CBOT A S	2-CBOT B S	IPC S			
IIb	wie IIa			06.08.2012 04.09.2012	MM1	
IIIa	CBOT A fw/	2-CBOT B fw/	-	19.05.2014	selbst gemischt	5.2.8.3
	CBOT A re/	2-CBOT B re/				
	CBOT A S	2-CBOT B S				
IIIb	wie IIIa			19.05.2014 04.06.2014	MM2	
IVa	CBOT E fw/	CBOT F fw/	-	15.05.2012	selbst gemischt	5.2.8.4
	CBOT E re/	CBOT F re/				
	CBOT E S	CBOT F S				
IVc	wie IVa			04.06.2014	MM2	

MM1: Agilent Brilliant Multiplex qPCR Mastermix

MM2: Quanta Perfecta Multiplex qPCR Tough Mix Low Rox

Tab. 18: Eingesetzte Reagenzien für die Multiplex-qPCR mit einem selbst gemischten Mastermix zum Nachweis von bont/A, bont/B und IPC bzw. bont/E und bont/F vom 15.05.2012

Reagenz	Konzentration
PCR-Puffer (ohne MgCl ₂ , Invitrogen™ Inc., USA)	1x
MgCl ₂ (Invitrogen™ Inc., USA)	6 mM
dNTPs (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)	200 µM
Primer, jeweils	300 nM (CBOT A, CBOT B, IPC) bzw. 500 nM (CBOT E, CBOT F)
Sonde, jeweils	200 nM
Platinum-Taq-Polymerase (Invitrogen™ Inc., USA)	0,75 U bis 1,25 U
Ziel-DNA/ Zellsuspension (verschiedene Verdünnungen)	5 µL
pUC19-Plasmid-DNA (100 fg * µL ⁻¹ - 10 pg * µL ⁻¹)	1 µL
Ultra reines, DNase/RNase-freies, destilliertes Wasser (Invitrogen™ Inc., USA)	ad. 25 µL

Die verwendeten Reagenzien für die Multiplex-qPCR-Anwendungen mit selbst gemischtem qPCR-Mastermix sind in Tab. 18 dargestellt. Das PCR-Programm wurde bei Läufen mit Agilent Brilliant Multiplex qPCR Mastermix (MM1) gemäß Protokoll und auch bei Verwendung des selbst gemischten Mastermixes zunächst (Läufe vom 15.05.2012) mit 10 min Aktivierung bei 95° durchgeführt (Tab. 17, Tab. 19, s. auch 5.2.8.1). Bei Verwendung des Quanta Perfecta Multiplex qPCR Tough Mix Low Rox (MM2, Tab. 17) wurde gemäß Protokoll ein Aktivierungsschritt von 2 min bei 95°C verwendet.

Tab. 19: Eingesetztes Temperaturprogramm für die Multiplex-qPCR mit einem selbst gemischten Mastermix zum Nachweis von *bont/A*, *bont/B* und IPC bzw. *bont/E* und *bont/F* vom 15.05.2012

PCR-Programm:	Phase	Dauer	Temperatur	
	Aktivierung	10 min bzw. 3 min ^a	95°C	
	Denaturierung	15 s	95°C	} 40-45 Zyklen
	Annealing/Extension	60 s	55°C	

^a vgl. 5.2.8.1

5.2.8.1 *In vitro*-Tests des Multiplex-qPCR-Systems zum Nachweis von *bont/A*, *bont/B* und IPC (CBOT A fw/CBOT A re/CBOT A S; CBOT B fw/CBOT B re/CBOT B S; IPC fw, IPC re, IPC S) – Variante I

Der Multiplex-qPCR Lauf der Variante Ia vom 15.05.2015 (Tab. 17), der mit einer Aktivierungsphase von 10 min bei 95°C durchgeführt wurde, lieferte keine Signale für *bont/A*, *bont/B* und die interne Amplifikationskontrolle. Die verwendete Platinum-Taq-Polymerase wurde wahrscheinlich durch die zu lange gewählte Erhitzung soweit inaktiviert, dass eine ausreichende Amplifikation der Ziel-DNA-Abschnitte nicht mehr möglich war. Weiterhin wurde eine für Multiplex-qPCR vergleichsweise niedrige und damit möglicherweise nicht ausreichende Konzentration der Platinum-Taq-Polymerase von 0,75 U eingesetzt.

Im Multiplex-qPCR Lauf der Variante Ia vom 25.05.2015 (Tab. 17), wurde die Aktivierungsphase bei 95°C auf 3 min gekürzt. Es kamen weiterhin 0,75 U Platinum-Taq-Polymerase zum Einsatz. DNA des Stamms *C. botulinum* Typ A (LGL REB1750) und die IAC (100 fg * µL⁻¹ pUC19-Plasmid-DNA) wurden nachgewiesen, dagegen wurde kein Signal für DNA des Stamms *C. botulinum* Typ B (LGL REB1944) erhalten (Abb. 48). Signale, die mit dem HEX-, FAM- bzw. ROX-Filter aufgenommen wurden, stehen dabei jeweils für Nachweise mit dem *bont/A*, *bont/B* bzw. IPC-System (vgl. Tab. 12).

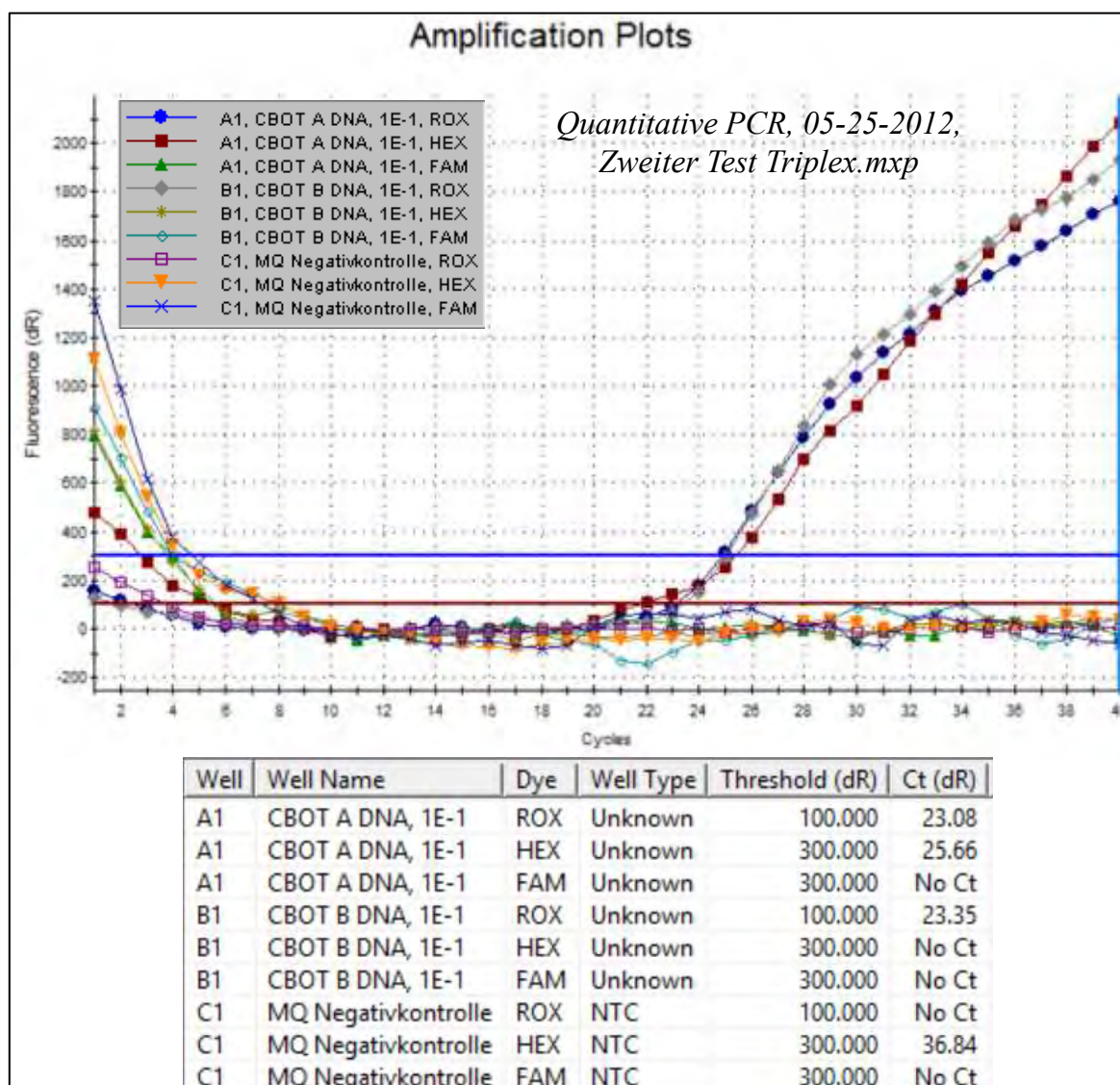


Abb. 48 Amplifikationsplots und C_q -Werte der Multiplex-qPCR der Variante Ia vom 25.05.2012 (s. Tab. 17)

Es wurde vermutet, dass das Ausbleiben der Signale für *bont/B* möglicherweise an einer nicht effizient funktionierenden Amplifikation für das entsprechende Primersystem liegen könnte. Daher wurde im Lauf der Variante Ia vom 29.05.2015 (Tab. 17) die Konzentration der Platinum-Taq-Polymerase auf 1,25 U pro Ansatz erhöht, jedoch wurde auch in diesem Lauf kein Signal für DNA des Stamms *C. botulinum* Typ B (LGL REB1944) erhalten. Daneben lieferte die IAC-qPCR ebenfalls kein Signal. Nur die DNA des Stamms *C. botulinum* Typ A (LGL REB1750) wurde detektiert (nicht gezeigt).

In einem letzten Versuch der Triplex-qPCR mit diesem *bont/B*-qPCR-Nachweissystem (Variante Ia vom 20.07.2015) wurden die selben Bedingungen wie im Lauf vom 29.05.2015 gewählt, außer, dass unverdünnte DNA-Extrakte zum Einsatz kamen. Auch eine Erhöhung der Ziel-DNA erhöht in einem bestimmten Rahmen i.d.R. die Amplifikation. In diesem Lauf kam als Ziel-DNA parallel zum DNA-Extrakt des Typ-B-*C. botulinum*-Stamms LGL REB1944 die DNA eines neuen DNA-Extrakts („Juni’12“) zum Einsatz. Außerdem wurde parallel ein abgewandeltes qPCR-System zum Nachweis von *bont/B* getestet. Die Ergebnisse dieses qPCR-Laufs sind im Vergleich der beiden

bont/B-qPCR-Systeme in Kapitel 5.2.8.2 dargestellt. Für das IPC-System wurde als Ziel-DNA 1 μL je Ansatz einer $100 \text{ fg} * \mu\text{L}^{-1}$ pUC19-Plasmid-DNA-Lösung eingesetzt. Es fand zwar Amplifikation statt (Abb. 49), die resultierenden qPCR-Signale waren aber bezüglich ihrer Fluoreszenzausbeute nicht sehr hoch (Maximum nicht höher als 400 dR) und entsprachen nicht einem optimalen Kurvenverlauf. Die nicht effiziente Amplifikation kann in einer zu geringen Konzentration an Ziel-DNA, die eingesetzt wurde (z.B. durch Abbau), in Verbindung mit wenig spezifischer Primerbindung begründet sein.

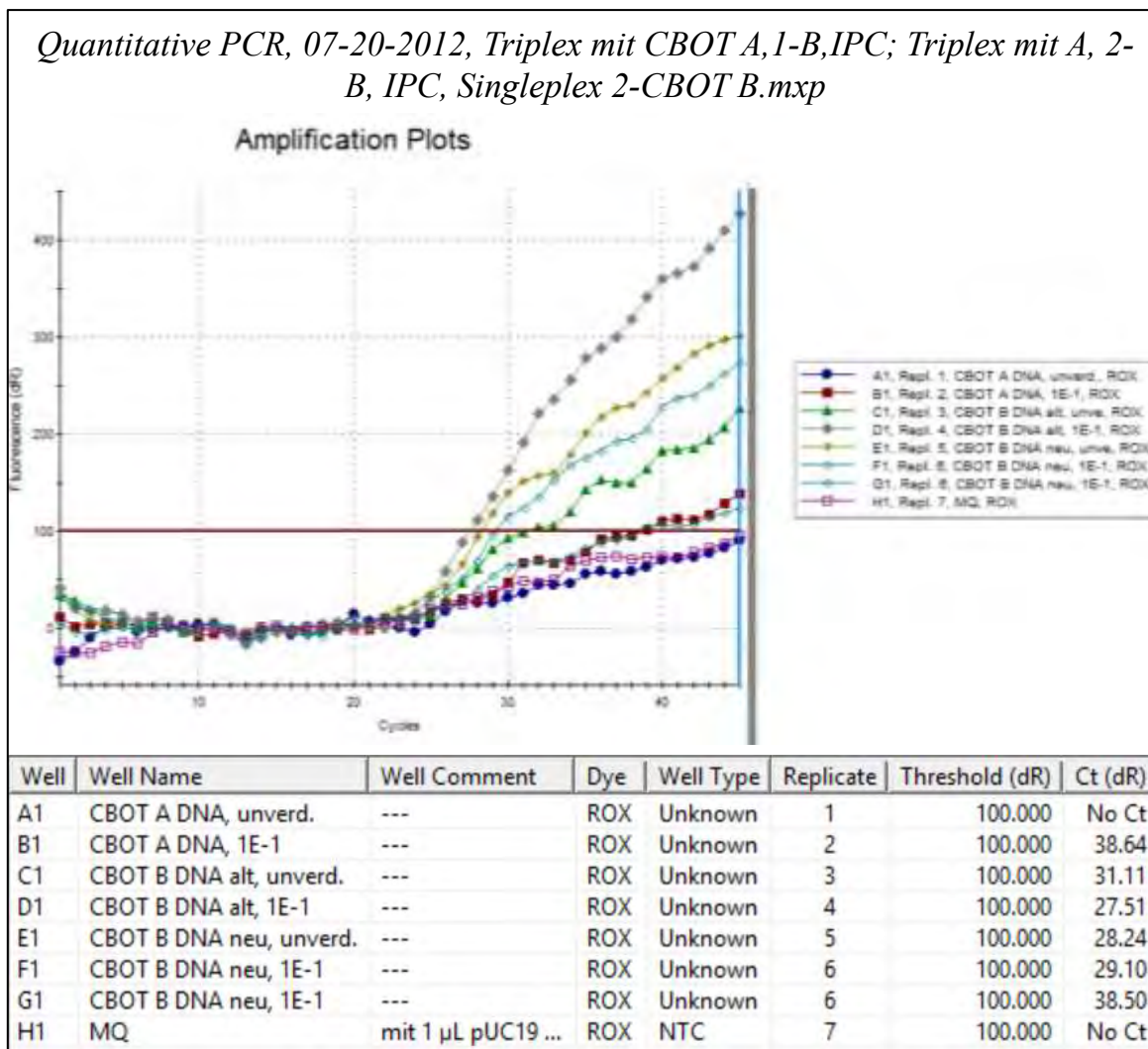


Abb. 49 Amplifikationsplots und C_q -Werte des IPC-Systems in der Multiplex-qPCR der Variante Ib vom 20.07.2012 (s. Tab. 17)

Der qPCR-Lauf der Variante Ib vom 04.09.2012 mit dem kommerziell erhältlichen qPCR-Mastermix Brilliant Multiplex qPCR Mastermix (Agilent Technologies, USA). Da in den vorangegangenen Versuchen wiederholt die Amplifikation mit dem IAC-System ausgeblieben waren (Gründe: evtl. durch ineffizient funktionierende Amplifikation, aber auch z.B. auf schnellen Abbau der pUC19-DNA in den verwendeten Aliquoten zurückzuführen), wurde in diesem Lauf ein Aliquot mit höherer Konzentration des pUC19-Plasmids ($10 \text{ pg} * \mu\text{L}^{-1}$) eingesetzt. Weiterhin wurde ein drei-schrittiges von Tab. 19 abweichendes qPCR-Programm getestet (Tab. 20).

Tab. 20: Temperaturprogramm der Multiplex-qPCR mit dem kommerziell erhältlichen qPCR-Mastermix Brilliant Multiplex qPCR Mastermix (Agilent Technologies, USA) zum Nachweis von *bont/A*, *bont/B* und IPC vom 04.09.2012

PCR-Programm:	Phase	Dauer	Temperatur
	Aktivierung	10 min	95°C
	Denaturierung	15 s	95°C
	Annealing	30 s	55°C
	Extension	30 s	72°C
			} 45 Zyklen

Diese qPCR erzielte durch die höher eingesetzte pUC19-Plasmidlösung verbesserte qPCR-Signale für die IPC-qPCR als in vorangegangenen Läufen (Vgl. Abb. 50 mit Abb. 49). Die Amplifikation der *bont/A*- und *bont/B*-qPCR war bei Einsatz des kommerziell erhältlichen Kits (Variante Ib) im Vergleich zum Lauf mit Einsatz des selbst gemischten Mastermix (Variante Ia vom 20.07.2015) entweder leicht verschlechtert (Vgl. Abb. 50 mit Abb. 51 und Abb. 52) oder leicht verbessert (Vgl. Abb. 50 mit Abb. 48, Abb. 49). Die Qualität der qPCR-Signale für *bont/A* und insbesondere *bont/B* war allerdings dennoch nicht hinreichend gut. Neben der geringen Fluoreszenzausbeute und nicht-optimalem Kurvenverlauf fiel auf, dass Ansätze, die eigentlich keine Ziel-DNA enthielten, dennoch einen Anstieg der Fluoreszenz z.T. über den Threshold aufwiesen, der möglicherweise auf unspezifische Amplifikation zurückzuführen war.

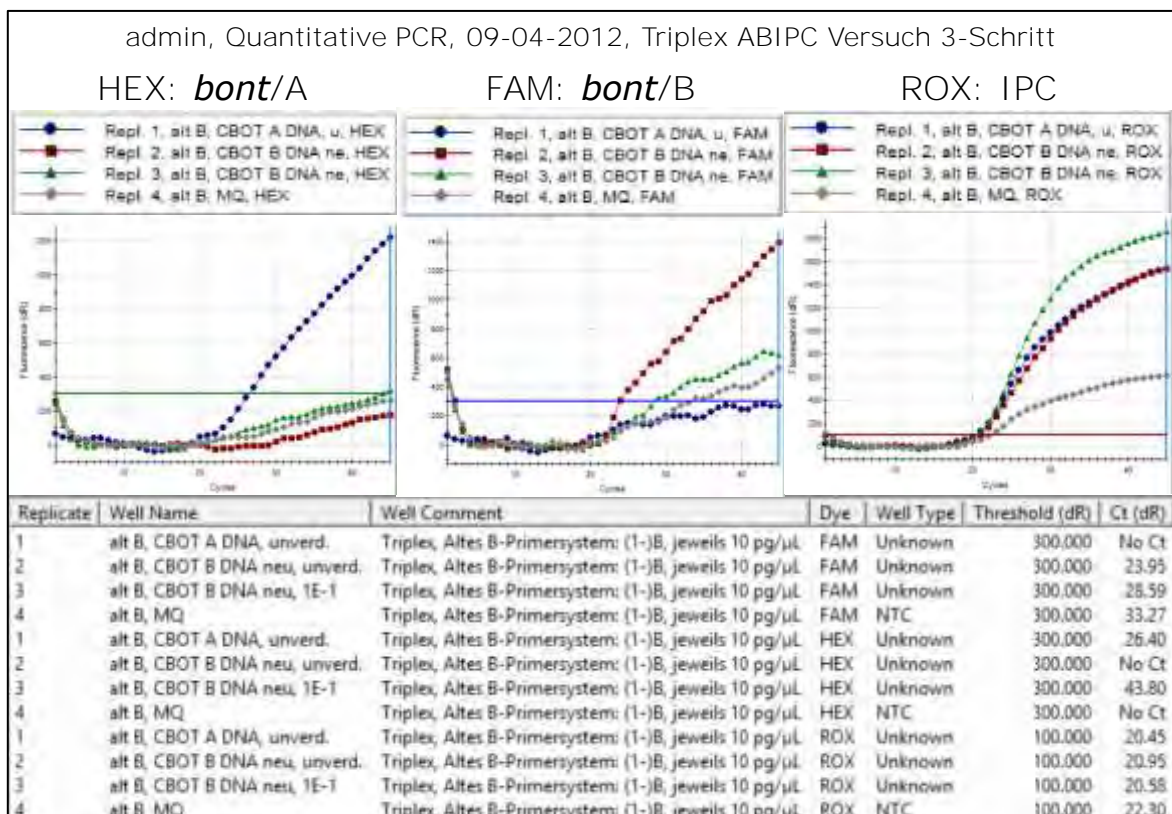


Abb. 50 Amplifikationsplots und C_q -Werte der Multiplex-qPCR der Variante Ib vom 04.09.2012 (s. Tab. 17)

5.2.8.2 *In vitro*-Tests des Multiplex-qPCR-Systems zum Nachweis von *bont/A*, *bont/B* und IPC (CBOT A fw/CBOT A re/CBOT A S; 2-CBOT B fw/2-CBOT B re/CBOT B S; IPC fw, IPC re, IPC S) – Variante II

Da das ursprüngliche *bont/B*-Primer/Sonden-System (CBOT B fw/CBOT B re/CBOT B S) weder im Singleplex (5.2.2) noch im Multiplex (5.2.8.1) überzeugte, wurde das leicht abgewandelte und in der Schmelztemperatur angepasste *bont/B*-Primer/Sonden-System 2-CBOT B fw/2-CBOT B re/CBOT B S nach *In vitro*-Tests im Singleplex (5.2.2.5) auch im Multiplex in Verbindung mit den Nachweissystemen für *bont/A* und IPC getestet.

Die qPCR-Signale der Variante IIa vom 20.07.2012 der Nachweissysteme für *bont/A* und *bont/B* sind in Abb. 51 und Abb. 52 direkt den Ergebnissen der Multiplex-qPCR der Variante Ia vom 20.07.2012 gegenübergestellt. Die IPC-Ergebnisse der Variante IIa vom 20.07.2012 unterschieden sich nicht wesentlich von den in Abb. 49 für die IPC-qPCR im Multiplex der Variante Ia vom 20.07.2012 dargestellten.

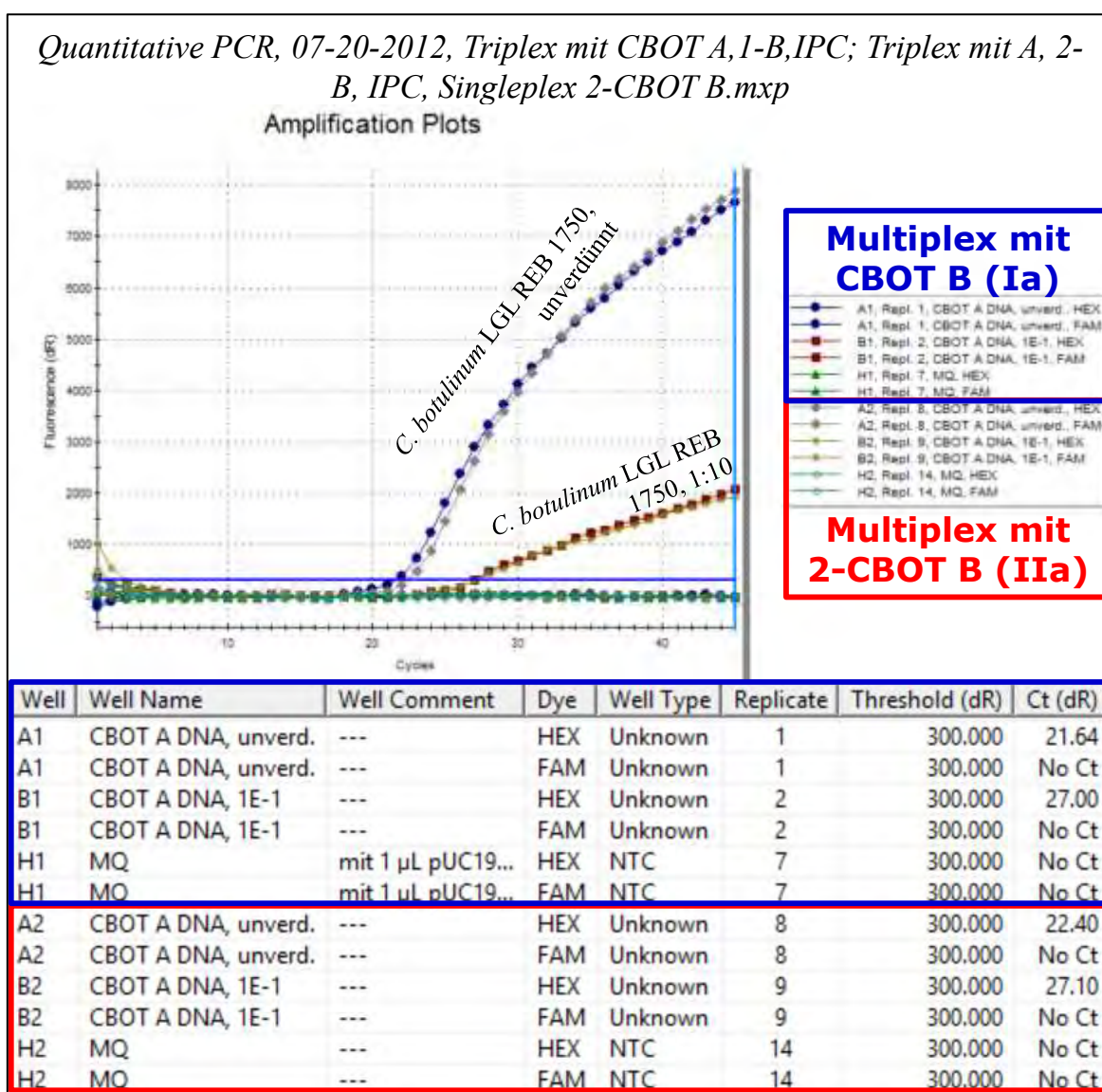


Abb. 51: Amplifikationsplots und C_q -Werte des *bont/A*-Primer/Sonden-Systems in der Multiplex-qPCR der Variante IIa vom 20.07.2012 im Vergleich zur Variante Ia vom 20.07.2012 (s. Tab. 17)

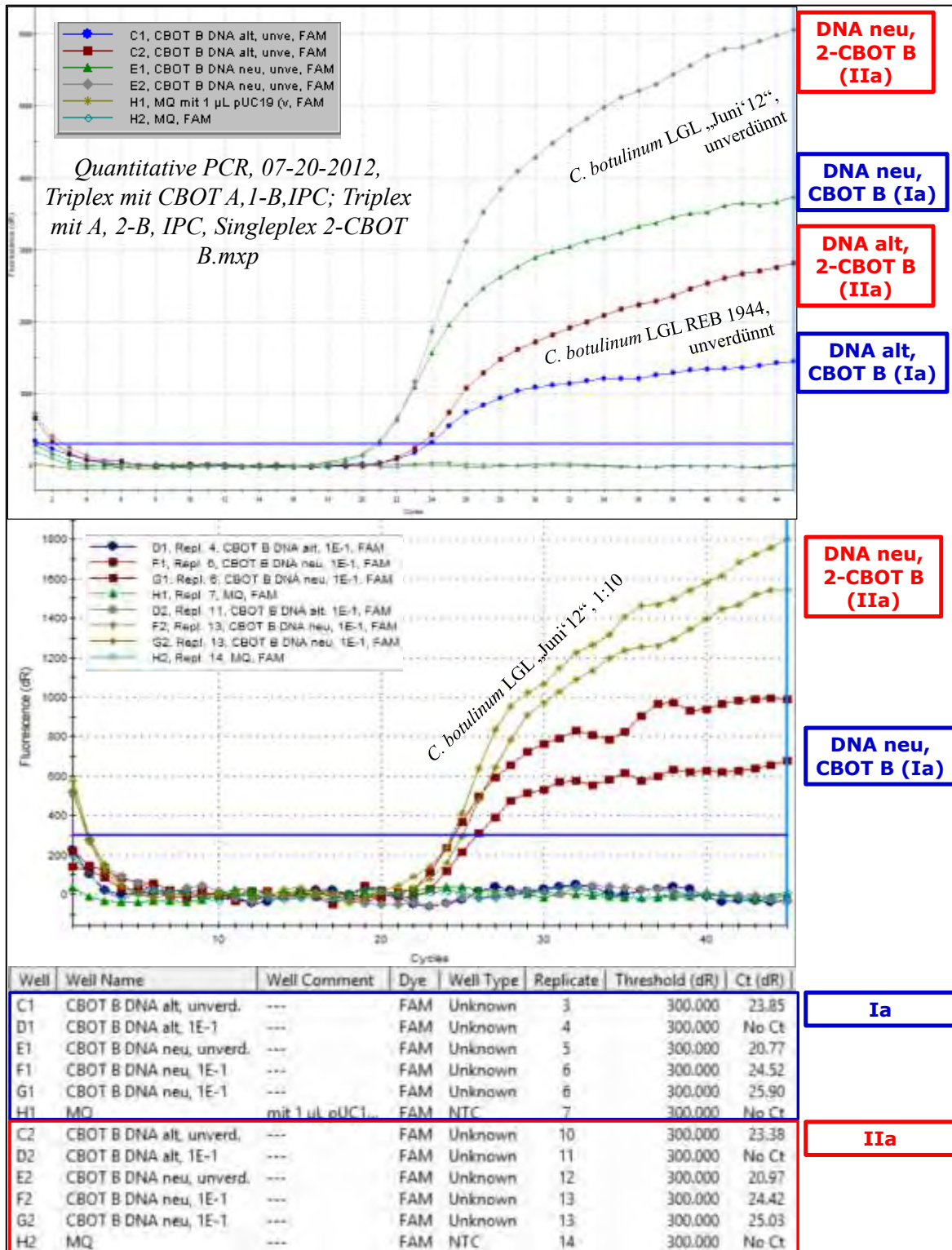


Abb. 52: Amplifikationsplots und C_q -Werte des bont/B-Primer/Sonden-Systems in der Multiplex-qPCR der Variante IIa vom 20.07.2012 im Vergleich zur Variante Ia vom 20.07.2012 (s. Tab. 17)

Die Kurven für *bont/A* verliefen bei Varianten Ia und IIa nahezu identisch (Differenz < 1 C_q -Wert, unverdünnt; Abb. 51); für *bont/B* dagegen waren mit dem verbesserten Primer-/Sondensystem 2-CBOT B fw/2-CBOT B re/CBOT B S deutlich höhere Fluoreszenzausbeuten festzustellen (Abb. 52). Die 1:10-Verdünnung des DNA-Extrakts

des Stammes *C. botulinum* Typ B 1944 zeigte aber weder im Lauf der Variante Ia noch im Lauf der Variante IIa ein Signal, obwohl anhand des C_q -Wertes bei Einsatz des unverdünnten DNA-Extrakts ein C_q -Wert der 1:10 Verdünnung von ca. 27 plausibel gewesen wäre.

Im Lauf der Variante IIb vom 06.08.2015 wurde dieselbe Primer-/Sondenkombination mit dem kommerziell erhältlichen Brilliant Multiplex qPCR Mastermix der Firma Agilent getestet. Der Mastermix wurde nach Herstellerangaben eingesetzt. Als IPC wurden zu jedem Ansatz (außer der Negativkontrolle) $1\mu\text{L}$ einer $100\text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ pUC19-Plasmidlösung zugesetzt. Verwendet wurde ein 2-Schrittiges PCR-Protokoll (10 min Aktivierung bei 95°C ; 45 Zyklen: 15 s, 95°C und 1 min 55°C). Hier wurden für die Ansätze mit dem ROX-Filter Signale mit sehr geringer Fluoreszenzausbeute gemessen Abb. 53. Die Negativkontrolle lieferte ein vergleichbares Signal wie die Ansätze mit Plasmidzusatz. Ein solches Bild könnte auf unspezifische Amplifikation hindeuten. *Bont/A* und *bont/B* wurden jeweils mit einem um ca. 1 C_q nach hinten verschobenen Signal gemessen. Die Fluoreszenzausbeute im Vergleich zum Lauf der Variante IIa vom 20.07.2012 war vergleichbar (*bont/A*) bzw. etwas höher (*bont/B*) (Vgl. Abb. 53 mit Abb. 51 und Abb. 52).

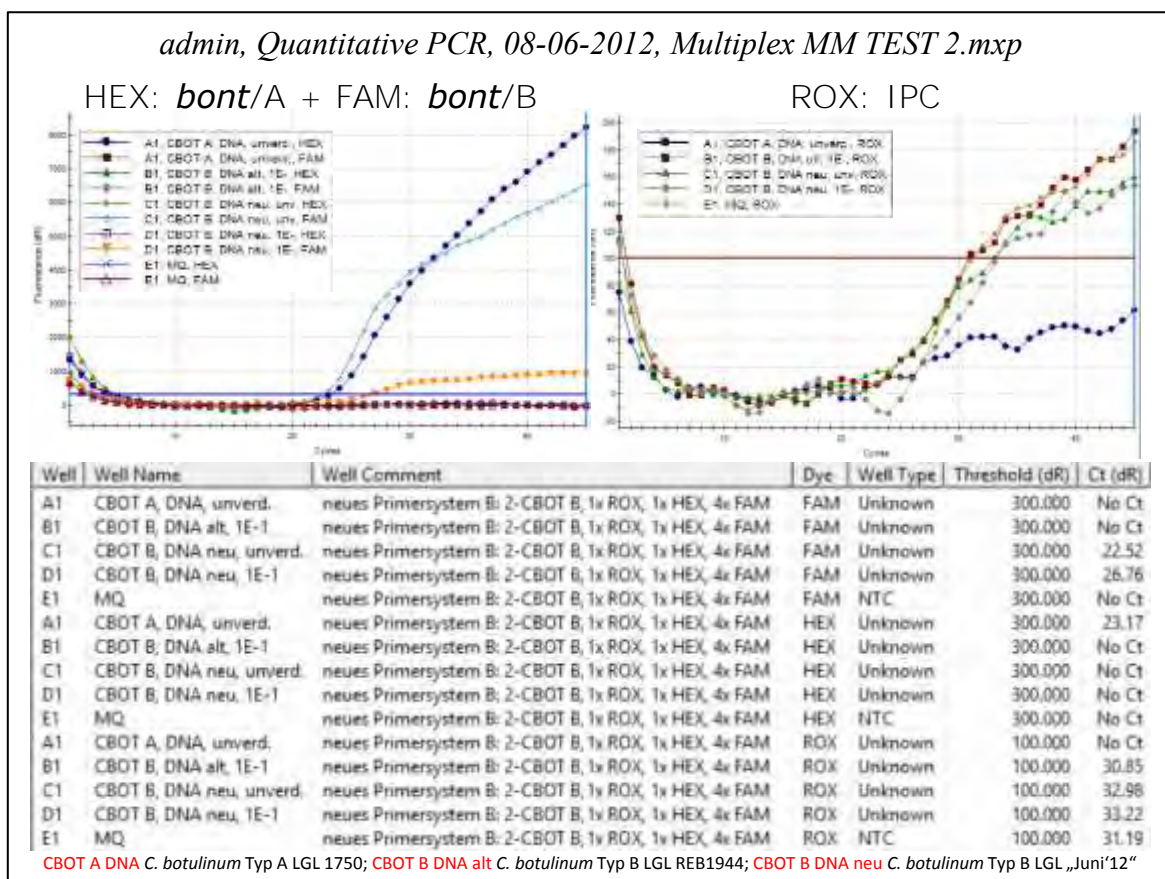


Abb. 53: Amplifikationsplots und C_q -Werte der Multiplex-qPCR der Variante IIb vom 06.08.2012 (s. Tab. 17)

Als Alternative wurde in der Variante IIb am 04.09.2012 noch ein 3-Schritt PCR-Programm mit dem Brilliant Multiplex qPCR Mastermix von Agilent unter den in Tab. 20 gezeigten Bedingungen getestet. Auch bei diesem Lauf wurde mit allen drei Nachweissystemen in Ansätzen ohne Ziel-DNA langsame aber stetige, unspezifische Amplifikation (Abb. 54) aufgenommen, die auch den gesetzten Threshold überschritt und

die durch die Bedingungen im 3-Schrittprogramm gefördert wird (vgl. auch 5.2.8.2). Der Ansatz mit Ziel-DNA des Stammes *C. botulinum* Typ B LGL 1750 erbrachte keine über die „Grundamplifikation“ der negativen Ansätze hinausgehenden Signalanstieg. Die restlichen Ansätze mit Ziel-DNA (*bont/A*- bzw. *bont/B*-Positivkontrollen) zeigten zwar jeweils gute Signalverläufe, allerdings mit deutlich geringeren Fluoreszenzausbeuten (vgl. Abb. 54 mit Abb. 51 und Abb. 52).

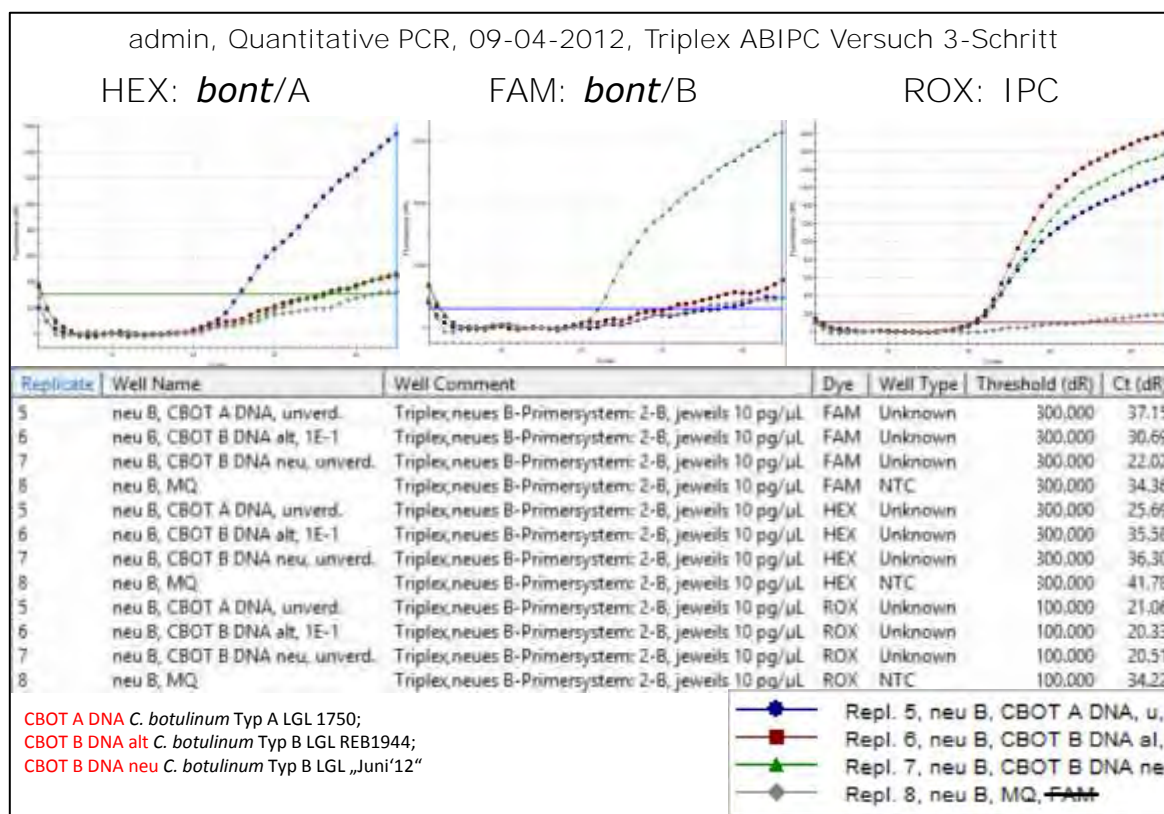


Abb. 54: Amplifikationsplots und C_q -Werte der Multiplex-qPCR der Variante IIb vom 04.09.2012 (s. Tab. 17)

Insgesamt betrachtet war bei Verwendung des Brilliant qPCR-Mastermixes insbesondere die unspezifische Amplifikation in Negativkontrollen, die dem Prinzip nach auch in Positiv-Ansätzen auftreten und damit zur Ergebnisverfälschung führen kann, ausschlaggebend, keine weiteren Tests mit diesem kommerziell erhältlichen Mastermix durchzuführen.

5.2.8.3 *In vitro*-Tests des Multiplex-qPCR-Systems zum Nachweis von *bont/A* und *bont/B* (CBOT A fw/CBOT A re/CBOT A S; 2-CBOT B fw/2-CBOT B re/CBOT B S) – Variante III

In weiteren Versuchen wurde die Interne Amplifikationskontrolle unter Einsatz des pUC19-Plasmids auf Grund des ausgebliebenen Amplifikationserfolgs und den in 5.2.3.2 beschriebenen Gründen nicht mehr eingesetzt. Deshalb kamen die Nachweissysteme für *bont/A* und *bont/B* in einer Duplex-qPCR zum Einsatz. Die Ergebnisse aus zwei qPCR-Läufen der Varianten IIIa und IIIb am 19.05.2014 (Tab. 17) unter Einsatz des selbst gemischten (IIIa) bzw. des Quanta perfecta Multiplex qPCR Tough mix low ROX (Quanta Biosciences Inc., USA) Multiplex-Mastermixes (IIIb) wurden in einem Projekt gegenübergestellt (Abb. 55, Abb. 56). Als Ziel-DNA kamen die DNA-Extrakte der

Stämme *C. botulinum* Typ A LGL 1750 sowie Typ B LGL „Juni‘12“ in einer Verdünnungsreihe in Einsatz.

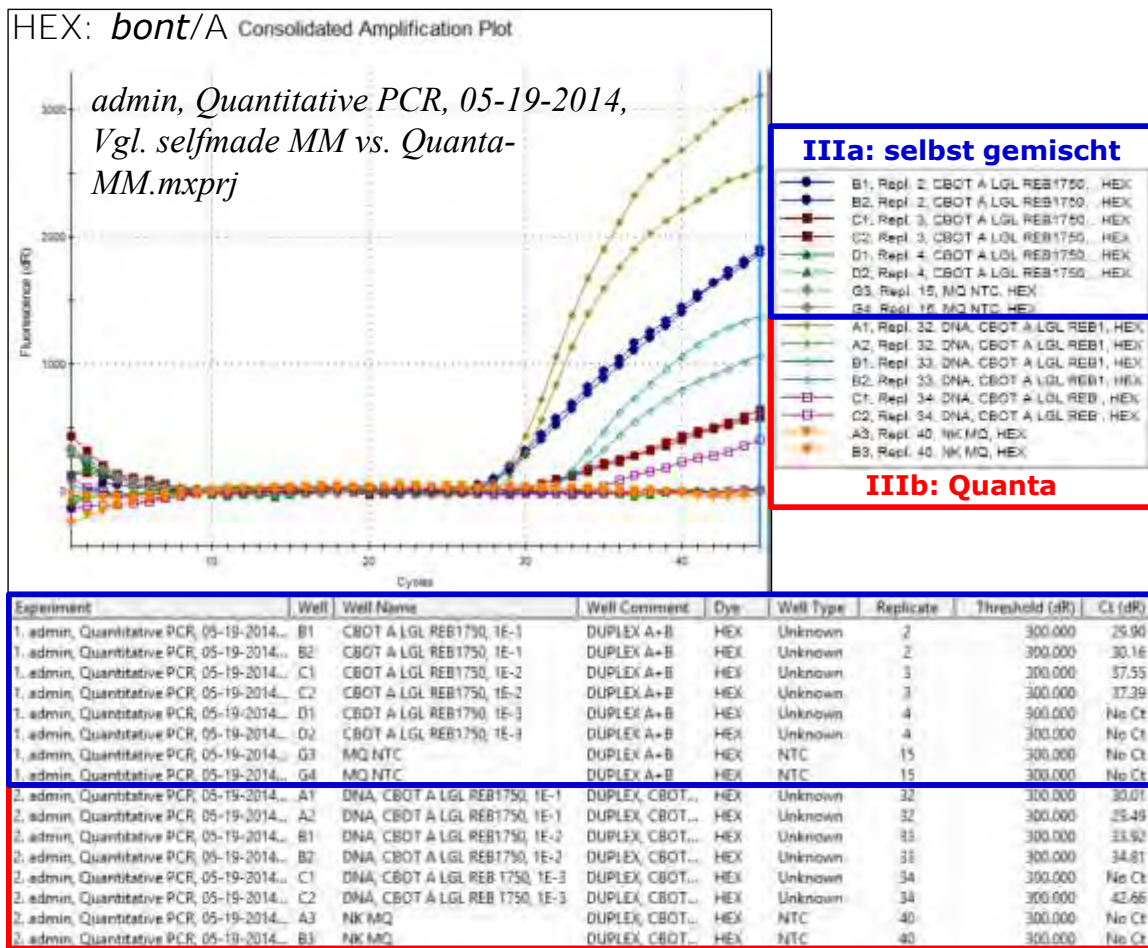


Abb. 55: Amplifikationsplots und C_q -Werte der Multiplex-qPCR der Varianten IIIa und IIIb vom 19.05.2014 im Vergleich (s. Tab. 17) – Auswertung bezüglich *bont/A*

Sowohl beim Nachweis von *bont/A* wie auch im Besonderen beim Nachweis von *bont/B* wurde im Duplex unter Verwendung des Quanta Multiplex-Mastermixes (IIIb) eine verbesserte Amplifikation gegenüber der Verwendung des selbst gemischten qPCR-Mastermixes (IIIa) festgestellt (Abb. 55, Abb. 56). Neben einer erhöhten Fluoreszenzausbeute bei i.d.R. gleichbleibendem C_q -Wert wurden höhere Verdünnungsstufen in Variante IIIb nachgewiesen, die mit Variante IIIa kein Signal ergaben.

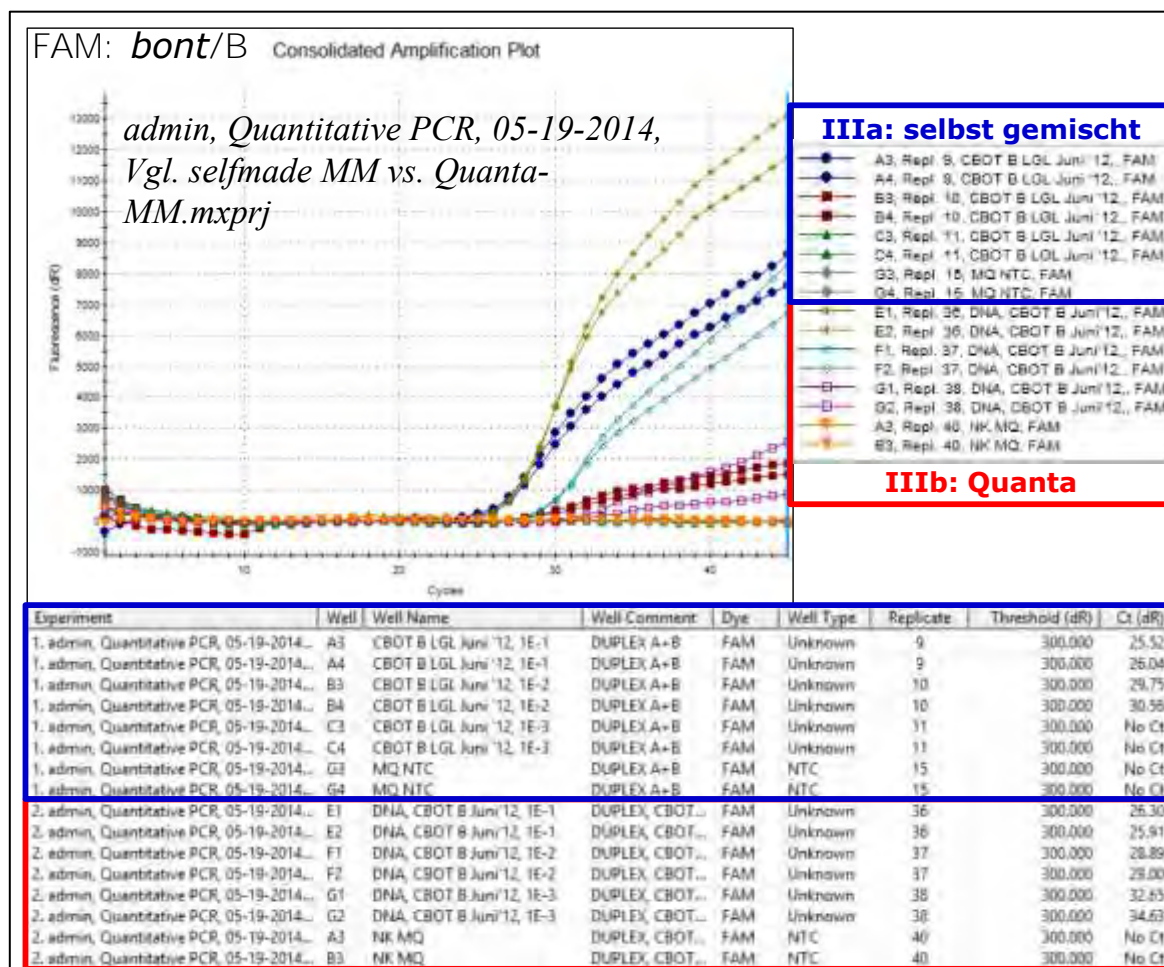


Abb. 56: Amplifikationsplots und C_q -Werte der Multiplex-qPCR der Varianten IIIa und IIIb vom 19.05.2014 im Vergleich (s. Tab. 17) – Auswertung bezüglich *bont/B*

In einem weiteren Test der Variante IIIb vom 04.06.2014 (mit dem Quanta-Multiplex-Mastermix) wurden DNA-Extrakte bzw. Hitze-inaktivierte Zellsuspensionen verschiedener Stämme von *C. botulinum* getestet (Abb. 57):

- Typ A LGL REB 1750, 1:10
- Typ B LGL „Juni‘12“, unverdünnt
- Typ C LGL 280514, unverdünnt und 1:10
- Typ E LGL 2625, unverdünnt und 1:10

Zudem wurden die Stämme der Typen A und B parallel in einer qPCR-Reaktion gemischt eingesetzt, um die parallele Amplifikation mit der Amplifikation bei Einzeleinsatz zu testen.

Eine Reaktion mit dem *bont/A*-Nachweissystem (HEX-Filter) wurde nur bei Einsatz des Typ A-Stammes als Ziel DNA gemessen (Abb. 57). Alle Nicht-Typ A-Stämme zeigen kein Signal. Entsprechendes galt für den Nachweis mit dem *bont/B*-System (Abb. 57).

Die Amplifikation bei gleichzeitigem Einsatz der DNA-Extrakte der Typen A und B ergab nahezu identische Amplifikationskurven wie bei Einzeleinsatz (Abb. 57).

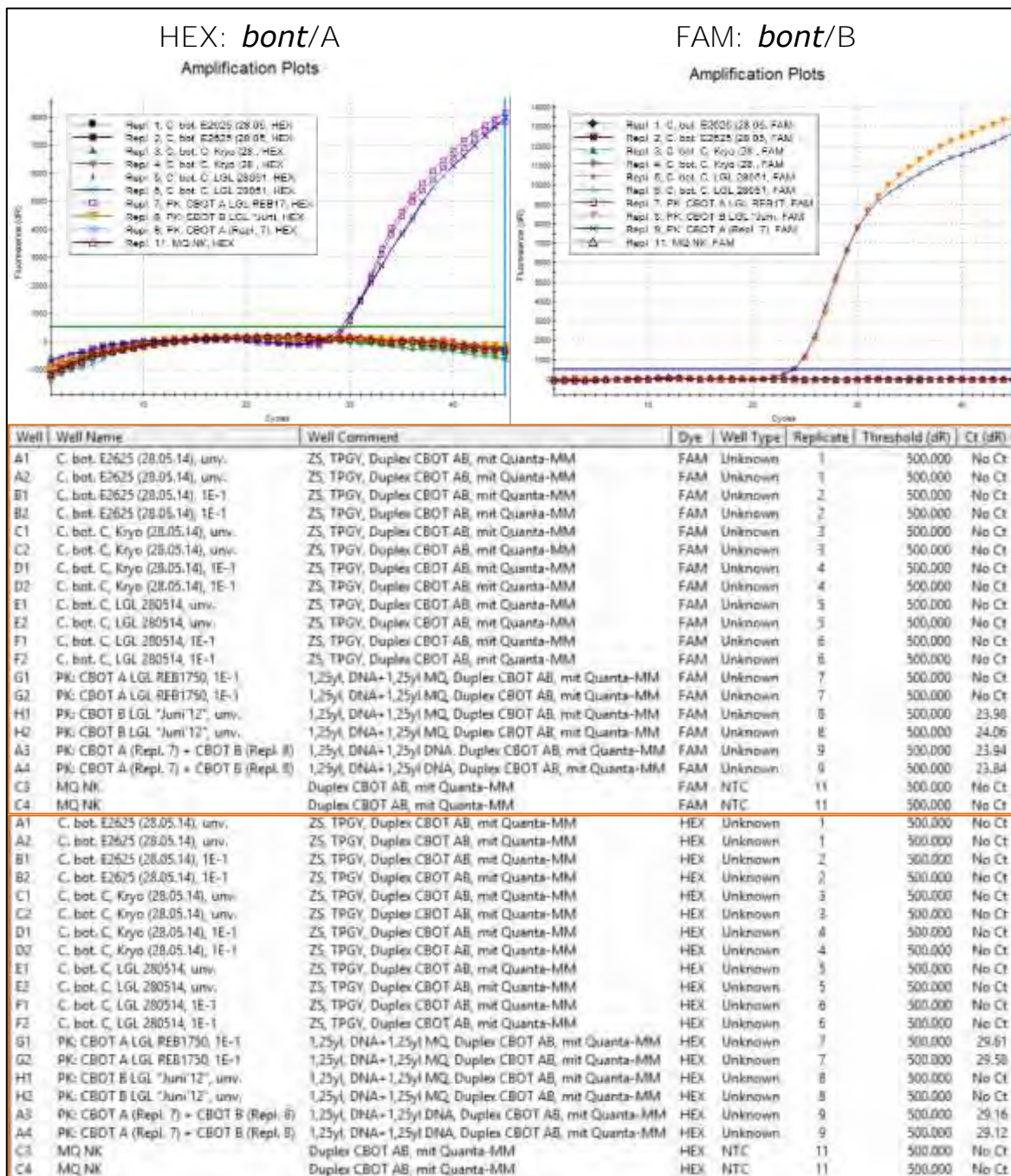


Abb. 57: Amplifikationsplots und C_q -Werte der Multiplex-qPCR der Variante IIIb vom 04.06.2014 (s. Tab. 17) – Testung verschiedener *C. botulinum*-Stämme

5.2.8.4 *In vitro*-Tests des Multiplex-qPCR-Systems zum Nachweis von *bont/E*, *bont/F* (CBOT E fw/CBOT E re/CBOT E S; CBOT F fw/CBOT F re/CBOT F S) – Variante IV

Auch die Systeme zum Nachweis der Gene *bont/E* und *bont/F* wurden im Multiplex getestet. Die Amplifikationsplots dieses Tests der Variante IVa vom 15.05.2012 sind in Abb. 58 dargestellt. Als Ziel-DNA wurden die DNA-Extrakte der *C. botulinum*-Stämme Typ E LGL REB1718 und Typ F LGL REB1955 in einer 1:100-Verdünnung eingesetzt. Parallel zu ihrem alleinigen Einsatz in eine qPCR-Reaktion wurden dieselben Verdünnungen 1:1 gemischt in entsprechend halber Konzentration in eine qPCR-Reaktion

eingesetzt. Entsprechend wurde ein um einen C_q -Wert nach hinten verschobenes Signal erwartet. Mit dem FAM-Filter wurden in diesem Multiplex-Ansatz Produkte des *bont/E*-Nachweises detektiert, mit dem HEX-Filter Produkte des *bont/F*-Nachweises (vgl. Tab. 12). Im Fall des Nachweises von *bont/E* wurde eine gute Amplifikationskurve mit ausreichend hoher Fluoreszenzausbeute erhalten (Abb. 58). Bei gleichzeitigem Einsatz der Ziel-DNA beider Stämme wurde fast ein um eine Einheit höherer C_q erhalten. Für *bont/F* wurde ebenfalls Amplifikation gemessen, die Fluoreszenzausbeute war nicht relativ niedrig aber noch ausreichend. Bei gleichzeitigem Einsatz der DNA-Extrakte beider Stämme und entsprechend halb so hoher Einsatz-Konzentration wurde eine relativ flache Amplifikations-Kurve aufgenommen. Der Verlauf der Amplifikation von *bont/F* wurde durch unbekannte Wechselwirkungen bei dieser geringeren Konzentration und möglicherweise in der Wechselwirkung mit den Reaktionen zur Amplifikation von *bont/E* beeinträchtigt.

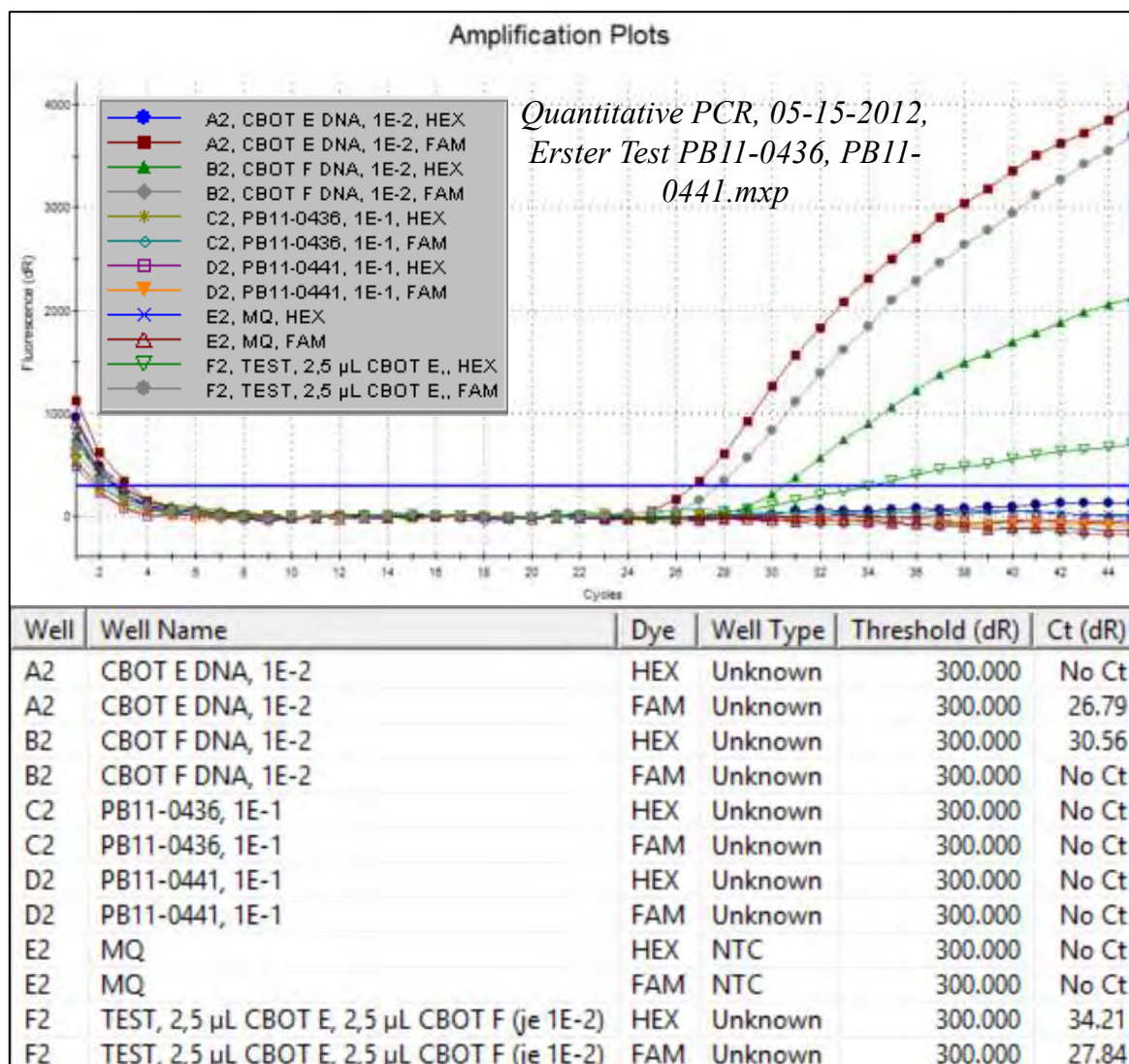


Abb. 58: Amplifikationsplots und C_q -Werte der Multiplex-qPCR der Variante IVa vom 15.05.2012 (s. Tab. 17)

Die beiden Nachweissysteme für *bont/E* und *bont/F* wurden im Multiplex auch unter Verwendung des kommerziell erhältlichen Quanta-Multiplex-Mastermixes getestet (Variante IVb vom 04.06.2014; Abb. 59). Alle gemessenen Signale hatten einen optimalen

Konzentration (Replikat 20) in Kombination mit der *bont*/F-Positivkontrolle (DNA-Extrakt des Stammes *C. botulinum* Typ F LGL REB1955). Auch die *bont*/F-Positivkontrolle wurde separat eingesetzt. Der Einsatz der Ziel-DNA separat bzw. in Kombination resultierte erwartungsgemäß jeweils beim *bont*/E- ähnlich wie beim *bont*/F-Nachweissystem in sehr ähnlichen Amplifikationsplots (Abb. 59). Wurde der DNA-Extrakt des *C. botulinum* Typ C-Stammes (LGL 280514) eingesetzt (Negativkontrolle), wurden mit beiden Nachweissystemen keine Signale gemessen. Dies war ebenso der Fall für die Typ E-Stämme mit dem *bont*/F-Nachweissystem und für die Typ F-Stämme mit dem *bont*/E-Nachweissystem.

5.2.8.5 Resümee: Anwendung der Nachweissysteme für Botulinum-Neurotoxine im Multiplex

In Abb. 60 sind in einem Projekt vergleichend die Läufe der Multiplex-qPCR mit selbst gemischtem Mastermix (1), mit Quanta-Multiplex-Mastermix (3) und der Singleplex-qPCR mit selbst gemischtem Mastermix (2) am Beispiel für den Nachweis von *bont*/B dargestellt. Hier wird deutlich, dass insbesondere je höher die Verdünnung des eingesetzten Ziel-DNA-Extrakts war, die Singleplex-qPCR entscheidend bessere Nachweisergebnisse erbrachte. Bereits ab der 10^{-3} -Verdünnung wurde *bont*/B nur noch im Singleplex zuverlässig nachgewiesen. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für den *bont*/A-Nachweis erhalten (nicht gezeigt).

Die in den vorangegangenen Kapiteln aufgezeigten Ergebnisse geben mehrfach Probleme bei der Durchführung der Nachweise im Multiplex wieder. Die Anwendung des Quanta-Multiplex-Mastermixes brachte zwar im Vergleich mit der Anwendung des selbst gemischten Mastermixes Vorteile mit sich, sie stand aber dennoch einer Anwendung der einzelnen Systeme im Singleplex nach.

Aufgrund der vorangegangenen Test-Ergebnisse der Multiplex-qPCR mit selbst gemischtem Mastermix und des in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisses (Abb. 60) wurde die Entscheidung getroffen, zukünftige Aussagen zum Nachweis der *bont*-Gene nur auf Ergebnisse aus Singleplex-qPCR-Analysen zu stützen.

Die Verwendung eines kommerziell erhältlichen Multiplex-Mastermixes (wie z.B. des Quanta Perfecta Multiplex qPCR Tough Mix Low Rox) stellt zudem insbesondere bei geringem Probendurchsatz insofern eine Herausforderung dar, weil die vergleichsweise kostenintensiven Chargen häufig auf relativ großen Durchsatz ausgelegt sind und nur relativ geringe Haltbarkeit aufweisen. Bei den Arbeiten an der LfL wurde ein geringer Durchsatz bezüglich der Überprüfung auf das Vorkommen von *bont* erwartet. Kostenersparnis durch die Anwendung von Multiplex-Systemen (Materialeinsatz, Arbeitszeit) stehen daher Mehr-Kosten durch übrig gebliebenes, nicht verwendetes (da nicht mehr haltbares) Material eines Multiplex-Mastermixes gegenüber.

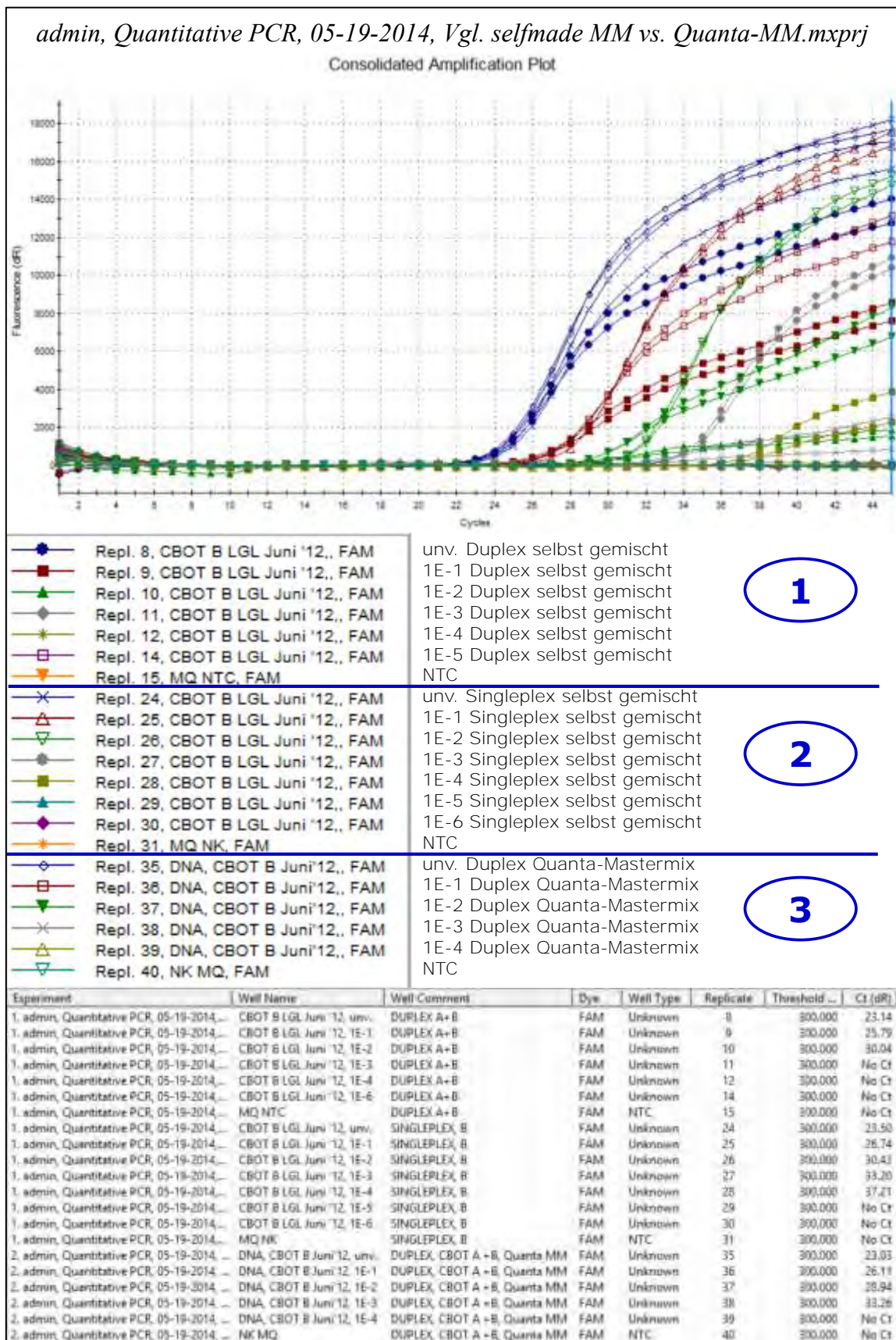


Abb. 60: Amplifikationsplots und C_q -Werte des bont/B-Nachweissystems in der Multiplex-qPCR mit selbst gemischtem Mastermix, mit Quanta-Mastermix und im Singleplex vom 19.05.2014

5.2.9 Singleplex-qPCR-System zum Nachweis des Gens *ntnh*

Ein Screening auf Botulinum-Neurotoxin (BoNT)-bildende Clostridien erfolgte an der LfL über das Gen *ntnh*. Dessen Genprodukt (nontoxic nonhemagglutinin H) bildet zusammen mit dem eigentlichen Toxin und weiteren Komponenten den Vorläufer-Toxinkomplex und ist als stark konserviertes Gen in allen BoNT-bildenden Stämmen vorhanden (East und Collins, 1994; Inoue et al., 1996; Nakamura et al., 2013).

Zum Nachweis des *ntnh*-Gens wurde ein bereits veröffentlichtes System *in silico* und *in vitro* getestet (Raphael und Andreadis, 2007). Dieses vergleichsweise komplexe System besteht aus vier Forward-Primern (ntnH-F1/ntnH-F2/ntnH-F3/ntnH-CD2F), drei Reverse-Primern (ntnH-R1/ntnH-R2/ntnH-R3) und einer Sonde (ntnH410-S). Die Vielzahl an eingesetzten Oligonukleotiden bringt einerseits die Problematik von Wechselwirkungen der einzelnen Oligonukleotide untereinander mit sich, andererseits hat es aber auch Auswirkung auf die Kosten durch Verlängerung der Arbeitszeit (Pipettierzeit) und den Einsatz vergleichsweise teurer LNA-Basen (locked nucleic acid bases) für die Synthetisierung der Sonde.

Deswegen wurde parallel dazu ein neues, vereinfachtes *ntnh*-Nachweissystem (*ntnh*-9a-F/*ntnh*-2c-F/*ntnh*-2d-S) entwickelt, etabliert und getestet.

5.2.9.1 Alignment

Es wurde ein Alignment mit allen zu diesem Zeitpunkt (September 2012) in der NCBI-Datenbank hinterlegten *ntnh*-Gen-Sequenzen gebildet. Alle Sequenzen, die das Amplikon der *ntnh*-Primer-/Sonden-Systeme nach Raphael und Andreadis (2007) und des selbst entwickelten (ntnH-9a-F/ntnH-2c-R/ntnH-2d-S, Tab. 12) enthielten, sind in Tab. 44 in Anhang 13.3.3 wiedergegeben.

5.2.9.2 *In silico*-Tests des *ntnh*-Primer-/Sonden-Systems nach Raphael und Andreadis (2007)

Von den in Tab. 44 wiedergegebenen Sequenzen wurden die in Tab. 21 dargestellten Anteile vollständig erfasst.

Tab. 21: Anteile der durch das Primer-/Sondensystem nach Raphael und Andreadis (2007) erfassten Sequenzen im Alignment (vgl. Tab. 44)

Sequenz erfasst durch Oligonukleotid	Anzahl erfasst (von $n_{\text{total}}=88$)	% erfasst
ntnH-F1	25	28,4
ntnH-F2	30	34,1
ntnH-F3	2	2,3
ntnH-CD2F	9	10,2
Summe	66	75,0
ntnH-R1 (nur)	21	23,9
ntnH-R2	7	8,0
ntnH-R3 (nur)	2	2,3
ntnH-R1 und R3	15	17,0
Summe	45	51,1
ntnH410-S	31	35,2

Der Anteil der durch die Forward-Primer erfassten Sequenzen lag mit ca. 75% noch relativ hoch. Dagegen erfassten die Reverse-Primer nur die Hälfte und die Sonde nur etwa ein Drittel der Sequenzen. Obwohl die Sonde LNA-Basen enthält, die die Bindungseigenschaften an degenerierte Positionen verbessern sollen, wurde dieses Ergebnis als nicht zufriedenstellend bewertet. Da das System dennoch in der Literatur mit einer großen Anzahl von Teststämmen etabliert wurde (Raphael und Andreadis, 2007), wurde das System dennoch *in vitro* getestet.

5.2.9.3 *In vitro*-Tests des *ntnh*-Primer-/Sonden-Systems (nach Raphael und Andreadis (2007))

Die Singleplex-Anwendung des Nachweissystems wurde u.a. durch den in Abb. 61 dargestellten qPCR-Lauf getestet. Hier wurde eine Verdünnungsreihe einer hitzeinaktivierten (95°C, 5 min) Zellsuspension des *C. botulinum*-Stammes Typ E LGL 2625 sowie ein schon zuvor als Positivkontrolle etablierter DNA-Extrakt des *C. botulinum*-Stammes Typ E LGL REB1718 (unverdünnt und 1:10-verdünnt) eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen sind in Tab. 22 dargestellt.

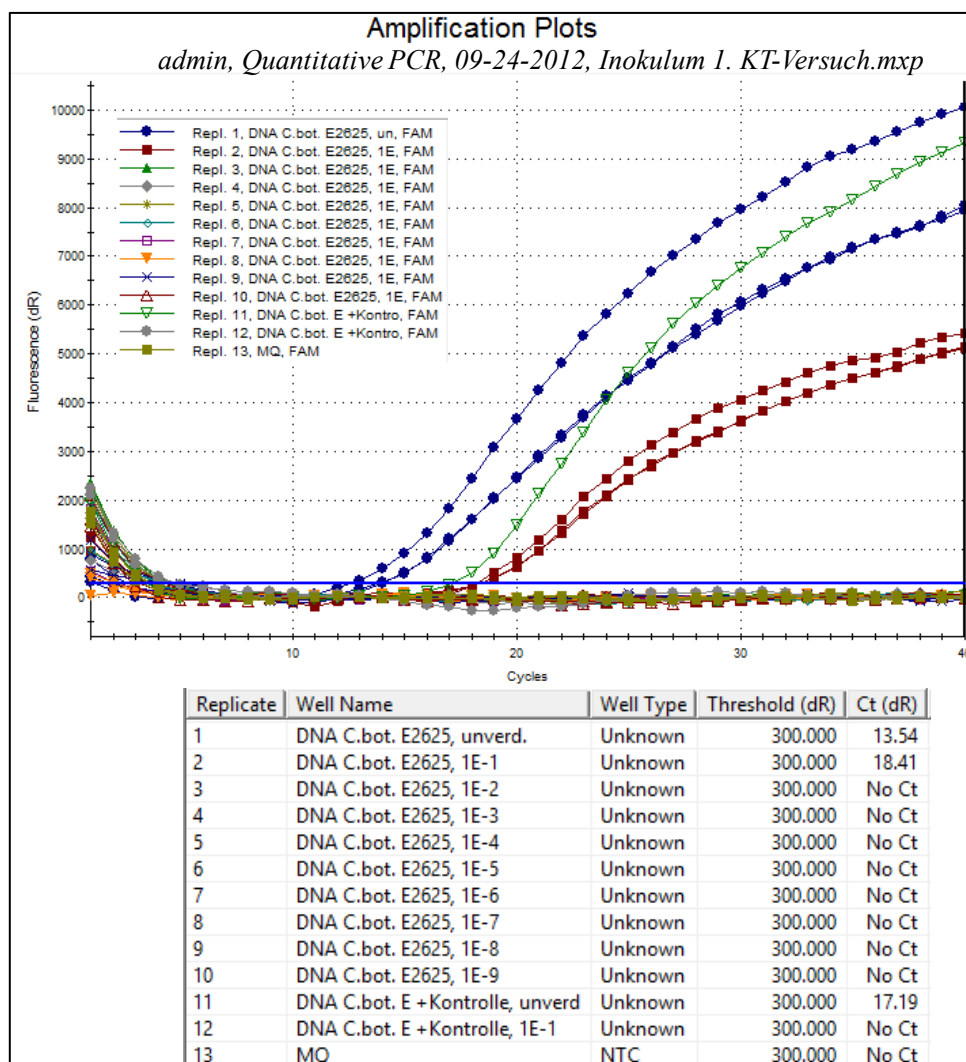


Abb. 61: Amplifikationsplots und C_q -Werte eines Tests des *ntnh*-Nachweissystems nach Raphael und Andreadis

Tab. 22: Reaktionsbedingungen der ntnh-qPCR nach Raphael und Andreadis (2007)

Kalkulation Hot-Start-PCR für 25 µl:		24.09.2012	
qPCR einzeln			
ntnH-for und rev/ Sonde (FAM-BHQ)			
		x Ansätze	final conc.
	1 Ansatz (µl)	38	(nm)
Puffer (10x, cont. no MgCl ₂)	2,5	95	1x
MgCl ₂ (50 mM)	2	76	4 mM
dNTPs (10 mM each)	0,5	19	200 µM
ntnH-F1 (10 µM)	1,25	47,5	500
ntnH-F2 (10 µM)	1,25	47,5	500
ntnH-F3 (10 µM)	1,25	47,5	500
ntnH-CD2F (10 µM)	1,25	47,5	500
ntnH-R1 (10 µM)	1,25	47,5	500
ntnH-R2 (10 µM)	1,25	47,5	500
ntnH-R3 (10 µM)	1,25	47,5	500
ntnH410-S (10 µM)	0,5	19	200
Platinum -Taq-Pol. (5 u / µL)	0,15	5,7	0,75 u
H ₂ O (=ad dispatch volume)	5,6	212,8	
Dispatch	20		
DNA (cell suspension)	5		
Ges.-Vol.	25		

2-step-PCR Programm:	
3 min	95°C Aktivierung
15 sec	95°C Denat.
15 sec	42°C Anneal.
60 sec	55°C Ext.
40 Zyklen	

Die Verdünnungen 10^{-2} bis 10^{-9} der Zellsuspension sowie 1:10 des DNA-Extrakts ergaben keine Signale im qPCR-Lauf (Abb. 61), obwohl anhand der Signale der unverdünnten Lösungen jeweils Signale für die verdünnten Stufen (+3,3 Zyklen pro log-Verdünnung) erwartet worden wären. Die Amplifikation verlief demnach bei geringen Ausgangskonzentrationen ineffizient.

Als Ergebnis der *in silico*-Tests und dieses qPCR-Laufs wurde von einer weiteren Verwendung des *ntnh*-Nachweissystems nach Raphael und Andreadis (2007) abgesehen.

5.2.9.4 *In silico*-Tests des *ntnh*-Primer-/Sonden-Systems (*ntnh-9a-F*/*ntnh-2c-F*/*ntnh-2d-S*)

Tab. 23: Anteile der durch das selbst entwickelte *ntnh*-Primer-/Sondensystem (*ntnH-9a-F*/*ntnH-2d-S*/*ntnH-2c-R*) erfassten Sequenzen im Alignment (vgl. Tab. 44)

Sequenz erfasst durch Oligonukleotid	Anzahl erfasst (von $n_{\text{total}}=88$)	% erfasst	Accession-Nummer der nicht erfassten Sequenzen
ntnh-9a-F gesamt	67	76,1	- keine Angabe -
ntnh-9a-F letzte 25 nt von 3'	85	96,6	JX847735; X87972; Y12091
ntnh-9a-F letzte 13 nt von 3'	87	98,9	X87972
ntnh-2c-R gesamt	83	94,3	AB745666; AB745667; JX847735; X87972; Y12091
ntnh-2d-S gesamt	87	98,9	X87972

Die Primer des an der LfL entwickelten *ntnh*-qPCR-Systems sind in Tab. 12 zusammengestellt. Forward- und Reverse-Primer enthalten jeweils 5, die Sonde enthält 3 degenerierte Positionen. In Tab. 23 sind die prozentualen Anteile der durch die Primer

erfassten Sequenzen an der gesamten Anzahl von Sequenzen ($n = 88$) im Alignment (Tab. 44) angegeben. Der Reverse-Primer und die Sonde erfassen deutlich über 90% der im Alignment enthaltenen Sequenzen. Der Forward-Primer zeigte mit dem eher unwichtigen 5'-Teil einen höheren Anteil an Mismatches, mit den wichtigen 23 am 3'-Ende des Oligonukleotids liegenden Nukleotiden wurde aber ein Anteil über 90% erfasst. Damit wurde das System als zufriedenstellend spezifisch angesehen.

5.2.9.5 *In vitro*-Tests des *ntnh*-Primer-/Sonden-Systems (*ntnH-9a-F*/*ntnH-2c-F*/*ntnH-2d-S*)

Für eine qPCR-Reaktion (25 μ L) wurden 1-fach konzentrierter qPCR-Puffer, 6 mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTPs, jeweils 400 nM Primer, 200 nM Sonde, 0,75 U Platinum Taq-Polymerase und 5 μ L Ziel-DNA eingesetzt. Das Temperaturprogramm setzte sich aus einer initialen Denaturierung von 3 min bei 95°C und 40 Zyklen bestehend aus 15 s Denaturierung bei 95°C gefolgt von 60 s Annealing und Extension bei 55°C zusammen. Zur Detektion wurde die mit 6-Carboxyfluorescein (FAM)-markierte Sonde über den FAM-Filter des MX3005-qPCR-Cyclers (Agilent Technologies, USA) detektiert.

Als Positivkontrolle wurde in einem ersten Test der qPCR eine durch Hitze (95°C, 5 min) inaktivierte Zellsuspension des *C. botulinum*-Stammes LGL E2625 in zwei log-Verdünnungsstufen verwendet (Abb. 62). Dieser Stamm besitzt die *ntnh*-Genregion, er enthält jedoch nur Teile des Gens *bont/E* und ist damit nicht in der Lage, ein funktionales Botulinum-Neurotoxin zu bilden.

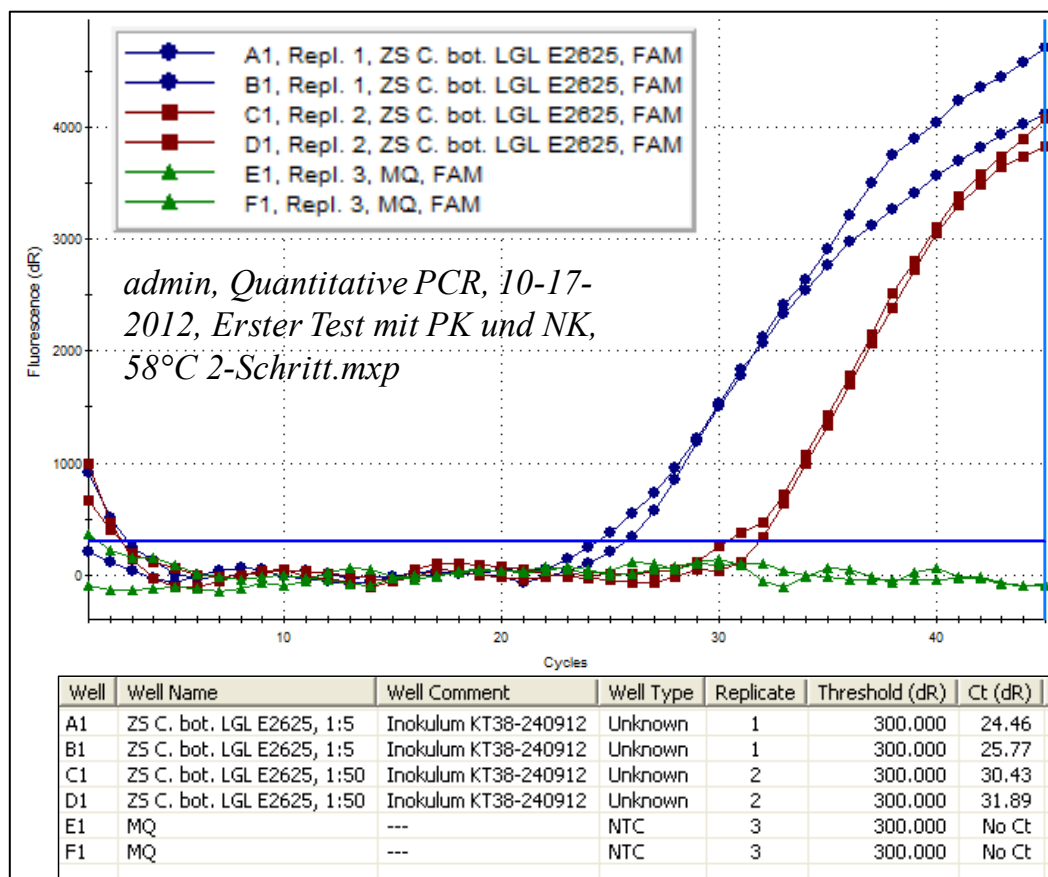


Abb. 62: Amplifikationsplots und C_q -Werte eines Tests des selbst entwickelten *ntnh*-Nachweissystems (*ntnH-9a-F*/*ntnH-2d-S*/*ntnH-2c-R*)

In einer Annealing-Temperatur-Gradienten-PCR wurden Annealing-Temperaturen zwischen 53 und 63°C getestet. Das Ergebnis der PCR wurde auf ein 3%-Agarose-Gel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 63). Bei Annealing-Temperaturen > 57,7°C wurden nie PCR-Produkte in Form einer Bande detektiert. Im Fall des *C. botulinum*-Stammes Typ F LGL 1955 wurde selbst bei einer Annealing Temperatur von 57,7°C keine Bande mehr sichtbar. Die Bandenstärke nahm bei 55,1°C im Vergleich zu 53°C dagegen zu. Die schon im ersten Test (Abb. 62) gewählte Annealing-Temperatur, die auch anhand der in silico-Analyse der Oligonukleotide als optimal bestimmt wurde, ist nach den Ergebnissen dieser Annealing-Temperatur-Gradienten-PCR als optimal zu bewerten.

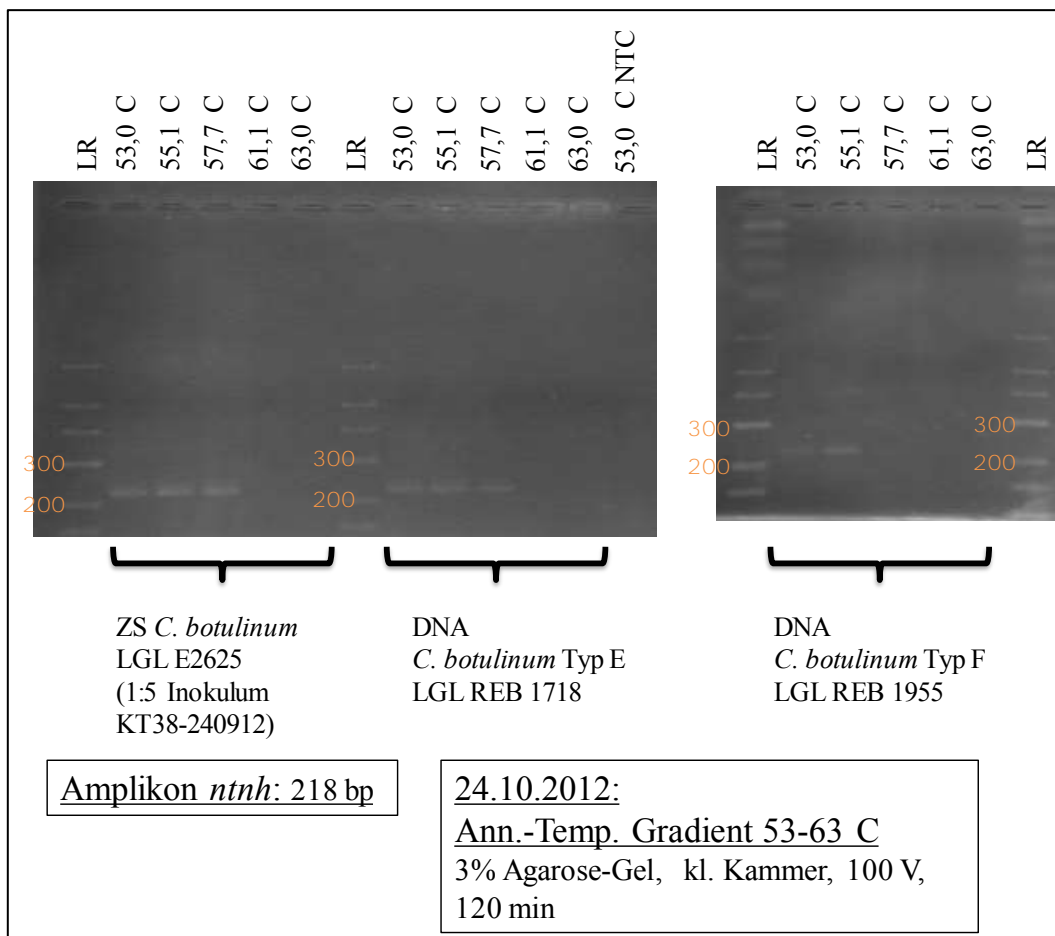


Abb. 63: Geldokumentation der Annealing-Temperatur-Gradienten-PCR des selbst entwickelten *ntnh*-Nachweissystems (*ntnH-9a-F/ntnH-2d-S/ntnH-2c-R*)

Eine weitere qPCR wurde zum Test unterschiedlicher Primer-Konzentrationen (200, 400 und 600 nM) durchgeführt. Dabei wurden nur noch 2,5 µL der jeweiligen Template-DNA eingesetzt (Zellsuspension des Stammes *C. botulinum* Typ E LGL 2625, 1:5 und 1:50; vgl. erster Test; Abb. 62). Die Ergebnisse des qPCR-Laufs sind in Abb. 64 dargestellt. Deutlich erkennbar war, dass die Amplifikation am besten bei einer Primerkonzentration von 600 nM (grüne Kurven) und am schlechtesten bei 200 nM (blaue Kurven) verlief. Die Amplifikationsplots bei 400 nM lagen zwischen diesen Ausprägungen. Für weitere Tests wurde daher eine Primerkonzentration von 600 nM verwendet.

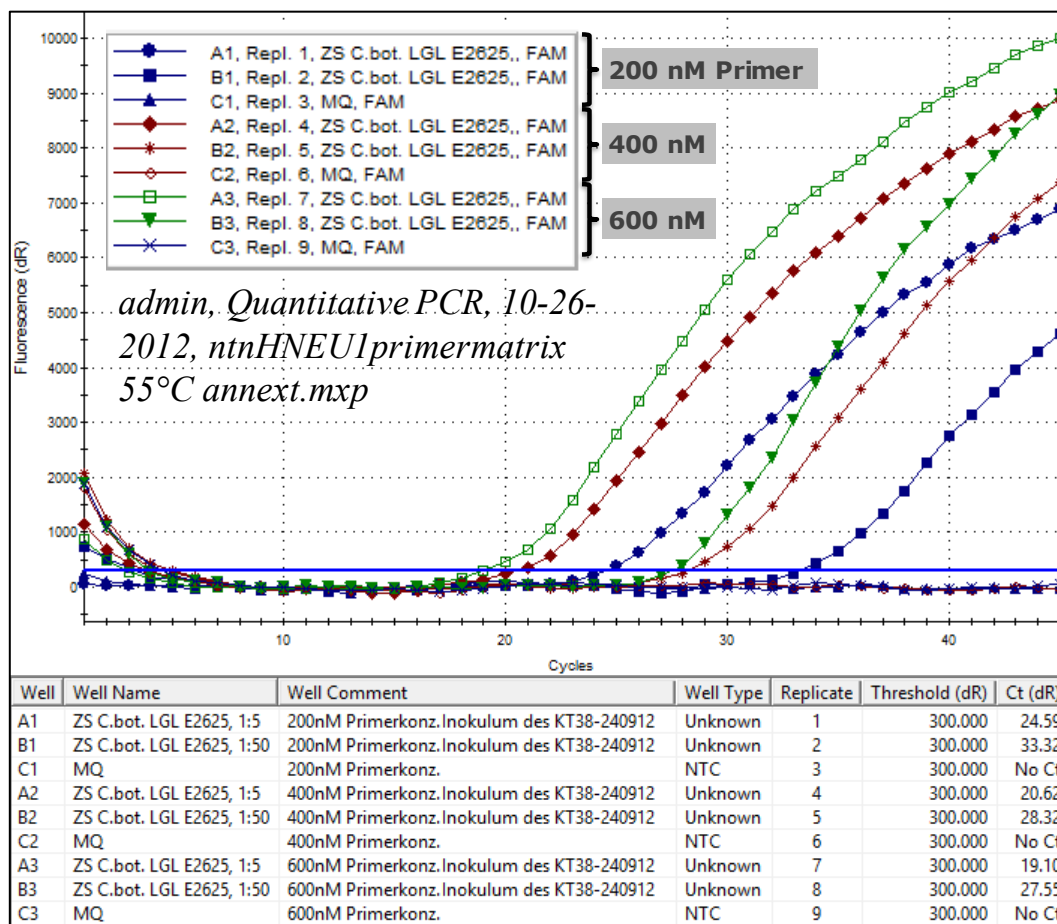


Abb. 64: Amplifikationsplots und C_q -Werte der Primermatrix-qPCR des selbst entwickelten ntnh-Nachweissystems (*ntnH-9a-F/ntnH-2d-S/ntnH-2c-R*)

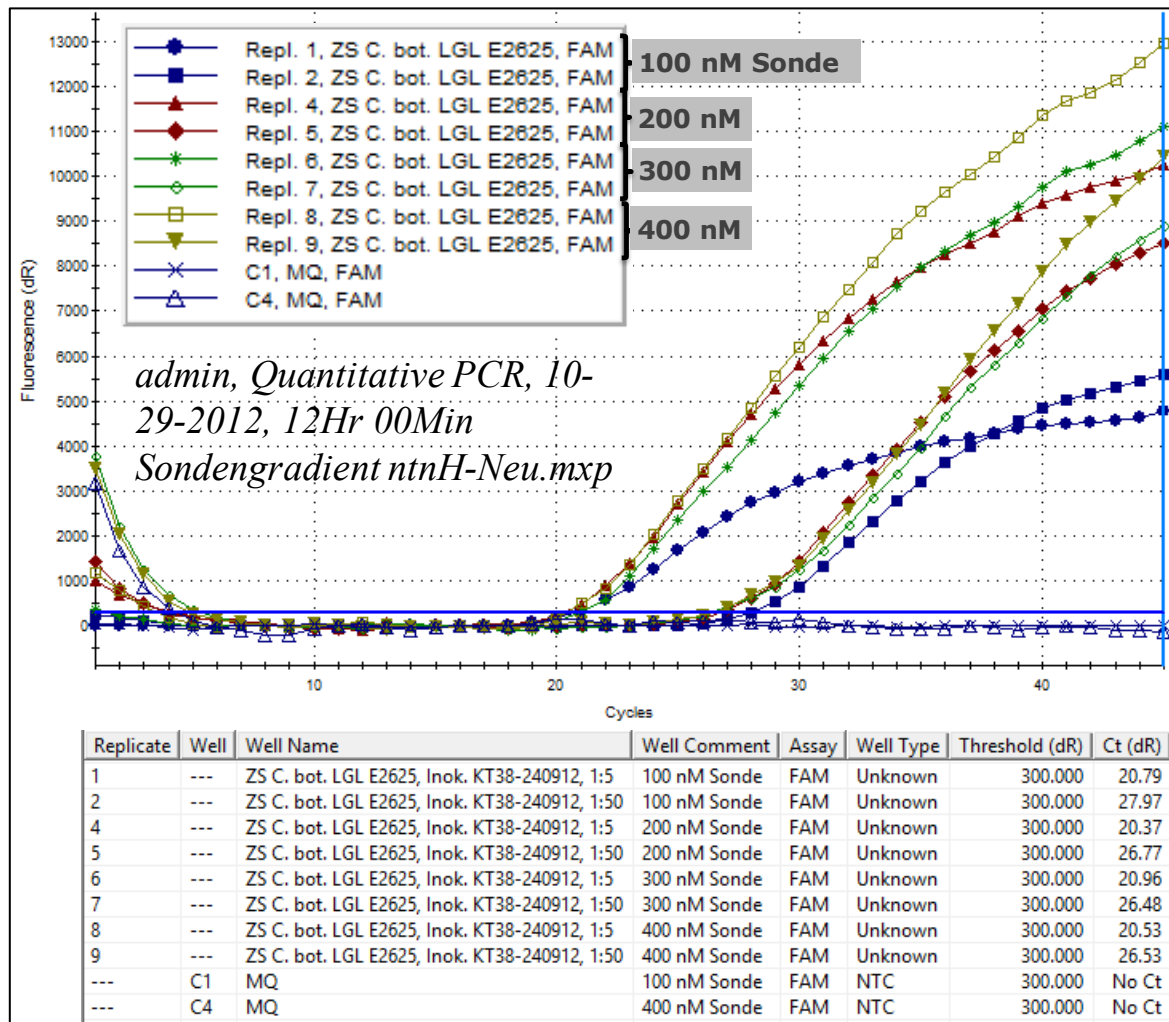
Im Anschluss wurde eine Sondengradienten-qPCR durchgeführt. Es wurden Sondenkonzentrationen von 100, 200, 300 und 400 nM getestet. Die Ergebnisse sind in Abb. 65 dargestellt. Die schlechtesten Amplifikationsergebnisse wurden mit einer Sondenkonzentration von 100 nM erzielt, die besten bei 400 nM. Die Amplifikationsplots bei 200 und 300 nM verliefen relativ ähnlich und lagen zwischen den 100 und 400 nM-Kurven. Für folgende qPCR-Läufe wurde daher eine Sondenkonzentration von 400 nM verwendet.

Aus den Ergebnissen wurden die in Tab. 24 dargestellten Standard-Reaktionsbedingungen abgeleitet. Der Aktivierungsschritt wurde nach Herstellerangaben im Laufe der Versuche von 3 min bei 95°C auf 2 min bei 94°C angepasst. Ebenso wurde die Temperatur jedes Denaturierungsschrittes im Zyklus von 95°C auf 94°C gesenkt.

Tab. 24: Standard-Reaktionsbedingungen der ntnh-qPCR mit dem selbst entwickelten Primer-/Sondensystem

Kalkulation Hot-Start-PCR für 25 µl:		
qPCR einzeln		
ntnH-9a-F, ntnH-2c-R, ntnH-2d-S (FAM-BHQ-1)		
	1 Ansatz (µl)	Konzentration
Puffer (10x, cont. no MgCl ₂)	2,5	1x
MgCl ₂ (50 mM)	2	6 mM
dNTPs (10 mM each)	0,5	200 µM
ntnH-9a-F (10 µM)	1,5	600 nm
ntnH-2c-R (10 µM)	1,5	600 nm
ntnH-2d-S (10 µM)	1	400 nm
Platinum -Taq-Pol. (5 u / µL)	0,15	0,75 u
H ₂ O (=ad dispatch volume)	13,35	
Dispatch	22,5	
DNA (cell suspension)	2,5	
Ges.-Vol.	25	

Temperaturprofil:
! 3 min activ. 95°C !
annealing: 55°C
2-step-PCR Programm:
2 min 94°C Aktivierung
15 sec 94°C Denat.
60 sec 55°C Ann./Ext.
45 Zyklen
Filter set gain settings:
4x FAM

Abb. 65: Amplifikationsplots und C_q-Werte der Sondenmatrix-qPCR des selbst entwickelten ntnh-Nachweissystems (ntnH-9a-F/ntnH-2d-S/ntnH-2c-R)

Zur Überprüfung der Spezifität des *ntnH*-Nachweissystems (*ntnH-9a-F/ntnH-2d-S/ntnH-2c-R*) wurde ein qPCR-Lauf ohne Sonde aber unter Einsatz des in den DNA-Doppelstrang interkalierenden Farbstoffs EvaGreen (Mao et al., 2007) durchgeführt. Als Ziel-DNA kamen erneut die beiden log-Verdünnungen der Zellsuspension des *C. botulinum*-Stammes Typ E LGL 2625 zum Einsatz. In der Dissoziationskurve zeigte sich ein einzelner, spezifischer Peak bei ca. 76,4°C (Abb. 66) für alle Ansätze der Positivkontrolle. Die Amplifikationsplots glichen den im ersten Test aufgenommenen Kurven mit den Unterschieden, i) dass die C_q -Werte deutlich früher geringer waren und ii) dass die Negativkontrolle (Ultra-Pure-Wasser; Milli-Q Plus Ultra-Pure Water System von Millipore™, USA) bei C_q -Werten über 42 den Threshold überschritten. Beides kann durch eine insgesamt höhere Fluoreszenzintensität des Farbstoffes EvaGreen gegenüber dem Einsatz von Sonden erklärt werden. Der Signalanstieg der Negativkontrolle kann zudem geringfügig vorhandenen, unspezifischen Amplikons geschuldet sein, die nur durch die unspezifische Bindungseigenschaft an dsDNA von EvaGreen detektiert werden, während sie bei Verwendung einer spezifischen Sonde nicht messbar sind.

Weiterhin wurde eine log-Verdünnungsreihe (10^{-1} bis 10^{-7}) einer hitzeinaktivierten Zellsuspension des *C. botulinum*-Stammes Typ E LGL 2625 in einer qPCR aufgetragen. Die Ergebnisse sind in Abb. 67 gezeigt. Hierfür wurde auch eine Standardgerade gebildet. Auffällig war, dass die einzelnen Verdünnungen in einem Abstand von ca. 5,1 Zyklen den Threshold überschritten (siehe Steigung der Standardgeradenfunktion, Abb. 67). Erwartet worden wäre ein Abstand von etwa 3,3 Zyklen für eine um den Faktor 10 vergrößerte Menge an Ziel-DNA ($2^{\text{Zyklus}} = 10 \rightarrow \text{Zyklus} = {}_2\log(10) = 3,3219$). Da dieser Effekt konsistent in weiteren qPCR-Tests auftrat, wurde vermutet, dass er in der Verwendung der hitzeinaktivierten Zellsuspension als DNA-Template begründet sein könnte. Möglicherweise ist das Vorliegen unzugänglicher DNA in gram-positive Zellwänden und/oder Sporen Ursache einer verminderten Erfassung in der PCR.

Für die Entwicklung eines Standards zur Quantifizierung wurde deshalb die Zellsuspension eines transformierten *E. coli*-Stamms mit dem Insert des selbst entwickelten *ntnH*-Primersystems (*ntnH-9a-F/ntnH-2c-R*) aus dem *C. botulinum*-Stamm Typ E LGL 2625 in log-Verdünnungsstufen (10^{-1} bis 10^{-4}) herangezogen. Die Amplifikationsplots der qPCR-Läufe zweier Verdünnungsreihen, die in einem Projekt zusammengefasst wurden, die daraus resultierende Standard-Gerade sowie die C_q -Werte sind in Abb. 68 gezeigt. Obwohl die einzelnen C_q -Werte einer Verdünnungsstufe der beiden Verdünnungsreihen einen relativ großen Zyklenbereich abdeckten, resultierte eine den Optimalvorstellungen sehr nahe kommende Standard-Geradengleichung (siehe Abb. 68). Die Verdünnungsreihen wurde aliquotiert und für die Verwendung zur Quantifizierung aufbewahrt.

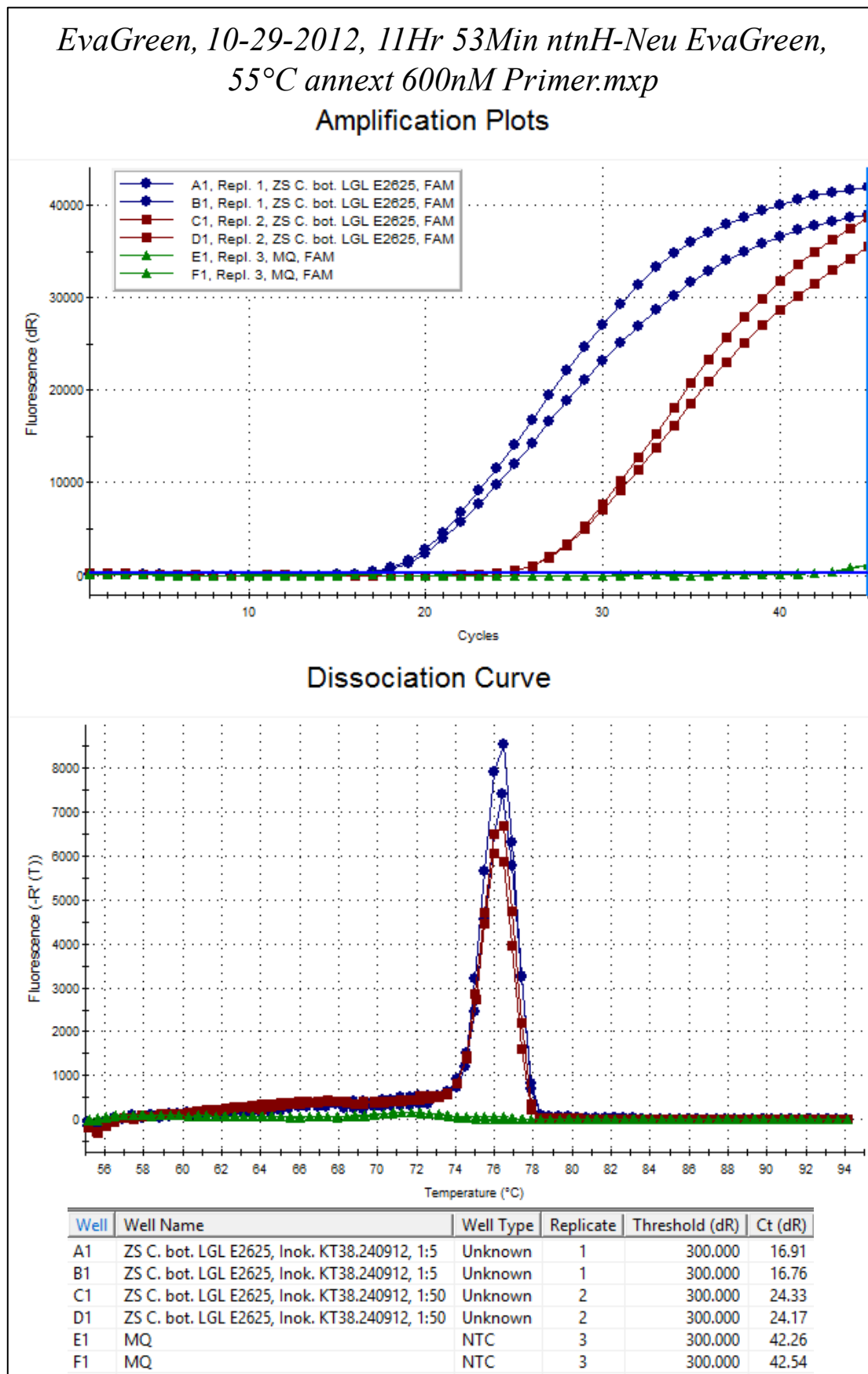


Abb. 66: Amplifikationsplots, Dissoziationskurve und C_q -Werte der EvaGreen-qPCR des selbst entwickelten *ntnH*-Nachweissystems (*ntnH-9a-F/ntnH-2d-S/ntnH-2c-R*)

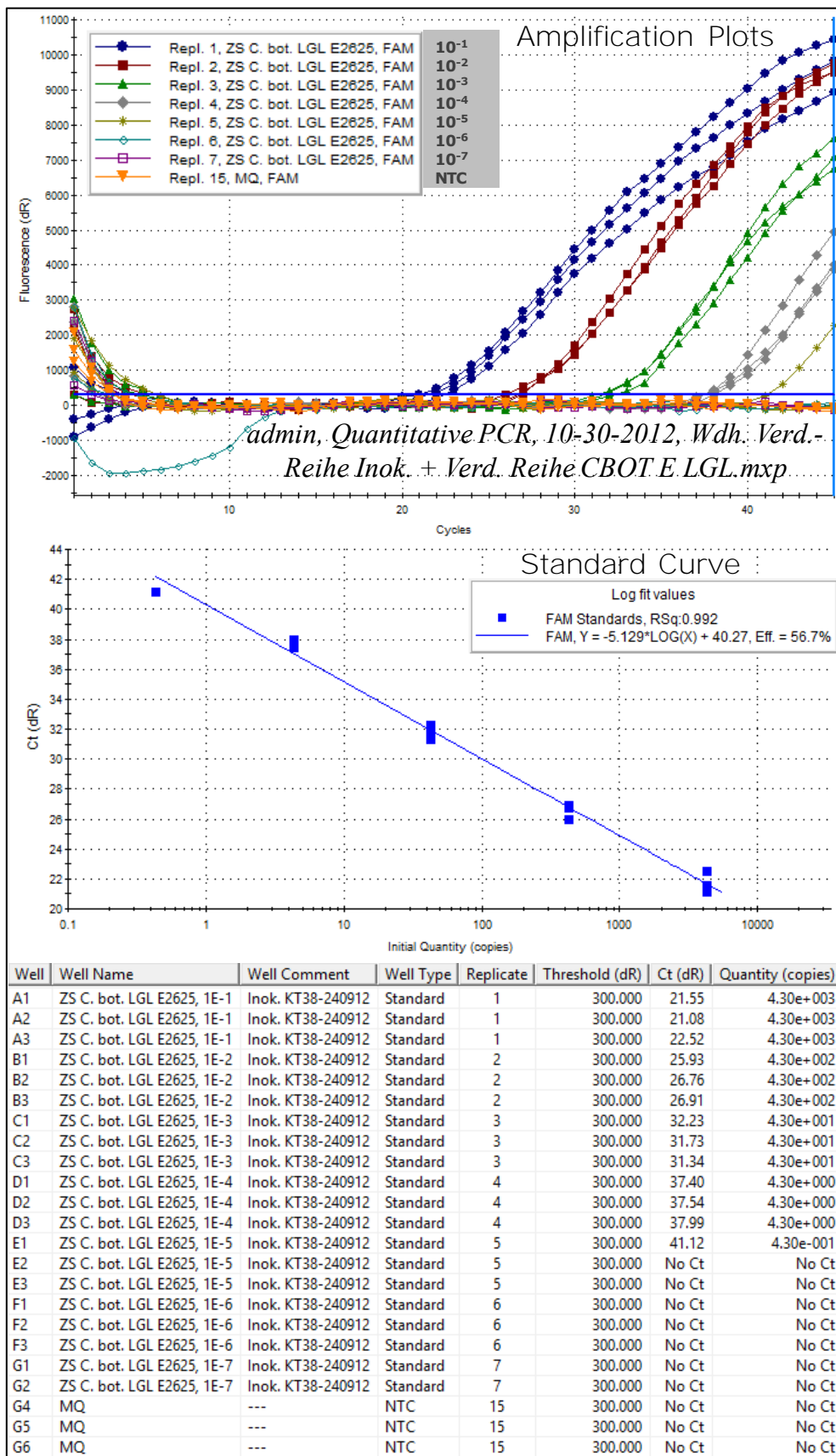


Abb. 67: Amplifikationsplots, Standardkurve und C_q -Werte der qPCR einer Zellsuspensions-Verdünnungsreihe des Stammes *C. botulinum* LGL E2625 mit dem ntnH-Nachweissystem ntnH-9a-F/ntnH-2d-S/ntnH-2c-R

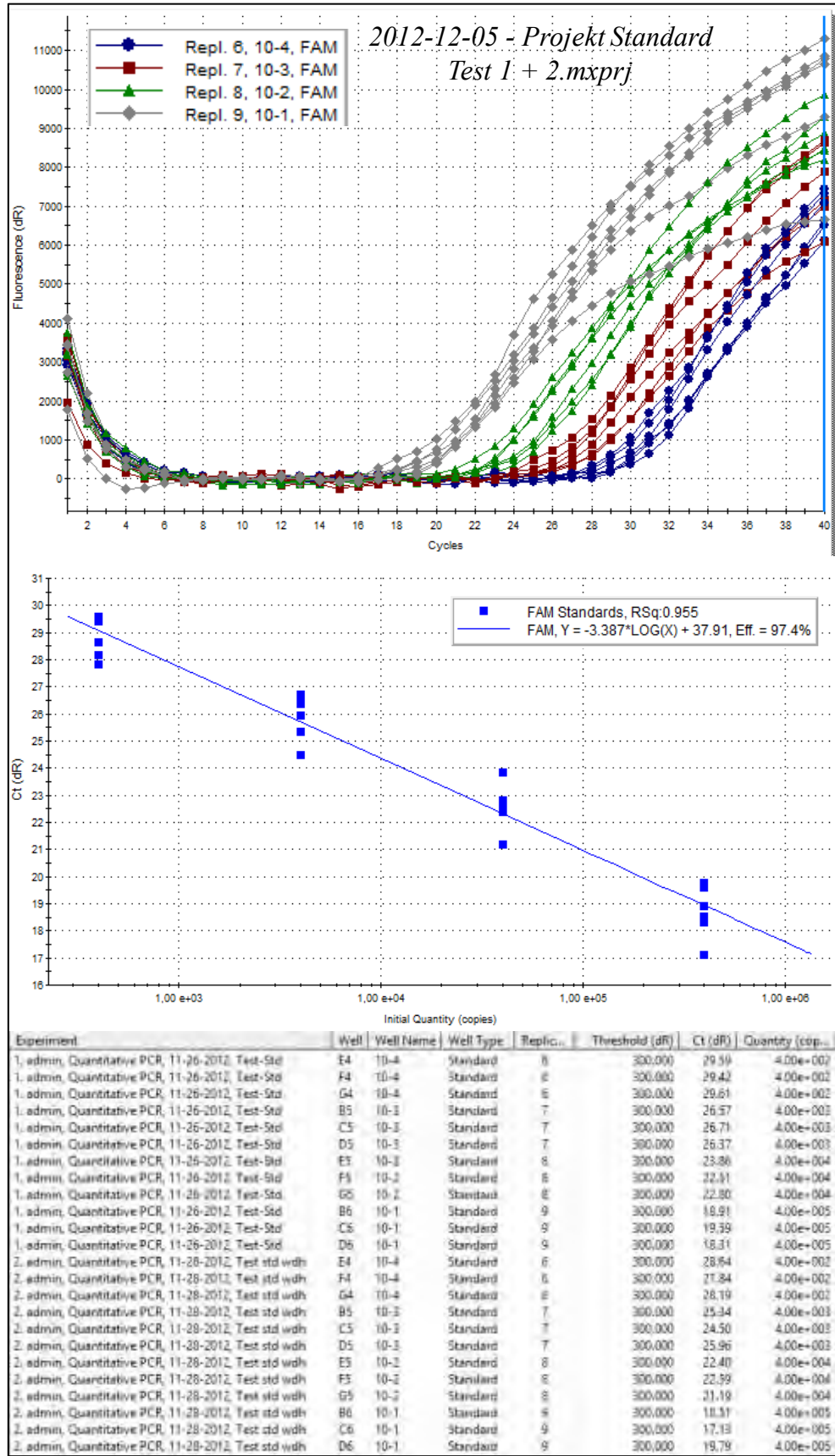


Abb. 68: Amplifikationsplots, Standardkurve und C_q -Werte der qPCR einer Zellsuspensions-Verdünnungsreihe eines transformierten *E. coli*-Stammes mit dem *ntnH*-Nachweissystem *ntnH-9a-F/ntnH-2d-S/ntnH-2c-R*

Mit den so optimierten Reaktionsbedingungen wurde die Sammlung der dem Aufgabenbereich AQU1c zur Verfügung stehenden *C. botulinum*-Stämme auf das Vorkommen des *ntnH*-Genabschnittes, der durch das selbst entwickelte Primer/Sonden-System (*ntnH-9a-F/ntnH-2d-S/ntnH-2c-R*) abgedeckt wurde, getestet. Das Ergebnis der qPCR ist in Tab. 25 anhand der erzielten Cq-Werte gezeigt. Nur ein *C. botulinum*-Stamm (Typ C, LGL PH87683) war nicht *ntnH*-positiv. Diese Zellsuspension konnte aber nicht mit anderen qPCR-Systemen auf die Anwesenheit von *C. botulinum*-DNA getestet werden. Es besteht daher die Möglichkeit, dass nicht der richtige Stamm in der Zellsuspension enthalten war, oder auch dass die DNA-Konzentration nicht ausreichend war. Es wurde weiterhin davon ausgegangen, dass *ntnH* als stark konserviertes Gen in allen BoNT-produzierenden Stämmen enthalten ist (East und Collins, 1994; Inoue et al., 1996; Nakamura et al., 2013).

Tab. 25: Überprüfung der Stammsammlung von *C. botulinum* auf das Vorkommen von *ntnH* mittels des selbst entwickelten *ntnH*-qPCR-Nachweissystems (*ntnH-9a-F/ntnH-2d-S/ntnH-2c-R*)

admin, Quantitative PCR, 11-08-2012, Positivkontrollen ntnH.mxp

Well	Well Name	Well Type	Replicate	Threshold (dR)	Ct (dR)	
A2	DNA, C.bot. A, REB1750, 1E-1	Unknown	1	300.000	30.45	
A3	DNA, C.bot. A, REB1750, 1E-1	Unknown	1	300.000	31.61	+
A4	DNA, C.bot. A, REB1750, 1E-1	Unknown	1	300.000	30.15	
B2	DNA, C.bot. B ALT, REB1944, 1E-1	Unknown	2	300.000	37.86	
B3	DNA, C.bot. B ALT, REB1944, 1E-1	Unknown	2	300.000	35.49	+
B4	DNA, C.bot. B ALT, REB1944, 1E-1	Unknown	2	300.000	30.72	
C2	DNA, C.bot. B NEU, REB1944, unverd.	Unknown	3	300.000	24.44	
C3	DNA, C.bot. B NEU, REB1944, unverd.	Unknown	3	300.000	23.72	+
C4	DNA, C.bot. B NEU, REB1944, unverd.	Unknown	3	300.000	24.78	
D2	DNA, C.bot. D, LGL-MG68986, 1E-1	Unknown	4	300.000	35.19	
D3	DNA, C.bot. D, LGL-MG68986, 1E-1	Unknown	4	300.000	34.91	+
D4	DNA, C.bot. D, LGL-MG68986, 1E-1	Unknown	4	300.000	35.30	
E2	DNA, C.bot. F, REB1955, 1E-1	Unknown	5	300.000	34.52	
E3	DNA, C.bot. F, REB1955, 1E-1	Unknown	5	300.000	34.68	+
E4	DNA, C.bot. F, REB1955, 1E-1	Unknown	5	300.000	34.92	
F2	ZS, C.bot. A, LGL-BW57, 1E-1	Unknown	6	300.000	20.30	
F3	ZS, C.bot. A, LGL-BW57, 1E-1	Unknown	6	300.000	21.62	+
F4	ZS, C.bot. A, LGL-BW57, 1E-1	Unknown	6	300.000	No Ct	
G2	ZS, C.bot. A, LGL-BW58, 1E-1	Unknown	7	300.000	26.18	
G3	ZS, C.bot. A, LGL-BW58, 1E-1	Unknown	7	300.000	26.64	+
G4	ZS, C.bot. A, LGL-BW58, 1E-1	Unknown	7	300.000	27.47	
H2	ZS, C.bot. B, LGL-BW93a, 1E-1	Unknown	8	300.000	23.15	
H3	ZS, C.bot. B, LGL-BW93a, 1E-1	Unknown	8	300.000	21.65	+
H4	ZS, C.bot. B, LGL-BW93a, 1E-1	Unknown	8	300.000	22.59	
A5	ZS, C.bot. C, LGL-PH87683, 1E-1	Unknown	9	300.000	No Ct	
B5	ZS, C.bot. C, LGL-PH87683, 1E-1	Unknown	9	300.000	No Ct	-
C5	ZS, C.bot. C, LGL-PH87683, 1E-1	Unknown	9	300.000	No Ct	
D5	ZS, C.bot. E, LGL-BW60a, 1E-1	Unknown	10	300.000	24.53	
E5	ZS, C.bot. E, LGL-BW60a, 1E-1	Unknown	10	300.000	24.44	+
F5	ZS, C.bot. E, LGL-BW60a, 1E-1	Unknown	10	300.000	24.31	
G5	MQ	NTC	11	300.000	No Ct	
H5	MQ	NTC	11	300.000	No Ct	-
H6	MQ	NTC	11	300.000	No Ct	

5.2.10 Interne Amplifikationskontrolle (IAC) zum Ausschluss von PCR-Inhibition

5.2.10.1 Durchführung: Interne Amplifikationskontrolle (IAC) zum Ausschluss von PCR-Inhibition

Waren zu untersuchende Ziel-DNA bzw. –Zellsuspensionen (ZS) *ntnh*-qPCR-negativ, wurde zum Ausschluss von inhibitorischen Effekten eine interne Amplifikationskontrolle in einem nachgelagerten qPCR-Ansatz durchgeführt. Dabei wurde entweder das *ehly*-qPCR-System (siehe 4.2.11) oder das hier beschriebene *ntnh*-qPCR-System selbst verwendet. Im zweiten Fall wurden dem Reaktionsansatz (25 µL) neben 2,5 µL Proben-Template noch weitere 2,5 µL einer ZS von transgenen *E. coli* zugegeben, die den Abschnitt des *ntnh*-Gens empfangen hatten, der mit dem in 5.2.9.4 beschriebenen System nachgewiesen wird. Es wurden 21,5 Kopien des *ntnh*-Amplikons pro qPCR-Reaktion zugesetzt. Trat bei der IAC ein qPCR-Signal auf, konnten nennenswerte inhibitorische Effekte ausgeschlossen werden.

5.2.10.2 Ergebnisse und Diskussion: Interne Amplifikationskontrolle (IAC) zum Ausschluss von PCR-Inhibition

Zunächst wurde die Variante der IAC unter Verwendung des *ehly*-Primer-/Sondensystems an zuvor *ntnh*-negativ getesteten, möglicherweise aber positiven Zellsuspensionen und mit *ehly*-haltiger Zellsuspension gespikten Ansätzen getestet (Abb. 69).

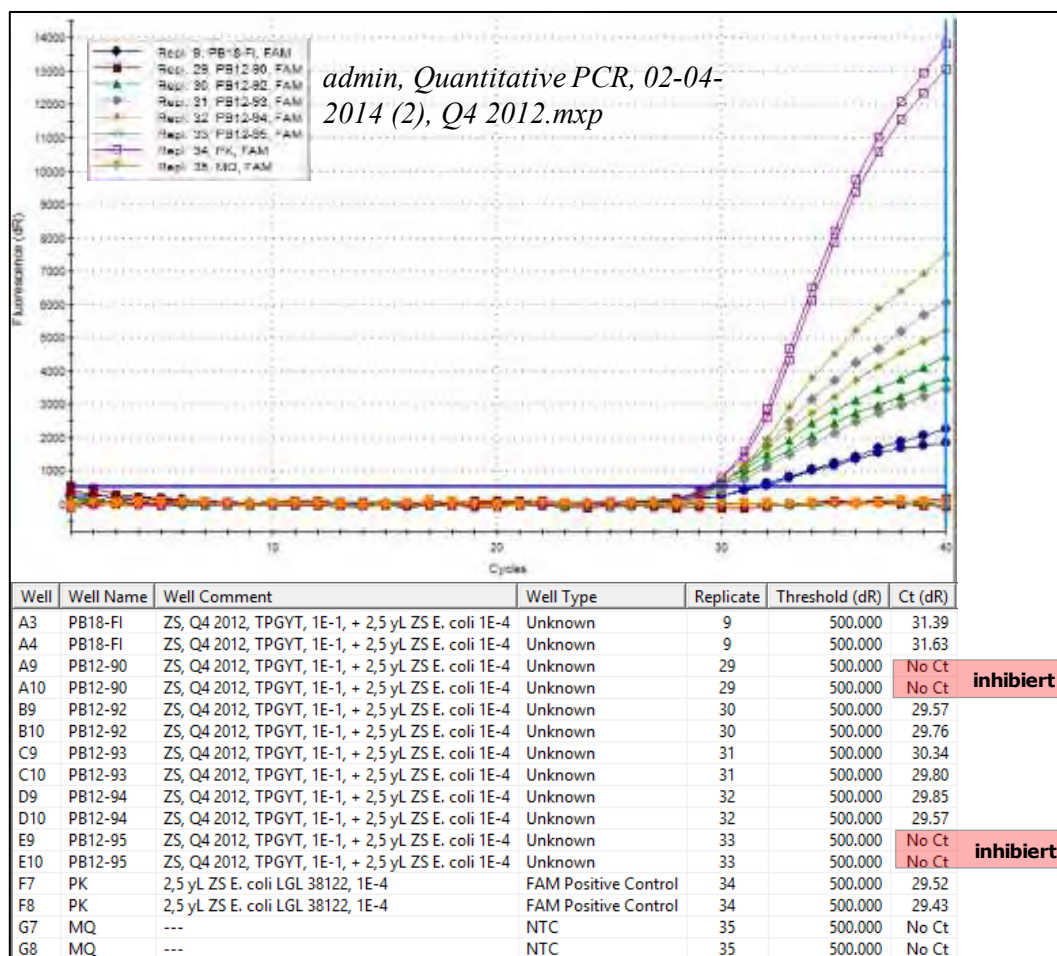


Abb. 69: Amplifikationsplots und C_q -Werte einer qPCR zur IAC mit dem *ehly*-Primer-/Sondensystem (*Ehly-F/Ehly-R/Ehly-S*)

Hier wurden zwei der Test-Zellsuspensionen in der *ehly*-IAC negativ getestet, während der Rest der Ansätze Signale ergab (*ehly*-positiv). Die *ehly*-negativ getesteten Reaktionen wurden als inhibiert eingestuft, weswegen ein zuvor erzielt (*ntnh*-negatives) Ergebnis nicht gewertet werden konnte. Bei den *ehly*-positiv getesteten Zellsuspensionen dagegen wurde keine Inhibition festgestellt, und das zuvor erzielte (*ntnh*-negative) qPCR-Ergebnis wurde auch negativ gewertet.

In Abb. 69 wird durch die im Vergleich zur Positivkontrolle (Replikat 34) etwas nach hinten verschobenen und flacheren Signale einzelner qPCR-Ansätze mit Test-Zellsuspensionen auch deutlich, dass eine leichte Inhibition vorlag, aber dennoch ein Signal zustande kam. Es muss bei dieser Art der IAC die Annahme vorausgesetzt werden, dass sich die Inhibition auf das *ehly*-Nachweissystem genauso auswirkt wie auf das *ntnh*-Nachweissystem. Eine leichte Inhibition beim *ehly*-System sollte also auch beim *ntnh*-System nur zu einer leichten Inhibition führen, nicht aber zu einer vollständigen.

Eine interne Amplifikationskontrolle mit demselben Nachweissystem, das auch zum Nachweis des Zielgens verwendet wird (*ntnh*-Primer-/Sondensystem), unter Spiking des Zielgens hat dabei den Vorteil, dass auf mögliche Inhibitoren in der Ziel-DNA die gleiche Reaktion/Hemmung erwartet werden kann. Auch diese Variante der internen Amplifikationskontrolle wurde in einem qPCR-Lauf getestet (Abb. 70).

In dem gezeigten qPCR-Lauf wurden zuvor *ntnh*-negativ getestete DNA-Extrakte in einer nachgeschalteten *ntnh*-qPCR mit *ntnh*-enthaltender Zellsuspension gespikt und erneut getestet. In diesem hier gezeigten Fall wurden in allen Fällen (außer der Ziel-DNA-freien Negativkontrolle (MQ-Wasser)) Signale aufgenommen, wodurch nennenswerte inhibitorische Effekte durch Substanzen in der Ziel-DNA-Lösung ausgeschlossen werden konnten. Das in der vorgeschalteten *ntnh*-qPCR erzielte Ergebnis (*ntnh*-negativ) wurde damit bestätigt.

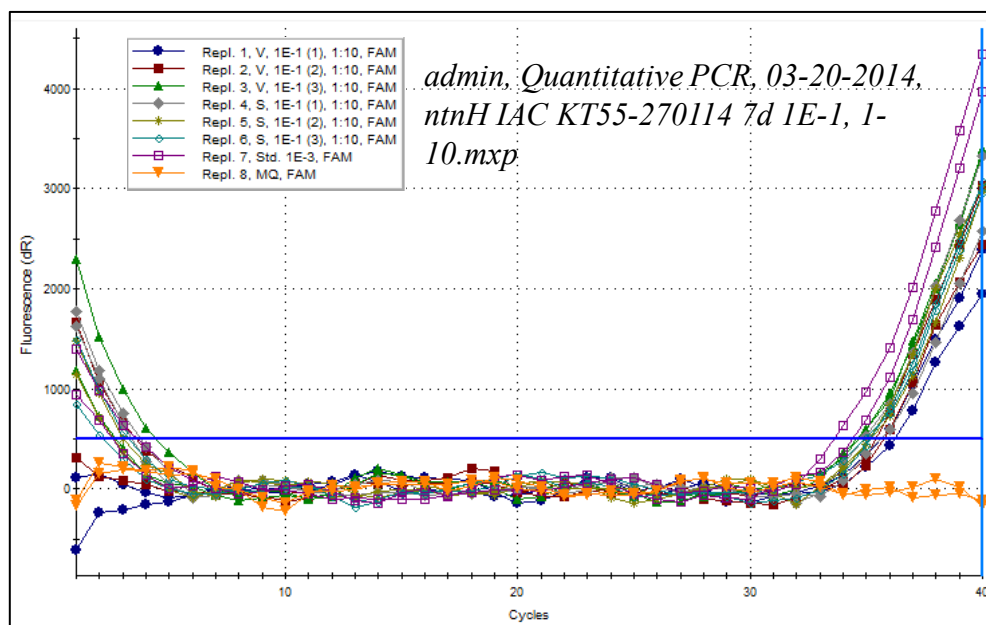


Abb. 70: Amplifikationsplots einer qPCR zur internen Amplifikationskontrolle mit dem selbst entwickelten *ntnh*-Nachweissystem (*ntnH-9a-F/ntnH-2d-S/ntnH-2c-R*)

5.3 Schnellscreening-Ansatz zum Nachweis von *C. botulinum*

5.3.1 Durchführung

Um ein Schnellscreening-Nachweissystem für *C. botulinum* umzusetzen, wurden qPCR-Analysen zu verschiedenen Zeitpunkten im Kultivierungsablauf (Kapitel 5.1, Abb. 29) integriert mit dem Ziel, die Analysezeit zu verkürzen. Beim Nachweis von *C. botulinum* aus Umweltproben wurde molekularbiologisch aus der Flüssiganreicherung in TPGY-Medium untersucht (qPCR; Abb. 71). Als Ziel-DNA wurden entweder Zellsuspensionen eingesetzt, die aus der TPGY-Anreicherung durch Waschen (abzentrifugieren, Überstand verwerfen und in gleichem Volumen MQ-Wasser resuspendieren) und anschließendes Verdünnen (1:10 und 1:100) gewonnen wurden, oder DNA-Extrakte die mit dem kommerziell erhältlichen DNA-Extraktionskit QIAamp DNA Stool Mini Kit nach Herstellerangaben extrahiert wurden (vgl. Anhang 13.1.3).

Eine weitere qPCR-Analyse von Zellsuspensionen, die vom Zellrasen auf den Agarplatten gewonnen wurden, diente zur Überprüfung des Ergebnisses. Für das Screening wurde als molekularbiologisches Nachweissystem das selbst entwickelte *ntnh*-Primer-/Sondensystem (ntnH-9a-F/ntnH-2d-S/ntnH-2c-R) verwendet, da es das in allen BoNT-produzierenden *C. botulinum*-Stämmen vorhandene Gen *ntnh* nachweist (siehe 5.2.9). Tritt hier ein *ntnh*-positives Ergebnis auf kann in einer nachfolgenden qPCR mit den Nachweissystemen für die *bont*-Gene (5.2.1 bis 5.2.8) eine genauere Charakterisierung des vorliegenden Toxintyps vorgenommen werden.

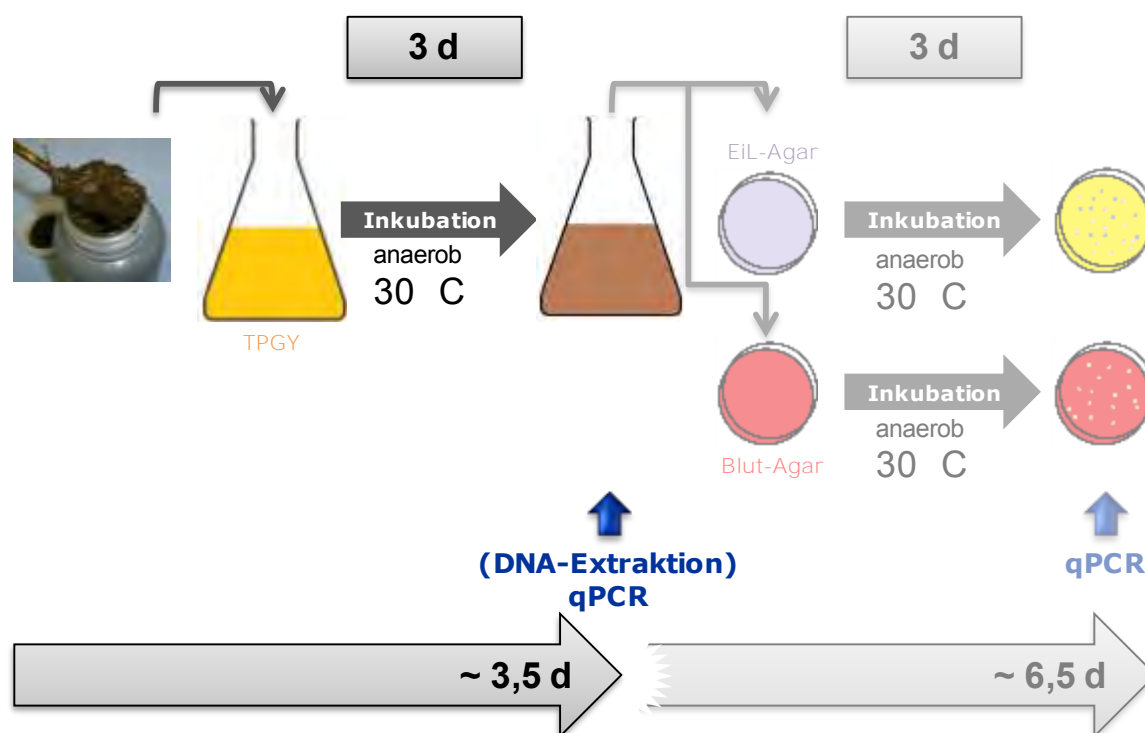


Abb. 71: Schnellscreening-Ansatz zum Nachweis von *C. botulinum*

5.3.2 Ergebnisse und Diskussion

Bei der qPCR aus der inkubierten Flüssiganreicherung (TPGY) konnten bei Umweltproben wie Gärgemischen auf Grund von qPCR-Inhibition häufig keine Signale

erhalten werden (Abb. 72). So waren bei der Untersuchung von Umweltproben auf *C. botulinum* im Rahmen des Projekts „Verhalten von EHEC und krankheitserregenden Clostridien in Biogasanlagen“ (Fröschle et al., 2015c) 33 von 111 Proben (ca. 30%) der 1:10 verdünnten TPGY-Flüssiganreicherungen in einer nachgeschobenen *ehly*-IAC (vgl. 5.2.10) negativ, d.h. es wurde PCR-Inhibition festgestellt.

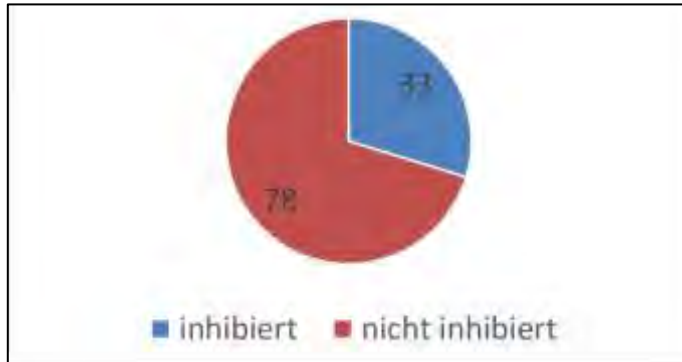


Abb. 72: Ergebnisse der internen Amplifikationskontrolle (IAC) von 1:10-verdünnten TPGY-Anreicherungskulturen

Auf Grund dieses Ergebnisses wurde nachfolgend der DNA-Extrakt aus der unverdünnten TPGY-Anreicherung als Ziel-DNA für qPCR-Analysen herangezogen. Dabei werden PCR-Inhibitoren zu großem Teil eliminiert. Es resultierte eine klare Lösung, die braun bzw. grün färbenden Bestandteile wurden mit dem Überstand verworfen. Die zusätzliche Arbeitszeit durch die DNA-Extraktion beträgt ca. 50-60 min.

Auch die DNA-Extrakte aus TPGY-Anreicherungen aus Fermenterhalten wurden mittels einer qPCR zur IAC überprüft. 28 DNA-Extrakte aus der TPGY-Anreicherung von Umweltproben (Fermenterhalten, Gülle, Silagen) wurden hierzu nach Spiking mit dem *ntnh*-Zellsuspensionsstandard (vgl. 5.2.10) auf Inhibition getestet (Interne Amplifikationskontrolle). Hier wurde nach Template-DNA-Spiking (*E. coli*-Klon mit integriertem *ntnh*-Gen) in keinem Fall eine wesentliche Inhibition mit der Folge eines ausbleibenden oder eines stark abgeflachten *ntnh*-Signals gemessen.

Zur Überprüfung der qPCR-Ergebnisse aus der TPGY-Anreicherung wurden vom späteren Kultivierungsschritt auf EiL- oder Blut-Agarplatten abgenommene Zellsuspensionen ebenfalls mittels qPCR untersucht. PCR-Inhibitoren, die aus der Umweltprobe selbst stammten, werden durch den weiteren Kultivierungsschritt des Ausstreichens großteils ausverdünnt. Die Gefahren, die das zufällige Picken von Kolonien aus einer Anreicherung aus einer Umweltprobe auf (nur teil-selektiven) Agar-Platten mit sich bringt, sind in Kapitel 4.3.1.2 beschrieben. Die Ergebnisse der *ntnh*-qPCR aus Zellsuspensionen von EiL- und Blut-Agar waren in allen Fällen negativ (kein Signal) und bestätigten daher die Ergebnisse sowohl der nicht-inhibierten qPCR-Ergebnisse aus TPGY-Kulturen als auch der DNA-Extrakte. Somit kann die hier beschriebene, vorgezogene molekularbiologische Untersuchung aus der TPGY-Voranreicherung als Schnellscreening-Methode zum Nachweis von *C. botulinum* eingesetzt werden. Dadurch konnte die Arbeitszeit von mindestens 6,5 d auf ca. 3,5 d verkürzt werden.

6 Clostridium difficile

Nachdem der Keim lange Zeit vorwiegend als Kommensale bzw. Umweltkeim betrachtet wurde, zählt *Clostridium difficile* (auch: *Peptoclostridium difficile*, Yutin, 2013) inzwischen zu den bedeutendsten Erregern nosokomialer Durchfallerkrankungen (Ackermann, 2004). Schätzungen zufolge ist der Erreger für 15 – 20% der Fälle von antibiotikaassoziierter Diarrhoe (AAD) und für über 95% der Fälle von pseudomembranöser Kolitis verantwortlich (Bartlett, 2002). Weitere Informationen zum Erreger sind im Abschlussbericht des Projektes „Verhalten von EHEC und krankheitserregenden Clostridien in Biogasanlagen“ (N/11/30) nachzulesen (Fröschle et al., 2015c).

6.1 Mikrobiologische Analytik

Zur Kultivierung von *Clostridium difficile* wurde die Methode des LGL übernommen, die in der Dissertation von Ziegler (2013) beschrieben ist.

Der zweistufige Kultivierungsablauf besteht aus einer Anreicherung in Flüssigmedium (mTPGY: modifizierter Trypticase-Phosphat-Glucose-Hefeextrakt-Bouillon) gefolgt von einem Parallelausstrich auf dem chromID™ *C. difficile* Agar (CDIF, bioMérieux, Frankreich) sowie auf Schaedler Agar + 5% Schafblut (SCS; bioMérieux, Frankreich). Ein Durchführungsprotokoll zur Kultivierung von *Clostridium difficile* ist in Anhang 13.1.4 enthalten.

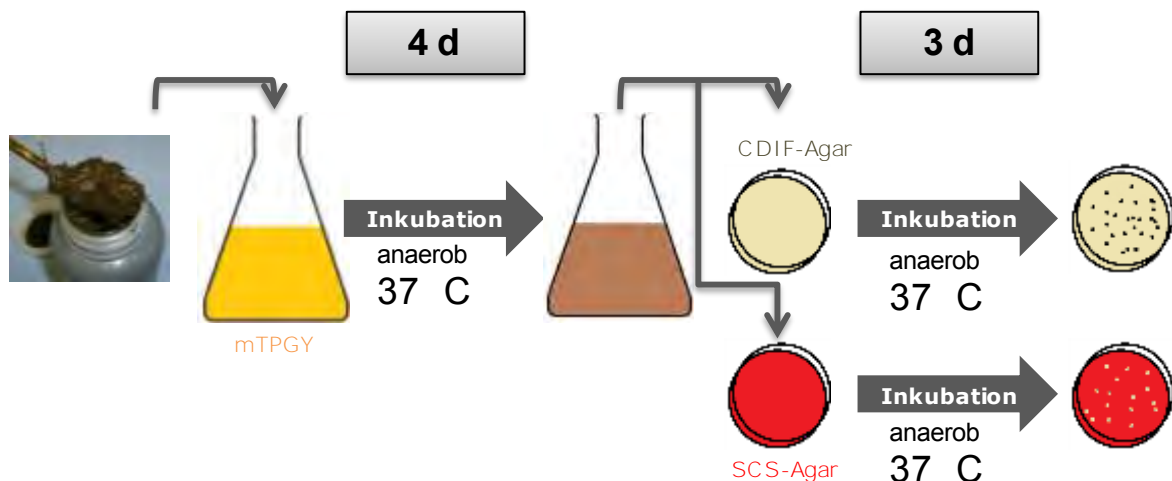


Abb. 73: Schema des mikrobiologischen Kultivierungsablaufs zum Nachweis von *C. difficile*

Für den schwierig zu isolierenden *C. difficile* wurde ein im Vergleich zur Kultivierung der BoNT-bildenden *Clostridium* spp. (vgl. 5.1) eine leicht abgewandelte TPGY-Bouillon verwendet. Die Anreicherungskultur in TPGY-Bouillon wurde (ggf. nach Erhitzungsschritt zum Sporennachweis) durch Zugabe von 1 g Taurocholsäure-Natriumsalz (Carl Roth GmbH + Co. KG, Deutschland) und 36 µL C.D.M.N.-Selektivsupplement (*C. difficile* Moxalactam-Norfloxacin, Oxoid, Thermo Fisher

Scientific Inc., USA) zur Verbesserung der Sporenauskeimung modifiziert (mTPGY; Ziegler, 2013).

6.2 Molekularbiologische Analytik - qPCR zum spezifischen Nachweis des *tpi*-Gens von *Clostridium difficile*

Ausgangspunkt zur Entwicklung eines qPCR-Systems zum Nachweis von *C. difficile* war das am LGL im Routinebetrieb eingesetzte Nachweissystem für das Triosephosphat-Isomerase-Gen (*tpi*). Da es sich dabei um ein Haushaltsgen handelt, das im Zuckermetabolismus eine Funktion trägt, ist es bei einer Vielzahl von Organismen im Allgemeinen und bei einer Vielzahl von *Clostridium* spp. im Speziellen verbreitet. Das Nachweissystem ist deshalb darauf ausgelegt nur die *C. difficile*-spezifischen *tpi*-Sequenzen zu erfassen. Das *tpi*-Gen wurde bereits in der Vergangenheit als Ansatzpunkt zum Nachweis von *C. difficile* beschrieben (Dhalluin et al., 2003; Lemee et al., 2004).

Das *tpi*-Gen hat zwar keine primäre Bedeutung für die Pathogenität des Krankheitserregers, es eignet sich aber zum qPCR-Nachweis im Rahmen eines Schnellscreenings. Sollten *tpi*-positive Ergebnisse entstehen, ist die Nachschaltung weiterer qPCR-Nachweise von Genen, die mit der Pathogenität bzw. Toxizität in Verbindung gebracht werden (z.B. Gene der Virulenzfaktoren Enterotoxin A *tcdA* und Cytotoxin B *tcdB* oder des binären Toxins *cdtA*), zur weiteren Charakterisierung wichtig.

Das *tpi*-qPCR-Nachweissystem wird am LGL im Rahmen einer Pentaplex-qPCR eingesetzt. Es wurde aus diesem Kontext entnommen und sollte an der LfL als Singleplex-qPCR für das Schnellscreening herangezogen werden.

6.2.1 Alignment

Es wurde ein Alignment mit allen zu diesem Zeitpunkt (letzte Aktualisierung: Juli 2015) in der NCBI-Datenbank hinterlegten *tpi*-Gen-Sequenzen gebildet.

Alle Sequenzen davon, die das Amplikon des in Ziegler (2013) dargestellten *tpi*-Primer-/Sonden-Systems (CDIF_tpi_fw/CDIF_tpi_re/CDIF_tpi_S; Tab. 26) enthielten, sind in Tab. 45 in Anhang 13.3.4 wiedergegeben.

Tab. 26: qPCR-Nachweissystem für das *Clostridium difficile*-spezifische *tpi*-Gen (Amplikon: 135 bp; Referenz: Ziegler, 2013)

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Länge [nt]	GC [%]	T _m [°C]
CDIF_tpi_fw	GAA GCT ACT AAG GGT ACA AAT ATA AAG	27	33,3	58,9
CDIF_tpi_re	TGA ATG TCC TAT TAC AAC ATA GTC CA	26	34,6	58,5
CDIF_tpi_S	Cy5 - GGA GCA TTT ACA GGA GAA GTT TCA - BHQ-2	24	41,7	59,3

6.2.2 In silico-Tests des *tpi*-Primer-/Sonden-Systems (CDIF_tpi_fw/CDIF_tpi_re/CDIF_tpi_S)

Forward- und Reverse-Primer des Systems erfassten jeweils nur die *C. difficile*-spezifischen *tpi*-Gensequenzen im Alignment (grau hinterlegte Sequenzen in Tab. 45 in Anhang 13.3.4), während die Sonde daneben einen weiteren, nicht näher phylogenetisch eingeordneten *Clostridium* sp.-Stamm (Accession-Nummer: CP003259) erfasste. Alle anderen nicht-*C. difficile*-spezifischen *tpi*-Sequenzen wurden nicht von den

Oligonukleotiden in ihrer gesamten Sequenz erfasst. Dieses Ergebnis wurde auch durch BLAST-Analysen bestätigt (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome).

Die Schmelztemperaturen der Primer-Oligonukleotide waren mit 58,9°C bzw. 58,5°C (Tab. 26) fast identisch. Die Sondensequenz sollte optimalerweise etwas höher liegen. Dies war mit einer Schmelztemperatur der Sonde CDIF_tpi_S von 59,3°C erfüllt.

In der zu Grunde liegenden Publikation von Ziegler (2013) wurde eine Annealingtemperatur von 55°C verwendet. Diese lag relativ weit unter den kalkulierten Schmelztemperaturen.

Mittels des „Oligo-Analyzer 3.1“ (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) wurden keine Sekundärstrukturen identifiziert, die die Reaktion nennenswert beeinträchtigen könnten.

6.2.3 *In vitro*-Tests des *tpi*-Primer-/Sonden-Systems (CDIF_tpi_fw/CDIF_tpi_re/CDIF_tpi_S)

In einem ersten Test des *tpi*-qPCR-Nachweissystems wurden als Ziel-DNA die Zellsuspensionen zweier CDIF-Agar-Kulturen, die nach mTPGY-Kultur von Fermenterinhalt-Proben gewonnen wurden, in unverdünnter und 1:10-verdünnter Form verwendet (Abb. 74). Da CDIF-Agar als ChromIDTM-Agar (bioMérieux, Frankreich) sehr selektiv das Wachstum von *C. difficile* fördert, konnte davon ausgegangen werden, dass die Zellsuspensionen *C. difficile* enthielten.

Für die erste Test-qPCR wurden die folgenden Konzentrationen der Reagenzien in einem 25 µL-Ansatz eingesetzt: 1x-konzentrierte 10x PCR-Puffer (ohne MgCl₂, InvitrogenTM, Inc., USA), 6 mM MgCl₂ (InvitrogenTM, Inc., USA), 200 µM dNTPs (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), jeweils 400 nM Primer und Sonde (biomers.net GmbH, Deutschland), 0,75 U Platinum-Taq-Polymerase (InvitrogenTM, Inc., USA). Das PCR-Temperaturprogramm startete mit einer initialen Denaturierung von 3 min bei 95°C und es folgten 40 Zyklen bestehend aus einem Denaturierungsschritt von 15 s bei 95°C und einem kombinierten Annealing-Extensionsschritt von 60 s bei 55°C.

Im Ergebnis (Abb. 74) wurden hinsichtlich Kurvenverlauf und Fluoreszenz-Ausbeute gute Amplifikationsplots erhalten. Auffällig war, dass die jeweils unverdünnten und 1:10-verdünnten Ansätze nahezu gleiche C_q-Werte erzielten, d.h. fast identisch konzentriert waren. Die Amplifikationsplots der unverdünnten Varianten waren von der Fluoreszenzausbeute etwas geringer und im Verlauf etwas geneigt, was auf die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren schließen lässt.

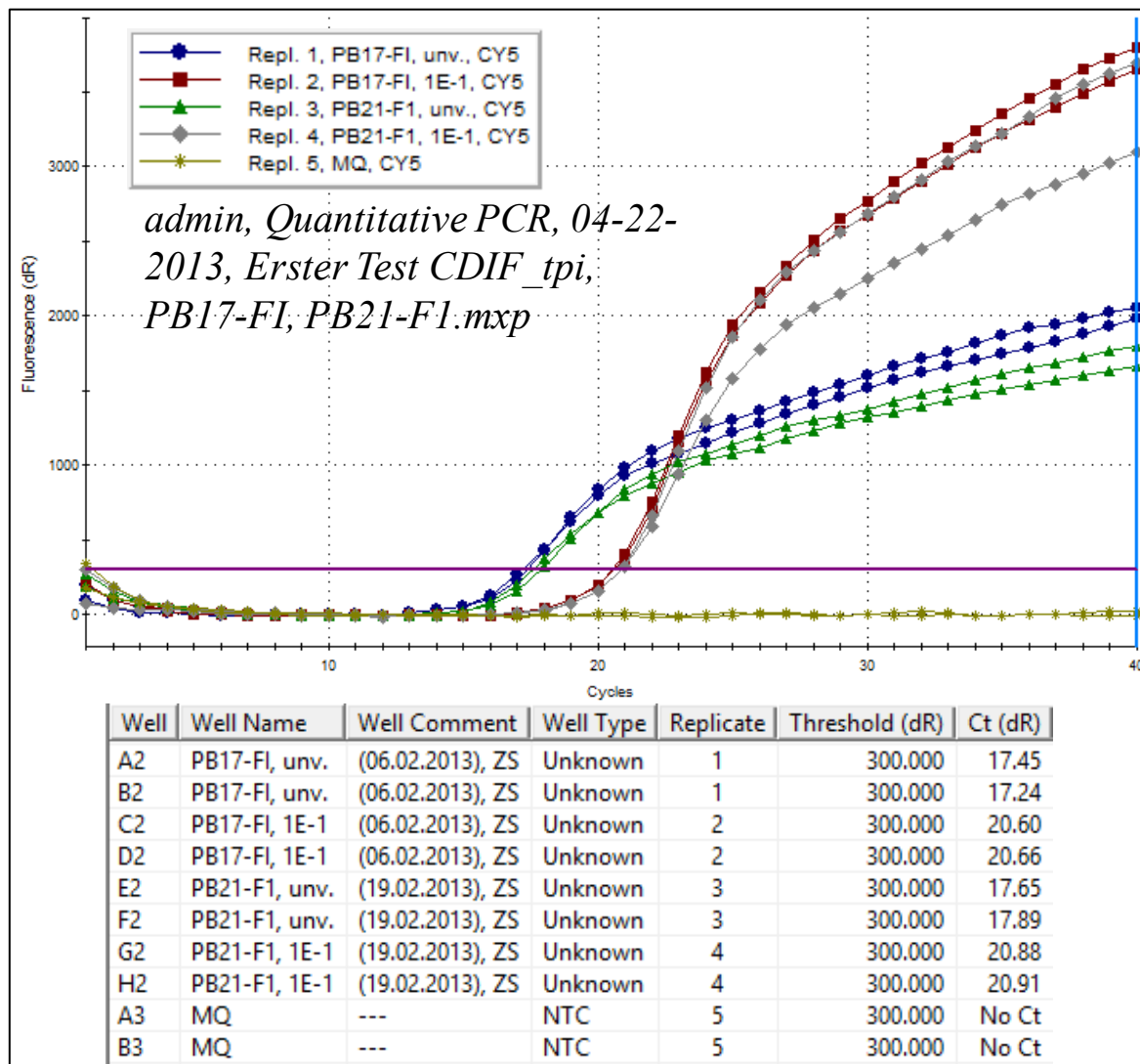


Abb. 74: Amplifikationsplots und C_q -Werte des ersten Tests des tpi-qPCR-Systems zum Nachweis von *C. difficile* (CDIF_tpi_fw/CDIF_tpi_re/CDIF_tpi_S)

Weiterhin wurden verschiedene Konzentrationen der Primer und der Sonden getestet.

In einer Primermatrix wurden 200, 400 und 600 nM der beiden Primer eingesetzt, während die Sondenkonzentration bei 400 nM und auch die sonstigen Konzentrationen der Reagenzien belassen wurden. Als Ziel-DNA wurde die im ersten Test bereits verwendete CDIF-Agar-Zellsuspension (PB21-FI) in drei Verdünnungsstufen (unverdünnt, 1:10 und 1:100) eingesetzt.

Im Ergebnis (Abb. 75) waren die Auswirkungen einer veränderten Primer-Konzentration marginal. Bei Verwendung einer Primerkonzentration von 600 nM wurde ein leicht früherer Anstieg der Kurven und damit leicht geringere C_q -Werte erzielt, diese Konzentration wurde für zukünftige Läufe beibehalten.

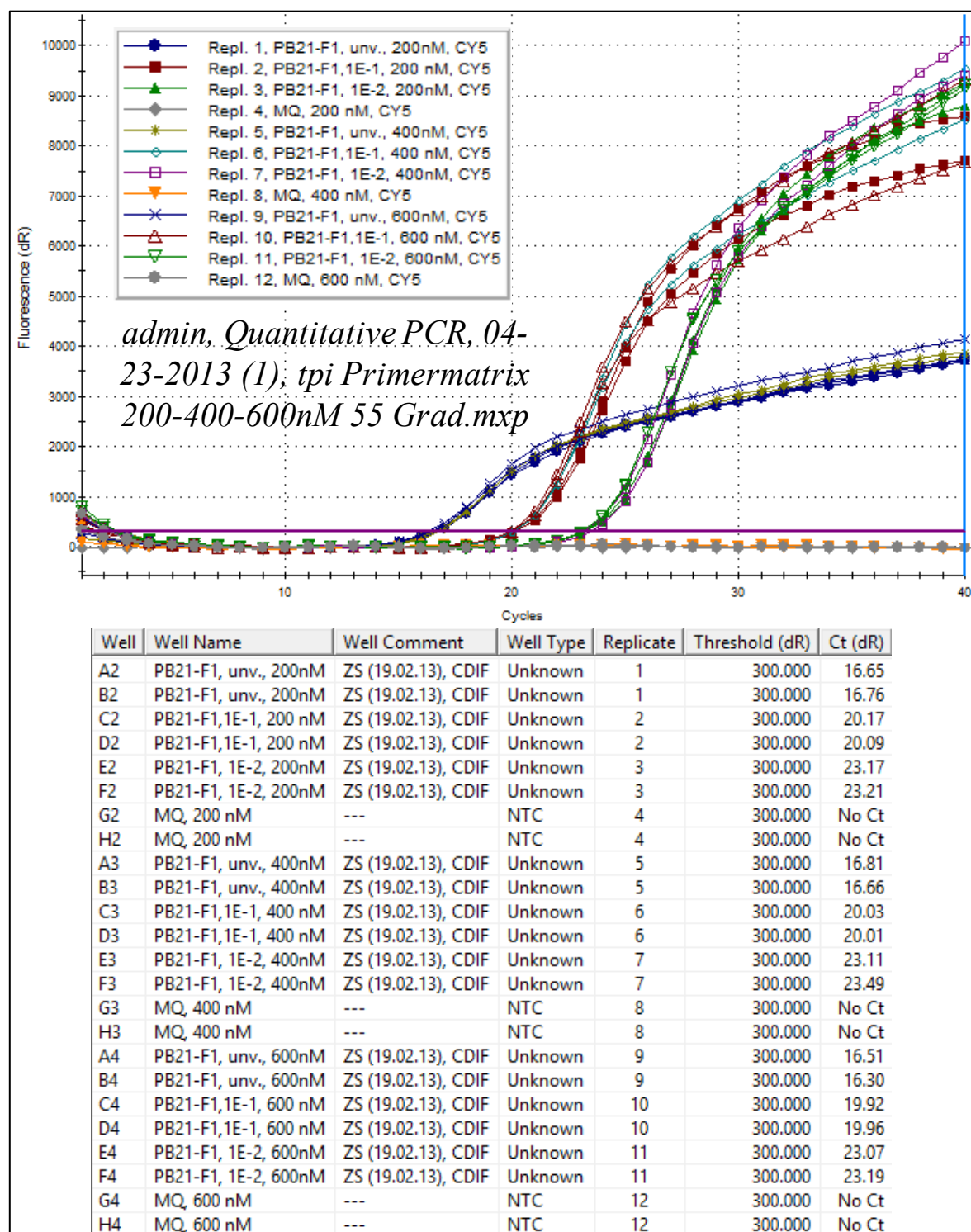


Abb. 75: Amplifikationsplots und C_q -Werte der Primergradienten-qPCR mit dem tpi-System zum Nachweis von *C. difficile* (CDIF_tpi_fw/CDIF_tpi_re/CDIF_tpi_S)

Zur Optimierung der Annealing/Extensions-Temperatur wurde eine Reihe von Läufen mit unterschiedlichen Annealing/Extensions-Temperaturen durchgeführt. Neben den bisher verwendeten 55°C, die auch in der originalen Multiplex-qPCR am LGL verwendet werden (Ziegler, 2013), wurden Temperaturen von 53, 57 und 59°C getestet. Als Ziel-DNA wurde wieder die CDIF-Agar-Zellsuspension der Anreicherung der Fermenterprobe PB21-FI in

unverdünnter, 1:10 und 1:100 verdünnter Form herangezogen. Die Ergebnisse der einzelnen Läufe wurden in einem Projekt kombiniert und verglichen.

In Abb. 76 und Abb. 77 sind jeweils die Amplifikationsplots und C_q -Werte unter Einsatz der unverdünnten und der 1:100 verdünnten Zellsuspension gezeigt. Die Ergebnisse für die 1:10 verdünnte Variante zeigten den gleichen Trend. Die Amplifikationsplots der Negativkontrollen wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit in den Abbildungen nicht dargestellt, sie waren aber alle erwartungsgemäß negativ.

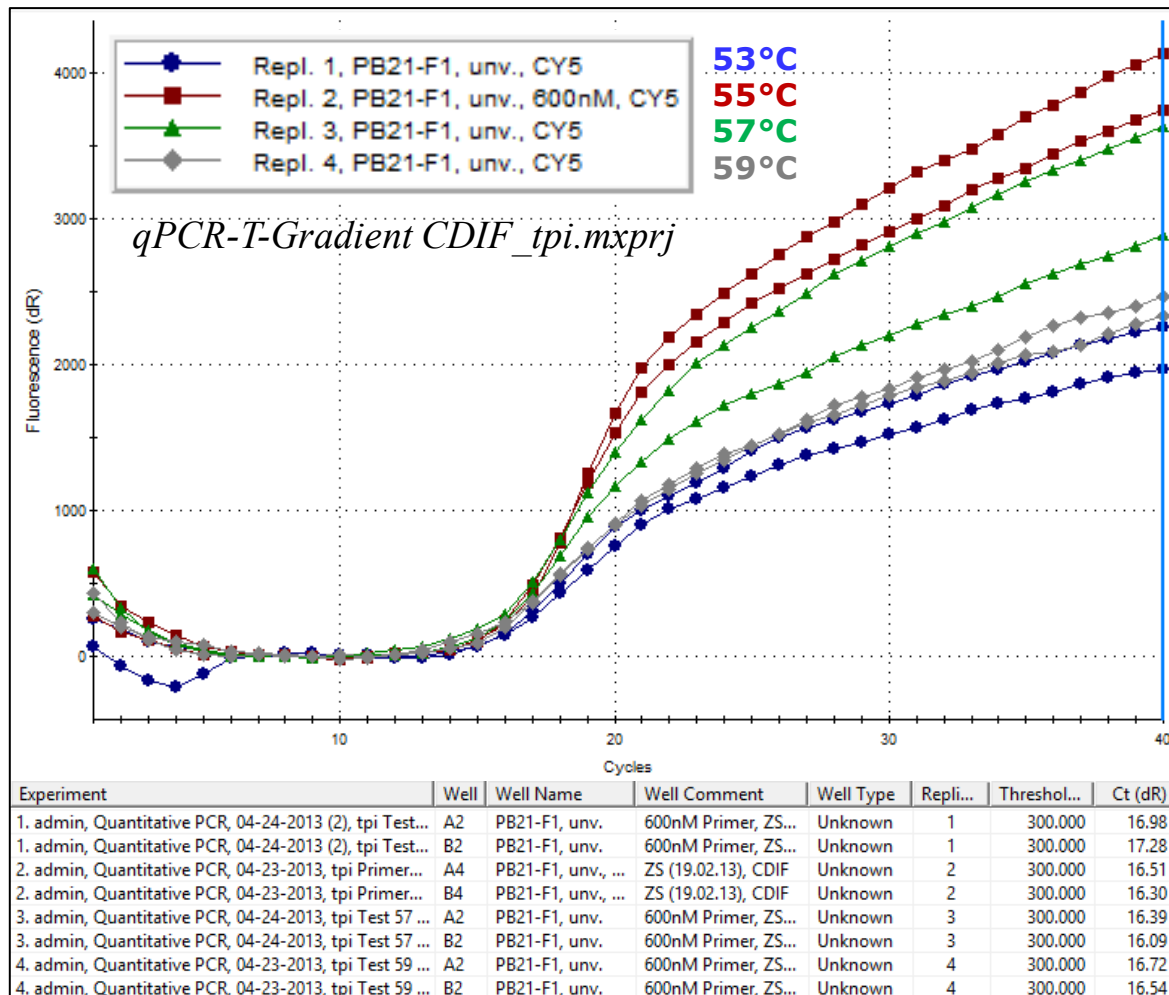


Abb. 76: Amplifikationsplots und C_q -Werte der Annealing-Temperatur Gradienten-qPCR mit dem *tpi*-System zum Nachweis von *C. difficile* (*CDIF_tpi_fw/CDIF_tpi_re/CDIF_tpi_S*) – unter Einsatz einer unverdünnten *CDIF*-Zellsuspension

Deutlich war, dass sowohl in Hinblick auf die C_q -Werte als auch in Hinblick auf den Kurvenverlauf bzw. die Fluoreszenz-Ausbeute die Variante unter Verwendung des 53°C-Annealing/Extension-Schrittes am schlechtesten abschnitt. Die bei einer Annealing/Extensions-Temperatur von 57 bzw. 59°C erzielten Amplifikationsplots erzielten etwas geringere C_q -Werte und etwas höhere Fluoreszenzausbeuten. Die im Vergleich frühesten C_q -Werte und höchsten Fluoreszenzausbeuten wurden bei Verwendung von 55°C Annealing/Extensions-Temperatur erreicht, die auch in der Originalen Publikation verwendet wurden (Ziegler, 2013).

In allen weiteren qPCR-Läufen wurde deshalb eine Annealing/Extensions-Temperatur von 55°C beibehalten.

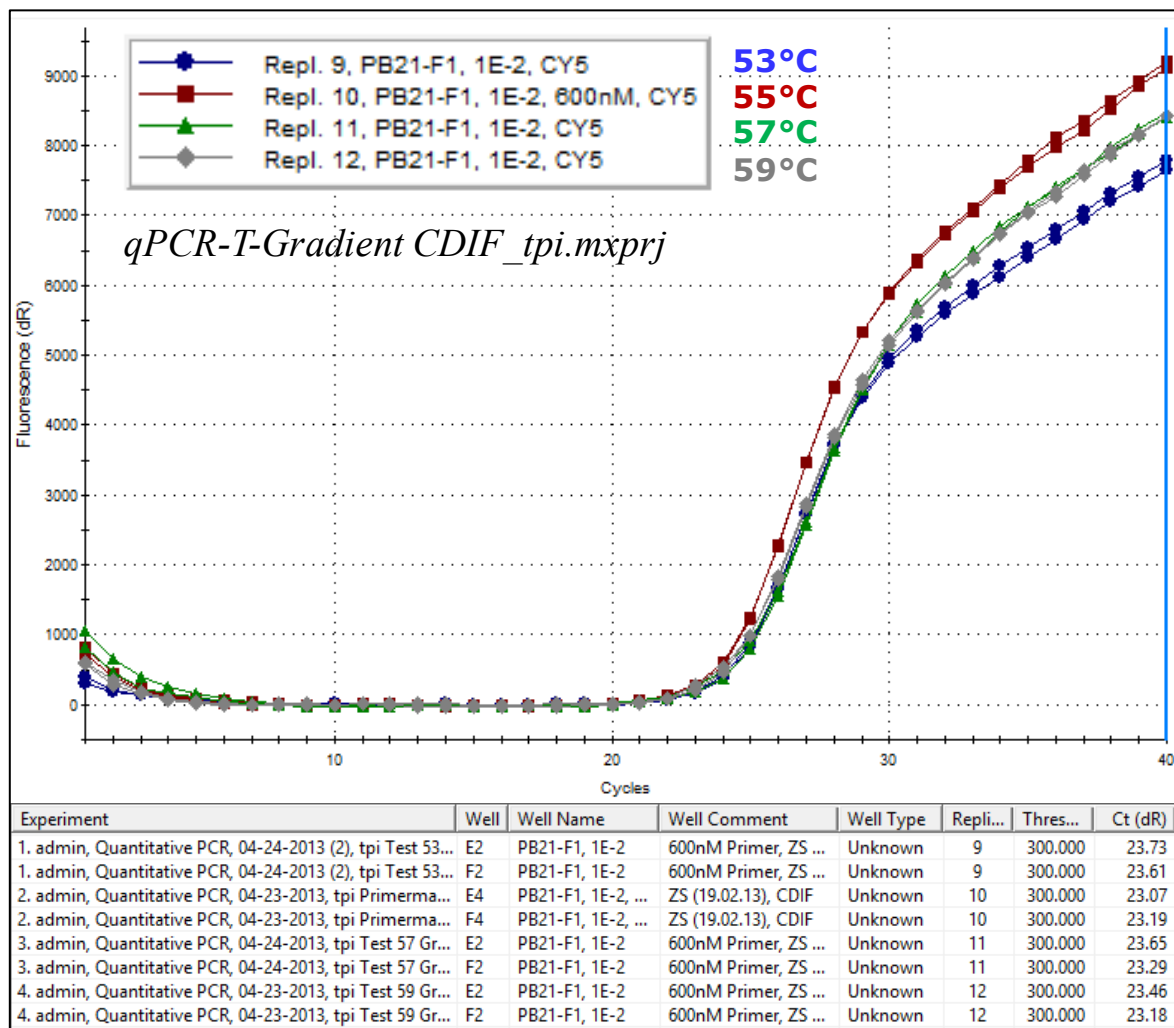


Abb. 77: Amplifikationsplots und C_q -Werte der Annealing-Temperatur Gradienten-qPCR mit dem tpi-System zum Nachweis von *C. difficile* (CDIF_tpi_fw/CDIF_tpi_re/CDIF_tpi_S) – unter Einsatz einer 1:100-verdünnten CDIF-Zellsuspension

In einem Sondenmatrix-Assay wurden Sondenkonzentrationen von 100, 200, 300 und 400 nM in Verbindung mit einer Primerkonzentration von je 600 nM getestet. Die Konzentrationen der restlichen Reagenzien und Reaktionsbedingungen blieben unverändert (s.o.). Als Ziel-DNA wurden die 1:10- und 1:100-Verdünnungen der bereits verwendeten PB21-FI-CDIF-Kultur eingesetzt.

Die Unterschiede der Amplifikationsplots waren ähnlich wie bei der Primermatrix bei unterschiedlichen Sondenkonzentrationen marginal. Lediglich bei Verwendung der geringsten Sondenkonzentration von 100 nM waren die C_q -Werte etwas erhöht. Deshalb wurde eine Sondenkonzentration von 200 nM für alle zukünftigen qPCR-Ansätze verwendet.

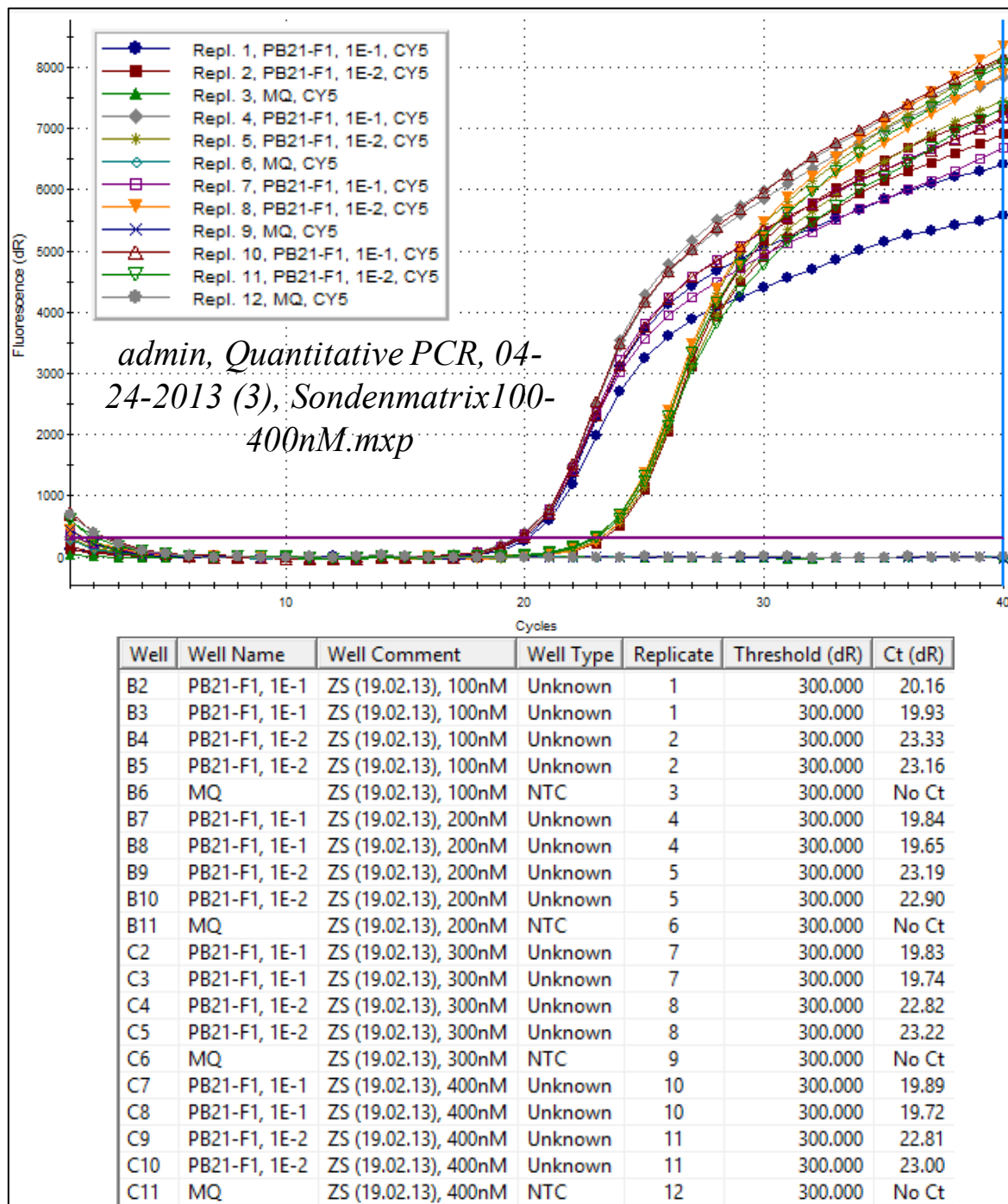


Abb. 78: Amplifikationsplots und C_q -Werte der Sondengradienten-qPCR mit dem *tpi*-System zum Nachweis von *C. difficile* (CDIF_ *tpi_fw*/CDIF_ *tpi_re*/CDIF_ *tpi_S*)

Mit Hilfe einer EvaGreen-qPCR kann die Spezifität eines Primerpaars überprüft werden. Das *tpi*-Primerpaar CDIF_ *tpi_fw*/CDIF_ *tpi_re* wurde in einer EvaGreen-qPCR getestet. Als Ziel-DNA wurden hier alle drei der bisher verwendeten Verdünnungsstufen (unv., 1:10 und 1:100) der PB21-FI-CDIF-Agar-Zellsuspension eingesetzt. Anstatt der Sonde wurde 2x EvaGreen (EvaGreen® Fluorescent DNA Stain, 50x, Jena Bioscience GmbH, Jena, Deutschland) zum qPCR-Ansatz hinzu pipettiert, wodurch der Anstieg der dsDNA unspezifisch in einer qPCR gemessen werden kann.

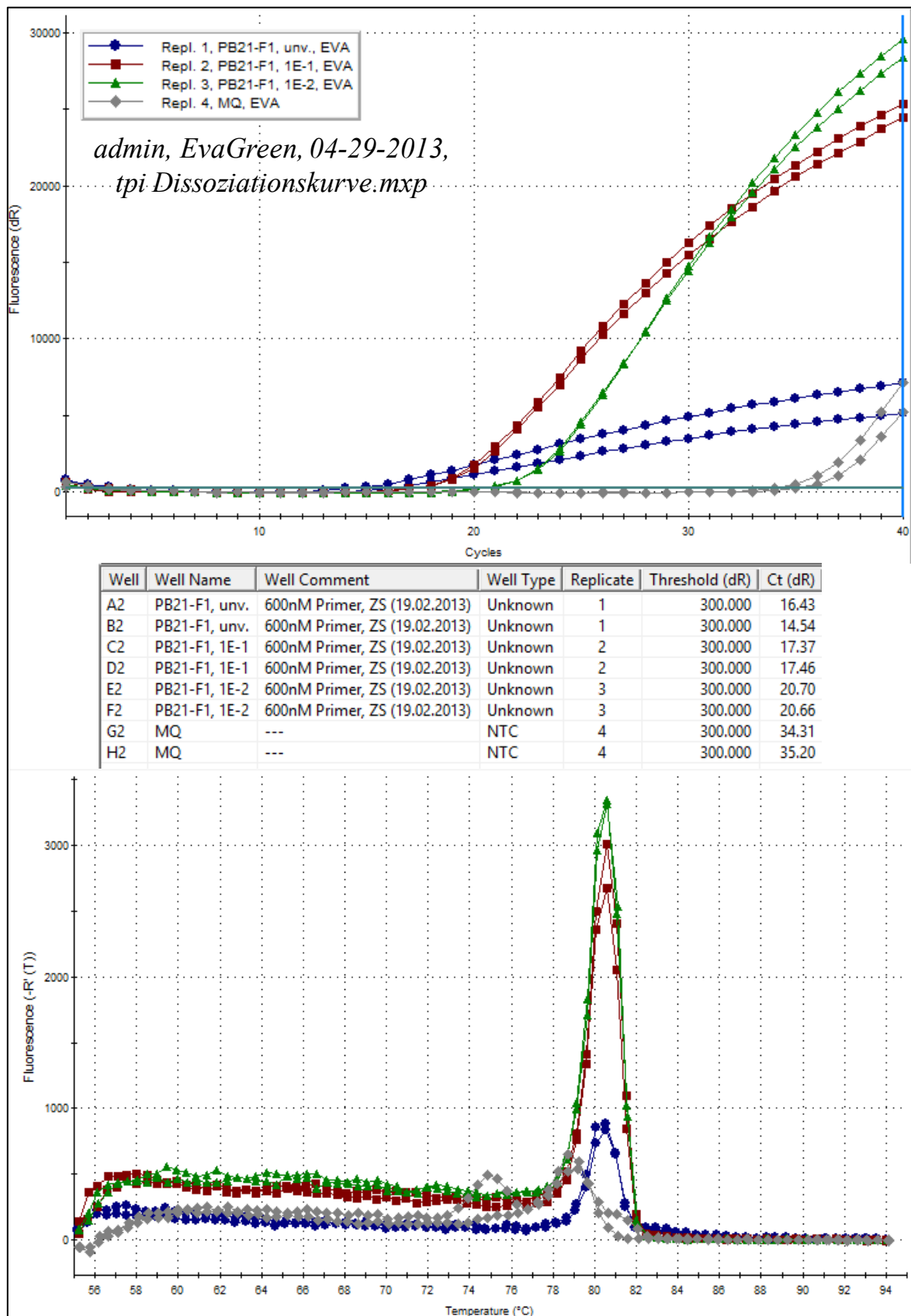


Abb. 79: Amplifikationsplots (oben), C_q -Werte (Mitte) und Dissoziationskurve (unten) der EvaGreen-qPCR mit den tpi-Primern zum Nachweis von *C. difficile* (CDIF_tpi_fw/CDIF_tpi_re)

Die Ergebnisse der EvaGreen-qPCR sind in Abb. 79 dargestellt. Bei den Amplifikationsplots wurde deutlich, dass der Ansatz mit unverdünnter Zellsuspension und auch in verminderter Ausprägung der Ansatz mit 1:10-verdünnter Zellsuspension durch abgeflachte Kurven Anzeichen von PCR-Inhibition zeigten. Da mit EvaGreen auch unspezifische Amplifikate sichtbar gemacht werden, stieg die Negativkontrolle in diesem Lauf wenn auch relativ spät (C_q bei ca. 35) über den Threshold. Der Dissoziationskurve (Abb. 79, unten) lässt sich jedoch anhand der zu geringeren Schmelztemperaturen verschobenen Dissoziationspeaks des Negativkontroll-Ansatzes entnehmen, dass es sich hier um unspezifische Amplifikons handelt. Die Dissoziationspeaks der Ansätze mit der Zellsuspension PB21-FI lagen dagegen alle einheitlich bei ca. 80,5°C. Somit kann die Amplifikation mit dem *tpi*-Primerpaar CDIF_tpi_fw/CDIF_tpi_re als spezifisch für die hier vorliegende Anwendung eingestuft werden. Durch die zusätzliche Verwendung der Sonde im Standard-Einsatz werden außerdem Auswirkungen unspezifischer Amplifikation, wie sie beim Vorliegen besonders niedriger Ausgangskonzentrationen von Ziel-DNA (vgl. Negativkontrolle) auftreten kann, nicht gemessen.

Auf Grund einer Anpassung an die Vorgaben des Herstellers der Platinum-Taq-Polymerase (Invitrogen™, Inc., USA) soll im Temperaturprogramm eine gesenkte Denaturierungstemperatur von 94°C (statt 95°C) sowie eine verkürzte initiale Denaturierungszeit von 2 min statt der bisher verwendeten 3 min bei 95°C ausreichen.

Die so optimierten Reaktionsbedingungen inklusive des Temperatur-Programms der qPCR sind in Tab. 27 zusammengefasst. Die qPCR wurde in Reaktionsansätzen von 25 µL durchgeführt. Als Template wurden 2,5 µL Hitze-inaktivierte Zellsuspension von CDIF- oder SCS-Agar-Kulturen (vgl. 6.1) nach mTPGY-Anreicherung von Umweltproben wie z.B. Fermenterinhalt eingesetzt.

Als Positivkontrolle diente entweder eine Hitze-inaktivierte mTPGY-ZS der *C. difficile*-Stämme LGL G346 oder LGL Bio498 oder die Zellsuspension PB21-FI von CDIF-Agar.

Tab. 27: Reaktionsbedingungen für die Singleplex-qPCR zum Nachweis des *tpi*-Gens von *C. difficile*

Reagenz	Hersteller	Konzentration	Einheit
10x PCR-Puffer - ohne MgCl ₂	Invitrogen™, Inc., USA	1x	-
MgCl ₂	Invitrogen™, Inc., USA	6	mM
dNTPs	Thermo Fisher Scientific Inc., USA	200	µM
Primer, jeweils	biomers.net GmbH, Deutschland	600	nM
Sonde, jeweils	biomers.net GmbH, Deutschland	200	nM
Platinum-Taq-Polymerase	Invitrogen™, Inc., USA	0,75	U * (25 µL) ⁻¹

PCR-Schritt	Dauer	Temperatur	Einheit
Initiale Denaturierung	2 min	94	°C
Denaturierung	15 s	94	°C
Annealing + Extension	60 s	55	°C

Zyklenanzahl	40
--------------	----

6.2.4 Überprüfung der *C. difficile* Kulturen in der Stammsammlung

Die beiden vom LGL erhaltenen *C. difficile*-Stämme LGL G346 und LGL bio 498 wurden in einer qPCR mit dem *tpi*-Nachweissystem auf die Anwesenheit des *C. difficile*-spezifischen *tpi*-Genabschnitts überprüft (Abb. 80). Beide Stämme waren erwartungsgemäß *tpi*-positiv.

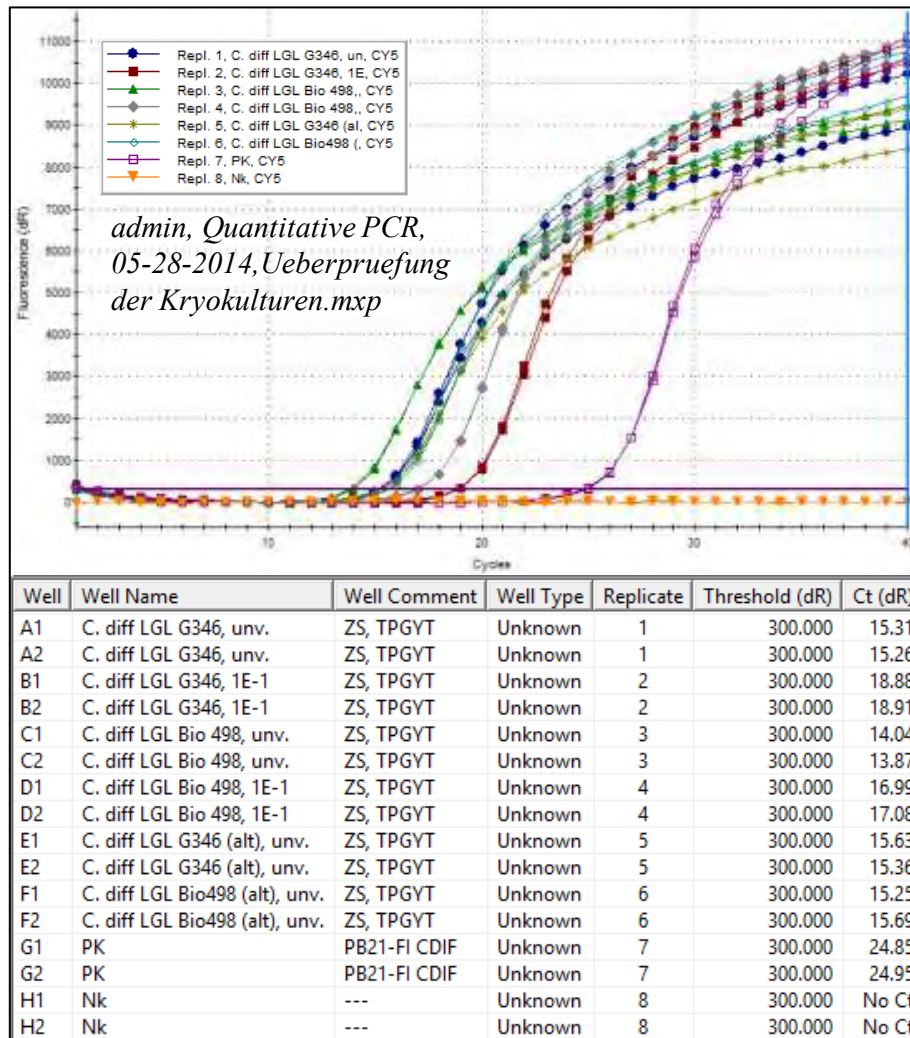


Abb. 80: Amplifikationsplots und C_q -Werte der qPCR zur Überprüfung der *C. difficile*-Kryokulturen in der Stammsammlung mit dem *tpi*-System zum Nachweis von *C. difficile* (CDIF_ *tpi*_fw/CDIF_ *tpi*_re/CDIF_ *tpi*_S)

6.3 Schnellscreening-Ansatz zum Nachweis von *C. difficile*

6.3.1 Durchführung

Um ein Schnellscreening für den Nachweis von *C. difficile* zu entwickeln, wurde der kulturelle Nachweisablauf nach der Inkubation der Flüssiganreicherung in mTPGY unterbrochen. Die gewaschenen mTPGY-Zellsuspensionen (d.h. das Pellet von 1 mL abzentrifugierter Kultur wurde im selben Volumen MQ-Wasser resuspendiert) wurden direkt als Ziel-DNA-Lösung in die *tpi*-qPCR eingesetzt (Abb. 81). Da bei Einsatz von Anreicherungen aus Gülle oder Fermenterhaltenen i.d.R. qPCR-Inhibition zu erwarten ist,

kann als Variante ein DNA-Extrakt des Pellets aus abzentrifugierter mTPGY-Kultur eingesetzt werden (Abb. 81, vgl. 5.3, Vorgehen bei *C. botulinum*).

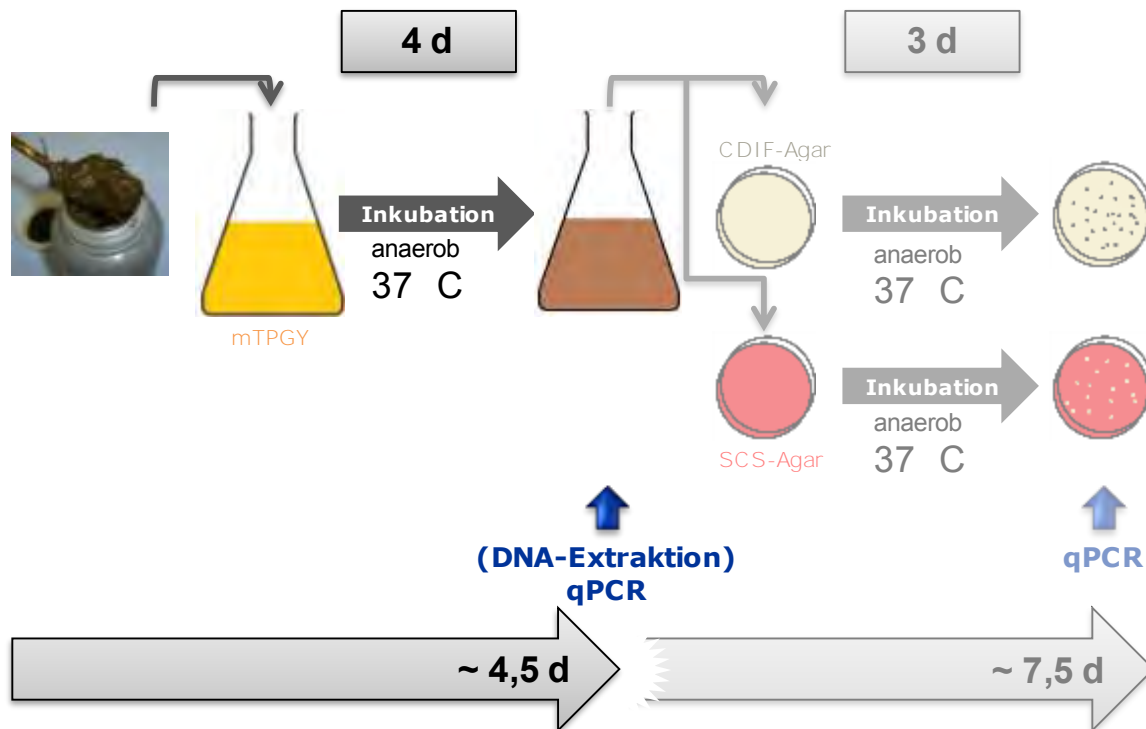


Abb. 81: Schnellscreening-Ansatz zum Nachweis von *C. difficile*

6.3.2 Ergebnisse und Diskussion

In einer EvaGreen-qPCR wurden die gewaschenen mTPGY-Kulturen bezüglich der Anwesenheit des *tpi*-Gens getestet, die in der weiteren Kultivierung *tpi*-positive Zellsuspensionen von CDIF-Agar erbrachten (Abb. 82). Im Amplifikationsplot wurden früh ansteigende Signale nur für eine als Positivkontrolle mitgeführte CDIF-Kultur gemessen. Für die Negativkontrolle (MQ-Wasser) ergab sich, wie bei der auch unspezifisch Doppelstrang-DNA-detektierenden EvaGreen-qPCR öfters beobachtet, ein später Anstieg (Abb. 82). Alle mTPGY-Zellsuspensionen ergaben kein Signal, obwohl sie anhand der CDIF-Ergebnisse (nicht gezeigt) definitiv *tpi*- d.h. *C. difficile*-positiv sein mussten (Abb. 82, oben, Mitte). Eine Inhibition der qPCR-Reaktion durch hemmende Stoffe in den insbesondere bei der Untersuchung von Gülle bzw. Fermenterhalten häufig stark braun/grünlich verfärbten Zellsuspensionen ist wahrscheinlich.

In der Dissoziationskurve der 1:10-verdünnten Variante ist ein minimaler Peak bei der Schmelztemperatur des *tpi*-Amplifikats gemessen worden (Replik 5, Abb. 82 unten). Dies lässt auf die Anwesenheit geringer Mengen des spezifischen *tpi*-Amplifikats schließen, die jedoch in der Amplifikation offenbar infolge Inhibition nicht zur Überschreitung des Thresholds geführt hatten. Die Dissoziationskurve der Negativkontrolle wies mehrere Peaks mit geringerer Schmelztemperatur auf (Replik 6, Abb. 82 unten), die auf unspezifische Amplifikation zurückzuführen sind.

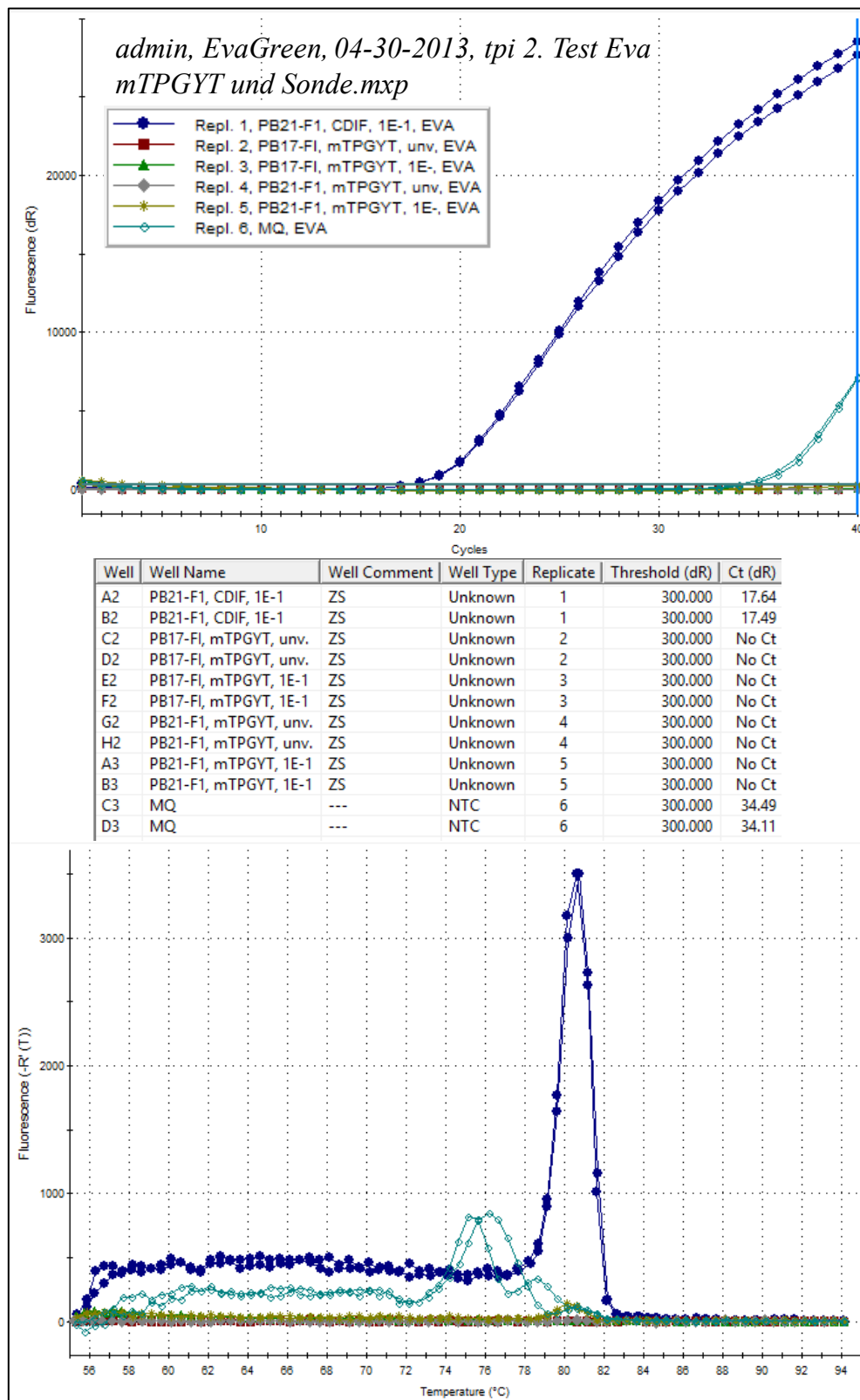


Abb. 82: Amplifikationsplots (oben), C_q -Werte (Mitte) und Dissoziationskurve (unten) der EvaGreen-qPCR aus mTPGY-Zellsuspensionen mit den tpi-Primern zum Nachweis von *C. difficile* (CDIF_tpi_fw/CDIF_tpi_re)

7 Clostridium perfringens

7.1 Durchführung

Für Untersuchungen zu *C. perfringens* bestand an AQU1c bereits ein für Arbeiten mit Umweltproben wie Gülle/Gärgemisch etabliertes qPCR-Hydrolysesonden-Nachweissystem (Cp_plc, Tab. 28). Dieses wurde allerdings im Jahr 2008 letztmalig eingesetzt. Da die Forschung ständig fortschreitet, wächst die Zahl der beschriebenen Stämme von Mikroorganismen und damit auch die Zahl und Vielfalt der in Datenbanken hinterlegten Sequenzdatensätze fortwährend an. Nukleinsäuresequenz-basierte Nachweissysteme sollten deshalb regelmäßig aktualisiert werden. Hierbei wird auch bioinformatisch überprüft, ob sie weiterhin *in silico* selektiv sind. Unter Umständen ist die eingesetzte Methodik der neuen Information entsprechend zu modifizieren.

Tab. 28: qPCR-Nachweissystem für das *Clostridium perfringens*-spezifische *plc*-Gen (Amplikon: 96 bp; Lebuhn et al., 2004)

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Länge [nt]	GC [%]	T _m [°C]
Cp_plc_840-f	AGA GGG TAA TGA TCC ATC AGT TGG AA	26	42,3	61,6
Cp_plc_889-r	CAT GTA GTC ATC TGT TCC AGC ATC TT	26	42,3	61,6
Cp_plc_861_S2	FAM - CAC CAC TAG TTG ATA TGT AAG CTA CTA GTT CTT TTA CA TAMRA	38	34,2	66,2

Im vorliegenden Projekt wurde das qPCR-Nachweissystem zur Detektion von *C. perfringens* auf Aktualität überprüft. Dieses weist das Gen der Phospholipase C (*plc*) von *C. perfringens* spezifisch nach. Die Phospholipase C wird in *C. perfringens* auch als Alpha-Toxin (Gen: *cpa*) bezeichnet und stellt einen der Schlüsselvirulenzfaktoren dar (Awad et al, 1995).

7.1.1 Alignment

Das für die Entwicklung herangezogene Alignment (Stand: Sept. 2001) bestand aus 17 *plc*-Sequenzen. Zur Aktualisierung und Erweiterung des Alignments wurde systematisch „geblastet“, d.h. die Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) wurde mit dem Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) durchsucht. So wurden alle zu diesem Zeitpunkt (Juli 2013) in der NCBI-Datenbank hinterlegten *plc*-Sequenzen heruntergeladen und aligniert. Alle Sequenzen, die den Bereich des Amplikons des *plc*-Primer-/Sonden-Systems (Cp_plc_840-f/Cp_plc_889-r/Cp_plc_861_S2) abdeckten, sind anhand ihrer Accession-Nummern in im Anhang 13.3.5 in Tab. 46 aufgelistet (Stand: Juli 2013). Die 17 im ursprünglichen Alignment (Stand: Sept. 2001) alignierten Sequenzen sind dort gekennzeichnet.

7.1.2 *In silico*-Tests des *plc*-Primer-/Sonden-Systems (Cp_plc_840-f/Cp_plc_889-r/Cp_plc_861_S2)

In silico wurden die Oligonukleotide Cp_plc_840-f/Cp_plc_889-r und Cp_plc_861_S2 gegen die vorhandenen *C. perfringens-plc*-Sequenzen (Tab. 46, Anhang 13.3.5) im Alignment hinsichtlich Matches und Mismatches überprüft. Die Mismatches mit den *C.*

perfringens-plc-Sequenzen sind in Tab. 29 zusammengestellt. Eine ähnliche Zusammenstellung findet sich für die *plc*-Sequenzen anderer *Clostridium* spp. in Tab. 30.

Tab. 29: Anzahl der *Clostridium perfringens-plc*-Sequenzen im Alignment ($n = 427$) mit Mismatches

nicht erfasst:	Cp_plc_840-f	Cp_plc_889-r	Cp_plc_861_S2
gesamtes Oligonukleotid	71*	6	32**
letzte 10 Positionen vom 3'-Ende	55*	3	28**
letzte 5 Positionen vom 3'-Ende	55*	2	27**
* hpts. Abweichung in 2. Base vom 3'-Ende (C bzw. T statt A)			
** hpts. Abweichung in 3. Base vom 3'-Ende (C statt T)			

Tab. 30: Anzahl der *plc*-ähnlichen Sequenzen anderer Clostridien im Alignment ($n = 20$) ohne Mismatches

nicht erfasst:	Cp_plc_840-f	Cp_plc_889-r	Cp_plc_861_S2
gesamtes Oligonukleotid	0	0	0
letzte 10 Positionen vom 3'-Ende	0	1	0
letzte 5 Positionen vom 3'-Ende	0	2	1

Mittels des „Oligo-Analyzer 3.1“ (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) wurden keine Sekundärstrukturen identifiziert, die die Reaktion nennenswert beeinträchtigen könnten. Mit dem *plc*-System für *C. perfringens* werden *plc*-Sequenzen anderer *Clostridium* spp. nach den vorliegenden *in silico*-Test-Ergebnissen nicht nachgewiesen (Tab. 30).

Nachdem eine relativ große Anzahl ($\geq 10\%$) der Sequenzen mit dem *plc*-Nachweissystem für *C. perfringens* mit großer Wahrscheinlichkeit nicht nachgewiesen wird, ist es nötig, das *plc*-System entsprechend den neuen Erkenntnissen zu modifizieren. Beispielsweise könnte die Einführung einer degenerierten Base an die hauptsächlich divergenten Basenpositionen (Abweichung in 2. Base vom 3'-Ende des Forward-Primers Cp_plc_840-f (C bzw. T statt A) bzw. in 3. Base vom 3'-Ende der Sonde (C statt T)) eine deutliche Verbesserung der *in silico*-Testergebnisse herbeiführen. Alternativ könnte eine Verkürzung die Spezifität verbessern. Entsprechende Entwicklungen können und sollten Inhalt weiterführender Arbeiten sein.

7.1.3 *In vitro*-Tests des *plc*-Primer-/Sonden-Systems (Cp_plc_840-f/Cp_plc_889-r/Cp_plc_861_S2)

Zum *in vitro*-Test des *C. perfringens-plc*-Primer-/Sonden-Systems wurden in einem qPCR-Lauf nach dem in Tab. 31 dargestellten Protokoll als Ziel-DNA drei Verdünnungen des Lysats eines *C. perfringens*-Stamms aus der eigenen Stammsammlung herangezogen. Von diesem war bekannt, dass er durch das Nachweissystem erfasst wird.

Tab. 31: Beispiel-Protokoll für die Durchführung einer *plc*-qPCR

<u>Test <i>C.perfringens</i> Zellsuspensions-Verdünnungen</u>			
			02.10.2014
Kalkulation Hot-Start-PCR für 25 µl			
Cp_plc_840-f / Cp_plc_861_S2 (FAM/TAMRA) / Cp_plc_889-r			
		x Ansätze	final conc.
	1 Ansatz (µl)	13	(nm)
Puffer (10x, cont. no MgCl ₂)	2,5	32,5	1x
MgCl ₂ (50 mM)	3	39	6 mM
dNTPs (10 mM each)	0,5	6,5	200 µM
forw.-Primer (10 µM)	1,5	19,5	600
rev.-Primer (10 µM)	1,5	19,5	600
Sonde (10 µM)	0,75	9,75	300
Platinum -Taq-Pol. (5 u / µl)	0,15	1,95	0,75 u
H ₂ O (=ad dispatch volume)	12,6	163,8	
Dispatch	22,5	292,5	
DNA (cell suspension)	2,5	32,5	
Ges.-Vol.	25	325	
Proben (Triplikate)	Replikate Nr.	! 2 min activ. 94°C !	
ZS, <i>C. perfringens</i> DSM 756 ^T , Verd. blau, 1E-1	1	15 sec Denat. 94°C	
ZS, <i>C. perfringens</i> DSM 756 ^T , Verd. blau, 1E-2	2	1 min an/ext.: 63°C	
ZS, <i>C. perfringens</i> DSM 756 ^T , Verd. blau, 1E-3	3	45 Zyklen	
NK	4		

Alle drei eingesetzten Verdünnungen ergaben gute qPCR-Signale (Abb. 83). Der Abstand der C_q-Werte zwischen den einzelnen Verdünnungen betrug erwartungsgemäß ca. 3,3 Zyklen, oder er war geringfügig geringer. Die Negativkontrolle führte zu keinem Signal in der *plc*-qPCR (Abb. 83).

Zwar kann geschlossen werden, dass die *plc*-qPCR für einen Stamm mit passender Zielsequenz optimal verläuft. Allerdings ist zu bedenken, dass in den letzten Jahren leicht divergente *C. perfringens-plc*-Sequenzen bekannt geworden sind, die eine Modifikation des Systems erforderlich machen (siehe 7.1.2).

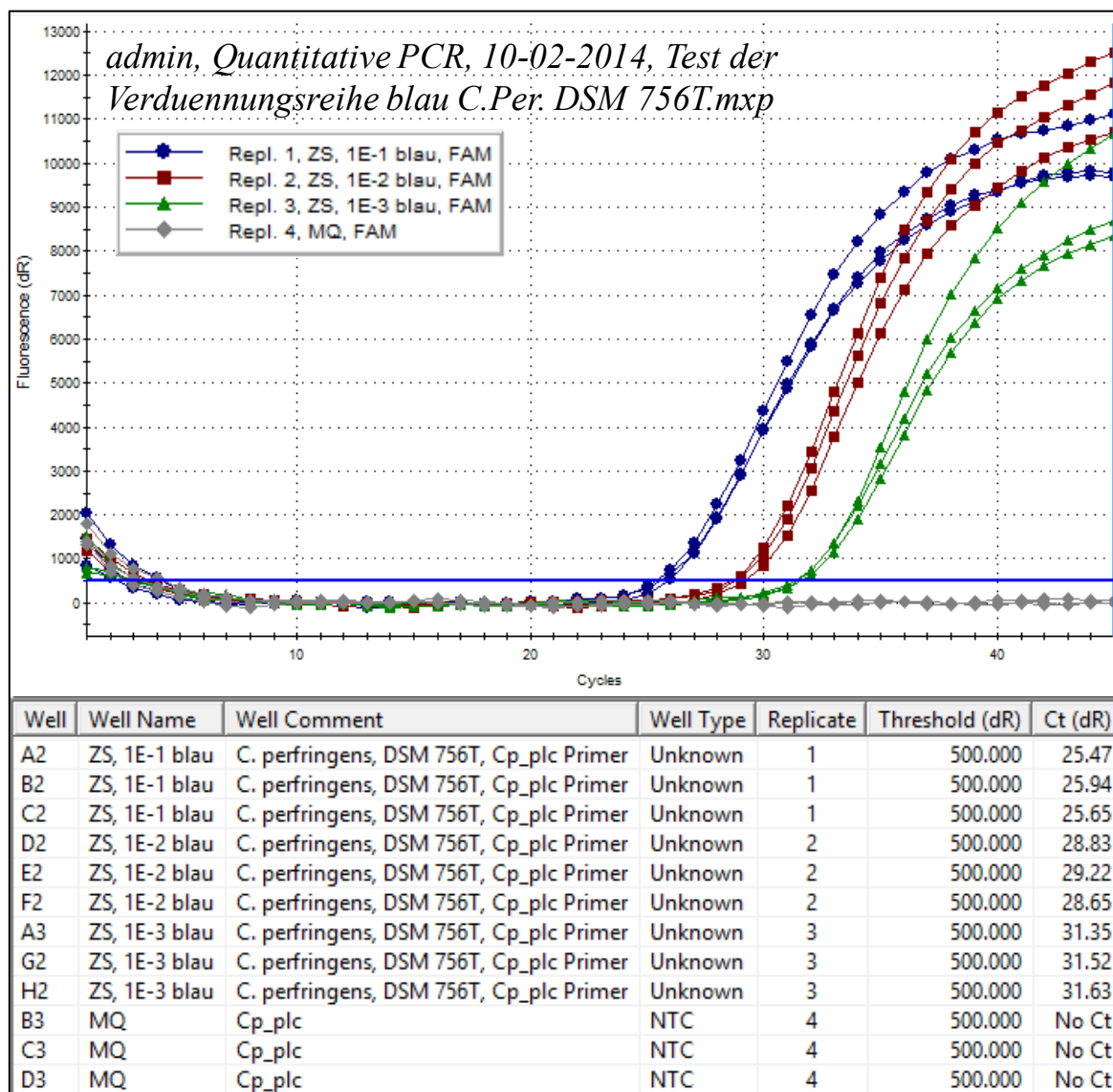


Abb. 83: Amplifikationsplots und C_q -Werte der qPCR zur Überprüfung eines *C. perfringens*-Stammes in der Stammsammlung mit dem *C. perfringens*-spezifischen *plc*-System (*Cp_plc_840-f/Cp_plc_889-r/Cp_plc_861_S2*)

8 Pathogene Kryptosporidien

Kryptosporidien (Gattung *Cryptosporidium*) sind einzellige Parasiten mit sehr resistenten Dauerstadien, den Oocysten. Sie infizieren häufig Kälber und gelegentlich Menschen oder auch andere Wirbeltiere. Sie kommen weltweit vor und werden vor allem über verunreinigtes Trinkwasser, fäkal-oral oder über kontaminierte Nahrungsmittel übertragen.

Mittlerweile sind 24 Kryptosporidien-Arten mit unterschiedlichem Wirtsspektrum beschrieben. Im Bereich der landwirtschaftlichen Tierhaltung sind insbesondere *C. parvum* und *C. bovis* als Erreger des „Kälberdurchfalls“ relevant, daneben auch *C. suis* als Erreger bei Schweinen. Für den direkten oder indirekten Nachweis von humanpathogenen Kryptosporidien wie z.B. *C. parvum* und *C. hominis* besteht nach dem Infektionsschutzgesetz eine namentliche Meldepflicht. Schätzungen zufolge sind etwa 3,5 % der Bevölkerung Europas Ausscheider von Oocysten ohne selbst Krankheitssymptome zu zeigen. Die Infektion (Kryptosporidiose) verheilt meist nach einigen Wochen von selbst. Krankheitssymptome sind leichtes Fieber, Schwindel, Bauchkrämpfe und Gewichtsverlust. Bei Personen mit geschwächtem Immunsystem (z.B. AIDS) kann sie jedoch zu chronischem Durchfall, in Einzelfällen sogar zum Tod führen.

8.1 Mikrobiologische Analytik

Eine Kultivierung von Kryptosporidien mit Standardmethoden ist bislang nicht möglich. Die Parasiten werden typischerweise in ihrem Wirt vermehrt bzw. von diesem für Untersuchungen gewonnen. Entsprechende Methoden wurden zur Untersuchung von *C. parvum* / *C. hominis* im Vorhaben „Biogastechnologie zur umweltverträglichen Flüssigmistverwertung und Energiegewinnung in Wasserschutzgebieten: wasserwirtschaftliche und hygienische Begleituntersuchung. Projektteil: Mikrobiologische, parasitologische und virologische Untersuchungen“ (weiter)entwickelt, evaluiert und eingesetzt. Details hierzu finden sich bei Lebuhn und Wilderer (2006).

Wegen der problematischen Kultivierung werden aktuell vorwiegend molekularbiologische Methoden (s. 8.2) zur qualitativen und quantitativen Analytik von Kryptosporidien eingesetzt. Um die Lebensfähigkeit der untersuchten Parasiten zu testen, werden allerdings auch physiologische bzw. metabolische Tests wie z.B. Fähigkeit zur Exzystierung oder Membranpermeabilität in den Analysegang eingebunden (Lebuhn und Wilderer, 2006).

8.2 Molekularbiologische Analytik

Vom Projektleiter wurde bereits in einem vorangegangenen Verbundvorhaben ein qPCR-Hydrolysesonden-Nachweissystem für den Parasitenkomplex *C. parvum* / *C. hominis* entwickelt und evaluiert (Tab. 32; Lebuhn und Wilderer, 2006). In der Folge wurde das auf das *hsp70*-Gen abzielende System auch für die Analyse von *hsp70*-mRNA zur Analyse lebensfähiger Einheiten erweitert und „primer/probe set 1PS“ erfolgreich auch im Rahmen eines Promotionsabschlusses eingesetzt (Garcés et al., 2006; Garcés-Sanchez et al., 2009; Garcés-Sanchez et al., 2013; Garcés-Sanchez, 2013).

Tab. 32: Primer- und Sondensequenzen des *hsp70*-(RT)qPCR-Systems IPS für *C. parvum* / *C. hominis*

Forward-Primer:	5'-AAC TTT AGC TCC AGT TGA GAA AGT ACT C-3'
Reverse-Primer	5'-CAT GGC TCT TTA CCG TTA AAG AAT TCC-3'
5'-Hydrolyse-Sonde	5'-FAM-AAT ACG TGT AGA ACC ACC AAC CAA TAC AAC ATC-TAMRA-3'

Da Kryptosporidien im vorliegenden Vorhaben nicht im Fokus standen, wurde die einsatzbereite Analytik nicht erneut aktualisiert. Allerdings wächst die Zahl der beschriebenen Stämme von Mikroorganismen und damit auch die Zahl und Vielfalt der in Datenbanken hinterlegten Sequenzdatensätze mit der ständig fortschreitenden Forschung fortwährend an. Nukleinsäuresequenz-basierte Nachweissysteme sollten deshalb regelmäßig aktualisiert werden. Hierbei wird primär bioinformatisch überprüft, ob sie weiterhin *in silico* als ausreichend spezifisch gelten können. Dies sollte auch vor einem neuerlichen Einsatz des *C. parvum* / *C. hominis hsp70*-Systems geschehen. Unter Umständen ist in Tab. 32 vorgestellte System der neuen Information entsprechend zu modifizieren.

8.3 Schnellscreening-Ansatz zum Nachweis von pathogenen Kryptosporidien

Das in Abschnitt 8.2 vorgestellte System „IPS“ (Tab. 32) wurde für die Quantifizierung auch lebensfähiger *C. parvum* / *C. hominis* Einheiten in Umweltproben entwickelt und im Rahmen des vorliegenden Vorhabens erfolgreich an der LfL für den Einsatz mit Gülle- und Fermenterproben etabliert. Bereits bei seiner Entwicklung war es konzeptionell als Schnellscreening-Ansatz vorgesehen. Auf DNA-Ebene (gesamte = lebende und tote/inaktivierte Fraktion) wird mit der bei Lebuhn und Wilderer (2006) sowie Garcés et al. (2006) beschriebenen Methodik die Konzentration der *C. parvum* / *C. hominis hsp70*-Gene äußerst sensitiv und spezifisch gemessen. Diese Konzentration kann in die in der Probe vorliegende Zahl an Oocysten umgerechnet werden. Darüber, ob diese oder ein Teil der Oocysten auch vital und damit potentiell infektiös sind, geben die Analysen auf mRNA-Ebene (Erfassung der lebenden Fraktion) Aufschluss, wie sie bei Garcés-Sanchez et al. (2009; 2013) und Garcés-Sanchez (2013) beschrieben sind.

Damit steht ein einsatzfähiges Schnellscreening-Testsystem für (lebensfähige) *C. parvum* / *C. hominis* Einheiten an der LfL zur Verfügung. Es beinhaltet keinen Kultivierungsschritt zur Verifizierung der Vermehrungsfähigkeit, wie dies bei den anderen im Rahmen dieses Vorhabens entwickelten Systemen der Fall ist, sondern es nutzt metabolische Reaktionen wie die Excystierbarkeit oder die *hsp70*-mRNA-Transkription zur Produktion von Hitzeschock-Proteinen bei Induktion durch diesen Stimulus, um die physiologische Aktivierbarkeit und damit die Lebensfähigkeit der untersuchten Oocysten zu demonstrieren und (relativ) zu quantifizieren.

Allerdings sollten, wie bei 8.2 erwähnt, die Primer- und Sondensequenzen vor einem neuerlichen Einsatz gegen die aktuelle Datenbanklage geprüft und ggf. modifiziert werden.

9 *Bacillus cereus*-Gruppe

Zur „*Bacillus cereus*-Gruppe“ zählen neben der hochpathogenen Species *Bacillus anthracis* und den mit unterschiedlichem Toxinbildungsvermögen ausgestatteten Arten *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* und *B. weihenstephanensis* neuerdings auch *B. cytotoxicus*, *B. toyonensis*, *B. bombysepticus*, *B. gaemokensis* und *B. manliponensis* als Krankheitserreger (*B. pseudomycooides* zählt mittlerweile nicht mehr zu dieser Gruppe) oder besitzen zumindest die Fähigkeit zur Toxinbildung. Diese Bacillen können auch Endosporen produzieren. In diesem Zustand sind sie sehr resistent gegenüber Hitze und anderen Stressfaktoren.

Diese ausgeprägte Resistenz von Vertretern der *Bacillus cereus*-Gruppe wurde in einer Studie zur meso- und thermophilen Vergärung von Rindergülle bestätigt (Lebuhn und Wilderer, 2006). In dieser Studie wurde weiterhin festgestellt, dass für solche Umweltproben mit komplexem mikrobiellen Besatz „die Auswertung spezifischer Kolonien auf PEMBA-Agar wegen teilweise starken Überwuchses durch Hintergrund-Mikroflora meist problematisch war“ (Lebuhn und Wilderer, 2006). Allerdings konnte die über die Kultivierung auf PEMBA-Agar ermittelten quantitativen Ergebnisse mittels einer von Lebuhn und Wilderer (2006) entwickelten qPCR-Analytik, die auf einen Abschnitt der Untereinheit β der RNA-Polymerase (*rpoB*) abzielt, zumindest größenordnungsmäßig bestätigt werden. Dabei wurden aber auch Probleme mit einem sehr langen und intensiven Bead-Beating zum Aufschluss bakterieller Sporen offenbar. Hierbei bildete sich „Glasmilch“, die Nukleinsäuren bindet und falsch-negative Ergebnisse erzeugt.

Hinsichtlich einer spezifischen Kultivierung der *Bacillus cereus*-Gruppe ergab sich also Entwicklungsbedarf. Dieser Punkt wird im Abschnitt 9.1 aufgegriffen. Weiterhin wuchs seit Konstruktion des *rpoB*-qPCR-Systems auch die Zahl der in den einschlägigen Datenbanken hinterlegten Nukleotid-Sequenzen beträchtlich. Eine vor kurz vor Ende der Projektlaufzeit durchgeführte Prüfung des *rpoB*-Primer- und SONDENSYSTEMS legte eine Modifikation des Systems nahe. Hierauf wird in Abschnitt 9.2 eingegangen.

9.1 Mikrobiologische Analytik

Die Problematik einer spezifischen Kultivierung von Vertretern der *Bacillus cereus*-Gruppe aus Umweltproben mit komplexem mikrobiellen Besatz auf PEMBA-Agar wurde bereits in Kapitel 9 angesprochen. Diese oder ähnliche Schwierigkeiten bestehen auch mit anderen selektiven Medien (z.B. Hendriksen and Hansen, 2011), und es ist zudem offen, ob die in Kapitel 9 genannten „neunen“ Species der *Bacillus cereus*-Gruppe mit den am Markt erhältlichen Medien für diese Gruppe identifizierbar oder sogar differenzierbar sind.

Es besteht also erheblicher Forschungsbedarf hinsichtlich der Optimierung einer mikrobiologischen, kultivierungsbasierten Analytik der *Bacillus cereus*-Gruppe. Die entsprechenden Arbeiten, die seit Antragstellung grundlegend neuen Erkenntnisse in eine spezifische Kultivierungsroutine umzusetzen, waren nicht Gegenstand der Zielsetzung des vorliegenden Vorhabens K/11/08 die molekularbiologische Analytik (s. 9.2) zu aktualisieren. Die Bearbeitungszeit hätte den Zeitrahmen deutlich überschritten. Eine Optimierung der mikrobiologischen, kultivierungsbasierten Analytik der *Bacillus cereus*-Gruppe konnte daher im Vorhaben K/11/08 nicht angegangen werden und müsste daher Gegenstand eines späteren Forschungsvorhabens sein.

9.2 Molekularbiologische Analytik

Im Rahmen des vorliegenden Vorhabens K/11/08 wurde zunächst das Alignment der *rpoB*-Sequenzen von 2006 (Lebuhn und Wilderer, 2006) aktualisiert, letztmalig kurz vor Redaktionsschluss. Von Anfangs knapp 30 Sequenzen hatte sich diese Zahl mehr als vervierfacht, und es wurde eine Reihe neuer Species in der *Bacillus-cereus* Gruppe in das Alignment aufgenommen.

Bei der *in-silico*-Spezifitätsanalyse ergab sich, dass der Forward-Primer (Bcg_ *rpoB*-F, Tab. 33) eine gute Spezifität für die „klassischen“ Mitglieder der Gruppe zeigte. Mit den neuen Gruppenmitgliedern (*B. cytotoxicus*, *B. manliponensis* und *B. gaemokensis*) ergaben sich zwar Mismatches, diese betrafen aber eher bei der PCR unwichtige Primerpositionen (nicht dargestellt). Auch die Sonde (Bcg_ *rpoB*-S, Tab. 33) erfasste die „klassischen“ Mitglieder Gruppe sehr gut, *B. manliponensis* und *B. cytotoxicus* zeigten allerdings Mismatches in kritischen Positionen (nicht dargestellt). Auch der Reverse-Primer (Bcg_ *rpoB*-R, Tab. 33) erwies sich als hervorragend spezifisch und erfasste alle Sequenzen der *Bacillus-cereus* Gruppe. Lediglich *B. gaemokensis* zeigte einen Mismatch in einer für die PCR unwichtigen Position (nicht dargestellt).

Tab. 33: Primer- und Sondensequenzen des *rpoB*-qPCR-Systeme für die „klassischen“ Species der *Bacillus-cereus* Gruppe

System	F: Forward-Primer (5'→3')	S: Sonde (5'→3')	R: Reverse-Primer (5'→3')
Bcg_ <i>rpoB</i> (Lebuhn und Wilderer, 2006)	CAG AAA CTG GTG AAA TTT TAG CGG C	FAM-CCT TAC TTA GAG AAA AAC ATT GGA TTC AAA ACA GCG-TAMRA	GGA GCA TAA ATC TTA ATA GAT TGC AGC TC

Die *in-silico*-Analysen ergaben eine hervorragende Spezifität des qPCR-Systems Bcg_ *rpoB* für die „klassischen“ Mitglieder der *Bacillus-cereus* Gruppe. Das System kann demnach für diese weiterhin eingesetzt werden. Ein wesentlicher Vorteil des Systems besteht darin, dass *rpoB* ein Haushaltsgen ist, und dass über die Produktion von *rpoB*-mRNA mittels RT-qPCR ein spezifischer Nachweis lebender und damit eine Differenzierung von toten Zellen möglich ist (Lebuhn et al., 2015).

Sollte es erforderlich werden, auch die „neuen“, erst vor kurzem beschriebenen oder transferierten Mitglieder der Gruppe (*B. cytotoxicus*, *B. manliponensis* und *B. gaemokensis*) zu erfassen, müsste das System modifiziert oder komplett neu gestaltet werden. Dies konnte in der verbleibenden Projektzeit nicht mehr angegangen werden.

9.3 Schnellscreening-Ansatz zum Nachweis von Mitgliedern der *Bacillus-cereus* Gruppe

Mit dem (RT)qPCR-System Bcg_ *rpoB* ist eine schnelle und spezifische molekularbiologische Analytik für die „klassischen“ Mitglieder der *Bacillus-cereus* Gruppe an der LfL einsatzbereit (siehe Abschnitt 9.2). Zur Analytik von *B. cytotoxicus*, *B. manliponensis* und *B. gaemokensis* wird auf Abschnitt 9.2 verwiesen. Der Nachweis von mRNA gestattet dabei auch, die Lebensfähigkeit der Zellen zu demonstrieren (Lebuhn et al., 2015). Dies kann als Nachweis aktueller Aktivität über den Bcg_ *rpoB*-mRNA-

Nachweis direkt aus der Probe (Sporen zeigen allerdings keine Aktivität) oder über den *Bcg_rpoB*-mRNA-Nachweis aus einem geeigneten Flüssigmedium erfolgen. Entsprechende Evaluierungen konnten in der verbleibenden Projektlaufzeit nicht mehr durchgeführt werden.

In das Analyseverfahren konnte aus den bei 9.1 genannten Gründen (noch) kein Kultivierungsschritt eingebaut werden, der eine MPN-qPCR mit Verdünnungsstufen einer Flüssigkultur oder –anreicherung gestatten würde. Ein solcher Ansatz ist sicher vielversprechend, muss aber Gegenstand eines späteren Forschungsvorhabens bleiben.

10 Zusammenfassung

Es ist ein zentrales Anliegen in der Landwirtschaft, die Sicherheit ihrer Produkte für die Abnehmer und die Produzenten zu gewährleisten. Hierzu dienen Kontrollen u.a. auf das Vorhandensein von lebensfähigen bzw. infektiösen Krankheitserregern in den betrachteten Materialien. Die entsprechende Analytik basiert daher typischerweise auf einer spezifischen Vermehrung der Krankheitserreger durch selektive Kultivierung häufig in mehreren unterschiedlichen Schritten und der anschließenden Untersuchung physiologischer und/oder phänotypischer Eigenschaften erhaltener Reinkulturen.

Die spezifische, selektive Kultivierung aus den zu untersuchenden Proben ist nach wie vor der „goldene Standard“ in der Routineanalytik von Krankheitserregern, sie bringt aber auch einige Probleme mit sich: zum einen ist sie ist zumeist sehr zeit- und arbeitsaufwändig. Manche Routinen erfordern Wochen, was z.B. für eine Freigabe verderblicher Ware, insbesondere von Lebensmitteln, viel zu lang ist. Fallweise hatte sich auch gezeigt, dass die vorgeschriebenen Routinen nicht spezifisch genug waren oder dass im schlimmeren Fall die Vermehrung potentieller Krankheitserreger im Nachweisverfahren (teilweise) unterdrückt wurde. Darüber hinaus lassen sich manche Pathogene nicht oder nur sehr schwer kultivieren.

Es besteht daher ein dringender Bedarf, schnelle, spezifische und sensitive Nachweisverfahren für praxisrelevante Krankheitserreger zu entwickeln, die auch das Kriterium Lebensfähigkeit bzw. Infektiosität abdecken. Molekularbiologische, insbesondere PCR-basierte Methoden haben in den letzten Jahrzehnten ihren besonderen Wert für eine schnelle, spezifische und sensitive Analytik jeder Art von Organismen bewiesen und haben fallweise auch schon Eingang in die Praxis gefunden. Wenn die Analytik auf DNA abzielt, kann meist nicht zwischen toten bzw. inaktiven und lebenden, aktiven bzw. lebensfähigen oder infektiösen Organismen unterschieden werden. Weiterhin eignet sich die molekularbiologische Analytik typischerweise nur zur Untersuchung kleiner Probenmengen, was bei heterogenem Material meist nicht statistische Erfordernisse erfüllt und zu falsch negativen Ergebnissen führen kann. Diese Anforderungen müssen allerdings Routinen erfüllen, die in der Praxis zum Nachweis von Pathogenen eingesetzt werden sollen.

Im vorliegenden Forschungsvorhaben wurden daher Methoden entwickelt, die diese Kriterien berücksichtigen. Hinsichtlich der untersuchten Materialien lag dabei der Fokus auf Proben aus der Prozesskette landwirtschaftlicher Biogasanlagen, da Biogasanlagen in den letzten Jahren wiederholt der Verbreitung von Krankheitserregern bezichtigt wurden. Hier waren insbesondere krankheitserregende Clostridien wie *Clostridium botulinum* und pathogene Vertreter von *Escherichia coli* (EHEC/STEC, EPEC u.a) angesprochen. Für diese, aber auch für Salmonellen, wurden spezifische und sensitive Schnellscreening-Systeme (weiter)entwickelt, evaluiert und etabliert, wobei die molekularbiologische Real-Time qPCR-Analytik zumindest einem Kultivierungsschritt nachgeschaltet wurde. Hierdurch ließ sich zum einen der Nachweis spezifisch von lebensfähigen Einheiten führen, zum anderen gestattete diese Kombination den Einsatz größerer Probenmengen. Weiterhin ließen sich die Erreger mit einem most probable number-Ansatz in der Originalprobe quantifizieren, was zur Definition der Belastung des untersuchten Materials mit dem untersuchten Krankheitserreger und damit zur Einschätzung einer Gefährdung essentiell ist.

Die entwickelte qPCR-Analytik für die toxinogenen Krankheitserreger der *Bacillus cereus*-Gruppe konnte wegen der verbesserungsbedürftigen Kultivierungsverfahren (noch) nicht zu einer Schnellscreening-Routine mit vorgeschalteter Kultivierung erweitert werden. Allerdings ermöglicht es der Einsatz der qPCR-Analytik bereits in der vorliegenden Form, Zeit einzusparen und den Nachweis spezifischer und sensitiver zu gestalten.

Da die pathogenen Kryptosporidien-Parasiten bislang nicht kultivierbar sind, musste für diese eine andere Strategie zur Etablierung eines Schnellscreening-Systems entwickelt werden. Statt der Fähigkeit zur Vermehrung erwiesen sich die Fähigkeit zur Produktion von Hitzeschockprotein-mRNA oder auch die Excystierbarkeit als geeignete Parameter, die Vitalität und Aktivierbarkeit der Parasiten-Dauerformen durch Induktion mit den entsprechenden Stimuli zu bestimmen. Die Gesamtkonzentration der Oocysten wird dabei auf DNA-Ebene gemessen. Durch die Kombination dieser physiologischen Parameter mit dem entwickelten (RT)qPCR-System lassen sich auch für die schwierige Parasitengruppe der Kryptosporidien Schnellscreening-Systeme erstellen.

Die im vorliegenden Vorhaben entwickelten molekularbiologischen Analyse- und die entsprechenden Schnellscreeningssysteme bildeten die Grundlage zur Durchführung angewandter Forschungsvorhaben und Untersuchungen in der Praxis. Beispielsweise konnte mit diesen die StMELF-Studie N/11/30 „Verhalten von EHEC und krankheitserregenden Clostridien in Biogasanlagen“ erfolgreich bearbeitet werden.

11 Summary

It is a central concern in agriculture to ensure the safety of agricultural products for the customers and the producer. Examinations amongst others for the presence of viable or rather infectious pathogenic agents in the materials under consideration are serving for this purpose. The corresponding analysis is therefore typically based on specific proliferation of pathogens through selective cultivation often in several different steps and the subsequent study of physiological and/or phenotypic characteristics of obtained pure cultures.

The specific, selective cultivation from examined samples is still the "gold standard" in the routine analysis of pathogens, but it also entails some problems: Some pathogens cannot be cultivated or are very difficult to cultivate, and if cultivation routines exist, they are usually very time consuming and labor intensive. Some routines require weeks, which is much too long e.g. for the release of perishable goods, especially food. Occasionally, it was also shown that the prescribed routines were not specific enough, or even worse that the proliferation of potential pathogens was (partially) suppressed in the cultivation routine.

There is therefore an urgent need to develop rapid, specific and sensitive detection methods for practically relevant pathogens, and these methods must also allow assessing the viability or infectivity. Molecular biology, particularly PCR-based methods have proved its special value for rapid, specific and sensitive analysis of all kinds of organisms in recent decades, and occasionally they have already found their way into practice. If the analysis is targeting DNA, between dead or inactive and living, active/viable or infectious organisms usually cannot be distinguished. Furthermore, molecular biology analysis is typically only performed with small amounts of sample. With heterogeneous material, this does usually not meet statistical requirements and may lead to false negative results.

Analytical routines for detecting pathogens in practice should thus enable working with higher sample amounts.

In the present research project, methods were developed that take into account these criteria. With regard to the materials studied, the focus was on samples from the process chain of agricultural biogas plants, since biogas plants were accused repeatedly in recent years to be responsible for the spread of pathogens, particularly of pathogenic Clostridia such as *Clostridium botulinum* and pathogenic representatives of *Escherichia coli* (EHEC/STEC, EPEC u.a). For these pathogens, but also for salmonella, specific and sensitive rapid screening systems have been (further) developed, evaluated and established, and molecular biology Real-Time qPCR analysis was integrated downstream of at least one cultivation step. This arrangement allowed detecting specifically viable units, and concomitantly, the use of larger sample volumes was possible. Furthermore, the pathogens could be quantified in the original sample with a most probable number approach. This is essential for defining the pathogen load of the examined material in order to estimate a potential hazard.

The developed qPCR analysis for toxinogenic pathogens of the *Bacillus cereus* group could not be extended (yet) to a rapid screening routine involving upstream cultivation because of the need to improve the respective cultivation techniques. However, the use of the qPCR analysis allows already in the present form saving time and making the determination more specific and sensitive.

Since pathogenic *Cryptosporidium* parasites are not yet cultivable, another strategy to establish a rapid screening system had to be developed. Instead of proliferation, the ability to produce heat shock protein mRNA or the excystation capability turned out to be suitable parameters to determine the vitality of the recalcitrant oocysts by induction with the appropriate stimuli. The total concentration of the oocysts is measured using qPCR at the DNA level. By combining these physiological parameters with the developed (RT) qPCR system, quick screening systems can be created also for the difficult *Cryptosporidium* parasites.

The molecular biology and quick screening systems that were developed in the current project were the basis for the realization of applied research projects and examinations in the practice. For example, using these approaches, it was possible conducting the StMELF project N/11/30 "behavior of EHEC and pathogenic clostridia in biogas plants" successfully.

12 Literaturverzeichnis

- Ackermann, G., 2004. *Clostridium difficile* - Aktueller Stand; Teil I: Epidemiologie, Pathogenese, Diagnostik, Therapie, Immunologie und Prophylaxe. Mikrobiologie. 14. Jg.: 123-129.
- Alves, J., Niguma, N.H., de Oliveira, T.C.R.M., 2015. Detection of *Salmonella* spp. in Eight Complex Food Matrices Using Polymerase Chain Reaction Assay. J. Food Saf. n/a–n/a. doi:10.1111/jfs.12194
- Amavisit, P., Browning, G.F., Lightfoot, D., Church, S., Anderson, G.A., Whithear, K.G., Markham, P.F., 2001. Rapid PCR detection of *Salmonella* in horse faecal samples. Vet. Microbiol. 79, 63–74. doi:10.1016/S0378-1135(00)00340-0
- Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren, 2002. nach §64 LFGB: BVL L 07.18-1: 2002-05: Untersuchung von Lebensmitteln - Nachweis, Isolierung und Charakterisierung Verotoxin-bildender *Escherichia coli* (VTEC) in Hackfleisch mittels PCR und DNA-Hybridisierungstechnik.
- Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren, 1988. nach §64 LFGB: BVL L 06.00-26: 1988-12: Untersuchung von Lebensmitteln; Nachweis von *Clostridium botulinum* und Botulinum-Toxin in Fleisch und Fleischerzeugnissen.
- Anonymus, 2006. 300.000 Liter Gülle überfluten Dorf. Augsburger Allgemeine.
- Awad, M.M., Bryant, A.E., Stevens, D.L., Rood, J.I., 1995. Virulence studies on chromosomal α -toxin and Θ -toxin mutants constructed by allelic exchange provide genetic evidence for the essential role of α -toxin in *Clostridium perfringens*-mediated gas gangrene. Mol. Microbiol., 15(2), 191-202.
- Bartlett, J.G. (2002): Clinical practice: antibiotic-associated diarrhea. The New England Journal of Medicine 346(5), 334-339.
- Bell, R.L., Jarvis, K.G., Ottesen, A.R., McFarland, M.A., Brown, E.W., 2016. Recent and emerging innovations in Salmonella detection: a food and environmental perspective. Microb. Biotech. 9(3), 279-292.
- BioAbfV, 2013. Bioabfallverordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 4. April 2013 (BGBl. I S. 658), die zuletzt durch Artikel 5 der Verordnung vom 5. Dezember 2013 (BGBl. I S. 4043) geändert worden ist.
- Brzostek, K., Hrebenda, J., Benz, R., Boos, W., 1989. The OmpC protein of *Yersinia enterocolitica*: Purification and properties. Res. Microbiol. 140, 599–614. doi:10.1016/0923-2508(89)90001-6
- Buschmann, A. Kliche, R., Pohl, A., Streicher, G., Effenberger, M. 2015. Monitoring von Biogasanlagen - Diversifizierung der Einsatzstoffe und Verfahrenstechnik. Abschlussbericht der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Landtechnik und Tierhaltung, pp. 156.
- Chatfield, S.N., Dorman, C.J., Hayward, C., Dougan, G., 1991. Role of *ompR*-dependent genes in *Salmonella typhimurium* virulence: mutants deficient in both *ompC* and *ompF* are attenuated in vivo. Infect. Immun. 59, 449–452.
- Dhalluin, A., Lemée, L., Pestel-Caron, M., Mory, F., Leluan, G., Lemeland, J. F., & Pons, J. L. (2003). Genotypic differentiation of twelve *Clostridium* species by polymorphism analysis of the triosephosphate isomerase (*tpi*) gene. Systematic and applied microbiology, 26(1), 90-96.
- DüMV, 2012. Düngemittelverordnung vom 5. Dezember 2012 (BGBl. I S. 2482).
- East, A.K., Collins, M.D., 1994. Conserved structure of genes encoding components of botulinum neurotoxin complex M and the sequence of the gene coding for the

- nontoxic component in nonproteolytic *Clostridium botulinum* type F. *Curr. Microbiol.* 29, 69–77.
- Ebertseder, F., Kissel, R., Bachmaier, H., Gracia, E.R., Lehner, A., Effenberger, M. 2012. Monitoring und Dokumentation von Praxisanlagen. Abschlussbericht des StMELF-Forschungsprojekts. LfL-Schrift 8/2012, ISSN 1611-4159, pp. 113.
- Eggert, M., Stüber, E., Heurich, M., Fredriksson-Ahomaa, M., Burgos, Y., Beutin, L., Märtlbauer, E., 2013. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in faeces and lymphatic tissue of free-ranging deer. *Epidemiol. Infect.* 141, 251–259. doi:10.1017/S0950268812000246
- Frahm, E., Obst, U., 2003. Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* in water samples. *J. Microbiol. Methods* 52, 123–131. doi:10.1016/S0167-7012(02)00150-1
- Fröschle, B., Heiermann, M., Lebuhn, M., Messelhäusser, U., Plöchl, M., 2015a. Hygiene and Sanitation in Biogas Plants, in: *Biogas Science and Technology, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 151, 63-99. Springer.
- Fröschle, B., Lebuhn, M., 2012. Abtötung von Salmonellen im Biogasprozess - LfL-Information, LfL-Schriftenreihe. Freising, Germany.
- Fröschle, B., Messelhäusser, U., Höller, C., Lebuhn, M., 2015b. Fate of *Clostridium botulinum* and incidence of pathogenic clostridia in biogas processes. *J. Appl. Microbiol.* 119(4), 936-947. doi: 10.1111/jam.12909.
- Fröschle, B., Messelhäuser, U., Lebuhn, M., Höller, C., 2015c. Verhalten von EHEC und krankheitserregenden Clostridien in Biogasanlagen - Projektabschlussbericht (N/11/30).
- Galán, J.E., Collmer, A., 1999. Type III Secretion Machines: Bacterial Devices for Protein Delivery into Host Cells. *Science* 284, 1322–1328. doi:10.1126/science.284.5418.1322
- Galán, J.E., Curtiss, R., 1991. Distribution of the *invA*, -B, -C, and -D genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: *invA* mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells. *Infect. Immun.* 59, 2901–2908.
- Galán, J.E., Ginocchio, C., Costeas, P., 1992. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *InvA* to members of a new protein family. *J. Bacteriol.* 174, 4338–4349.
- Garcés-Sanchez, G., 2013. Quantification of *Cryptosporidium parvum* and enteroviruses by quantitative Real-Time PCR (qPCR) in environmental samples - Methodological developments for monitoring anaerobic systems. Dissertation an der Technischen Universität München, pp. 175, <https://mediatum.ub.tum.de/doc/1115672/1115672.pdf>.
- Garcés, G., Effenberger, M., Najdrowski, M., Wackwitz, C., Gronauer, A., Wilderer, P.A., Lebuhn M., 2006. Quantification of *Cryptosporidium parvum* in anaerobic digesters treating manure by (reverse-transcription) quantitative real-time PCR, infectivity and excystation tests. *Water Sci. Tech.* 53/8, 195-202.
- Garcés-Sanchez, G., Wilderer, P.A., Horn, H., Munch, J.C., Lebuhn, M., 2013. Assessment of the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts with the induction ratio of *hsp70* mRNA production in manure. *J. Microbiol. Meth.* 94, 280-289; DOI:10.1016/j.mimet.2013.05.011.
- Garcés-Sanchez, G., Wilderer, P.A., Munch, J.C., Horn, H., Lebuhn, M., 2009. Evaluation of two methods for quantification of *hsp70* mRNA from the waterborne pathogen *Cryptosporidium parvum* by reverse transcription real-time PCR in environmental samples. *Water Res.*, 43(10), 2669-2678.

- Gonzalez-Escalona, N., Hammack, T.S., Russell, M., Jacobson, A.P., De Jesus, A.J., Brown, E.W., Lampel, K.A., 2009. Detection of Live *Salmonella* sp. Cells in Produce by a TaqMan-Based Quantitative Reverse Transcriptase Real-Time PCR Targeting *invA* mRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 3714–3720. doi:10.1128/AEM.02686-08
- Haumacher, R., Schnauffer, S., Philipp, W., Pietsch, M., Hölzle, L., 2012. Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben: Hygieneaspekte organischer Düngemittel und ihre Anwendung. Universität Hohenheim, Hohenheim, Deutschland.
- Hendriksen, N.B., Hansen, B.M., 2011. Diagnostic properties of three conventional selective plating media for selection of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis* and *B. weihenstephanensis*. *Folia microbiologica*, 56(6), 535-539.
- Inoue, K., Fujinaga, Y., Watanabe, T., Ohyama, T., Takeshi, K., Moriishi, K., Nakajima, H., Oguma, K., 1996. Molecular composition of *Clostridium botulinum* type A progenitor toxins. *Infect. Immun.* 64, 1589–1594.
- Jensen, A., 2003. Addition of Novobiocin in pre-enrichment step can improve *Salmonella* culture protocol of modified semisolid Rappaport–Vassiliadis. *J. Microbiol. Methods* 55, 249–255. doi:10.1016/S0167-7012(03)00158-1
- Karch, H., Leopold, S.R., Kossow, A., Mellmann, A., Köck, R., Bauwens, A., 2015. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC): Environmental-Vehicle-Human Interface, in: Sing, A. (Ed.), *Zoonoses - Infections Affecting Humans and Animals - Focus on Public Health Aspects*. Springer, pp. 235–248.
- Kerenyi, M., Allison, H.E., Batai, I., Sonnevend, A., Emody, L., Plaveczyk, N., Pal, T., 2005. Occurrence of *hlyA* and *sheA* Genes in Extraintestinal *Escherichia coli* Strains. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2965–2968. doi:10.1128/JCM.43.6.2965-2968.2005
- Kissel, R., Adikaram, K.K.L.B., Pohl, A., Gracia, E.R., Effenberger, M. 2015. Betriebs-Monitoring: Vergleichende Untersuchung für die Einwerbung und Vergärung von Grünlandaufwüchsen. Abschlussbericht des StMELF-Vorhabens K/11/05 - Schwerpunkt Biogasanlagen, pp. 137.
- Kwang, J., Littledike, E.T., Keen, J.E., 1996. Use of the polymerase chain reaction for *Salmonella* detection. *Lett. Appl. Microbiol.* 22, 46–51.
- Lemee, L., Dhalluin, A., Testelin, S., Mattrat, M. A., Maillard, K., Lemeland, J. F., & Pons, J. L. (2004). Multiplex PCR targeting *tpi* (triose phosphate isomerase), *tcdA* (Toxin A), and *tcdB* (Toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*. *Journal of clinical microbiology*, 42(12), 5710-5714.
- Lebuhn, M., Effenberger, M., Garcés, G., Gronauer, A., Wilderer, P.A., 2004. Evaluating Real-Time PCR for the quantification of distinct pathogens and indicator organisms in environmental samples. *Water Sci. Tech.* 50/1, 263-27.
- Lebuhn, M., Wilderer, P., 2006. Abschlussbericht des StMUGV-Projekts "Biogastechnologie zur umweltverträglichen Flüssigmistverwertung und Energiegewinnung in Wasserschutzgebieten: wasserwirtschaftliche und hygienische Begleituntersuchung, Projektteil: Mikrobiologische, parasitologische und virologische Untersuchungen". Technische Universität München, LS f. Siedlungswasserwirtschaft. <http://www.sww.bgu.tum.de/mwg-internal/de5fs23hu73ds/progress?id=6E75KQx0es>, pp. 102.
- Lebuhn, M., Derenkó, J., Rademacher, A., Helbig, S., Munk, B., Pechtl, A., Stolze, Y., Prowe, S., Schwarz, W.H., Schlüter, A., Liebl, W., Klocke, M., 2016. DNA and RNA Extraction and Quantitative Real-Time PCR-Based Assays for Biogas Biocenoses in an Interlaboratory Comparison. *Bioengineering*, 3(1), 7, pp. 24; doi:10.3390/bioengineering10x000x, ISSN 2306-5354.

- Lebuhn, M., Weiß, S., Munk, B., Guebitz, G.M., 2015. Microbiology and Molecular Biology Tools for Biogas Process Analysis, Diagnosis and Control. In: Biogas Science and Technology (G.M. Guebitz, ed.), Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 151, 1-40. doi: 10.1007/978-3-319-21993-6_1
- Mao, F., Leung, W.-Y., Xin, X., 2007. Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. BMC Biotechnology 7, 76. doi:10.1186/1472-6750-7-76
- Marín Pérez, C., Fröschle, B., Lebuhn, M., 2013. Abschlussbericht des Forschungsprojektes: "Prozessbeschleunigung und Hygienisierung in Biogasanlagen durch Vorschaltung einer Hydrolysephase/ -stufe" (1. aktualisierte Fassung). Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Freising.
- Messelhäusser, U., Fröschle, B., Lebuhn, M., Höller, C., 2015. Detection of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in biogas plants in combination with germ carrier experiments. submitted.
- Messelhäusser, U., Zucker, R., Ziegler, H., Elmer-Englhard, D., Kleih, W., Höller, C., Busch, U., 2007. Nachweis von *Clostridium botulinum* Typ A, B, E und F mittels real-time-PCR. J. Für Verbraucherschutz Leb. 2, 198–201. doi:10.1007/s00003-007-0174-y
- Myllykoski, J., Lindström, M., Keto-Timonen, R., Söderholm, H., Jakala, J., Kallio, H., Sukura, A., Korkeala, H., 2009. Type C bovine botulism outbreak due to carcass contaminated non-acidified silage. Epidemiol. Infect. 137, 284–293. doi:10.1017/S0950268808000939
- Nakamura, K., Kohda, T., Seto, Y., Mukamoto, M., Kozaki, S., 2013. Improved detection methods by genetic and immunological techniques for botulinum C/D and D/C mosaic neurotoxins. Vet. Microbiol. 162, 881–890. doi:10.1016/j.vetmic.2012.11.009
- Pavlovic, M., Huber, I., Skala, H., Konrad, R., Schmidt, H., Sing, A., Busch, U., 2010. Development of a multiplex real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* and enteropathogenic *Escherichia coli* strains. Foodborne Pathog. Dis. 7, 801–808.
- Raphael, B.H., Andreadis, J.D., 2007. Real-time PCR detection of the nontoxic nonhemagglutinin gene as a rapid screening method for bacterial isolates harboring the botulinum neurotoxin (A–G) gene complex. J Microbiol Meth 71, 343–346. doi:10.1016/j.mimet.2007.09.016
- Reischl, U., Youssef, M.T., Kilwinski, J., Lehn, N., Zhang, W.L., Karch, H., Strockbine, N.A., 2002. Real-Time Fluorescence PCR Assays for Detection and Characterization of Shiga Toxin, Intimin, and Enterohemolysin Genes from Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 40, 2555–2565. doi:10.1128/JCM.40.7.2555-2565.2002
- RKI (Ed.), 2011. Steckbriefe seltener Infektionskrankheiten.
- RKI (Ed.), 2009a. RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten - Merkblätter für Ärzte - Salmonellose (Salmonellen-Gastroenteritis). Epidemiol. Bull. Robert Koch-Inst., Epidemiologisches Bulletin 13, 117–126.
- RKI (Ed.), 2009b. RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte - *Clostridium difficile*. Epidemiol. Bull. Robert Koch-Inst., Epidemiologisches Bulletin 24, 233–239.
- Robertson, L.J., 2015. Waterborne Zoonoses: Cryptosporidium and Cryptosporidiosis: A Small Parasite that Makes a Big Splash, in: Sing, A. (Ed.), Zoonoses - Infections Affecting Humans and Animals. Springer Netherlands, pp. 803–819.

- Roblin, P., Dewitte, F., Villeret, V., Biondi, E.G., Bompard, C., 2015. A *Salmonella* Type Three Secretion Effector/Chaperone Complex Adopts a Hexameric Ring-Like Structure. *J. Bacteriol.* 197, 688–698. doi:10.1128/JB.02294-14
- Sauer, S., 2012. Güllepanne: Gutachter suchen nach der Ursache. *Mainpost*.
- Schmidt, H., Beutin, L., Karch, H., 1995. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157: H7 strain EDL 933. *Infect. Immun.* 63, 1055–1061.
- Schrank, I.S., Mores, M.A.Z., Costa, J.L.A., Frazzon, A.P.G., Soncini, R., Schrank, A., Vainstein, M.H., Silva, S.C., 2001. Influence of enrichment media and application of a PCR based method to detect *Salmonella* in poultry industry products and clinical samples. *Vet. Microbiol.* 82, 45–53. doi:10.1016/S0378-1135(01)00350-9
- Sharma, V.K., Dean-Nystrom, E.A., Casey, T.A., 1999. Semi-automated fluorogenic PCR assays (TaqMan) for rapid detection of *Escherichia coli* O157: H7 and other Shiga toxicogenic *E. coli*. *Mol. Cell. Probes* 13, 291–302.
- Skarin, H., Håfström, T., Westerberg, J., Segerman, B., 2011. *Clostridium botulinum* group III: a group with dual identity shaped by plasmids, phages and mobile elements. *BMC Genomics* 12, 185.
- Strauch, D., 1996. Hygieneaspekte bei der Cofermentation, in: Braun, R. (Ed.), Vorträge und Podiumsdiskussion im Rahmen der Fachtagung “Internationale Erfahrungen mit der Verwertung biogener Abfälle zur Biogasproduktion.” Präsentiert bei: Internationale Erfahrungen mit der Verwertung biogener Abfälle zur Biogasproduktion, Tulln, pp. 53–92.
- Wittl, W., 2013. Hochwasser in Niederbayern - Das große Aufräumen. *Süddeutsche Zeitung*.
- Yutin, N., Galperin, M.Y., 2013. A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia: *Genomics update. Environmental Microbiology* n/a–n/a. doi:10.1111/1462-2920.12173
- Ziegler, J.S., 2013. Vergleichende Differenzierung von *Clostridium* spp. mittels biochemischer und molekularbiologischer Methoden sowie MALDI-TOF Massenspektrometrie (Inaugural-Dissertation). Ludwig-Maximilians-Universität München, München, Germany.

13 Anhang

13.1 Anhang: Durchführungsprotokolle zur Kultivierung von Krankheitserregern

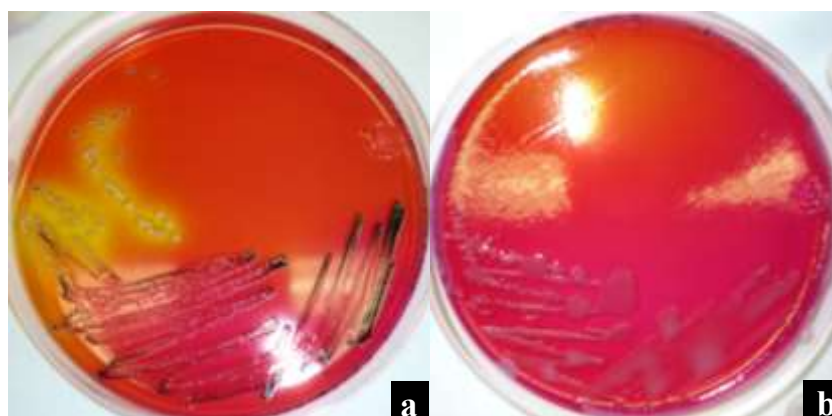
13.1.1 Kultivierung von *Salmonella* spp.

I. Medien/Platten

<i>Nährmedien und Agar, etc.</i>	<i>Hersteller</i>
<i>Peptonwasser (gepuffert)</i>	<i>Merck 1.07228</i>
<i>Novobiocin</i>	<i>CalBiochem 491207</i>
<i>Anreicherungsbouillon nach Rappaport</i>	<i>Merck 1.10236</i>
<i>XLD-Agar</i>	<i>Merck 1.05287</i>
<i>BPLS-Agar</i>	<i>Merck 1.10747</i>

II. Herstellung (nach Herstellerangaben):

- 1) **Peptonwasser (gepuffert) mit Novobiocin „PW+N“:**
 - 25,5 g * L⁻¹
 - Autoklavieren: 15 min, 121°C [Farbe danach: gelblich, klar]
 - nach Kühlen auf ca. 50°C: 1 µL pro mL Medium einer Novobiocin-Lösung [22 mg * mL⁻¹] zugegeben (→ Konzentration im Medium: 22 µg * mL⁻¹)
- 2) **Anreicherungsbouillon nach Rappaport „RV“:**
 - 32,7 g * L⁻¹
 - Autoklavieren: 20 min, 115°C [Farbe danach: dunkelblau, klar]
- 3) **XLD-Agar:**
 - 55,0 g * L⁻¹
 - Im Wasserbad zum Kochen bringen, um komplett in Lösung zu bringen
 - schnell durch Schwenken auf 47-50°C (mögl. in 2. Wasserbad) abkühlen
- 4) **BPLS-Agar:**
 - 51,5 g * L⁻¹
 - Im Wasserbad zum Kochen bringen, um komplett in Lösung zu bringen
 - nach Abkühlen auf ca. 50°C Platten gießen



Verdünnungsausstrich von *Salmonella enterica* sv. Senftenberg W775 (H₂S-negativ) auf XLD-Agar (a) und BPLS-Agar (b)

QUALITATIVER NACHWEIS

III. Voranreicherung (VA)

- 1) 90 mL mTSB-Medium werden mit 90 µL Novobiocin-Lösung versetzt
- 2) 10 g Probe werden zum Medium gegeben
- 3) Inkubation: aerob, 22 ± 2 h, $36 \pm 2^\circ\text{C}$, Schüttelfrequenz 100 min^{-1}

IV. Vorbereitung für die qPCR der VA

- 1) Für eine Untersuchung mittels qPCR 1 mL der inkubierten Voranreicherung in ein 2 mL-Reaktionsgefäß abfüllen
- 2) Abzentrifugieren, höchste rcf/rpm, 5-10 min
- 3) Überstand verwerfen
- 4) Pellet in 1 mL sterilem MQ-Wasser resuspendieren
- 5) Hitze-Inaktivierung: 5 min, 95°C Heizblock
- 6) Einfrieren

V. Hauptanreicherung (HA)

- 1) 0,1 mL der Voranreicherungskultur werden zu 10 mL RV-Bouillon gegeben
- 2) Inkubation: aerob, 22 ± 2 h, parallel bei 36 ± 2 C („RV36“) und 42 ± 1 C („RV42“), Schüttelfrequenz: 180 min^{-1}

VI. Vorbereitung für die qPCR der HA

siehe IV

VII. Plattierung

- 1) Ausstrich/ Ausplattierung (100 µL) der Hauptanreicherung (RV36 und RV42) parallel auf XLD- und BPLS-Agar
- 2) Inkubation: aerob, 22 ± 2 h, $36 \pm 2^\circ\text{C}$

VIII. Vorbereitung für die qPCR der XLD- und BPLS-Kolonien

- 1) Für eine Untersuchung mittels qPCR wird von beiden Platten je eine volle Impföse des Bakterienrasens in je 1 mL sterilem MQ-Wasser suspendiert (2 mL-Reaktionsgefäß)
- 2) Hitze-Inaktivierung: 5 min, 95°C Heizblock
- 3) Einfrieren

IX. qPCR

QUANTITATIVER NACHWEIS

Quantitativ nachgewiesen wird in Keimträgerversuchen der Stamm *Salmonella enterica* sv. Senftenberg W775 (H₂S-negativ) in Anlehnung an die Vorgaben der Bioabfallverordnung.

Abänderungen im Vergleich zum QUALITATIVEN NACHWEIS-Verfahren:

zu III. VA

- Die VA wird in Log-Verdünnungsstufen mit 10 mL zu 90 mL PW+N verdünnt.
- Es werden 47 Verdünnungsstufen nach der zu erwartenden Zellzahl ausgewählt und für die weitere Kultivierung verwendet.
- Die ausgewählten Verdünnungen werden in 35 Replikate zu je 10 mL in Kulturröhrchen abgefüllt.
- Die Inkubation erfolgt im Schüttelinkubator bei einer Schüttelfrequenz von 180 min⁻¹.

zu IV. Vorbereitung für die qPCR der VA

- Jedes Replikate der Verdünnungsstufen der VA wird für die qPCR vorbereitet (siehe IV).

zu V. HA

- Die VA wird auf Wachstum begutachtet. Die erste Verdünnungsstufe, bei der alle Replikate kein Wachstum bzw. keine Trübung zeigen, ist Ausschlag gebend für die Auswahl:
- diese und 34 darunterliegende Verdünnungsstufen (mit Trübung oder vereinzelter Trübung der Replikate) werden für die weitere Kultivierung herangezogen.
- Alle Replikate der ausgewählten Verdünnungsstufen der VA werden für die Inokulation der HA verwendet (siehe V).

zu VI. Vorbereitung für die qPCR der HA

- Jedes Replikate der Verdünnungsstufen der HA wird für die qPCR vorbereitet (siehe VI).

zu VII. Plattierung

- Vorgehen wie in „zu V“: i.d.R. tritt Trübung, die in einem Replikate der VA aufgetreten ist, auch im korrespondierenden Replikate der HA auf, so dass die zuvor ausgewählten Verdünnungsstufen auch weiter ausplattiert werden.
- Alle Replikate der ausgewählten Verdünnungsstufen der HA werden jeweils auf die Agar-Böden ausplattiert (siehe VII).

zu VIII. Vorbereitung für die qPCR der XLD- und BPLS-Kolonien

- Die Platten werden nach Augenschein auf das Auftreten des Stamms *S. Senftenberg* W775 anhand des charakteristischen Aussehens von Einzelkolonien begutachtet.
- Stichprobenartig wird die Auswertung mittels einer Identifizierung durch qPCR überprüft (siehe VIII und IX)

13.1.2 Kultivierung von EHEC/EPEC

I. Medien/Platten

1) mTSB-Bouillon (nach Rezept des LGL):

	Für 1 L [g]	Für 2,5 L [g]
Tryptose Soja Bouillon	30,0	75,00
Gallesalz Nr. 3	1,5	3,75
di-Kalium-Hydrogenphosphat	1,5	3,75
Die Zutaten zu ... deionisiertem Wasser geben	1 L	2,5 L

→ bei Raumtemperatur lösen

→ pH-Wert auf 7,3 einstellen [*bisher war der pH ohne Einstellen bei pH 7,3*]

→ 225 mL in Kolben vorlegen oder leere Kulturkolben mit-autoklavieren

→ Autoklavieren: 15 min, 121°C [*Farbe danach: gelblich, klar*]

→ zu einem Teil des mTSB-Bouillon (Voranreicherung) werden

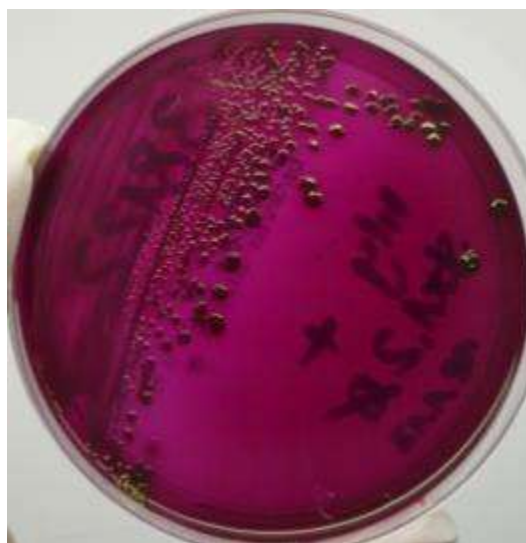
1 µL pro mL Bouillon einer Novobiocin-Lösung [20 mg/mL] zugegeben

(→ Konzentration im Medium: 20 µg/mL)

2) „Endo“: Endo-Agar (Abb. 1)

3) „MH“: Müller-Hinton-Agar

<i>Hersteller</i>	<i>AQUIC</i>
<i>Tryptose Soja Bouillon</i>	<i>Merck 1.00550</i>
<i>Gallesalz Nr. 3</i>	<i>Oxoid L0056</i>
<i>di-Kalium-Hydrogenphosphat</i>	<i>Merck 1.05101</i>
<i>Novobiocin</i>	<i>CalBiochem 491207</i>
<i>Endo-Agar</i>	<i>Merck 1.04044</i>
<i>Müller-Hinton-Agar</i>	<i>Fluka 70191 (Sigma Aldrich)</i>

*E. coli* (EPEC LGL 38122) auf Endo-Agar

QUALITATIVER NACHWEIS

II. Voranreicherung

- 1) 225 mL **mTSB**-Medium werden mit 225 μ L **Novobiocin**-Lösung versetzt
- 2) 25 g Probe werden zum Medium gegeben
- 3) Inkubation: aerob, 6h (\pm 1h), 37°C, geschüttelt (Schüttelfrequenz: 100 min^{-1}),
(*alternativ im Brutschrank gelegentlich per Hand schütteln*)

III. Vorbereitung für die qPCR der Voranreicherung

- 1) Für eine Untersuchung mittels qPCR 1 mL der inkubierten Voranreicherung in ein 2 mL-Reaktionsgefäß abfüllen
- 2) Abzentrifugieren, höchste rcf/rpm, 5-10 min
- 3) Überstand verwerfen
- 4) Pellet in 1 mL sterilem MQ-Wasser resuspendieren
- 5) Hitzedeaktivieren: 5 min, 95°C Heizblock
- 6) Einfrieren

IV. Anreicherung

- 1) 1mL der Voranreicherungskultur (nach 6 \pm 1bh) werden zu 4 mL **mTSB**-Medium (ohne Novobiocin) gegeben
- 2) Inkubation: 16 – 18 h, 37°C, geschüttelt (Schüttelfrequenz: 180 min^{-1})

V. Vorbereitung für die qPCR der Anreicherung

- 1) Für eine Untersuchung mittels qPCR 1 mL der inkubierten Anreicherung in ein 2 mL-Reaktionsgefäß abfüllen
- 2) Abzentrifugieren, höchste rcf/rpm, 5-10 min
- 3) Überstand verwerfen
- 4) Pellet in 1 mL sterilem MQ-Wasser resuspendieren
- 5) Hitzedeaktivieren: 5 min, 95°C Heizblock
- 6) Einfrieren

VI. Plattierung

- 1) Ausstrich/ Ausplattierung der Voranreicherung parallel auf **MH**- und **Endo**-Agar
- 2) Inkubation: aerob, 24 h, 37°C

VII. Vorbereitung für die qPCR der MH- und Endo-Kolonien

- 1) Für eine Untersuchung mittels qPCR wird von beiden Platten je eine volle Impföse des Bakterienrasens in je 1 mL sterilem MQ-Wasser suspendiert (2 mL-Reaktionsgefäß)
- 2) Hitzedeaktivieren: 5 min, 95°C Heizblock
- 3) Einfrieren

VIII. Multiplex-qPCR der Anreicherung (mTSB)

1) Beispiel eines Multiplex-qPCR-Ansatzes

Kalkulation Hot-Start-PCR für 25 µl EHEC-Multiplex-System		
Reagenzien (Konzentration der Stocklösung)	Volumen 1 Ansatz [µL]	finale Konzentration
Puffer (10x, ohne MgCl ₂)	2,5	1x
MgCl ₂ (50 mM)	3	6 mM
dNTPs (jeweils 10 mM)	0,5	200 µM
mVS1-F (10 µM)	1	400 nM
VS2-R (10 µM)	1	400 nM
VS3-S (FAM/BHQ-1), (10 µM)	1	400 nM
stx2_for4 (10 µM)	1	400 nM
stx2_rev2 (10 µM)	1	400 nM
stx2_rev2f (10 µM)	1	400 nM
stx2_t_p1 (TEX/-BBQ650) (10 µM)	1	400 nM
stx2_t_p2 (TEX/-BBQ650) (10 µM)	1	400 nM
eae_1_for1 (10 µM)	1	400 nM
eae_1_rev1 (10 µM)	1	400 nM
eae_1_p1 (YAK/BBQ650) (10 µM)	1	400 nM
eae_1_p2 (YAK/BBQ650) (10 µM)	1	400 nM
uidA-784F (10 µM)	0,25	100 nM
uidA-866R (10 µM)	0,25	100 nM
uidA-S-EC807 (Cy5/BBQ650) (10 µM)	0,25	100 nM
Platinum-Taq-Pol. (5 u / µL)	0,2	1 u
H ₂ O (=ad dispatch volume)	2,55	
Volumen vor DNA-Zugabe	21,5	
IAC	1,0	
Ziel-DNA/Zellsuspension	2,5	
Gesamt-Volumen.	25	

2) DNA-Einsatz für die qPCR

2,5	µL	mTSB-Zellsuspension, unverdünnt als Ziel-DNA
1	µL	Zellsuspension, E. coli DSM 4509 „EC27“, 1:10000 als Interne Amplifikations-Kontrolle (IAC)

3) 2-Schritt-PCR-Programm:

Phase	Dauer	Temperatur	
Aktivierung	2 min	94°C	} 45 Zyklen
Denaturierung	15 s	94°C	
Annealing/Extension	60 s	58°C	

13.1.3 Kultivierung von *Clostridium botulinum*I. Medien/Platten

1) TPGY-Bouillon (nach Rezept des LGL):

	Für 1 L [g]	Für 1,5 L [g]	Für 4 L [g]
Pepton aus Casein	50,0	75,0	200,0
Pepton aus Fleisch	5,0	7,5	20,0
Hefeextrakt	20,0	30,0	80,0
Glucose	4,0	6,0	16,0
Natrium-Thioglycolat	1,0	1,5	4,0
Die Zutaten zu ... deionisiertem Wasser geben	1 L	1,5 L	4 L

→ bei Raumtemperatur lösen

→ pH-Wert auf 7,0 einstellen (mit 1 molarer NaOH)

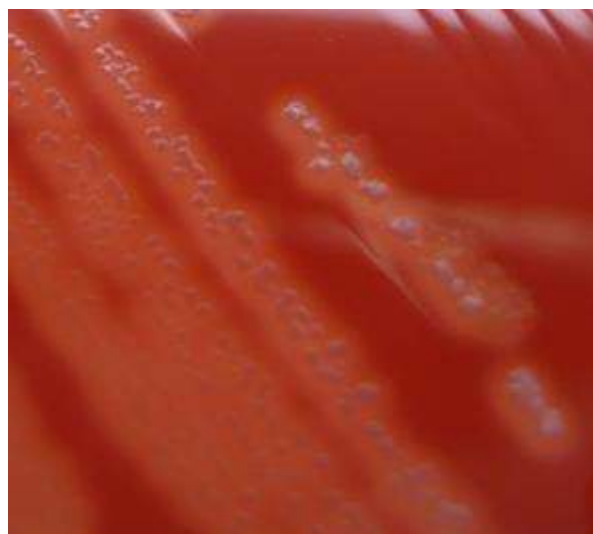
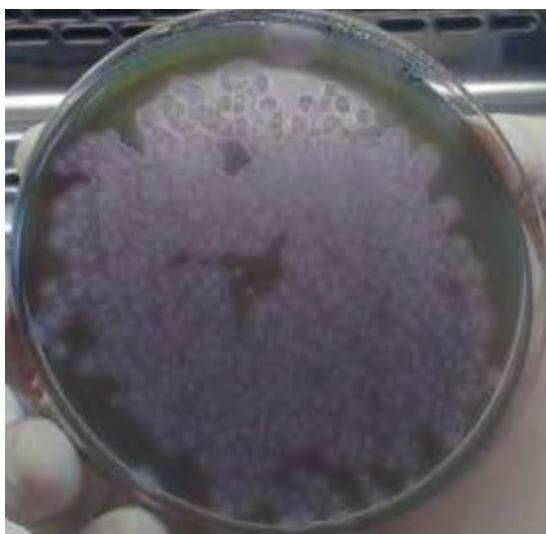
→ 90 mL in Kolben vorlegen oder leere Kulturkolben mit-autoklavieren

→ Autoklavieren: 15 min, 121°C

2) „EiL“: Eigelb-Lactose-Agar

3) „Blut“: Blut-Agar

Hersteller	AQU1c
Pepton aus Casein	<i>Fluka 70171 (Sigma-Aldrich)</i>
Pepton aus Fleisch	<i>Merck 1.07214</i>
Hefeextrakt	<i>Carl Roth 2363</i>
Glucose	<i>Merck 1.08342</i>
Natrium-Thioglycolat	<i>Sigma T 0632 (Sigma Aldrich)</i>
Eigelb-Lactose-Agar	<i>Heipha (Merck Millipore) 183e; ca. 4 Monate haltbar</i>
Blut-Agar	<i>Merckoplate 1.13414, ca. 2 Monate haltbar</i>



C. botulinum LGL E2625 auf Eigelb-Lactose-Agar (links) und Blut-Agar (rechts)

II. Voranreicherung

- 1) 90 mL TPGY-Medium werden mit 5 bis 10 g Probe versetzt
- 2) Sporenaktivierung: Erhitzen auf 60°C, 15 min
ODER bei Keimträgerversuchen: Doppelansatz Erhitzt/ Unerhitzt zum Nachweis von Sporen/ vegetativen Zellen
- 3) Inkubation: anaerob, 3-4 d, 30°C [*oder 37°C bei proteolytischen Stämmen*]
BD-Anaerobier-Kasten: 3 BD Anaerobpakete + 1 Oxoid Anaerobindikator
Oxoid-Anaerobier-Töpfe: 1 Oxoid Anaerobpaket + 1 Oxoid Anaerobindikator
[Entlüftungsschrauben müssen geschlossen sein]

III. Vorbereitung für die qPCR der Voranreicherung

- 1) Für eine Untersuchung mittels qPCR 1 mL der inkubierten Voranreicherung in ein Reaktionsgefäß abfüllen
- 2) Abzentrifugieren, höchste rcf/rpm, 5-10 min
- 3) Überstand verwerfen
- 4) Pellet in 1 mL sterilem MQ-Wasser resuspendieren
- 5) Hitzedeaktivieren: 5 min, 95°C Heizblock
- 6) Einfrieren

ODER

IV. DNA-Extraktion

- 1) Für eine Untersuchung mittels qPCR 1,8 mL der inkubierten Voranreicherung in ein Reaktionsgefäß abfüllen
- 2) Abzentrifugieren, höchste rcf/rpm, 5-10 min
- 3) Überstand bis auf ca. 200 µL (inkl. Pellet) verwerfen
- 4) Pellet resuspendieren
- 5) Hitzedeaktivieren: 5 min, 95°C Heizblock
- 6) DNA-Extraktion mit dem Qiagen Stuhl-Kit anhand des Protokolls für die Detektion von Pathogenen mit den folgenden Abänderungen:
 - Zur Lyse wird eine Temperatur von 95°C verwendet.
 - Ein größeres Volumen von 350 µL wird für die Proteinase K-Behandlung eingesetzt.

V. Plattierung

- 1) Ausstrich/ Ausplattierung der Voranreicherung parallel auf **EiL-** und **Blut-** Agar
- 2) Inkubation 3-4 d, 30°C

VI. Vorbereitung für die qPCR der EiL- und Blut-Agar-Kolonien

- 1) Für eine Untersuchung mittels qPCR wird von beiden Platten je eine volle Impföse des Bakterienrasens in je 1 mL sterilem MQ-Wasser suspendiert
- 2) Hitzedeaktivieren: 5 min, 95°C Heizblock
- 3) Einfrieren

VII. *ntnh*-qPCR

1) Beispiel eines Singleplex-qPCR-Ansatzes zum Nachweis von *ntnh*

Kalkulation Hot-Start-PCR für 25 µl <i>ntnh</i>-Singleplex-System		
Reagenzien (Konzentration der Stocklösung)	Volumen 1 Ansatz [µL]	finale Konzentration
Puffer (10x, ohne MgCl ₂)	2,5	1x
MgCl ₂ (50 mM)	3	6 mM
dNTPs (jeweils 10 mM)	0,5	200 µM
<i>ntnH</i> -9a-F (10 µM)	1,5	600 nM
<i>ntnH</i> -2c-R (10 µM)	1,5	600 nM
<i>ntnH</i> -2d-S(FAM/-BHQ1) (10 µM)	1	400 nM
Platinum -Taq-Pol. (5 u / µL)	0,15	0,75 u
H ₂ O (=ad dispatch volume)	12,35	
Volumen vor DNA-Zugabe	22,5	
Ziel-DNA/Zellsuspension	2,5	
Gesamt-Volumen.	25	

2) DNA-Einsatz für die qPCR

2,5 µL Zellsuspension aus TPGY-Kultur bzw. von Agarplatten,
in verschiedenen Verdünnungsstufen (10⁰ bis 10⁻²)

ODER

2,5 µL DNA-Extrakt aus TPGY-Kultur, unverdünnt

3) 2-Schritt-PCR-Programm:

Phase	Dauer	Temperatur	
Aktivierung	2 min	94°C	
Denaturierung	15 s	94°C	} 40 Zyklen
Annealing/Extension	60 s	55°C	

Hinweis: Beim Einsatz von Zellsuspensionen aus TPGY-Kultur in niedrigen Verdünnungsstufen (10⁰ bis 10⁻¹) tritt häufig qPCR-Inhibition auf. Für ein aussagekräftiges Ergebnis, bei dem Inhibition ausgeschlossen werden kann, werden dieselben Zellsuspensionen mit dem *ehly*-qPCR-System und nach Spiking mit *ehly*-enthaltender Zellsuspension (z.B. EPEC LGL 38122) in einer Art nachgeschobener interner Amplifikations-Kontrolle (IAC) untersucht.

VIII. bont-qPCR

Bei positivem Ergebnis der *ntnh*-qPCR kann anhand der Nachweissysteme für die einzelnen Botulinum-Neurotoxingene (A bis F) eine genauere Charakterisierung durchgeführt werden.

- Beispiel eines Singleplex-qPCR-Ansatzes zum Nachweis von *bont/A* (analog für *bont/B*, *bont/E* und *bont/F*)

Kalkulation Hot-Start-PCR für 25 µl <i>bont/A</i>-Singleplex-System		
Reagenzien (Konzentration der Stocklösung)	Volumen 1 Ansatz [µL]	finale Konzentration
Puffer (10x, ohne MgCl ₂)	2,5	1x
MgCl ₂ (50 mM)	3	6 mM
dNTPs (jeweils 10 mM)	0,5	200 µM
CBOT A fw (10 µM)	0,75	300 nM
CBOT A re (10 µM)	0,75	300 nM
CBOT A S (HEX/BHQ-1) (10 µM)	0,5	200 nM
Platinum-Taq-Pol. (5 u / µL)	0,2	1 u
H ₂ O (=ad dispatch volume)	14,3	
Volumen vor DNA-Zugabe	22,5	
Ziel-DNA/Zellsuspension	2,5	
Gesamt-Volumen.	25	

Der Nachweis mit dem *bont/B*-System (2-CBOT B fw/2-CBOT B re/CBOT B S), mit dem *bont/E*-System (CBOT E fw/CBOT E re/CBOT E S) und mit dem *bont/F*-System (CBOT F fw/CBOT F re/CBOT F S) erfolgt unter Einsatz der selben Primer- und Sondenkonzentrationen wie für *bont/A*.

- 2-Schritt-PCR-Programm:

Phase	Dauer	Temperatur	
Aktivierung	2 min	94°C	} 40 Zyklen
Denaturierung	15 s	94°C	
Annealing/Extension	60 s	55°C	

- Beispiel eines Singleplex-qPCR-Ansatzes zum Nachweis von *bont/C*

Kalkulation Hot-Start-PCR für 25 µl <i>bont/C</i>-Singleplex-System		
Reagenzien (Konzentration der Stocklösung)	Volumen 1 Ansatz [µL]	finale Konzentration
Puffer (10x, ohne MgCl ₂)	2,5	1x
MgCl ₂ (50 mM)	3	6 mM
dNTPs (jeweils 10 mM)	0,5	200 µM
CBOT_C_fw2 (10 µM)	1,5	600 nM
CBOT_C_re3 (10 µM)	1,5	600 nM
CBOT_C_S2 (FAM/BHQ-1) (10 µM)	1	400 nM
Platinum-Taq-Pol. (5 u / µL)	0,2	1 u
H ₂ O (=ad dispatch volume)	12,3	
Volumen vor DNA-Zugabe	22,5	
Ziel-DNA/Zellsuspension	2,5	

Gesamt-Volumen.	25
-----------------	----

- 2-Schritt-PCR-Programm:

Phase	Dauer	Temperatur	
Aktivierung	2 min	94°C	} 45 Zyklen
Denaturierung	15 s	94°C	
Annealing/Extension	60 s	58°C	

- Beispiel eines Singleplex-qPCR-Ansatzes zum Nachweis von *bont/D*

Kalkulation Hot-Start-PCR für 25 µl <i>bont/D</i> -Singleplex-System		
Reagenzien (Konzentration der Stocklösung)	Volumen 1 Ansatz [µL]	finale Konzentration
Puffer (10x, ohne MgCl ₂)	2,5	1x
MgCl ₂ (50 mM)	3	6 mM
dNTPs (jeweils 10 mM)	0,5	200 µM
CBOT D fw (10 µM)	1	400 nM
CBOT D re (10 µM)	1	400 nM
CBOT D S (HEX/BHQ-1) (10 µM)	1	400 nM
Platinum -Taq-Pol. (5 u / µL)	0,2	1 u
H ₂ O (=ad dispatch volume)	13,3	
Volumen vor DNA-Zugabe	22,5	
Ziel-DNA/Zellsuspension	2,5	
Gesamt-Volumen.	25	

- 2-Schritt-PCR-Programm:

Phase	Dauer	Temperatur	
Aktivierung	2 min	94°C	} 45 Zyklen
Denaturierung	15 s	94°C	
Annealing/Extension	60 s	55°C	

13.1.4 Kultivierung von *Clostridium difficile*

I. Medien/Platten

- 1) TPGY-Medium, modifiziert („mTPGY“)
Ein Ansatz (90 mL) **TPGY-Medium** (siehe „Kultivierung von *Clostridium botulinum*“, siehe 13.1.3) werden NACH ERHITZEN mit
1 g **Taurocholsäure-Natriumsalz** (Roth) und
36 µL **C.D.M.N. – Selektivsupplement** (*Clostridium difficile* Moxalactam Norfloxacin, Oxoid, Art.-Nr. SR0173)
versetzt
- 2) **CDIF-Agar** (bioMérieux, Art.-Nr. 43871; 20 St. = 45,14 €; *Bestellung per Fax/Email*) (= ChromID-Agar)
- 3) **SCS-Agar** (bioMérieux, Art.-Nr. 43401; 20 St. = 20,42 € oder 43279; 100 St. = 98,80 €)

II. Voranreicherung

- 1) zu 90 mL TPGY-Medium werden 10 g Probe eingewogen
- 2) Sporenaktivierung: Erhitzen auf 60°C, 15 min
ODER: Doppelansatz Erhitzt/ Unerhitzt zum Nachweis von Sporen/vegetativen Zellen
- 3) nach Abkühlen (< 50°C): Zugabe von 1 g Taurocholsäure-Na-Salz und 36 µL **C.D.M.N. – Selektivsupplement**
- 4) Inkubation: 4 d, 37°C, anaerob

III. Plattierung

- 1) Ausstrich/ Ausplattierung parallel auf CDIF- und SCS-Agar
- 2) Inkubation 3-4 d, 37°C

IV. Vorbereitung für die qPCR der CDIF- und SCS-Agar-Kolonien

- 1) Für eine Untersuchung mittels qPCR wird von beiden Platten je eine volle Impföse des Bakterienrasens in je 1 mL sterilem MQ-Wasser suspendiert
- 2) Hitzedeaktivieren: 5 min, 95°C Heizblock
- 3) Einfrieren



C. difficile auf chromID™ *C. difficile* Agar (CDIF, bioMérieux, Frankreich)

V. *tpi*-qPCR

Reaktionsbedingungen eines Singleplex-qPCR-Ansatzes zum Nachweis von *C. difficile* mittels *tpi*-qPCR und 2-Schritt-qPCR-Temperaturprogramm:

Reagenz	Hersteller	Konzentration	Einheit
10x PCR-Puffer - ohne MgCl ₂	Invitrogen™, Inc., USA	1x	-
MgCl ₂	Invitrogen™, Inc., USA	6	mM
dNTPs	Thermo Fisher Scientific Inc., USA	200	μM
Primer, jeweils	biomers.net GmbH, Deutschland	600	nM
Sonde, jeweils	biomers.net GmbH, Deutschland	200	nM
Platinum-Taq-Polymerase	Invitrogen™, Inc., USA	0,75	U * (25 μL) ⁻¹

PCR-Schritt	Dauer	Temperatur	Einheit
Initiale Denaturierung	2 min	94	°C
Denaturierung	15 s	94	°C
Annealing + Extension	60 s	55	°C

Zyklusanzahl	40
--------------	----

13.2 Anhang: Durchführungsprotokolle zur DNA-Extraktion

13.2.1 DNA-Extraktion für kleine Probenvolumina (FastDNA™ SPIN Kit for Soil)

Probenvorbereitung:

1. 500 µl der Fermenterprobe in ein 2 ml PCR-sauberes Reaktionsgefäß abfüllen, Füllstand markieren
2. mit 1 ml 0,85 %iger KCl-Lösung waschen, invertieren
3. 5 min bei 16000 rcf zentrifugieren, kompletten Überstand verwerfen
4. Schritt 1-3 wiederholen, aber den Überstand nur bis zur Markierung verwerfen
5. die gewaschenen Fermenterproben mit Salmonellenzellsuspension spiken und gut mischen

DNA-Extraktion:

1. 40 µL der gespikten Fermenterprobe in ein Lysing Matrix E Gefäß überführen
2. 978 µL Sodium Phosphate Buffer hinzufügen
3. 122 µL MT Buffer hinzufügen, mischen
4. im FastPrep® Instrument für 40 sec. bei einer Geschwindigkeit von 6 m/s homogenisieren
5. bei 14000 rcf 5-10 min zentrifugieren um Fasertrümmer zu pelletieren
6. Überstand in ein sauberes 2 ml Reaktionsgefäß überführen. 250 µL PPS (Protein Precipitation Solution) hinzufügen und durch 10-maliges mischen mit der Hand durchmischen
7. bei 14000 rcf für 5 min zentrifugieren. Überstand in ein sauberes 15 ml Zentrifugengefäß überführen.
8. Resuspension der Binding Matrix, Zugabe von 1 ml zu dem Überstand im Zentrifugengefäß
9. 2 min händisch invertieren um die Bindung der DNA zu gewährleisten. Zentrifugenröhrchen für 3 min in einen Ständer stellen, damit sich die Silica-Matrix absetzen kann
10. 500 µl des Überstandes verwerfen. Rest gut resuspendieren (mit Pipette)
11. 600 µl der resuspendierten Lösung in einen SPIN™ Filter überführen und bei 14000 rcf für eine Minute zentrifugieren. Filtrat verwerfen und Schritt 11 wiederholen
12. Zugabe von 500 µl SEWS-M, dabei vorsichtig die Binding Matrix resuspendieren
13. bei 14000 rcf für 1 min zentrifugieren, Filtrat verwerfen und Schritte 12-13 wiederholen
14. ohne Zusatz irgendeiner Flüssigkeit den Filter ein zweites Mal für 2 min bei 14000 rcf zentrifugieren um die Binding Matrix zu trocknen. Auffanggefäß verwerfen und durch ein neues ersetzen
15. SPIN™ Filter 5 min bei Raumtemperatur lufttrocknen lassen
16. Binding Matrix in 100 µl DES (DNase/Pyrogen-Free Water) vorsichtig resuspendieren
17. bei 14000 rcf für 1 min zentrifugieren um die eluierte DNA in das saubere Reaktionsgefäß zu überführen, Filter verwerfen. DNA ist fertig für PCR. Probe beschriften und bei - 20 °C lagern

13.2.2 DNA-Extraktion für große Probenvolumina (FastDNA[®] 50 ml SPIN Kit for Soil)

Probenvorbereitung:

1. 10 g der Fermenterprobe in 50 ml Zentrifugenröhrchen einwiegen, Füllstand markieren
2. Mit 20 ml 0,85 %iger KCl-Lösung waschen, invertieren
3. 5 min bei maximaler rcf zentrifugieren, kompletten Überstand verwerfen
4. Schritt 1-3 wiederholen, aber den Überstand nur bis zur Markierung verwerfen

DNA-Extraktion:

1. In ein 50 ml Garnet Lysing Matrix Gefäß 15 ml Sodium Phosphate Buffer und 5 ml PLS Solution (vorher schütteln) vorlegen; die gewaschene Fermenterprobe (500 µL) zugeben und mit Salmonellenzellsuspension spiken. Schütteln und dann 10-15 sec. vortexen. 5 min bei Raumtemperatur invertieren
2. 10 min bei 3500 g zentrifugieren
3. Überstand verwerfen
4. 9,8 ml Sodium Phosphate Buffer und 1,2 ml MT-Buffer zufügen, kräftig schütteln und 10-15 sec. vortexen
5. Homogenisieren der Proben im FastPrep-24 Instrument bei 4,0 m/s für 40 sec.
6. Zentrifugieren der Proben für 5 min bei 3500 g
7. Den Überstand vorsichtig in ein sauberes 50 ml Collection Gefäß überführen.
8. 2,5 ml PPS for Soil dazu pipettieren, kräftig schütteln und 10 min bei 4°C im Kühlschrank inkubieren
9. Proben bei 3500 g 5 min zentrifugieren
10. während die Proben zentrifugieren, 10 ml der Binding Matrix Solution (vorher schütteln) in ein sauberes 50 ml SPIN Filter Tube füllen
11. Überstand in das SPIN Filter tube überführen. Vorsichtig mischen 3-5 min
12. Proben bei 3500 g für 3 min zentrifugieren. Filtrat verwerfen
13. Probe mit 10 ml GTC Wash Buffer waschen. Pellet vorsichtig resuspendieren
14. 3 min bei 3500 g zentrifugieren. Filtrat verwerfen
15. 6 ml SEWS-M solution hinzugeben. Pellet vorsichtig resuspendieren
16. 5 min bei 3500 g zentrifugieren. Filtrat verwerfen. Erneut 5 min zentrifugieren um die Proben zu trocknen
17. Filter in ein sauberes 50 ml Collection Tube geben. Elution der DNA durch Zugabe von 5 ml TES. Vorsichtig das Pellet resuspendieren
18. Proben bei 3500 g für 5 min zentrifugieren. Filter verwerfen. Extrakt bei -20°C lagern

13.3 Anhang: Accession-Nummern der Sequenz-Datensätze in Alignments

13.3.1 Alignment zum *invA*-Gene von *Salmonella* spp.

Tab. 34: Sequenz-Datensatz zur Aktualisierung des *invA*-qPCR-Nachweissystems

Accession Nummer	Organismus	ssp.	sv.	Stamm	Genlocus
DQ644632	<i>Salmonella bongori</i>			CNM-262	<i>invA</i>
DQ644633	<i>Salmonella bongori</i>			CNM-256	<i>invA</i>
FR877557	<i>Salmonella bongori</i>			NCTC_12419	<i>invA</i>
AY594273	<i>Salmonella bongori</i>			66:z41	<i>invA</i>
CP006608	<i>Salmonella bongori</i>			N268-08	<i>invA</i>
CP000880	<i>Salmonella enterica</i>	arizonae		RSK2980	Gen für Typ III-Sekretions-system-Komponente (<i>escV</i>)
DQ644622	<i>Salmonella enterica</i>	arizonae		CNM-259	<i>invA</i>
DQ644621	<i>Salmonella enterica</i>	arizonae		CNM-247	<i>invA</i>
DQ644620	<i>Salmonella enterica</i>	arizonae		CNM-771-03	<i>invA</i>
DQ644619	<i>Salmonella enterica</i>	arizonae		CNM-822-02	<i>invA</i>
AY594271	<i>Salmonella enterica</i>	arizonae		48:z4z23	<i>invA</i>
DQ644625	<i>Salmonella enterica</i>	diarizonae		CNM-2667-02	<i>invA</i>
DQ644624	<i>Salmonella enterica</i>	diarizonae		CNM-750-02	<i>invA</i>
DQ644623	<i>Salmonella enterica</i>	diarizonae		CNM-834-02	<i>invA</i>
AY594272	<i>Salmonella enterica</i>	diarizonae		18:Lv:z	<i>invA</i>
EU348365	<i>Salmonella enterica</i>	enterica		CVCC541	<i>invA</i>
EU311614	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Abony		<i>invA</i>
CP001138	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Agona	SL483	<i>invA</i>
CP006053	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Bareilly	CFSAN000189	<i>invA</i>
DQ644615	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Brandenburg	CNM-3685-03	<i>invA</i>
EU348367	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Choleraesuis	GHPS1	<i>invA</i>
AE017220	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Choleraesuis	SC-B67	<i>invA</i>
CP006055	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Cubana	CFSAN002050	<i>invA</i>
CP001144	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Dublin	CT_02021853	<i>invA</i>
AM933172	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Enteritidis	P125109	<i>invA</i>
AM933173	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Gallinarum	287/91	<i>invA</i>
EU348366	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Gallinarum	S9873	<i>invA</i>
JQ812057	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Gallinarum	WBSGPCS1	<i>invA</i>
AY956825	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Gallinarum	SGB-8	<i>invA</i>
CP003047	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Gallinarum/ pullorum	RKS5078	<i>invA</i>
CP005390	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Heidelberg	CFSAN002069	<i>invA</i>
CP004086	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Heidelberg	41578	<i>invA</i>
CP003416	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Heidelberg	B182	<i>invA</i>
CP001120	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Heidelberg	SL476	<i>invA</i>
CP004027	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Javiana	CFSAN001992	<i>invA</i>
CP001113	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Newport	SL254	<i>invA</i>
CP000857	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Paratyphi C	RKS4594	<i>invA</i>
CP000886	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Paratyphi B	SPB7	Gen für Typ III-Sekretions-system-Komponente (<i>escV</i>)
JF951187	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Paratyphi C	XT11	putativ: Sekretionsprotein-Gen (<i>invA</i>)
JF951186	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Paratyphi C	DT4	putativ: Sekretionsprotein-Gen (<i>invA</i>)
JF951189	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Paratyphi C	XY25	putativ: Sekretionsprotein-Gen (<i>invA</i>)
JF951188	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Paratyphi C	DY1	putativ: Sekretionsprotein-Gen (<i>invA</i>)

Accession Nummer	Organismus	ssp.	sv.	Stamm	Genlocus
FM200053	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Paratyphi A	AKU_12601	putativ: Sekretionsprotein-Gen (Virulenz-assoziiert)
CP000026	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Paratyphi A	ATCC_9150	<i>invA</i>
EU348368	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Pullorum	1794	<i>invA</i>
CP001127	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Schwarzen- grund	CVM19633	<i>invA</i>
EU348369	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Senftenberg	JXS-0401	<i>invA</i>
CAGQ010 00071	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Senftenberg	SS209	Contig einer Genomsequenzierung
AOXU010 00003	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Senftenberg	ATCC 8400	Contig einer Genomsequenzierung
AOYP010 00043	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Senftenberg	423984-2	Contig einer Genomsequenzierung
AY771364	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Typhi		<i>invA</i>
CP002099	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Typhi	Ty21a	<i>invA</i>
JX293343	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Typhi	SET6-HB-2012	<i>invA</i>
CP003278	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Typhi	P-stx-12	ähnlich <i>mxlA</i>
AE014613	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Typhi	Ty2	<i>invA</i>
AL513382	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Typhi	CT18	putativ: Sekretionsprotein- Gen (Virulenz-assoziiert)
CP006602	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Typhimurium	08-1736	<i>invA</i>
CP006048	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Typhimurium	CFSAN001921	<i>invA</i>
CP003836	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Typhimurium	U288	<i>invA</i>
CP002614	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Typhimurium	UK-1	<i>invA</i>
AP011957	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Typhimurium	T000240	<i>invA</i>
CP001363	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Typhimurium	14028S	<i>invA</i>
FN424405	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Typhimurium	D23580	putativ: Sekretionsprotein- Gen (Virulenz-assoziiert)
AE006468	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Typhimurium	LT2	<i>invA</i>
CP003386	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Typhimurium	798	<i>invA</i>
CP002487	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Typhimurium	ST4/74	<i>invA</i>
FQ312003	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Typhimurium	SL1344	<i>invA</i>
JN982040	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Typhimurium	J4STEHO	nicht funktionelles <i>invA</i>
JN982041	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Typhimurium	OEHST5	nicht funktionelles <i>invA</i>
KC197069	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Typhimurium	Azh2	<i>invA</i>
KC197068	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Typhimurium	Azh1	<i>invA</i>
JN680859	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Typhimurium	EHO22-TU	<i>invA</i>
JX293342	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Typhimurium	SETM1-CFS- 2012	<i>invA</i>
FR775234	<i>Salmonella enterica</i>	enterica	Weltevreden	2007-60-3289-1	<i>invA</i>
DQ644626	<i>Salmonella enterica</i>	houtenae		CNM-2556-03	<i>invA</i>
DQ644628	<i>Salmonella enterica</i>	houtenae		ST-15	<i>invA</i>
DQ644627	<i>Salmonella enterica</i>	houtenae		ST-22	<i>invA</i>
DQ644629	<i>Salmonella enterica</i>	indica		CNM-186	<i>invA</i>
DQ644631	<i>Salmonella enterica</i>	indica		CDC-1937	<i>invA</i>
DQ644630	<i>Salmonella enterica</i>	indica		CDC-811	<i>invA</i>
AY594274	<i>Salmonella enterica</i>	indica		1,4,6,25:a:enx	<i>invA</i>
JQ747540	<i>Salmonella enterica</i>	salamae	Sofia	S1635	Teil von <i>escV</i>
JQ747523	<i>Salmonella enterica</i>	salamae	Sofia	S1296	Teil von <i>escV</i>
FJ496648	<i>Salmonella enterica</i>	salamae	Sofia	Bt8	<i>invA</i>
DQ644618	<i>Salmonella enterica</i>	salamae		CNM-169	<i>invA</i>
DQ644617	<i>Salmonella enterica</i>	salamae		CNM-176	<i>invA</i>
DQ644616	<i>Salmonella enterica</i>	salamae		CNM-5936-02	<i>invA</i>
GU183866	<i>Salmonella</i> sp.				<i>invA</i>
AY593967	<i>Salmonella</i> sp.			BSCC 29	<i>invA</i>
JX682534	<i>Salmonella</i> sp.			CMCC50041	<i>invA</i>
FN545188	<i>Arsenophonus nasoniae</i>				Contig einer Genomsequenzierung

Accession Nummer	Organismus	ssp.	sv.	Stamm	Genlocus
JQ003581	<i>Candidatus Sodalis melophagi</i>			CZT	<i>invA</i>
AE016825	<i>Chromobacterium violaceum</i>			ATCC 12472	<i>invA</i>
CP001277	<i>Candidatus Hamiltonella</i>				<i>invA</i>
AY864672	<i>Escherichia coli</i>			36-5	Gen für ein Protein des Typ-III-Sekretionsapparats
FN554766	<i>Escherichia coli</i>			042	Gen für ein Protein des Typ-III-Sekretionsapparats
CU928163	<i>Escherichia coli</i>			UMN026	<i>invA</i>
EU179217	<i>Escherichia coli</i>			EC10	Teil von <i>eivA</i> (Gen für ein Protein des Typ III-Sekretionsapparats)
CP003034	<i>Escherichia coli</i>			CE10	Teil von <i>eivA</i> (Gen für ein Protein des Typ III-Sekretionsapparats)
AY029125	<i>Escherichia coli</i>				<i>mxIA</i>
AY029123	<i>Escherichia coli</i>				<i>mxIA</i>
AY029122	<i>Escherichia coli</i>				<i>mxIA</i>
AY029121	<i>Escherichia coli</i>				<i>mxIA</i>
AY029120	<i>Escherichia coli</i>				<i>mxIA</i>
AY029119	<i>Escherichia coli</i>				<i>mxIA</i>
AY029118	<i>Escherichia coli</i>				<i>mxIA</i>
AY029117	<i>Escherichia coli</i>				<i>mxIA</i>
AY029114	<i>Escherichia coli</i>				<i>mxIA</i>
AY029113	<i>Escherichia coli</i>				<i>mxIA</i>
AY029110	<i>Escherichia coli</i>				<i>mxIA</i>
AY029109	<i>Escherichia coli</i>				<i>mxIA</i>
AY029108	<i>Escherichia coli</i>				<i>mxIA</i>
AY029107	<i>Escherichia coli</i>				<i>mxIA</i>
AY029112	<i>Escherichia coli</i>				<i>mxIA</i>
CP001062	<i>Shigella boydii</i>			CDC 3083-94	<i>mxIA</i>
AY206439	<i>Shigella flexneri</i>				<i>mxIA</i>

13.3.2 Alignments zu Genen von EHEC/EPEC

Tab. 35: Accession-Nummern der im Alignment vom qPCR-System *stx1-VS1-F* (bzw. *stx1-mVS1-F*)/*stx1-VS2-R*/*stx1-VS3-S* abgedeckten *stx1*-Sequenzen (n=139)

<i>Escherichia coli</i>					
AB015056	AJ251325	AP010958	EF441577	EF441597	GQ429158
AB030485	AJ312232	AP010960	EF441578	EF441598	GQ429159
AB035142	AJ314838	AY135685	EF441579	EU273279	GQ429160
AB048231	AJ314839	AY170851	EF441580	EU700490	HM367099
AB048232	AJ537515	AY986980	EF441581	EU754735	JN578679
AB048234	AJ537516	AY986981	EF441582	EU754736	JN641288
AB048235	AJ537517	AY986982	EF441583	EU754737	JQ327853
AB048237	AJ537518	BA000007	EF441584	EU754738	JQ327854
AB050958	AJ537519	CP001925	EF441585	EU754739	JQ907524
AB050959	AJ537520	DQ449666	EF441586	EU754740	JQ907525
AB071619	AJ537521	DQ452094	EF441587	FR875150	JQ907526
AB071621	AJ537522	DQ452095	EF441588	FR875151	JX206444
AB071623	AJ537523	DQ452096	EF441589	FR875152	L04539
AB083043	AJ537524	DQ452097	EF441590	FR875153	Z36899
AB083044	AJ537525	EF079675	EF441591	FR875154	Z36900
AE005174	AJ537526	EF441572	EF441592	FR875155	Z36901
AF461166	AJ537527	EF441573	EF441593	GQ429154	
AF461168	AM230662	EF441574	EF441594	GQ429155	
AF461169	AM230663	EF441575	EF441595	GQ429156	
AF461172	AP010953	EF441576	EF441596	GQ429157	
<i>Shigella</i> spp.					
AF153317	AJ271153	EF685162	M19437	X07903	
AJ132761	CP000034	HM017965	M24352		
<i>stx1</i>-tragende Phagen					
AF034975	AJ413275	AP000400	FJ184280	M19473	
AJ279086	AJ413986	AP005153	M16625	M23980	
AJ304858	AJ556162	AY838795	M17358		

Tab. 36: Accession-Nummern der im Alignment vom qPCR-System *stx2* (*stx2_for4/stx2_rev2/stx2_rev2f/stx2_p1/stx2_p2*) abgedeckten *stx2*-Sequenzen ($n=360$)

<i>Escherichia coli</i>					
AB012101	AB741082	AJ966783	DQ231586	EU754733	GQ429163
AB012102	AB761230	AM230664	DQ231587	EU754734	GQ429164
AB015057	AE005174	AM904726	DQ231588	EU816436	GQ429165
AB017524	AF043627	AM937001	DQ231589	EU816437	GQ429166
AB030484	AF175707	AM939641	DQ231590	EU816438	GQ429167
AB035143	AF291819	AM939642	DQ235774	EU816439	GQ429168
AB046175	AF298816	AM939643	DQ235775	EU816440	GQ429169
AB048222	AF329817	AM982821	DQ449665	EU816441	GQ429170
AB048223	AF378101	AP010958	EF079674	EU816442	GQ429171
AB048224	AF461165	AP010960	EF441599	FM177471	GQ429172
AB048225	AF461167	AY095209	EF441600	FM177472	GQ919289
AB048226	AF461170	AY143336	EF441601	FM998838	GQ995452
AB048227	AF461171	AY143337	EF441602	FM998839	GU126552
AB048228	AF461173	AY286000	EF441603	FM998840	GU228505
AB048229	AF461174	AY332411	EF441604	FM998841	GU244510
AB048230	AF479828	AY368993	EF441605	FM998842	GU363957
AB048233	AF479829	AY443043	EF441606	FM998843	GU459254
AB048236	AF500187	AY443044	EF441607	FM998844	GU945538
AB048238	AF500188	AY443045	EF441608	FM998845	GU945539
AB048239	AF500189	AY443046	EF441609	FM998846	GU945540
AB048240	AF500190	AY443047	EF441610	FM998847	GU983682
AB048835	AF500191	AY443048	EF441611	FM998848	GU983683
AB048836	AF500192	AY443049	EF441612	FM998849	JQ411011
AB048837	AF500193	AY443050	EF441613	FM998850	JX206445
AB052227	AF521641	AY443051	EF441614	FM998851	KC339670
AB071845	AF524944	AY443052	EF441615	FM998852	L11078
AB119450	AF524945	AY443053	EF441616	FM998853	L11079
AB119451	AF525039	AY443054	EF441617	FM998854	M21534
AB119452	AF525040	AY443055	EF441618	FM998855	M29153
AB119453	AF525041	AY443056	EF441619	FM998856	M36727
AB119454	AJ010730	AY443057	EF441620	FM998857	M59432
AB119455	AJ270998	AY443058	EF441621	FM998858	U41235
AB119456	AJ272135	AY443059	EF441622	FM998859	U41236
AB119457	AJ313015	AY443060	EF584538	FM998860	U41237
AB119458	AJ313016	AY652745	EU086525	FM998861	U41238
AB119459	AJ543441	BA000007	EU526759	FN182284	U41239
AB119460	AJ543442	CP001164	EU526760	FN182285	U41240
AB168103	AJ543443	CP001368	EU526761	FN182286	U41241
AB168104	AJ543444	CP001925	EU526762	FN182287	U41242
AB168105	AJ543445	CP003289	EU526763	FN252457	U41243
AB168106	AJ543446	CP003297	EU526764	FN252458	U41244
AB168107	AJ543447	CP003301	EU700491	FN252459	U72191
AB168108	AJ543448	DQ059012	EU754724	FR850031	X61283
AB168110	AJ543449	DQ143180	EU754725	FR850032	X65949
AB168111	AJ567994	DQ143181	EU754726	FR851896	X81415
AB232172	AJ567995	DQ143182	EU754727	FR851897	X81416
AB252836	AJ567996	DQ143183	EU754728	FR874039	X81417
AB290936	AJ567997	DQ231582	EU754729	FR874040	X81418
AB290937	AJ567998	DQ231583	EU754730	FR874041	Z37725
AB290938	AJ567999	DQ231584	EU754731	GQ429161	
AB472687	AJ966782	DQ231585	EU754732	GQ429162	

Andere Spezies

DQ344636

Acinetobacter haemolyticus

X67514	<i>Citrobacter freundii</i>
Z50754	<i>Enterobacter cloacae</i>
DQ491342	Uncultured bacterium
DQ491343	Uncultured bacterium

stx2-tragende Phagen

AB255436	AJ298298	AY633455	AY633464	AY633473	JN193429
AF125520	AJ413274	AY633456	AY633465	AY739670	JN193431
AF548456	AJ605767	AY633457	AY633466	DQ491344	JN194203
AF548457	AP000363	AY633458	AY633467	EU311208	JQ011318
AJ249351	AP000422	AY633459	AY633468	FJ188381	X07865
AJ251231	AP004402	AY633460	AY633469	FM180578	Y10775
AJ251232	AP005154	AY633461	AY633470	HE664024	
AJ251233	AY633453	AY633462	AY633471	HQ424691	
AJ251234	AY633454	AY633463	AY633472	JN193428	

Tab. 37: Accession-Nummern der im Alignment vom qPCR-System *eae* (*eae_t_for1/eae_t_rev1/eae_t_p1/eae_t_p2*) abgedeckten *eae*-Sequenzen ($n=384$)

E. coli						
AB334558	AB647422	AB647499	AB647601	AJ303141	AY186750	FJ609813
AB334559	AB647423	AB647500	AB647602	AJ308550	AY223510	FJ609814
AB334560	AB647424	AB647501	AB647603	AJ308551	AY255520	FJ609815
AB334561	AB647425	AB647507	AB647605	AJ308552	AY520904	FJ609816
AB334562	AB647426	AB647509	AB647607	AJ633129	AY520905	FJ609818
AB334563	AB647428	AB647510	AB647610	AJ633130	BA000007	FJ609820
AB334564	AB647430	AB647512	AB647611	AJ705049	CP001164	FJ609822
AB334565	AB647431	AB647513	AB647612	AJ705050	CP001368	FJ609823
AB334566	AB647432	AB647514	AB647613	AJ705051	CP001846	FJ609828
AB334567	AB647434	AB647519	AB647615	AJ705052	CP001925	FJ609829
AB426060	AB647435	AB647520	AB647616	AJ715407	CP003109	FM180568
AB647359	AB647436	AB647522	AB647617	AJ715408	DQ486634	FM201463
AB647360	AB647437	AB647523	AB647618	AJ715409	DQ523600	FM201464
AB647362	AB647439	AB647525	AE005174	AJ715409	DQ523601	FM872416
AB647364	AB647440	AB647526	AF022236	AJ744865	DQ523602	FM872417
AB647365	AB647441	AB647527	AF025311	AJ748082	DQ523603	FM872418
AB647366	AB647443	AB647528	AF043226	AJ748082	DQ523604	FM872419
AB647369	AB647446	AB647529	AF065628	AJ748083	DQ523605	FM872420
AB647371	AB647447	AB647530	AF071034	AJ748084	DQ523606	FM872421
AB647372	AB647449	AB647531	AF081182	AJ781125	DQ523607	FM872422
AB647373	AB647454	AB647534	AF081183	AJ833637	DQ523609	FM872423
AB647374	AB647455	AB647535	AF081184	AJ833638	DQ523610	FM872424
AB647375	AB647457	AB647536	AF081185	AJ875027	DQ523611	FM872425
AB647378	AB647459	AB647538	AF081186	AJ876647	DQ523612	FM872426
AB647379	AB647460	AB647539	AF081187	AJ876648	DQ523613	FM986650
AB647380	AB647461	AB647543	AF116899	AJ876649	DQ523614	FM986651
AB647381	AB647462	AB647548	AF200363	AJ876650	EF079676	FM986652
AB647383	AB647463	AB647549	AF253560	AJ876651	EF204930	GQ338312
AB647386	AB647466	AB647550	AF253561	AJ876652	EF540939	GU944691
AB647387	AB647467	AB647551	AF301015	AJ876653	EF540940	GU944692
AB647389	AB647469	AB647552	AF319597	AJ876654	EF540941	GU944693
AB647391	AB647470	AB647553	AF339751	AJ877226	EU816360	M58154
AB647393	AB647471	AB647556	AF449414	AJ877227	EU871626	U38618
AB647394	AB647473	AB647558	AF449415	AJ877228	EU871627	U59502
AB647395	AB647474	AB647559	AF449416	AJ877229	EU871628	U59503
AB647396	AB647475	AB647561	AF449417	AJ877230	FJ609798	U59504
AB647398	AB647480	AB647562	AF449418	AJ879898	FJ609799	U60002
AB647399	AB647481	AB647569	AF449419	AJ879899	FJ609800	U66102
AB647401	AB647482	AB647573	AF449420	AJ879900	FJ609801	X60439
AB647402	AB647485	AB647578	AF453441	AM116755	FJ609802	Z11541
AB647404	AB647486	AB647582	AF479581	AM180616	FJ609803	
AB647405	AB647487	AB647584	AF530553	AM180617	FJ609804	
AB647407	AB647488	AB647586	AF530554	AM180618	FJ609805	
AB647408	AB647489	AB647589	AF530555	AM180619	FJ609806	
AB647410	AB647490	AB647592	AF530556	AM180620	FJ609807	
AB647411	AB647492	AB647593	AF530557	AM180621	FJ609808	
AB647412	AB647493	AB647595	AJ223063	AP010953	FJ609809	
AB647414	AB647496	AB647596	AJ271407	AP010958	FJ609810	
AB647415	AB647497	AB647597	AJ277443	AP010960	FJ609811	

E. coli

AB647418	AB647498	AB647598	AJ298279	AY114154	FJ609812
----------	----------	----------	----------	----------	----------

E. albertii

AB647363	AB647400	AB647574	AB647560	AB647609	FJ609821	FJ609830
AB647367	AB647406	AB647575	AB647567	AY696838	FJ609824	FJ609831
AB647368	AB647419	AB647576	AB647604	DQ523615	FJ609825	FJ609832
AB647385	AB647554	AB647577	AB647606	FJ609817	FJ609826	FJ609833
AB647397	AB647555	AB647557	AB647608	FJ609819	FJ609827	FJ609834
						FJ609835

Shigella boydii

AY696839	AY696840	AY696841	AY696842	AY696843	DQ523608
----------	----------	----------	----------	----------	----------

andere

AF311901	Citrobacter rodentium	L11691	Citrobacter freundii
----------	-----------------------	--------	----------------------

Tab. 38: Accession-Nummern der im Alignment (07.03.2013) vom qPCR-System ehly (Ehly-F/Ehly-S/Ehly-R) abgedeckten Hämolysin-Gen-Sequenzen

Erfasste Sequenzen: <i>E. coli</i> Enterohämolysin-Gene (n=104)					
AB011549	EF088504	EU118033	LM995452	LM996665	NG 041040
AB032930	EF116599	EU118034	LM995546	LM996714	X79839
AF043471	EF204919	EU118035	LM995588	LM996771	X86087
AF074613	EF204920	EU118036	LM995679	LM996828	X94129
AF401292	EF204921	EU118037	LM995727	LM996897	
AP010954	EF204922	EU118038	LM995784	LM996949	
AP010959	EF204923	EU118039	LM995800	LM996990	
AP010963	EF204924	EU118040	LM995881	LM997033	
AY258503	EF204925	EU118041	LM995922	LM997081	
CP001163	EF204926	EU118042	LM995974	LM997106	
CP001369	EF204927	FJ386569	LM996023	LM997159	
CP001926	EF204928	FJ875096	LM996057	LM997209	
CP006028	EF204929	GQ259888	LM996103	LM997302	
CP006263	EU118026	GU363949	LM996301	LM997385	
CP007135	EU118027	HM138194	LM996413	LN554907	
CP008806	EU118028	HM367097	LM996436	NG 034740	
CP008958	EU118029	KF623545	LM996482	NG 034740	
CP009105	EU118030	KM085449	LM996517	NG 035035	
CP009107	EU118031	KM085450	LM996560	NG 035035	
CP010305	EU118032	LK931563	LM996633	NG 041040	
Nicht-erfasste Sequenzen: <i>E. coli</i> Hämolysin A Gene (Alpha-Hämolysine, n=17)					
AE014075	AM261284	AM690761	CP002167	CP009072	M10133
AJ488511	AM690759	CP000243	CP002733	FM180012	M14107
AJ494981	AM690760	CP001671	CP007149	JN130365	

13.3.3 Alignments zu Genen von BoNT-produzierenden *Clostridium* spp.Tab. 39: Accession-Nummern der im Alignment vom qPCR-System CBOT A *fw/CBOT A re/CBOT A S* abgedeckten *bont/A*-Sequenzen (n=94)

Accession Nummer	Organismus	Stamm/Genlocus
AB302879	<i>Clostridium botulinum</i>	str. 7I03-H BoNT A
AB443580	<i>Clostridium botulinum</i>	Chiba-H BoNT A
AB474365	<i>Clostridium botulinum</i>	strain 56A BoNT A
AB474366	<i>Clostridium botulinum</i>	strain 62A BoNT A
AB474367	<i>Clostridium botulinum</i>	strain 97A BoNT A
AB474368	<i>Clostridium botulinum</i>	strain hallA BoNT A
AB474369	<i>Clostridium botulinum</i>	strain Renkon BoNT A
AB665554	<i>Clostridium botulinum</i>	Miyagi2006 bont/A gi377550323
AF461540	<i>Clostridium botulinum</i>	Hall A-hyper BoNT A
AF488749	<i>Clostridium botulinum</i>	Allergan-Hall A BoNT
AM412317	<i>Clostridium botulinum</i>	A str. ATCC 3502 ATCC 3502 BotA (NT-precursor)
AY166872	<i>Clostridium botulinum</i>	isolate Kumgo BoNT light chain gene
AY953275	<i>Clostridium botulinum</i>	FRI-H1A2 BoNT A2
CP000726	<i>Clostridium botulinum</i>	A str. ATCC 19397 ATCC 19397 botA bontoxilysin A
CP000727	<i>Clostridium botulinum</i>	A str. Hall rpmH botA bontoxilysin A (precursor)
CP000963	<i>Clostridium botulinum</i>	A3 str. Loch Maree botA
CP001081	<i>Clostridium botulinum</i>	Ba4 str. 657 BoNT BvA4
CP001581	<i>Clostridium botulinum</i>	A2 str. Kyoto rpmH botA
DQ185900	<i>Clostridium botulinum</i>	Loch Maree BoNT A
DQ310546	<i>Clostridium botulinum</i>	Mascarpone BoNT A
DQ409059	<i>Clostridium botulinum</i>	Hall A BoNT A
EF028391	<i>Clostridium botulinum</i>	ATCC 25763 BoNT A
EF028392	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 297 BoNT A
EF028393	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 1436 BoNT A
EF033126	<i>Clostridium botulinum</i>	str. Hall 183 BoNT A
EF470981	<i>Clostridium botulinum</i>	BoNT A
EF470982	<i>Clostridium botulinum</i>	BoNT A
EF506572	<i>Clostridium botulinum</i>	BoNT A
EF506573	<i>Clostridium botulinum</i>	BoNT A
EU341305	<i>Clostridium botulinum</i>	A1/A2 BoNT A1
EU341306	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC/A3 BoNT A3
EU341307	<i>Clostridium botulinum</i>	657Ba BoNT A4
EU416225	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC51303 BoNT A
EU416226	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC1882 BoNT A
EU416227	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC1903 BoNT A
EU429475	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC5328 BoNT A
EU679004	<i>Clostridium botulinum</i>	H04402 065 H0 4402 065 cntA BoNT A5
FJ959094	<i>Clostridium botulinum</i>	IBCA94-0216 BoNT A5
FJ968749	<i>Clostridium botulinum</i>	Af84 BoNT A2
FJ981684	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC1727 BoNT A
FJ981685	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC5277 BoNT A
FJ981686	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC5178 BoNT A
FJ981687	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC4893 BoNT A
FJ981688	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC28184 BoNT A
FJ981689	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC588 BoNT A
FJ981696	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC41370 BoNT A
FR773526	<i>Clostridium botulinum</i>	H04402 065 BoNT A5 precursor

Accession Nummer	Organismus	Stamm/Genlocus
GQ150772	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC36955 BoNT A1
GQ150773	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC36956 BoNT A1
GQ150774	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC36923 BoNT A1
GQ150775	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC36924 BoNT A1
GQ150776	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC220726 BoNT A1
GQ150777	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC220727 BoNT A1
GQ168370	<i>Clostridium botulinum</i>	62A BoNT A1
GQ168371	<i>Clostridium botulinum</i>	69A BoNT A1
GQ168372	<i>Clostridium botulinum</i>	73A BoNT A1
GQ168373	<i>Clostridium botulinum</i>	32A BoNT A1
GQ168374	<i>Clostridium botulinum</i>	BS-A BoNT A1
GQ168375	<i>Clostridium botulinum</i>	Cam2A BoNT A1
GQ168376	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 21547 BoNT A1
GQ180065	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC42961 BoNT A1
GQ180066	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC59755 BoNT A1
GQ241938	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 49127 BoNT A2
GQ241939	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC2171 BoNT A2
GQ241940	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC40234 BoNT A3
GQ241941	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 41376 BoNT A1
GQ477161	<i>Clostridium botulinum</i>	H04402 065 BoNT A5
GU184340	<i>Clostridium botulinum</i>	91 BoNT A-like
GU184341	<i>Clostridium botulinum</i>	NCTC7272 BoNT A-like
GU184342	<i>Clostridium botulinum</i>	C48 Hall BoNT A-like
GU184343	<i>Clostridium botulinum</i>	7-Wien BoNT A-like
GU184344	<i>Clostridium botulinum</i>	C144-77 BoNT A-like
GU184345	<i>Clostridium botulinum</i>	C106-CK-2A BoNT A-like
GU184346	<i>Clostridium botulinum</i>	C105-A6 BoNT A-like
GU184347	<i>Clostridium botulinum</i>	H5-Hadlok BoNT A-like
GU184348	<i>Clostridium botulinum</i>	C147-33 BoNT A-like
GU184349	<i>Clostridium botulinum</i>	C148-62 BoNT A-like
GU184350	<i>Clostridium botulinum</i>	C168-910 BoNT A-like
GU184351	<i>Clostridium botulinum</i>	REB 1750 BoNT A-like
GU184352	<i>Clostridium botulinum</i>	T1-CN 7236 BoNT A-like
GU184353	<i>Clostridium botulinum</i>	T26 5/5A BoNT A-like
GU184354	<i>Clostridium botulinum</i>	T38 1/5A NWHC BoNT A-like
GU206530	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 54076 BoNT A
GU206531	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 54079 BoNT A
GU206532	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 54084 BoNT A
GU206533	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 54091 BoNT A
GU206534	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 54093 BoNT A
GU206535	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 54096 BoNT A
HM135956	<i>Clostridium botulinum</i>	136.06 BoNT A2
HM153705	<i>Clostridium botulinum</i>	A661222 BoNT A5
M30196	<i>Clostridium botulinum</i>	BoNT
X52066	<i>Clostridium botulinum</i>	sub sp. type A NCTC2916 botA
X73423	<i>Clostridium botulinum</i>	A2 str. Kyoto Kyoto-F BoNT A
X87848	<i>Clostridium botulinum</i>	667Ab BoNT A

Tab. 40: Accession-Nummern der im Alignment vom qPCR-System
CBOT B fw/CBOT B re/CBOT B S abgedeckten bont/B-Sequenzen (n=52)

Acc. Nr.	Organismus	Stamm/Genlocus
AB665557	<i>Clostridium botulinum</i>	Ibaragi2007 BoNT B
AB084152	<i>Clostridium botulinum</i>	BoNT B
AB232927	<i>Clostridium botulinum</i>	B1 str. Okra BoNT B
AB302852	<i>Clostridium botulinum</i>	Osaka05 BoNT B
AB302854	<i>Clostridium botulinum</i>	Osaka06 BoNT B
AB665558	<i>Clostridium botulinum</i>	Okayama2011 BoNT B
AF295926	<i>Clostridium botulinum</i>	1436 BoNT B
AF300465	<i>Clostridium botulinum</i>	isolate 588 type B cryptic neurotoxin gene
AF300466	<i>Clostridium botulinum</i>	isolate 593 type B cryptic neurotoxin gene
AF300467	<i>Clostridium botulinum</i>	type B cryptic neurotoxin-like gene
AF300468	<i>Clostridium botulinum</i>	type B cryptic neurotoxin-like gene
AF300469	<i>Clostridium botulinum</i>	type B cryptic neurotoxin-like gene
CP000940	<i>Clostridium botulinum</i>	B1 str. Okra botA
CP001057*	<i>Clostridium botulinum</i>	B str. Eklund 17B botA
CP001081	<i>Clostridium botulinum</i>	Ba4 str. 657 657 CLJ 0001 BoNT Ba4
DQ417353	<i>Clostridium botulinum</i>	BoNT B
DQ417354	<i>Clostridium botulinum</i>	BoNT B
EF028394*	<i>Clostridium botulinum</i>	ATCC 17844 BoNT B
EF028395	<i>Clostridium botulinum</i>	ATCC 7949 BoNT B
EF028396	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 1656 BoNT B
EF028397	<i>Clostridium botulinum</i>	An436 BoNT B
EF028398	<i>Clostridium botulinum</i>	Smith L-590 BoNT B
EF028399	<i>Clostridium botulinum</i>	Hall 6517(B) BoNT B
EF028400	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 795 BoNT B
EF028401	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 6291 BoNT B
EF028402*	<i>Clostridium botulinum</i>	strain 10068 BoNT B
EF033127	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 1758 BoNT B
EF033128	<i>Clostridium botulinum</i>	Prevot 59 BoNT B
EF033129	<i>Clostridium botulinum</i>	Prevot 25 NCASE BoNT B
EF033130	<i>Clostridium botulinum</i>	Ba4 str. 657 BoNT B
EF051570*	<i>Clostridium botulinum</i>	B str. Eklund 17B BoNT B
EF051571	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 1828 BoNT B
EU341304*	<i>Clostridium botulinum</i>	657Ba BoNT B
FJ981690	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC28184 BoNT B
FJ981691	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC3517 BoNT B
FJ981692	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC4893 BoNT B
FJ981693	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC5178 BoNT B
FJ981694	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC5277 BoNT B
FJ981695	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC48706 BoNT B
FJ981697	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC41370 BoNT B
FM865704	<i>Clostridium botulinum</i>	B KV-39/1 botB
FM865705	<i>Clostridium botulinum</i>	B M-18/3 botB
GQ244311	<i>Clostridium botulinum</i>	115B BoNT B
GQ244312	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC22816 BoNT B
GQ244313	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC3281 BoNT B
GU271943	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 4013 BoNT B
JN120760	<i>Clostridium botulinum</i>	NCTC 3807 BoNT B
M81186	<i>Clostridium botulinum</i>	botB
X71343	<i>Clostridium botulinum</i>	B str. Eklund 17B Eklund 17B ATCC25765 BoNT B
X87849	<i>Clostridium botulinum</i>	667Ab clone pCBC1-28 BoNT B
Y13630	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 3281 (ATCC 43757) BoNT
Z11934	<i>Clostridium botulinum</i>	BoNT B

* Diese Sequenzen haben eine Diskrepanz-Stelle an Position 6 bzgl. dem 3'-Ende des Primers CBOT B fw

Tab. 41: Accession-Nummern der im Alignment von den qPCR-Systemen für *bont/C* und *bont/D* abgedeckten *bont/C* bzw. *bont/D*-Sequenzen und ihre Erfassung durch die jeweiligen Primer/Sonden

erfasst durch:		<i>bont/C alt</i>			<i>bont/C alt</i>			<i>bont/D</i>		
Primer		CBOT C fw	CBOT C re	CBOT C S	CBOT_C_fw2	CBOT_C_re3	CBOT_C_S2	CBOT D fw	CBOT D re	CBOT D S
		<i>bont/C</i>	AY738198	+	+	-	+	+	+	-
	AY677180	+	+	-	+	+	+	-	-	-
	X62389	+	+	-	+	+	+	-	-	-
	AB200359	+	+	-	+	+	+	-	-	-
	AB200358	+	+	-	+	+	+	-	-	-
	AP008983	+	+	-	+	+	+	-	-	-
	X72793	+	+	-	+	+	+	-	-	-
	X66433	+	+	-	+	+	+	-	-	-
	X53751	+	+	-	+	+	+	-	-	-
	AB061780	+	+	-	+	+	+	-	-	-
	X71126	+	+	-	+	+	+	-	-	-
	D90210	+	+	-	+	+	+	-	-	-
	AB745665	+	+	-	+	+	+	-	-	-
	AB745657	+	+	-	+	+	+	-	-	-
	AB745658	+	+	-	+	+	+	-	-	-
	AB745665	+	+	-	+	+	+	-	-	-
	AB745657	+	+	-	+	+	+	-	-	-
	AB745658	+	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>bont/CD</i>	CP002411	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	FN436022	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	FN436021	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	AB200364	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	AB200363	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	AB200362	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	AB200361	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	AB200360	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	AY251553	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	AB037166	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	D49440	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	AB745666	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	AB745667	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	AB745659	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	ABDQ0100	+	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>bont/DC</i>	AB745669	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	AB745663	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	AB745661	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	AB461921	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	AB461920	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	AB461919	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	AB461918	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	AB461917	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	AB461916	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	AB461915	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	AB461914	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	EF378947	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	AB037920	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	AB745668	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	D38442	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>bont/D</i>	X54254	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	AB012112	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	S49407	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	AB217841	-	-	-	-	-	-	+	+	+

Tab. 42: Accession-Nummern der im Alignment vom qPCR-System
CBOT E fw/CBOT E re/CBOT E S abgedeckten bont/E-Sequenzen von
C. botulinum und *C. butyricum* (n=61)

Accession Nummer	Organismus	Stamm/Genlocus
AB040123	<i>Clostridium botulinum</i>	Iwanai BoNT E
AB040124	<i>Clostridium botulinum</i>	Tenno2 BoNT E
AB040125	<i>Clostridium botulinum</i>	Biwako BoNT E
AB040126	<i>Clostridium botulinum</i>	5545 BoNT E
AB040127	<i>Clostridium botulinum</i>	35396 BoNT E
AB040128	<i>Clostridium botulinum</i>	164-1 BoNT E
AB082519	<i>Clostridium botulinum</i>	35396 BoNT E
AM695752	<i>Clostridium botulinum</i>	E strain: K35 BoNT
AM695753	<i>Clostridium botulinum</i>	E strain: K81 BoNT
AM695754	<i>Clostridium botulinum</i>	E strain: 31-2570 BoNT
AM695755	<i>Clostridium botulinum</i>	E strain: K3 BoNT
AM695756	<i>Clostridium botulinum</i>	E strain: K8 BoNT
AM695757	<i>Clostridium botulinum</i>	E strain: K14 BoNT
AM695758	<i>Clostridium botulinum</i>	E strain: K15 BoNT
AM695759	<i>Clostridium botulinum</i>	E strain: K36 BoNT
AM695760	<i>Clostridium botulinum</i>	E strain: K44 BoNT
AM695761	<i>Clostridium botulinum</i>	E strain: K51 BoNT
AM695762	<i>Clostridium botulinum</i>	E strain: K101 BoNT
AM695763	<i>Clostridium botulinum</i>	E strain: K117 BoNT
AM695764	<i>Clostridium botulinum</i>	E strain: K119 BoNT
AM695765	<i>Clostridium botulinum</i>	E strain: S16 BoNT
AM941719	<i>Clostridium botulinum</i>	E strain: CB 11/1-1 BoNT
CP001078	<i>Clostridium botulinum</i>	E3 str. Alaska E43(botA)
EF028403	<i>Clostridium botulinum</i>	Alaska E43 BoNT E
EF028404	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 5247 BoNT
EF517320*	<i>Clostridium botulinum</i>	ATCC 9564 BoNT E
EF517321*	<i>Clostridium botulinum</i>	BL 1177 BoNT E
EF517322*	<i>Clostridium botulinum</i>	BL E64 S20 St15 BoNT E
EF517323*	<i>Clostridium botulinum</i>	BL E823 BoNT E
EF517324*	<i>Clostridium botulinum</i>	CB-124E BoNT
EF517325*	<i>Clostridium botulinum</i>	CB-K27E BoNT E
EF517326*	<i>Clostridium botulinum</i>	CB-K44E BoNT E
EF517327*	<i>Clostridium botulinum</i>	CB-K58E BoNT E
EF517328*	<i>Clostridium botulinum</i>	CB-K83E BoNT E
EF517329*	<i>Clostridium botulinum</i>	CB-K114E BoNT E
EF517330*	<i>Clostridium botulinum</i>	CB-S3E BoNT E
EF517331*	<i>Clostridium botulinum</i>	CB-S4E E BoNT E
EF517332*	<i>Clostridium botulinum</i>	CB-S21E BoNT E
EF517333*	<i>Clostridium botulinum</i>	CB-S25E BoNT E
GQ244314	<i>Clostridium botulinum</i>	Beluga BoNT E
GQ247737	<i>Clostridium botulinum</i>	VH-E BoNT E
GQ294552	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 52256 BoNT E
GU455967	<i>Clostridium botulinum</i>	AIP188.09 BoNT E3
JN695729	<i>Clostridium botulinum</i>	IBCA97-0192 BoNT/E
JN695730	<i>Clostridium botulinum</i>	E134 BoNT/E
X62089	<i>Clostridium botulinum</i>	Beluga BoNT E
X62683	<i>Clostridium botulinum</i>	NCTC 11219 BoNT E
AB037704	<i>Clostridium butyricum</i>	LCL 155 (KZ 1885) BoNT E
AB037705	<i>Clostridium butyricum</i>	KZ 1899 BoNT E
AB037706	<i>Clostridium butyricum</i>	KZ 1897 BoNT E
AB037707	<i>Clostridium butyricum</i>	KZ 1898 BoNT E
AB037708	<i>Clostridium butyricum</i>	KZ 1886 BoNT E
AB037709	<i>Clostridium butyricum</i>	KZ 1887 BoNT E
AB037710	<i>Clostridium butyricum</i>	KZ 1889 BoNT E
AB037711	<i>Clostridium butyricum</i>	KZ 1890 BoNT E
AB037712	<i>Clostridium butyricum</i>	KZ 1891 BoNT E
AB037713	<i>Clostridium butyricum</i>	LCL 063 BoNT E
AB037714	<i>Clostridium butyricum</i>	LCL 095 BoNT E
AB039264	<i>Clostridium butyricum</i>	BL 6340/ATCC 43755/BL 5520/KZ 147 BoNT E
AB088207	<i>Clostridium butyricum</i>	BL 5262 BoNT E
X62088	<i>Clostridium butyricum</i>	ATCC43755 and ATCC43181 BoNT E

* Die Teil-Sequenz deckt nur den Bereich der Sonde CBOT E S und des Reverse-Primers CBOT E re ab.

Tab. 43: Accession-Nummern der im Alignment vom qPCR-System
CBOT F fw/CBOT F re/CBOT F S abgedeckten bont/F-Sequenzen von
C. botulinum und *C. baratii*(n=46)

Accession Nummer	Organismus	Stamm/Genlocus
Erfasste Sequenzen		
CP000728	<i>Clostridium botulinum</i>	F str. Langeland BoNT F
CP002011	<i>Clostridium botulinum</i>	F str. 230613 CBF 3841 BoNT F
FJ968748	<i>Clostridium botulinum</i>	strain Af84 BoNT F
GU21320	<i>Clostridium botulinum</i>	4VII BoNT F
GU213203	<i>Clostridium botulinum</i>	F str. Langeland BoNT F
GU213204	<i>Clostridium botulinum</i>	12F BoNT F
GU213205	<i>Clostridium botulinum</i>	4VI BoNT F
GU213207	<i>Clostridium botulinum</i>	8g BoNT F
GU213208	<i>Clostridium botulinum</i>	Pasteurized Crab BoNT F
GU213210	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 49930 BoNT F
GU213213	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 54076 BoNT F
GU213214	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 54078 BoNT F
GU213219	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 54087 BoNT F
GU213220	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 54088 BoNT F
GU213221	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 54089 BoNT F
GU213223	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 54091 BoNT F
GU213224	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 54093 BoNT F
GU213226	<i>Clostridium botulinum</i>	VPI 2382 BoNT F
GU213228	<i>Clostridium botulinum</i>	VPI 7943 BoNT F
GU213229	<i>Clostridium botulinum</i>	strain 83F BoNT F
GU213230	<i>Clostridium botulinum</i>	KA-173 BoNT F
HQ441176	<i>Clostridium botulinum</i>	IBCA66-5436 BoNT F6
L35496	<i>Clostridium botulinum</i>	BoNT F
M92906	<i>Clostridium botulinum</i>	strain 202F BoNT F
X81714	<i>Clostridium botulinum</i>	NCTC 10281 BoNT F
Nicht erfasste Sequenzen		
GU213206	<i>Clostridium botulinum</i>	4VII BoNT F
GU213209	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 4013 BoNT F
GU213211	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 54074 BoNT F
GU213212	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 54075 BoNT F
GU213215	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 54079 BoNT F
GU213216	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 54084 BoNT F
GU213217	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 54085 BoNT F
GU213218	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 54086 BoNT F
GU213222	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 54090 BoNT F
GU213225	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 54096 BoNT f
GU213227	<i>Clostridium botulinum</i>	strain VPI 4257 BoNT F
S76749	<i>Clostridium botulinum</i>	strain Langeland BoNT F
Y13631	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 3281 (ATCC 43757) BoNT
GU213231	<i>Clostridium baratii</i>	CDC 59837 BoNT F
GU213232	<i>Clostridium baratii</i>	CDC 51192 BoNT F
GU213233	<i>Clostridium baratii</i>	CDC 35112 BoNT F
GU213234	<i>Clostridium baratii</i>	CDC 32356 BoNT F
GU213235	<i>Clostridium baratii</i>	CDC 51267 BoNT F
HM746655	<i>Clostridium baratii</i>	strain Orange BoNT F
HM746656	<i>Clostridium baratii</i>	strain Sullivan BoNT F
X68262	<i>Clostridium baratii</i>	BoNT F

Tab. 44: Accession-Nummern der im Alignment von den *ntnh*-Primer-/Sondensystemen nach Raphael und Andreadis (2007) und *ntnH-9a-F/ntnH-2c-R/ntnH-2d-S* (selbst entwickelt) abgedeckten *ntnh*-Sequenzen von *C. botulinum*, *C. baratii* und *C. butyricum* (n=88)

Accession Nummer	Organismus	Stamm/Genlocus
AB012112	<i>Clostridium botulinum</i>	D phage gene for <i>ntnh</i>
AB037166	<i>Clostridium botulinum</i>	<i>ntnh/A</i>
AB037920	<i>Clostridium botulinum</i>	<i>ntnh/A</i>
AB061780	<i>Clostridium botulinum</i>	<i>ntnh/A</i>
AB232927	<i>Clostridium botulinum</i>	B type B progenitor <i>ntnh</i>
AB302852	<i>Clostridium botulinum</i>	<i>ntnh bont/B</i> genes
AB302853	<i>Clostridium botulinum</i>	<i>ntnh</i>
AB745665	<i>Clostridium botulinum</i>	<i>ntnh bont/C</i> genes
AB745666	<i>Clostridium botulinum</i>	<i>ntnh bont/CD</i> genes
AB745667	<i>Clostridium botulinum</i>	<i>ntnh bont/CD</i> genes
AB745668	<i>Clostridium botulinum</i>	<i>ntnh bont/DC</i> genes
AB745669	<i>Clostridium botulinum</i>	<i>ntnh bont/DC</i> genes
AB855771	<i>Clostridium botulinum</i>	plasmid pCB111 DNA
AF461540	<i>Clostridium botulinum</i>	strain Hall A-hyper <i>ntnh</i>
AF488748	<i>Clostridium botulinum</i>	Allergan-Hall A <i>ntnh</i>
AM412317	<i>Clostridium botulinum</i>	A str. ATCC 3502 <i>ntnh</i>
AM695752	<i>Clostridium botulinum</i>	E ORF _{x3} (partial) <i>ntnh</i>
AM695753	<i>Clostridium botulinum</i>	E ORF _{x3} (partial) <i>ntnh</i>
AM695754	<i>Clostridium botulinum</i>	E ORF _{x3} (partial) <i>ntnh</i>
AM941719	<i>Clostridium botulinum</i>	E neurotoxin gene strain CB 11/1-1 <i>ntnH</i>
AP014517	<i>Clostridium botulinum</i>	B str. Osaka05 DNA
CP000726	<i>Clostridium botulinum</i>	A str. ATCC 19397 <i>ntnh</i>
CP000727	<i>Clostridium botulinum</i>	A str. Hall <i>ntnH</i>
CP000728	<i>Clostridium botulinum</i>	F str. Langeland <i>ntnh</i>
CP000940	<i>Clostridium botulinum</i>	B1 str. Okra plasmid pCLD <i>ntnh</i>
CP000963	<i>Clostridium botulinum</i>	A3 str. Loch Maree plasmid pCLK <i>ntnh</i>
CP001057	<i>Clostridium botulinum</i>	B str. Eklund 17B plasmid pCLL <i>ntnh</i>
CP001078	<i>Clostridium botulinum</i>	E3 str. Alaska E43 <i>ntnh</i>
CP001081	<i>Clostridium botulinum</i>	Ba4 str. 657 <i>ntnh</i> 1 zu BoNT/bvA4 plasmid pCLJ
CP001081	<i>Clostridium botulinum</i>	Ba4 str. 657 <i>ntnh</i> 2 zu BoNT/bvB plasmid pCLJ
CP001581	<i>Clostridium botulinum</i>	A2 str. Kyoto <i>ntnh</i>
CP002011	<i>Clostridium botulinum</i>	F str. 230613 <i>ntnH</i>
CP002411	<i>Clostridium botulinum</i>	BKT015925 plasmid <i>ntnH</i>
D12697	<i>Clostridium botulinum</i>	<i>ntnh</i>
D67030	<i>Clostridium botulinum</i>	<i>ntnh</i>
D84289	<i>Clostridium botulinum</i>	<i>ntnh</i> gene
DQ310546	<i>Clostridium botulinum</i>	strain Mascarpone boNT/A gene cluster <i>ntnh</i>
DQ409059	<i>Clostridium botulinum</i>	HA70 (ha70) HA17 (h)
EU341304	<i>Clostridium botulinum</i>	strain 657Ba boNT/B
EU341305	<i>Clostridium botulinum</i>	strain A1/A2 boNT/A
EU341306	<i>Clostridium botulinum</i>	strain CDC/A3 boNT/A3
EU341307	<i>Clostridium botulinum</i>	strain 657Ba boNT/A
FJ959094	<i>Clostridium botulinum</i>	strain IBCA94-0216 NT gene cluster
FJ981696	<i>Clostridium botulinum</i>	strain CDC41370 Bont/A <i>ntnh</i>
FJ981697	<i>Clostridium botulinum</i>	strain CDC41370 Bont/B <i>ntnh</i>
FR745876	<i>Clostridium botulinum</i>	B str. Eklund 17B
FR773526	<i>Clostridium botulinum</i>	H04402 065 <i>ntnH</i>
GQ477161	<i>Clostridium botulinum</i>	strain H04402 065

GU221927	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 54079 ntnH/A
GU221928	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 54079 ntnH/F
GU221929	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 54085 ntnH/F
GU299674	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 54096 ntnH/A
GU299675	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 54096 ntnH/F
GU299676	<i>Clostridium botulinum</i>	CDC 54090 NTNH/F
HM153705	<i>Clostridium botulinum</i>	strain A661222 BoNT ntnh
HQ441176	<i>Clostridium botulinum</i>	strain IBCA66-5436 ntnh
JQ964807	<i>Clostridium botulinum</i>	strain Maehongson 2 ntnh
KC516868	<i>Clostridium botulinum</i>	strain IFR 06/001 NT gene cluster
KC516869	<i>Clostridium botulinum</i>	strain IFR 06/005 NT gene cluster
KC516870	<i>Clostridium botulinum</i>	strain Craig610 NT gene cluster
KC516871	<i>Clostridium botulinum</i>	strain Eklund202F NT gene cluster
KC516872	<i>Clostridium botulinum</i>	strain HobbsFT10 NT gene cluster
KC951107	<i>Clostridium botulinum</i>	strain Surat Thani 2012
KM017078	<i>Clostridium botulinum</i>	bont/A ntnh
L42537	<i>Clostridium botulinum</i>	ntnh/A gene
S73676	<i>Clostridium botulinum</i>	ntnh gene
S80809	<i>Clostridium botulinum</i>	progenitor toxin L ntnh
U63808	<i>Clostridium botulinum</i>	ntnh/B gene
X66433	<i>Clostridium botulinum</i>	phage 1C Chn-138
X71086	<i>Clostridium botulinum</i>	ntnh gene for neurotoxin type F
X72793	<i>Clostridium botulinum</i>	C phage ANTP-139
X78229	<i>Clostridium botulinum</i>	on-proteolytic EKLUN
X78230	<i>Clostridium botulinum</i>	ype B (NCTC 7273) nt
X87848	<i>Clostridium botulinum</i>	NTNH gene BoNT/A gene upstream
X87849	<i>Clostridium botulinum</i>	NTNH gene BoNT/B gene clone pCB
X87972	<i>Clostridium botulinum</i>	ntnh
X87974	<i>Clostridium botulinum</i>	bont (partial) and ntnh genes
X92973	<i>Clostridium botulinum</i>	62A ntnH
X99064	<i>Clostridium botulinum</i>	ntnh boNT/F genes ntnH
Y13630	<i>Clostridium botulinum</i>	ntnh
Y13631	<i>Clostridium botulinum</i>	ntnh gene
Y14238	<i>Clostridium botulinum</i>	ntnh gene
Y14239	<i>Clostridium botulinum</i>	ntnh, bont/B gene
JX847735	<i>Clostridium baratii</i>	strain IBCA03-0045 type F7 botulinum toxin gene cluster
Y12091	<i>Clostridium baratii</i>	ntnh bonT genes
D12739	<i>Clostridium butyricum</i>	ntnh
AP008983	<i>Clostridium</i> phage	c-st genomic DNA complete
X62389	Botulinum bacteriophage	genes for HA-17 HA-

13.3.4 Alignment des *tpi*-Gens von *Clostridium difficile*

Tab. 45: Accession-Nummern der im Alignment von den *tpi*-Primer-/Sondensystemen (CDIF_tpi_fw/CDIF_tpi_re/CDIF_tpi_S) abgedeckten *tpi*-Sequenzen von *C. difficile* (grau), anderen *Clostridium* spp. und weiteren Spezies (n=163)

Accession Nummer	Organismus	Accession Nummer	Organismus
AM180355	<i>Clostridium difficile</i>	HQ123269	<i>Clostridium chauvoei</i>
FN538970	<i>Clostridium difficile</i>	HQ123268	<i>Clostridium chauvoei</i>
FN545816	<i>Clostridium difficile</i>	HQ123264	<i>Clostridium chauvoei</i>
FN665654	<i>Clostridium difficile</i>	HQ123263	<i>Clostridium chauvoei</i>
FN665652	<i>Clostridium difficile</i>	CP004121	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>
FN665653	<i>Clostridium difficile</i>	DQ911305	<i>Clostridium botulinum</i>
FN668375	<i>Clostridium difficile</i>	CP002011	<i>Clostridium botulinum</i>
FN668941	<i>Clostridium difficile</i>	CP001581	<i>Clostridium botulinum</i>
FN668944	<i>Clostridium difficile</i>	CP000728	<i>Clostridium botulinum</i>
AY700149	<i>Clostridium difficile</i>	CP000939	<i>Clostridium botulinum</i>
AY533286	<i>Clostridium difficile</i>	FR773526	<i>Clostridium botulinum</i>
AY533289	<i>Clostridium difficile</i>	CP000962	<i>Clostridium botulinum</i>
AY533287	<i>Clostridium difficile</i>	CP000727	<i>Clostridium botulinum</i>
AY533291	<i>Clostridium difficile</i>	CP000726	<i>Clostridium botulinum</i>
AY533292	<i>Clostridium difficile</i>	AM412317	<i>Clostridium botulinum</i>
AY533290	<i>Clostridium difficile</i>	CP001056	<i>Clostridium botulinum</i>
AY533288	<i>Clostridium difficile</i>	CP001083	<i>Clostridium botulinum</i>
KJ676594	<i>Peptoclostridium difficile</i>	CP000312	<i>Clostridium perfringens</i>
KJ676593	<i>Peptoclostridium difficile</i>	EU605781	<i>Clostridium perfringens</i>
KJ676592	<i>Peptoclostridium difficile</i>	EU605780	<i>Clostridium perfringens</i>
KJ676590	<i>Peptoclostridium difficile</i>	EU605775	<i>Clostridium perfringens</i>
KJ676589	<i>Peptoclostridium difficile</i>	EU605774	<i>Clostridium perfringens</i>
CP003259	<i>Clostridium</i> sp.	BA000016	<i>Clostridium perfringens</i>
AY700154	<i>Clostridium sordellii</i>	FP565809	<i>Clostridium sticklandii</i>
AY700153	<i>Clostridium bifermentans</i>	DQ911306	<i>Clostridium sporogenes</i>
HQ123317	<i>Clostridium sordellii</i>	AY700151	<i>Clostridium sporogenes</i>
GQ470991	<i>Tissierella</i> sp.	DQ911301	<i>Clostridium subterminale</i>
GQ470968	<i>Sporanaerobacter acetigenes</i>	EU622488	<i>Clostridium septicum</i>
DQ911309	<i>Clostridium tetanomorphum</i>	FJ213388	<i>Clostridium septicum</i>
DQ911310	<i>Clostridium tetanomorphum</i>	FJ213389	<i>Clostridium septicum</i>
DQ911302	<i>Clostridium oceanicum</i>	FJ213318	<i>Clostridium septicum</i>
DQ911303	<i>Clostridium oceanicum</i>	FJ213319	<i>Clostridium septicum</i>
HQ123310	<i>Clostridium botulinum</i>	HM624669	<i>Clostridium perfringens</i>
HQ123309	<i>Clostridium botulinum</i>	HM624671	<i>Clostridium perfringens</i>
GQ470989	<i>Tissierella</i> sp.	HM624646	<i>Clostridium perfringens</i>
DQ911344	<i>Tissierella praeacuta</i>	HM624648	<i>Clostridium perfringens</i>
AY700156	<i>Clostridium cadaveris</i>	HM624650	<i>Clostridium perfringens</i>
AY700157	<i>Clostridium tertium</i>	HM624644	<i>Clostridium perfringens</i>
DQ911329	<i>Clostridium</i> sp.	HM624645	<i>Clostridium perfringens</i>
DQ911332	<i>Clostridium</i> sp.	AY700146	<i>Clostridium perfringens</i>
DQ911307	<i>Clostridium sporogenes</i>	HQ123314	<i>Clostridium tertium</i>
DQ911304	<i>Clostridium botulinum</i>	HQ123290	<i>Clostridium septicum</i>
HQ123311	<i>Clostridium carnis</i>	HQ123301	<i>Clostridium septicum</i>
GQ470975	<i>Tissierella praeacuta</i>	HQ123299	<i>Clostridium septicum</i>
DQ911327	<i>Tissierella praeacuta</i>	HQ123297	<i>Clostridium septicum</i>
HQ123307	<i>Clostridium botulinum</i>	HQ123295	<i>Clostridium septicum</i>

Accession Nummer	Organismus	Accession Nummer	Organismus
HQ258963	<i>Tissierella creatinophila</i>	HQ123287	<i>Clostridium septicum</i>
DQ911299	<i>Clostridium estertheticum</i>	HQ123296	<i>Clostridium septicum</i>
DQ911298	<i>Clostridium estertheticum</i>	HQ123294	<i>Clostridium septicum</i>
DQ911318	<i>Clostridium scatologenes</i>	HQ123293	<i>Clostridium septicum</i>
HM624737	<i>Clostridium perfringens</i>	HQ123289	<i>Clostridium septicum</i>
HM624738	<i>Clostridium perfringens</i>	HQ123288	<i>Clostridium septicum</i>
HM624655	<i>Clostridium perfringens</i>	AY700155	<i>Clostridium septicum</i>
HM624657	<i>Clostridium perfringens</i>	GQ470987	<i>Tissierella sp.</i>
EU605782	<i>Clostridium perfringens</i>	GQ470986	<i>Tissierella sp.</i>
EU605779	<i>Clostridium perfringens</i>	GQ470988	<i>Tissierella sp.</i>
EU605778	<i>Clostridium perfringens</i>	GQ470990	<i>Tissierella sp.</i>
EU605777	<i>Clostridium perfringens</i>	GQ470971	<i>Clostridium ultunense</i>
EU605776	<i>Clostridium perfringens</i>	HQ123308	<i>Clostridium botulinum</i>
HQ123313	<i>Clostridium perfringens</i>	DQ911317	<i>Clostridium magnum</i>
HM624752	<i>Clostridium perfringens</i>	DQ911345	<i>Tissierella praeacuta</i>
GQ470982	<i>Tissierella praeacuta</i>	DQ911336	<i>Tissierella praeacuta</i>
GQ470978	<i>Tissierella praeacuta</i>	DQ911337	<i>Tissierella praeacuta</i>
GQ470980	<i>Tissierella praeacuta</i>	DQ911300	<i>Clostridium subterminale</i>
GQ470977	<i>Tissierella praeacuta</i>	DQ911315	<i>Clostridium tetani</i>
GQ470976	<i>Tissierella praeacuta</i>	DQ911312	<i>Clostridium malenominatum</i>
GQ470973	<i>Tissierella praeacuta</i>	DQ911311	<i>Clostridium malenominatum</i>
GQ470974	<i>Tissierella praeacuta</i>	DQ911322	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>
DQ911326	<i>Clostridium sp.</i>	DQ911320	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>
HQ123302	<i>Clostridium septicum</i>	DQ911321	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>
GQ470969	<i>Soehngenia saccharolytica</i>	DQ911323	<i>Clostridium ljungdahlii</i>
AC243111	<i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>	DQ911316	<i>Clostridium pasteurianum</i>
CP003326	<i>Clostridium acidurici</i>	HQ123316	<i>Clostridium fallax</i>
CP002739	<i>Thermoanaerobacterium xylanolyticum</i>	HQ123312	<i>Clostridium haemolyticum</i>
CP003066	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	HQ123315	<i>Clostridium spiroforme</i>
CP002171	<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	M87647	<i>Bacillus megaterium</i>
AY700150	<i>Clostridium butyricum</i>	M87648	<i>Bacillus megaterium</i>
HQ123277	<i>Clostridium chauvoei</i>	AF043386	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
HQ123275	<i>Clostridium chauvoei</i>	GQ470970	<i>Tepidimicrobium ferriphilum</i>
HQ123273	<i>Clostridium chauvoei</i>	AY700147	<i>Clostridium ramosum</i>
HQ123272	<i>Clostridium chauvoei</i>	AJ567908	<i>Lactobacillus plantarum</i>
HQ123270	<i>Clostridium chauvoei</i>		

13.3.5 Alignment des *plc*-Gens von *Clostridium perfringens*

Tab. 46: Accession-Nummern der im Alignment von den *plc*-Primer-/Sondensystemen (*Cp_plc_840-f/Cp_plc_889-r/Cp_plc_861_S2*) abgedeckten *plc*-Sequenzen von *C. perfringens* anderen *Clostridium* spp. (n=455, Stand: Juli 2013, grau: bereits im Alignment vom Sept. 2001 enthaltene Sequenzen)

<i>Clostridium perfringens</i> (n=427)					
AF204209	DQ183977	DQ184049	DQ184121	EU839787	FR688005
AM888379	DQ183978	DQ184050	DQ184122	EU839788	FR688006
AM888380	DQ183979	DQ184051	DQ184123	EU839789	FR688007
AM888381	DQ183980	DQ184052	DQ184124	EU839790	FR688008
AM888382	DQ183981	DQ184053	DQ184125	EU839791	FR688009
AM888383	DQ183982	DQ184054	DQ184126	EU839792	FR688010
AM888384	DQ183983	DQ184055	DQ184127	EU839793	FR688011
AM888385	DQ183984	DQ184056	DQ184128	EU839794	HQ332225
AM888386	DQ183985	DQ184057	DQ184129	EU839795	HQ332226
AM888387	DQ183986	DQ184058	DQ184130	EU839796	HQ332227
AM888388	DQ183987	DQ184059	DQ184131	EU839797	HQ585981
AY277724	DQ183988	DQ184060	DQ184132	EU839798	JF298801
AY823400	DQ183989	DQ184061	DQ184133	EU839799	JF298802
BA000016	DQ183990	DQ184062	DQ184134	EU839800	JF298803
CP000246	DQ183991	DQ184063	DQ184135	EU839801	JN793988
CP000312	DQ183992	DQ184064	DQ184136	EU839802	JQ071535
D10248	DQ183993	DQ184065	DQ184137	EU839803	JQ071536
D32123	DQ183994	DQ184066	DQ184138	EU839804	JQ071537
D32124	DQ183995	DQ184067	DQ184139	EU839805	JQ071538
D32126	DQ183996	DQ184068	DQ184140	EU839806	JQ071539
D32127	DQ183997	DQ184069	DQ184141	EU839807	JQ071540
D32128	DQ183998	DQ184070	DQ184142	EU839808	JQ071541
D49968	DQ183999	DQ184071	DQ184143	EU839809	JQ071542
D49969	DQ184000	DQ184072	DQ184144	EU839810	JQ071543
D63911	DQ184001	DQ184073	DQ184145	EU839811	JQ071544
DQ183930	DQ184002	DQ184074	DQ184146	EU839812	JQ071545
DQ183931	DQ184003	DQ184075	DQ184147	EU839813	JQ071546
DQ183932	DQ184004	DQ184076	DQ184148	EU839814	JQ071547
DQ183933	DQ184005	DQ184077	DQ184149	EU839815	JQ071548
DQ183934	DQ184006	DQ184078	DQ184150	EU839816	JQ071549
DQ183935	DQ184007	DQ184079	DQ184151	EU839817	JQ071550
DQ183936	DQ184008	DQ184080	DQ184152	EU839818	JQ071551
DQ183937	DQ184009	DQ184081	DQ184153	EU839819	JQ071552
DQ183938	DQ184010	DQ184082	DQ184154	EU839820	JQ071553
DQ183939	DQ184011	DQ184083	DQ184155	EU839821	JQ071554
DQ183940	DQ184012	DQ184084	DQ184156	EU839822	JQ071555
DQ183941	DQ184013	DQ184085	DQ184157	EU839823	JQ071556
DQ183942	DQ184014	DQ184086	DQ184158	EU839824	JQ071557
DQ183943	DQ184015	DQ184087	DQ184159	EU839825	JQ071558
DQ183944	DQ184016	DQ184088	DQ184160	EU839826	JQ071559
DQ183945	DQ184017	DQ184089	DQ184161	EU839827	JQ071560
DQ183946	DQ184018	DQ184090	DQ184162	EU839828	JQ071561
DQ183947	DQ184019	DQ184091	DQ184163	EU839829	JQ071562
DQ183948	DQ184020	DQ184092	DQ184164	EU839830	JQ071563
DQ183949	DQ184021	DQ184093	DQ184165	EU839831	JQ071564
DQ183950	DQ184022	DQ184094	DQ184166	EU839832	JQ071565
DQ183951	DQ184023	DQ184095	DQ184167	EU839833	JQ071566
DQ183952	DQ184024	DQ184096	DQ184168	EU839834	JQ071567
DQ183953	DQ184025	DQ184097	DQ184169	EU839835	JQ071568
DQ183954	DQ184026	DQ184098	DQ184170	FJ655567	JQ071569
DQ183955	DQ184027	DQ184099	DQ184171	FJ655568	JQ071570

<i>Clostridium perfringens</i> (n=427)					
DQ183956	DQ184028	DQ184100	DQ184172	FJ655569	JQ071571
DQ183957	DQ184029	DQ184101	DQ184173	FJ655570	JQ071572
DQ183958	DQ184030	DQ184102	DQ184174	FJ655571	JQ071573
DQ183959	DQ184031	DQ184103	DQ184175	FJ655572	JQ071574
DQ183960	DQ184032	DQ184104	DQ184176	FJ655573	JQ071575
DQ183961	DQ184033	DQ184105	DQ202275	FJ655574	JQ071576
DQ183962	DQ184034	DQ184106	DQ202276	FJ655575	JQ071577
DQ183963	DQ184035	DQ184107	EU605734	FJ655576	JX262930
DQ183964	DQ184036	DQ184108	EU605735	FJ655577	L43545
DQ183965	DQ184037	DQ184109	EU605736	FJ655578	L43546
DQ183966	DQ184038	DQ184110	EU605737	FJ655579	L43547
DQ183967	DQ184039	DQ184111	EU605738	FJ655580	L43548
DQ183968	DQ184040	DQ184112	EU605739	FR687996	M24904
DQ183969	DQ184041	DQ184113	EU839779	FR687997	NC 003366
DQ183970	DQ184042	DQ184114	EU839780	FR687998	X13608
DQ183971	DQ184043	DQ184115	EU839781	FR687999	X17300
DQ183972	DQ184044	DQ184116	EU839782	FR688000	
DQ183973	DQ184045	DQ184117	EU839783	FR688001	
DQ183974	DQ184046	DQ184118	EU839784	FR688002	
DQ183975	DQ184047	DQ184119	EU839785	FR688003	
DQ183976	DQ184048	DQ184120	EU839786	FR688004	
andere <i>Clostridium</i> spp. (n=20)					
AB061868	AB699604	AB699608	AB699612	CP000382	
AB061869	AB699605	AB699609	AF072123	CP002410	
AB162962	AB699606	AB699610	AF525415	CP002413	
AB699603	AB699607	AB699611	AY159815	D32125	

13.4 Anhang: Veröffentlichungen und Ausbildung im Rahmen dieses Projekts

13.4.1 Studien-, Bachelor- und Master-Arbeiten sowie Dissertationen

13.4.1.1 Dissertation Gabriela Garcés-Sanchez

Gabriela Garcés-Sanchez (2013): Quantification of *Cryptosporidium parvum* and enteroviruses by quantitative Real-Time PCR (qPCR) in environmental samples - Methodological developments for monitoring anaerobic systems.

Dissertation an der Technischen Universität München, pp. 175, <https://mediatum.ub.tum.de/doc/1115672/1115672.pdf>. Betreuung: Prof. J.C. Munch (TUM), Prof. H. Horn (TUM), Dr. M. Lebuhn (LfL-AQU)

13.4.1.2 Studienarbeit/Praktikum Isabella Kinker (1)

Isabella Kinker (2013): Bestimmung der DNA-Extraktionseffizienz zweier DNA-Extraktionskits.

Studienarbeit an der Hochschule Weihenstephan-Triesdorf. Betreuung: B. Fröschle, Dr. M. Lebuhn (LfL-AQU)

13.4.1.3 Studienarbeit Isabella Kinker (2)

Isabella Kinker (2014): Inaktivierung von pathogenen Keimen im thermophilen Biogasprozess.

Studienarbeit an der Hochschule Weihenstephan-Triesdorf. Betreuung: B. Fröschle, Dr. M. Lebuhn (LfL-AQU)

13.4.2 Veröffentlichungen und Poster

13.4.2.1 Veröffentlichung G. Garcés-Sanchez et al. (2013)

Garcés-Sanchez, G., Wilderer, P.A., Horn, H., Munch, J.C. and Lebuhn, M. (2013): Assessment of the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts with the induction ratio of hsp70 mRNA production in manure. *J. Microbiol. Meth.* 94, 280-289; DOI:10.1016/j.mimet.2013.05.011.

Abstract: Determining the presence of viable *Cryptosporidium parvum* oocysts in complex environmental matrices in hygiene control can prevent the contamination of water resources and food with this pathogen. This study assessed the induction ratio of hsp70 mRNA production by heat shock in different oocysts as a marker of viability. Using different procedures for (m)RNA extraction directly from manure and reverse transcription real-time qPCR, this study found slightly increased hsp70 mRNA contents in viable oocysts that were heat shock induced at 45 °C for 20 min compared to not induced oocysts (1.6 fold induction in average). Prolonging the heat shock treatment to 2 h did not further increase the copy numbers. Heat shock by consecutive stimuli, such as freezing and then heating, did not yield significantly higher copy numbers than the 45 °C treatment. There was a certain background level of hsp70 mRNA in viable oocysts that were not exposed to heat shock, indicating a constitutive production of the transcripts in the oocysts. The production of hsp70 mRNA induced by heat shock in oocysts aged for 9 months that exhibited reduced viability was lower than in fresher oocysts (induction ratio < 1.2). No production of hsp70 mRNA by heat shock was detected in 12 months old

oocysts that were not viable in the excystation test. Oocysts inactivated at 75 °C for 30 min were not able to respond to heat shock, and low amount of copies were occasionally measured only in total RNA extracts, but not in mRNA extracts that were purified directly with an oligo (dT)₂₅ based system. The induction ratio of hsp70 mRNA varied according to the viability of the organisms in a sample. Copy numbers of β -tubulin mRNA in viable oocysts were lower than hsp70 mRNA, therefore the latter is more suitable to detect low numbers of oocysts by RT-qPCR.

13.4.2.2 Buchbeitrag B. Fröschle et al. (2015)

Fröschle, B., Heiermann, M., Lebuhn, M., Messelhäusser, U. and Plöchl, M. (2015): Hygiene and Sanitation in Biogas Plants. In: Biogas Science and Technology, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 151, 63-99. Springer.

Abstract: The increasing number of agricultural biogas plants and higher amounts of digestate spread on agricultural land arouse a considerable interest in the hygiene situation of digested products. This chapter reviews the current knowledge on sanitation during anaerobic digestion and the hygienic status of digestate concerning a multitude of pathogens potentially compromising the health of humans, animals and plants. Physical, chemical and biological parameters influencing the efficiency of sanitation in anaerobic digestion are considered. The degree of germ reduction depends particularly on the resistance of the pathogen of concern, the processing conditions, the feedstock composition and the diligence of the operation management. Most scientific studies facing sanitation in biogas plants have provided data ascertaining reduction of pathogens by the biogas process. Some pathogens, however, are able to persist virtually unaffected due to the ability to build resistant permanent forms. As compared to the feedstock, the sanitary status of the digestate is thus improved or in the worst case, the sanitary quality remains almost unchanged. According to this, the spreading of digestate on agricultural area in accordance to current rules and best practice recommendations is considered to impose no additional risk for the health of humans, animals and plants.

13.4.2.3 Manuskript zur Posterpräsentation auf der internationalen Konferenz „Biogas Science 2014“, Wien (B. Fröschle et al., 2014)

Fast quantification of viable EHEC/EPEC involving qPCR methodology

Bianca Fröschle, Isabella Kinker and Michael Lebuhn

Bavarian State Research Center for Agriculture, Department for Quality Assurance and Analytics, Lange Point 6, 85354 Freising, Germany.

Introduction

Although DNA targeted biomolecular methods such as quantitative real-time PCR (qPCR) are highly specific, sensitive and time saving, they can confer problems if only viable organisms are of interest. If regulatory requirements demand the absence of certain pathogenic germs in biological material, only the presence of DNA of viable germs is relevant, whereas the detection of DNA of dead germs can overestimate this fraction. We developed a fast method to differentiate between qPCR signals caused by DNA of viable and nonviable EHEC/EPEC and to quantify the viable fraction.

Materials and Methods

An exponentially growing EPEC strain LGL 38122 (*stx*-, *eae*+, *ehly*+) was diluted in biogas digester content, poured into sentinel chambers and exposed to the conditions in laboratory biogas digesters fed with renewable resources. After exposure, the sentinel

chamber contents were enriched by cultivation on the basis of LFGB method L07.18. This method includes a pre-enrichment step in modified Tryptic Soy Broth with Novobiocin (mTSB+N) followed by an enrichment step (inoculation of 4 volumes of mTSB with 1 volume of pre-enrichment culture). The enrichment culture was streaked on Endoagar. Cultivation was performed in log dilutions and in triplicate allowing quantification by MPN analysis. qPCR analyses were done before and after pre-enrichment and enrichment steps as well as with colonies from agar suspended in sterile water. Strain LGL 38122 was detected by qPCR targeting the gene for enterohemolysin (*E-hly*). The 5' nuclease qPCR system was developed using bioinformatical routines and evaluated with a strain collection.

Results and discussion

Exposure to the conditions in laboratory digesters caused a reduction of viable EPEC strain LGL 38122 to a variable extent, providing material with DNA either of exclusively viable, viable and nonviable or exclusively nonviable cells. Dilutions of pre-enrichment cultures without viable cells resulted either in no qPCR signal if DNA was eliminated by dilution or degradation within the laboratory digesters, or qPCR signals arose due to the presence of dead cells. This was verified by comparison of C_q -values after incubation (C_q [mTSB+N]) to C_q -values of the analogue dilution in mTSB+N before incubation (C_q [BI]). If C_q [mTSB+N] - C_q [BI] ≥ 0 was correct, detected DNA originated from dead EPEC. If C_q [mTSB+N] - C_q [BI] < 0 was true, viable cells of strain LGL 38122 proliferated and caused increase of DNA. A similar approach was successfully conducted by comparing C_q [mTSB+N] and C_q of the mTSB culture C_q [mTSB], taking account of the dilution at inoculation of the enrichment culture. Results were verified by qPCR of cell suspensions from Endo agar. Further studies should reveal if the method is applicable with other gene markers of EHEC like *stx* or *eae*.

Conclusions

Applying the comparative method allowed to differentiate between qPCR signals from DNA of viable and nonviable EHEC/EPEC and to quantify the viable fraction involving MPN statistics.

Quantification was accomplished within 24 h. This shortened the analysis time by 1.5 d compared to the reference method.

13.4.2.4 Artikel im LfL-Jahresbericht 2014 (B. Fröschle et al., 2014)

Schnelle Quantifizierung von lebensfähigen EHEC/EPEC mittels qPCR

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Abteilung Qualitätssicherung und
Untersuchungswesen, AQU1c - Mikro- und Molekularbiologie,
Lange Point 6, 85354 Freising

Zielsetzung



Abbildung 1: Verdünnungsausstrich einer EPEC-Kultur auf Endo-Agar

Die DNA-basierte, molekularbiologische Methode der quantitativen real-time PCR (qPCR) ermöglicht hoch spezifische, sensitive und äußerst schnelle Analysen. Beim Vorliegen abgetöteter Mikroorganismen überschätzt sie allerdings um diesen Anteil, wenn nur die lebende Fraktion nachgewiesen werden soll.

Einige rechtliche Verordnungen fordern Angaben zu lebensfähigen oder die Abwesenheit bestimmter Krankheitserreger in biologischem Material wie organischen Düngemitteln oder behandeltem Bioabfall. In solchen Fällen ist es wichtig, mit molekularbiologischen Methoden

nur die DNA von lebenden, vermehrungsfähigen Keimen zu erfassen.

Im Rahmen des vom Bayerischen Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten geförderten Projektes „Entwicklung eines Schnellscreenings auf Pathogene in landwirtschaftlich relevanten Substraten“ (K/11/08) wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, schnell zwischen qPCR-Signalen der DNA lebensfähiger und nicht lebensfähiger enterohämorrhagischer/enteropathogener *Escherichia coli* Bakterien (EHEC/EPEC) zu unterscheiden und nur den Anteil lebensfähiger Keime zu quantifizieren.

Methode

In Biogas-Gärgemisch wurde eine definierte Konzentration an EPEC-Bakterien des Stammes LGL 38122 aus einer exponentiell wachsenden Kultur eingestellt. Das Gemisch wurde in Keimträger gefüllt und den Bedingungen in Labor-Biogasfermentern ausgesetzt. Nach definierten Expositionszeiten wurden EHEC/EPEC in den Keimträgerinhalten in Anlehnung an die Methode L07.18 §64 LFGB kultivierungsbasiert angereichert. Diese Methode besteht u.a. aus einer Voranreicherung in modifiziertem Tryptose Soja Bouillon (mTSB) mit Antibiotika-Supplement (Novobiocin; „mTSB+N“) und einer nachfolgenden Überimpfung in mTSB als Hauptanreicherungsschritt. Nach Inkubation wird diese Kultur auf Endo-Agar ausgestrichen (Abbildung 1). Die Kultivierung wurde in Log-Verdünnungsreihen und in Triplikaten durchgeführt, um eine Quantifizierung über MPN-Statistik zu gewährleisten. qPCR Analysen erfolgten vor und nach der Voranreicherung, nach der Hauptanreicherung und von Zellsuspensionen der Kolonien auf Endo-Agar in sterilem Wasser. Der Nachweis des EPEC-Stammes LGL 38122 erfolgte mit einem qPCR-System für das Gen Enterohämolysin (*Ehly*), welches im Projekt über bioinformatische Routinen entwickelt und evaluiert wurde. In der qPCR wird die Probe mit einem C_q -Wert charakterisiert. Dieser Wert stellt den Zyklus dar, bei dem die gemessene Fluoreszenz im Verlauf der PCR-Analyse einen Schwellenwert (Threshold, Abbildung 2) überschreitet.

Ergebnisse

Die Exposition gegenüber den Bedingungen in Labor-Biogasanlagen bewirkte eine Reduktion der lebensfähigen EPEC-Bakterien in unterschiedlichem Ausmaß. Dadurch standen drei verschiedene Ausgangssituationen für die Analysen zur Verfügung: Untersuchungsmaterial mit der DNA (I) von ausschließlich lebensfähigen, (II) von lebensfähigen und nicht lebensfähigen und (III) ausschließlich von nicht lebensfähigen Zellen.

Verdünnungen der Voranreicherungskulturen ohne lebensfähige Zellen (III) ergaben in der qPCR entweder kein Signal ($C_q > 40$), wenn die DNA durch die Verdünnung oder durch mikrobiellen Abbau im Fermenter eliminiert wurde, oder ein Signal, das durch die Anwesenheit von DNA inaktivierter Zellen hervorgerufen wurde. Durch die Anwendung der neuen Methodik konnten solche qPCR-Signale von Signalen lebensfähiger Zellen (I oder II) unterschieden werden, indem die C_q -Werte nach Inkubation ($C_q[\text{mTSB+N}]$) mit den C_q -Werten der analogen Verdünnung vor Inkubation ($C_q[\text{BI}]$) verglichen wurden. Wenn $C_q[\text{mTSB+N}] \geq C_q[\text{BI}]$ zutraf, stammte die nachgewiesene DNA von toten EPEC-Zellen. Wenn $C_q[\text{mTSB+N}] < C_q[\text{BI}]$ zutraf, hatten sich lebensfähige EPEC-Zellen vermehrt und eine Zunahme der im Ansatz vorhandenen DNA verursacht (Abbildung 2).

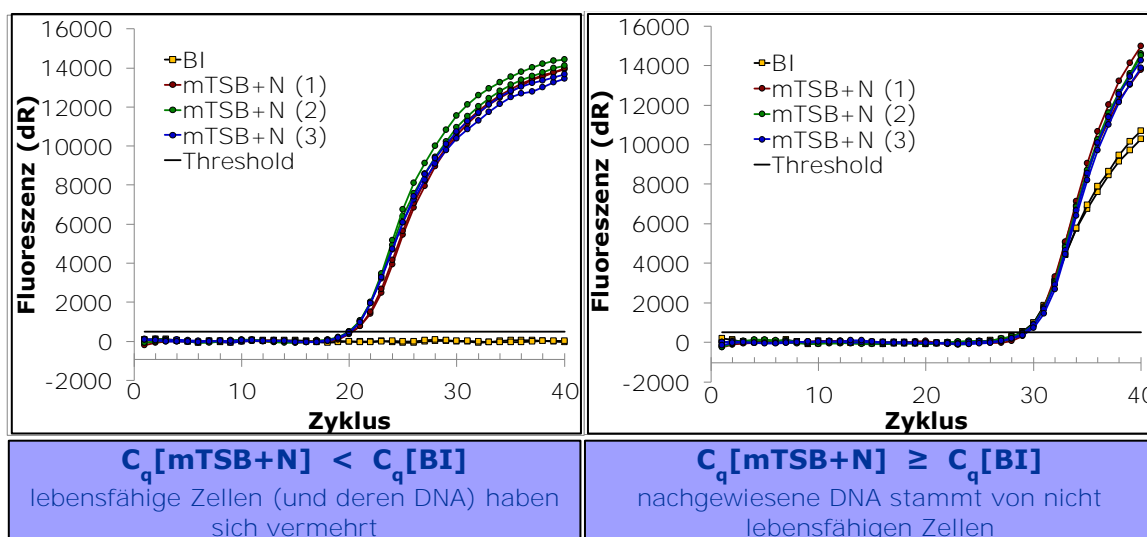


Abbildung 2: Vergleich der Ehly-qPCR-Signale aus Voranreicherungskulturen von EPEC-Bakterien vor (BI) und nach der Inkubation (mTSB+N)

Ein ähnlicher Ansatz wurde zum Vergleich der qPCR-Signale vor und nach der Inkubation der Hauptanreicherung erfolgreich angewendet. Dabei wurde der Verdünnungsschritt bei der Inokulation der Hauptanreicherungskultur berücksichtigt. Die Ergebnisse wurden mittels qPCR-Analyse der Zellsuspensionen überprüft, die auf Endo-Agar gewachsen waren.

Die hier vorgestellte neue Methode ermöglicht es, zwischen qPCR-Signalen der DNA lebensfähiger und nicht lebensfähiger EHEC/EPEC-Zellen zu unterscheiden und mittels MPN-Statistik ausschließlich den Anteil lebensfähiger Zellen zu quantifizieren. Die Quantifizierung dauerte weniger als 24 h, wodurch die Analyse-Dauer um 1,5 d im Vergleich zur Referenzmethode gekürzt werden konnte.

Projektleitung: Dr. M. Lebuhn

Projektbearbeitung: B. Fröschle, I. Kinker

Laufzeit: 01.10.2011 – 30.06.2015

Finanzierung: Bayerisches Staatministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten

13.4.2.5 Posterpräsentation auf der internationalen Konferenz „Biogas Science 2014“, Wien (B. Fröschle et al., 2014)

Fast quantification of viable EHEC/EPEC in digestate involving qPCR methodology

Bianca Fröschle, Isabella Kinker and Michael Lebuhn

Introduction

Although DNA targeted biomolecular methods such as quantitative real-time PCR (qPCR) are highly specific, sensitive and time saving, they can confer problems if only viable organisms are of interest. If regulatory requirements demand the absence of certain pathogenic germs in

biological material, only the presence of DNA of viable germs is relevant, whereas the detection of DNA of dead germs can overestimate this fraction. We developed a fast method to differentiate between qPCR signals caused by DNA of viable and non-viable EHEC/EPEC and to quantify the viable fraction.

cultivation method

pre-enrichment
1 part sample
9 parts mTSB+N

log dilution series

selected dilutions:
partition into 3
aliquots at 10 mL

incubation:
over night
37°C, 180 min⁻¹

enrichment
1 part pre-enrichment
4 parts mTSB

incubation:
over night
37°C, 180 min⁻¹

streaking on
ENDO agar

incubation:
over night
37°C

quantification
MPN analysis



qPCR

BI
Before incubation

mTSB+N
with Novobiocin

mTSB
without Novobiocin

ENDO

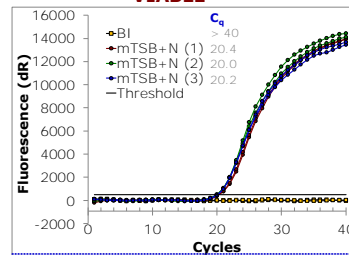
Materials and Methods

- exposure of digestate spiked with EPEC cells to the conditions in laboratory biogas digesters fed with renewable resources in sentinel chambers
- enrichment of the sentinel chamber contents by cultivation on the basis of the German Food and Feed Code (LFGB) method L07.18 adapted for MPN analysis
- qPCR analyses targeting the gene for enterohemolysin (*Ehly*) before and after pre-enrichment and enrichment steps as well as of colonies from agar
- MPN analysis

Results

Comparison of corresponding qPCR results before and after incubation

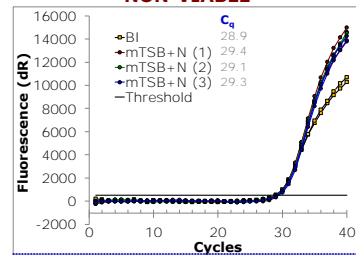
VIABLE



$C_q[\text{mTSB+N}] < C_q[\text{BI}]$
viable cells proliferated and caused increase of DNA

no qPCR signal for BI due to elimination of DNA by dilution

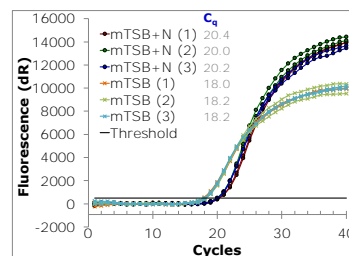
NON-VIABLE



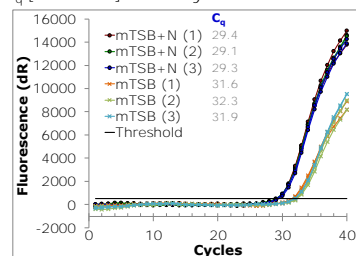
$C_q[\text{mTSB+N}] \geq C_q[\text{BI}]$
detected DNA originated from non-viable EPEC

OR: no qPCR signal if DNA was eliminated by dilution or degradation within the laboratory digesters

A similar approach was successfully conducted by comparing qPCR results before and after incubation of the enrichment, taking account of the dilution (1:5) at inoculation of the enrichment culture. → $C_q[\text{mTSB+N}] + 2.3$ cycles



$C_q[\text{mTSB}] < C_q[\text{mTSB+N}] + 2.3$



$C_q[\text{mTSB}] \geq C_q[\text{mTSB+N}] + 2.3$

Verification of results by qPCR of cell suspensions from ENDO agar

Conclusions

Applying the comparative method allowed

- to differentiate between qPCR signals from DNA of viable and nonviable EHEC/EPEC
- therefore, to quantify the viable fraction involving MPN statistics already after one over night incubation step (< 24 h)
- shortening of the analysis time by > 1.5 d compared to the reference method (values from ENDO agar)



This study was realized by financial support of the Bavarian State Ministry for Nutrition, Agriculture and Forestry.

Bavarian State Research Center for Agriculture,
Central Department for Quality Assurance and Analytics, Micro- and Molecular Biology
Lange Point 6, 85354 Freising, Germany, www.LFL.bayern.de
bianca.froeschle@lfl.bayern.de



13.4.2.6 Manuskript zur Posterpräsentation auf dem V. EHEC-Workshop des LGL, Nördlingen, 2016 (B. Fröschle et al., 2016)

Schnellscreening-Ansatz zum Nachweis lebensfähiger EHEC/EPEC

Bianca Fröschle, Isabella Kinker, *Michael Lebuhn*

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Abteilung für Qualitätssicherung und Untersuchungswesen, Lange Point 6, 85354 Freising

Schlüsselwörter: *Escherichia coli*, quantitative real-time PCR, MPN-qPCR

Key words: *Escherichia coli*, quantitative real-time PCR, MPN-qPCR

DNA-basierte, molekularbiologische Methoden wie z.B. die quantitative real-time PCR (qPCR) ermöglichen einen schnellen und gleichzeitig sehr spezifischen Nachweis verschiedener Mikroorganismen. Bei DNA-basierten Verfahren kann jedoch nicht zwischen toten und lebenden Zellen unterschieden werden. Kommen überwiegend tote Mikroorganismen in einer Probe vor, so wird der Anteil lebensfähiger Keime überschätzt. Ziel der Arbeit war es, eine schnelle Methode zu entwickeln, die eine Unterscheidung zwischen qPCR-Signalen der DNA lebensfähiger und nicht lebensfähiger enterohämorrhagischer bzw. enteropathogener *Escherichia coli* (EHEC/EPEC) ermöglicht, um ausschließlich lebende, vermehrungsfähige Keime zu quantifizieren. Hierfür wurde eine definierte Zellzahl EPEC LGL 38122 (stx-, eae+, Ehly+) in Keimträgern in Labor-Biogasfermentern mit Gärgemisch eingesetzt. Nach bestimmten Expositionszeiten wurde der Keimträgerinhalt entnommen und EHEC/EPEC mithilfe des spezifischen kultivierungsbasierten Verfahrens LFGB L07.18 angereichert. Die Kultivierung bestand aus drei Schritten: i) Voranreicherung in modifizierter Tryptose Soja Bouillon mit Novobiocin (mTSB+N), ii) Anreicherung in mTSB ohne Novobiocin-Zusatz, und iii) Ausstrich auf Endo-Agar. Die Kultivierung wurde in Log-Verdünnungsreihen und in Triplikaten durchgeführt, um eine Quantifizierung mithilfe des MPN-Verfahrens zu ermöglichen. qPCR Analysen (Zielgen Enterohämolysin (*ehly*)) wurden vor und nach der Voranreicherung, nach der Hauptanreicherung und von Zellsuspensionen der Kolonien auf Endo-Agar in sterilem Milli-Q-Wasser durchgeführt.

Die Exposition des Stamms LGL 38122 gegenüber den Fermenterbedingungen bewirkte eine Abnahme seiner Lebendzellzahl in unterschiedlichem Ausmaß, wobei DNA aus lebenden und/oder toten Zellen messbar war. Verdünnungen der Voranreicherungen ohne lebende Zellen ergaben kein qPCR-Signal wenn keine DNA durch die Verdünnung mehr vorhanden war oder wenn sie im Biogasprozess abgebaut worden war. Positive qPCR-Signale konnten auf Präsenz lebender oder toter Zellen beruhen. Dies wurde verifiziert durch den Vergleich des Werts ($Cq[mTSB+N]$) nach der Inkubation gegenüber dem Wert aus mTSB+N vor der Inkubation ($Cq[BI]$). Bei $Cq[mTSB+N] - Cq[BI] \geq 0$ stammte die DNA aus toten Zellen, bei $Cq[mTSB+N] - Cq[BI] < 0$ vermehrten sich Zellen. Ein ähnlicher Ansatz war erfolgreich, wenn der Cq-Wert nach der Voranreicherung $Cq[mTSB+N]$ nach der Inkubation in der Hauptanreicherung verglichen wurde $Cq[mTSB]$, wobei die Verdünnung 1:5 als +2,3 Cq-Werte einberechnet wurden. Die Spezifität wurde durch qPCR-Analysen auf Endo-Agar gewachsener Kolonien überprüft.

Mithilfe des neu entwickelten Schnellscreenings konnte zwischen qPCR-Signalen der DNA lebensfähiger und toter EHEC/EPEC-Zellen unterschieden und der Anteil lebensfähiger Keime durch die Anwendung der MPN-Statistik quantifiziert werden. Die Quantifizierung der Keime erfolgte innerhalb von 24 Stunden und war somit im Vergleich zur Referenzmethode ca. 1,5 Tage schneller.

13.4.2.7 Posterpräsentation auf dem V. EHEC-Workshop des LGL, Nördlingen, 2016 (B. Fröschle et al., 2016)

Das Poster wird aktuell (nach Redaktionsschluss dieses Abschlussberichts) erstellt.