

**Untersuchungen zum Potential biotechnologischer
Methoden zur Inaktivierung von tier- und
humanmedizinischen Krankheitserregern der
Schutzstufe 3**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim**

**Institut für Nutztierwissenschaften (460) /
Prof. Dr. med.vet. L. E. Hölzle
und
Institut für Genetik (240) /
Prof. Dr. A. J. P. Pfitzner**

vorgelegt von
M. Sc. Nadja Hartmann

aus Pfaffenhofen
2017

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heinz Breer
1. berichtende Person: Prof. Dr. med. vet. Ludwig E. Hölzle
2. berichtende Person: Prof. Dr. Artur J. P. Pfitzner
Mündliche Prüfung am: 09.11.2017

Die vorliegende Arbeit wurde am 25.10.2017 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Für Mama und Papa

“THERE MUST BE A BEGINNING OF ANY GREAT MATTER, BUT THE CONTINUING
UNTO THE END UNTIL IT BE THOROUGHLY FINISHED YIELDS THE TRUE GLORY.”

Sir Francis Drake

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Verbundvorhaben: Einfluss der landwirtschaftlichen Biogaserzeugung auf die Qualität von Gärresten: Bewertung des Einflusses des Biogasprozesses auf die Inaktivierung von Erregern von Bestandserkrankungen (BIOGAS-SANITATION); Teilvorhaben 2, Schlussbericht, veröffentlicht durch die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (FNR); 4.Juli 2016.

Das dieser Arbeit zugrundeliegende Vorhaben (Förderkennzeichen: 22003313) wurde aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. (FNR) als Projektträger des BMEL für das Förderprogramm Nachwachsende Rohstoffe unterstützt.

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Abkürzungsverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	X
Zusammenfassung	1
Summary	3
1. Einleitung	5
2. Literaturteil	7
2.1. Nutzung und Recycling von Wirtschaftsdünger – mikrobielle Risiken	7
2.2. Informationen zu den verwendeten bakteriellen Pathogenen	9
2.2.1. Mycobacteria	9
2.2.2. Bovine Tuberkulose: <i>Mycobacterium bovis</i> , <i>Mycobacterium caprae</i>	10
2.2.3. <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	12
2.2.4. <i>Coxiella burnetii</i>	14
2.2.5. Chlamydien	19
2.3. Übersicht der verwendeten viralen Pathogene	21
2.3.1. Equines Rhinitis A Virus	21
2.3.2. Bovines Virusdiarrhoe Virus/Mucosal Disease	24
3. Material und Methoden	28
3.1. Verwendete Bakterien- und Virusstämme sowie Zelllinien	28
3.2. Vermehrung der Bakterien	29
3.3. Vermehrung der Viren und der obligat intrazellulären Bakterien	29
3.3.1. Kultivierung von Säugerzellen	29
3.3.2. Infektion der Zellen	30
3.4. Methoden zur Inaktivierung: Lagerung und thermische Inaktivierung	32
3.4.1. Inaktivierung von <i>M. bovis</i> , <i>M. caprae</i> , <i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	33
3.4.2. Inaktivierung von <i>C. burnetii</i> und <i>Ch. abortus</i>	35
3.4.3. Inaktivierung von Viren: ERAV und BVDV	41
4. Ergebnisse	46
4.1. Inaktivierung von Bakterien durch Lagerung und thermische Behandlung	46
4.1.1. Einfluss der Lagerung auf die Reduktion von <i>M. bovis</i>	46

4.1.2.	Einfluss der thermischen Inaktivierung auf <i>M. bovis</i> , <i>M. caprae</i> , <i>MAP</i>	48
4.1.3.	Einfluss der thermischen Inaktivierung auf <i>C. burnetii</i> und <i>Ch. abortus</i>	51
4.1.4.	Einfluss der thermischen Inaktivierung auf <i>Ch. abortus</i>	52
4.2.	Inaktivierung von Viren durch Lagerung und thermische Behandlung.....	53
4.2.1.	Einfluss der Lagerung auf die Reduktion von ERAV und BVDV.....	53
4.2.2.	Einfluss der thermischen Inaktivierung auf ERAV und BVDV.....	58
5.	Diskussion	60
6.	Literaturverzeichnis.....	72
Anhang	81

Abkürzungsverzeichnis

AI	Aviäre Influenza
BDV	Border Disease Virus
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
Bgbl	Bundesgesetzblatt
BGM-Zellen	Buffalo-Green-Monkey-Kidney-Zellen
BioStoffV	Biostoffverordnung
Btest	Bovine testicle
BT	Bovine turbinata
BVDV	Bovines Virusdiarrhoe Virus
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
C.	<i>Chlamydia</i>
<i>C. pneumoniae</i>	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
<i>C. trachomatis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
Ch.	<i>Chlamydophila</i>
<i>Ch. abortus</i>	<i>Chlamydophila abortus</i>
<i>Ch. psittaci</i>	<i>Chlamydophila psittaci</i>
<i>C. burnetii</i>	<i>Coxiella burnetii</i>
cp	cytopathogen
cpE	cytopathischer Effekt
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
EHEC	Enterohämorrhagisches <i>Escherichia coli</i>
EFK	equine foetal kidney
EFSA	European Food Safety Authority
EK	Elementarkörperchen
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMEM	Eagles's minimum essential medium
ERAV	Equine Rhinitis A Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESBL	extended-spectrum-beta-lactamase
FKS	fötales Kälberserum
HEYM	Herrold's Egg Yolk Medium
HTST	High-Temperature-Short-Time
IFT	Immunfluoreszenztest
KSP	Klassische Schweinepest
LCV	large cell variant
LPS	Lipopolysaccharid
MKS	Maul- und Klauenseuche

MDBK	Madin Darby Bovine kidney
MD	mucosal disease
MEM	Minimum Essential Medium
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MTC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
<i>MAP</i>	<i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>M. caprae</i>	<i>Mycobacterium caprae</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ncp	nicht-cytopathogen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction
PK	porcine kidney
qPCR	quantitative real-time PCR
Q-Fieber	Query-Fieber
RDs	regions of difference
RK	Retikularkörperchen
SCV	small cell variant
SLP	spore like particles
TSIS	Tier-Seuchen-Informations-System

Abbildungsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Abbildung 1: Schematische Darstellung der verwendeten Glasspritzen	44
Abbildung 2: Ergebnisse der einzelnen Vermehrungen von <i>C. burnetii</i>	51
Abbildung 3: Ergebnisse der log ₁₀ Verdünnungsreihe von <i>C. burnetii</i>	51
Abbildung 4: Nicht infizierte BGM-Zellkultur	52
Abbildung 5: Mit <i>Ch. abortus</i> infizierte BGM-Zellkultur.	52
Abbildung 6: Verlauf des Virustiters von ERAV über zehn Tage.	53
Abbildung 7: Verlauf des Virustiters von ERAV über 15 Tage	54
Abbildung 8: Verlauf des Virustiters von ERAV über sieben Tage.	54
Abbildung 9: Verlauf des Virustiters von BVDV über 15 Tage	56
Abbildung 10: Verlauf des Virustiters von BVDV über zehn Tage	56
Abbildung 11: Verlauf des Virustiters von ERAV im Biogasprozess.	57
Abbildung 12: Verlauf des Virustiters von ERAV bei drei Temperaturen	58
Abbildung 13: Verlauf des Virustiters von BVDV bei drei Temperaturen	59

Tabellenverzeichnis

	<u>Seite</u>
Tabelle 1: Gemeldete und bestätigte Q-Fieber Fälle beim Menschen	16
Tabelle 2: Zahlen humaner Q-Fieber-Ausbrüche in Deutschland.....	16
Tabelle 3: Tenazität von <i>C. burnetii</i> in ausgewählten Milieus	18
Tabelle 4: Zusammenstellung der verwendeten Bakterienstämme	28
Tabelle 5: Zusammenstellung der verwendeten Viren	28
Tabelle 6: Zusammenstellung der verwendeten Zelllinien.....	29
Tabelle 7: Zusammensetzung der verwendeten Substrate	32
Tabelle 8: Analyse der Gärreste unverdünnt und 1:20 verdünnt	32
Tabelle 9: Darstellung des Versuchsdesigns für <i>C. burnetii</i>	35
Tabelle 10: Standard PCR-Protokoll	36
Tabelle 11: Übersicht der verwendeten Primer	37
Tabelle 12: Thermoprotokoll StepOne Real-Time-PCR	38
Tabelle 13: Versuchsdesign Lagerungsversuche ERAV und BVDV.....	41
Tabelle 14: Versuchsdesign Lagerungsversuch mit Keimträgern.....	43
Tabelle 15: Versuchsdesign thermische Inaktivierung für ERAV und BVDV	45
Tabelle 16: Ergebnisse der Lagerung bei 4 °C für <i>M. bovis</i>	46
Tabelle 17: Ergebnisse der Lagerung bei 20 °C für <i>M. bovis</i>	47
Tabelle 18: Ergebnisse der Lagerung bei 37 °C für <i>M. bovis</i> ³	47
Tabelle 19: Ergebnisse thermische Inaktivierung bei 70 °C für <i>M. bovis</i> ⁴	48
Tabelle 20: Ergebnisse thermische Inaktivierung bei 70 °C für MAP ₁₉	48
Tabelle 21: Ergebnisse thermische Inaktivierung bei 80 °C für MAP ₁₉ ^{6,7}	49
Tabelle 22: Ergebnisse thermische Inaktivierung bei 60 °C für <i>M. bovis</i> und <i>M. caprae</i> ⁶	49
Tabelle 23: Ergebnisse thermische Inaktivierung bei 55 °C für <i>M. bovis</i> und <i>M. caprae</i> ..	50
Tabelle 24: Ergebnisse thermische Inaktivierung bei 50 °C für <i>M. bovis</i> und <i>M. caprae</i> ^{8,9}	50
Tabelle 25: Thermische Inaktivierung von <i>Ch. abortus</i> bei 40, 50 und 60 °C	52
Tabelle 26: Reduktion von ERAV durch die Lagerung in Substrat 1 - 3	55

Zusammenfassung

Mit der steigenden Verwertung von Gülle und anderer Biomasse in Biogasanlagen stellt sich immer wieder die Frage nach der Gefährdung von Mensch und Tier durch die Verbreitung von Krankheitserregern, die über kontaminierte Substrate in die Biogasanlagen gelangen. Durch die Verwendung der Gärreste als organische Dünger können mögliche Infektketten geschlossen werden und es besteht dadurch ein epidemiologisches Risiko für Mensch und Tier. Denn bei den übertragenen Erregern kann es sich neben tierpathogenen Erregern auch um humanpathogene Erreger handeln. Durch die sehr heterogene Zusammensetzung der verwendeten Substrate ist dieses infektiologische Risiko nur schwer kalkulierbar, sollte aber durch adäquate in den Prozess integrierbare Inaktivierungsmethoden möglichst minimiert werden. Dafür sollten mögliche Inaktivierungsmethoden analysiert und Maßnahmen zur Vermeidung eines hygienischen Risikos etabliert werden.

Ziel dieser Arbeit war es, geeignete Inaktivierungsparameter für verschiedene hochkontagiöse Tierseuchenerreger und hochpathogene Bakterien zu verifizieren. Dafür wurde der Fermentationsprozess selbst sowie potentielle vor- und nachgelagerte Verfahren analysiert, die zu einer Inaktivierung möglicher im Input-Material vorhandenen Pathogene beitragen können. Zunächst wurde der Fermentationsprozess im Labor hinsichtlich einer Erhöhung der Temperatur und Verweilzeit angepasst, um zu sehen wie sich die Parameter auf die Inaktivierung von Pathogenen auswirken. Zudem wurden die Pasteurisierung und der mögliche Substrateinfluss auf das Inaktivierungsverhalten verschiedener Pathogene untersucht. Auch die an den Biogasprozess anschließende Lagerung kontaminierter Substrate wurde dabei betrachtet. Es wurden aufgrund der ausgeprägten Tenazität, die Erreger der Rindertuberkulose *M. bovis* und *M. caprae* sowie der Erreger der Paratuberkulose *M. avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) verwendet. Als weiterer, ebenfalls wichtiger Zoonoseerreger wurde das obligat intrazelluläre Bakterium *C. burnetii* welches bei Coxiellose-positiven Tierbeständen in hohen Konzentration in Gülle nachgewiesen werden kann, untersucht. Da zu anderen obligat intrazellulären Infektionserregern wie Chlamydien in Gülle bisher wenig über deren Nachweis bekannt ist, wurde *Ch. abortus* in die Untersuchungen einbezogen. Neben bakteriellen Infektions- und Zoonoseerregern spielen auch virale Erreger eine große Rolle. Hierzu zählen die hochkontagiösen Viren der Maul- und Klauenseuche (MKS) und der Klassischen Schweinepest (KSP). Zur Untersuchung der Eigenschaften dieser Viren unter verschiedenen Inaktivierungsprozessen wurden die beiden Viren durch Surrogatviren ersetzt. Anstelle des MKS-Virus wurde das Equine Rhinitis A Virus (ERAV) und als Surrogat für das KSP-Virus wurde das Bovine Virusdiarrhoe Virus (BVDV) verwendet. Aufgrund ihrer jeweils engen phylogenetischen Verwandtschaft und vergleichbarer biologischer Eigenschaften sind die gewonnenen Ergebnisse der Surrogatviren auf das MKS- bzw. KSP-Virus übertragbar. Die Inaktivierungsversuche von

M. bovis durch eine 21-tägige Lagerung ergaben substrat-, temperatur- sowie intraspezifische Unterschiede, die bei der Auswahl der Methode zur Inaktivierung berücksichtigt werden müssen. Bei Temperaturen von 4 und 20 °C konnten über die Dauer der Versuchslaufzeit Mykobakterien nachgewiesen werden. Nach bereits sieben Tagen konnten bei 37 °C keine Erreger mehr nachgewiesen werden. Die in PBS suspendierten Mykobakterien waren hingegen über die gesamte Versuchslaufzeit nachweisbar. Lagerungsversuche wurden mit ERAV und BVDV mit den verschiedenen Substraten bei über 15 Tage durchgeführt. Bei Temperaturen von 4 bzw. 20 °C fand eine signifikante Virusreduktion statt. Bei höheren Temperaturen (40 – 42 °C) zeigte sich bereits nach drei Tagen eine signifikante Virusreduktion (ERAV) bzw. lag der Titer unter der Nachweisgrenze (BVDV). Zudem wurde nachgewiesen, dass das Substrat keinen Einfluss auf die Reduktion von ERAV hat. Versuche mit auf Keimträgern adsorbiertem ERAV ergaben eine substratabhängige Inaktivierung bei 40 °C. Aufgrund dessen wurde mit diesen Keimträgern in Anlehnung an den Hohenheimer-Biogasertragstest der Biogasprozess im Labormaßstab für 24 Stunden simuliert. Es zeigte sich, dass erst ab mindestens 120 min ein Abfall des Virustiters stattfand. Im Verlauf zwischen 120 min und 24 Stunden fand eine signifikante Reduktion des ERAV-Titers statt. Im Rahmen der Pasteurisierungsuntersuchungen konnte bei den verschiedenen untersuchten *Mycobacterium*-Isolaten kein signifikanter Einfluss des Substrates auf den Pasteurisierungserfolg gefunden werden. Bei Versuchen mit *M. bovis* und *M. caprae* konnten bei 60 °C nach 30 min keine Erreger mehr nachgewiesen werden. Bei *MAP* konnten bei 70 °C erst nach 360 min keine kultivierbaren Erreger mehr nachgewiesen werden, bei 80 °C waren nach 240 min noch Erreger nachweisbar. Pasteurisierungsversuche mit *C. burnetii* lieferten keine belastbaren Daten. Bei *Ch. abortus* waren bereits nach fünf min bei 40 °C keine kultivierbaren Erreger mehr nachzuweisen. Bei der Pasteurisierung von ERAV in Abhängigkeit drei verschiedener Substrate zeigte sich, dass eine Reduktion allein durch die Temperatur hervorgerufen wurde, weshalb bei BVDV nur das Substrat mit der heterogensten Zusammensetzung verwendet wurde. Für ERAV konnte nach 15 min bei 55 °C ein signifikanter Titerverlust nachgewiesen werden. Bei BVDV konnte bei 40 °C keine signifikante Virusreduktion aber eine Substratabhängigkeit nachgewiesen werden. Bei den in Substrat suspendierten Viren konnte bei 45 °C nach 60 min sowie bei 50 °C nach 30 min eine signifikante Reduktion des Virustiters erzielt werden. Die in Zellkulturmedium suspendierten Viren zeigten diese Reduktion bei 50 °C nach 60 - 120 Minuten. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die Wichtigkeit, dass bei der Auswahl eines geeigneten biotechnologischen Prozesses die Eigenschaften der einzelnen Pathogene eine wichtige Rolle hinsichtlich der Inaktivierungsdauer spielen. Das Verfahren sollte sich daher stets am Worstcase, den Erregern mit der höchsten Tenazität, orientieren, um das infektiologische Risiko zu minimieren. Die hier gewonnenen Daten können in weiteren Studien dazu verwendet werden, um Richtlinien für die Praxis zu etablieren.

Summary

With the increasing use of slurry in biogas plants there remains the question of the extent of the potential hazard for human and animal beings due to infectious pathogens which enter biogas plants through contaminated substrates. Possible chains of infection can be created by using digestates as an organic fertilizer. As a consequence, there is an epidemiological risk for humans and animals because the transmitted pathogens can be infectious for animals as well as for humans. Due to the very heterogeneous composition of the used substrates this infectious risk is highly unpredictable. The risk should be minimized by adequate methods of inactivation throughout the process. For this purpose, possible methods of inactivation have to be analyzed and measurements to avoid this hygienic risk have to be established.

The aim of this doctoral thesis was to establish a suitable approach for the inactivation of infectious and zoonotic agents. Therefore, the fermentation process itself as well as potential pre- and post-procedures which can contribute to the inactivation of pathogens were analyzed. First of all, a laboratory process was established concerning an increase of temperature and dwelling time to analyze the consequences for the inactivation of the pathogens. Additionally, the possible impact of pasteurization and diverse substrates on the inactivation of different pathogens were investigated. The influence of storage to the contaminated substrates after the biogas process was also considered. Due to the distinctive tenacity of the bovine tuberculosis pathogens *M. bovis* and *M. caprae* as well as the paratuberculosis pathogen *M. avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP). Those pathogens are used within this study. As another major cause of zoonotic, the obligate intracellular bacterium *C. burnetii* was used. This bacterium occurs also in high concentrations in slurry from animal populations which are tested positively of coxelliosis. Due to the fact that other obligate intracellular infectious pathogens like chlamydia are unknown to occur in slurry, *Ch. abortus* was included in this investigation. Beside bacterial infection and zoonotic pathogens, viral agents are playing a major role, such as the highly contagious foot-and-mouth disease (FMD) and the virus classical swine fever (CSF). To investigate the properties of these viruses under different inactivation conditions they were substituted by surrogate viruses. FMD was substituted by the equine rhinitis A virus (ERAV) and CSF by the bovine virus diarrhea (BVD). The results can be transferred to FMD and CSF because of the close phylogenetic relation of the surrogate viruses. The inactivation studies of *M. bovis* through storage over 21 days showed that there are besides the substrate and temperature specific differences also intraspecific differences. This fact should be included in future selection of the inactivation methods. At temperatures of 4 and 20 °C it was possible to detect mycobacteria throughout the entire experimental duration time. At 37 °C already after seven days no pathogens could be detected. Mycobacteria which were

suspended in PBS were detectable during the whole experimental time. The storage studies with ERAV and BVDB were performed over 15 days with the different substrates. At low temperatures of 4 and 20 °C there was no significant virus reduction detectable. At higher temperatures (40 – 42 °C) after three days, a significant virus reduction for ERAV was detectable and a complete inactivation for BVD, respectively. Additionally, it could be proven, that the substrate has no impact on the reduction of ERAV. Experiments using ERAV absorbed membranes showed a substrate dependent inactivation at 40 °C. As a consequence, those adsorbed membranes were used for a biogas plant in a laboratory dimension for 24 hours in the style of the Hohenheim biogas yield test. The reduction of the titer could be seen at least after 120 minutes. Furthermore, it could be shown, that there is a significant reduction of the ERAV titer between 120 minutes and 24 hours. In regard to the success of pasteurization dependent on the substrate, no substrate dependency was found for mycobacteria. In experiments with *M. bovis* and *M. caprae* no pathogens could be found after 30 minutes incubation time at 60 °C. For *MAP* after 240 minutes incubation at 80 °C pathogens were still detectable. After 360 minutes at 70 °C, no culturable pathogens were present. Pasteurization studies with *C. burnetii* showed no reliable data. In experiments with *Ch. abortus* already after 5 minutes at 40 °C no culturable pathogens were present. The pasteurization studies of ERAV in dependence of three different substrates showed, that the reduction was only caused by temperature. Therefore, BVD was only combined with one substrate which had the most heterogenic composition. Concerning ERAV, after 15 minutes at 55 °C a significant reduction of the titer was detectable. For BVD at 40 °C no significant virus reduction was achieved, but a dependency of the substrate was proven. A significant reduction of the titer was achieved after 60 minutes at 45 °C in the substrate suspended viruses, 30 minutes at 50 °C, and for in cell culture suspended viruses after 60 – 120 minutes at 50 °C. The results of this thesis show the massive effect of the properties of individual pathogens on the duration of inactivation. This subordinate role should be considered within the choice of the suitable biotechnological process. To reduce the infectious risk the procedure should always orientate at the worst case: the pathogen with the highest tenacity. This information can be used in further studies to establish guidelines for general working practice.

1. Einleitung

Die Nutzung und das Recycling von Wirtschaftsdüngern sind mit ständigen mikrobiologisch infektiologischen Risiken verbunden, deren verlässliches Management nur dann sicher möglich ist, wenn mögliche Gefährdungspotentiale und Gesundheitsrisiken sowie deren Eintrittswahrscheinlichkeit klar erforscht sind. Daneben ist die Analyse möglicher Strategien zur Verringerung dieser Risiken sehr wichtig. Mikrobielle Risiken sind dann als sehr gefährlich einzustufen, wenn organische Abfall- und Reststoffe aus Tierhaltungsbetrieben überbetrieblich oder überregional als Düngemittel eingesetzt werden. Dadurch können vorhandene Infektketten geschlossen und neue epidemiologische Infektionskreisläufe geschaffen werden.

Da die Tenazität der über Kot und Harn ausgeschiedenen tier- bzw. humanpathogenen Zoonose- und Infektionserreger einen entscheidenden Einfluss auf das epidemiologische Risiko haben, ist es von besonderer Wichtigkeit diese genau zu untersuchen. Zu den wichtigsten Infektions- und Zoonoseerregern, die im Zusammenhang mit der Anwendung von Wirtschaftsdüngern zu erwähnen sind, gehören neben Vertretern der Gattungen *Salmonella* und *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, die Erreger der Rindertuberkulose (*Mycobacterium (M.) bovis* und *M. caprae*), sowie das Q-Fieber auslösende obligat intrazelluläre Bakterium *Coxiella (C.) burnetii*. *M. bovis*, *M. caprae* und *C. burnetii* besitzen ein hohes Infektionsrisiko, da die Infektionsdosis dieser aerogen übertragbaren Bakterien für Mensch und Tier sehr niedrig ist. Ebenfalls sind im Zusammenhang mit der Verwendung von Wirtschaftsdünger die hochkontagiösen viralen Tierseuchenerreger wie das Virus der Maul- und Klauenseuche, der Klassischen Schweinepest und der Aviären Influenza von Bedeutung. Sowohl bakterielle Zoonose- und Infektionserreger, als auch hochkontagiöse virale Tierseuchen sind durch ihr breites Wirtsspektrum und ihre zum Teil aerogene Übertragbarkeit in der Lage innerhalb kurzer Zeit einen hohen Durchseuchungsgrad zu erreichen. Sie spielen daher eine große Rolle, da bei der Nutzung von tierischen Nebenprodukten als Wirtschaftsdünger und der überbetrieblichen Nutzung von Gülle und Festmist in Biogasanlagen Aerosole entstehen können.

Das Hauptaugenmerk liegt daher auf der Optimierung des Biogasprozesses hinsichtlich der Temperatur und Verweilzeit der Substrate in den Anlagen. Der Prozess muss dahingehend optimiert werden, dass die Gefahren eines Tierseuchenausbruchs oder humaner Infektionen mit potentiell in Gülle vorkommenden Pathogenen auf ein Minimum reduziert werden können. Die Untersuchungen und resultierenden Ergebnisse zum Vorkommen von tier- und humanpathogenen Infektionserregern in Gülle ergaben den Problemkreis, der in dieser Arbeit behandelt wurde. Verwendet man Festmist und Gülle als Substrat in Biogasanlagen, besteht ein epidemiologisches Risiko durch Verschleppung, sofern keine ausreichende Inaktivierung durch den Biogasprozess stattfindet. Daher wäre eine

Pasteurisierung der Substrate vor Beschickung der Biogasanlage bzw. die Behandlung der Gärprodukte nach dem Biogasprozess denkbar. Des Weiteren wäre eine Kompostierung der Gärprodukte möglich. Beide Möglichkeiten sind jedoch mit einem hohen technischen und finanziellen Aufwand für die Betreiber der Anlagen verbunden. Weitere Möglichkeiten zur sicheren Inaktivierung der Erreger wäre zum einen eine höhere Temperatur sowie eine längere Verweilzeit des Substrates im Fermenter und zum anderen die Inaktivierung von Pathogenen durch die Lagerung der Gärprodukte über einen definierten Zeitraum. Diese möglichen Inaktivierungseffekte wurden für ausgewählte Erreger in der vorliegenden Arbeit untersucht.

2. Literaturteil

2.1. Nutzung und Recycling von Wirtschaftsdünger – mikrobielle Risiken

Eine überbetriebliche und überregionale Nutzung von Wirtschaftsdüngern ohne dazwischen geschaltete biotechnologische Prozesse (z. B. Biogasfermentation) ist mit einer mehr oder minder großen Gefahr der Verbreitung von Krankheitserregern (epidemiologisches Risiko) und damit einer Ansteckungsgefahr für Mensch und Tier (Infektionsrisiko) verbunden.

Bei der Verwertung von Gülle in Biogasanlagen stellt sich die Frage nach der Gefährdung durch Krankheitserreger, die über kontaminierte Substrate in die Biogasanlagen gelangen. Werden auch Substrate aus anderen Betrieben genutzt, so kann es die Gefahr erhöhen, neue Krankheitserreger in die Tierbestände einzutragen. Es kann sich bei Erregern wie Bakterien, Viren oder Protozoen neben tierpathogenen Erregern aber auch um humanpathogene Erreger handeln, mit denen Tiere klinisch inapparent infiziert sind und diese ausscheiden. Es können aber auch Pathogene ausgeschieden werden, wenn bereits klinische Symptome auftreten, die Behandlung aber zu spät begonnen wurde. So stellen Biogasanlagen, die mit Gülle betrieben werden, im Falle eines Tierseuchenausbruchs z. B. mit Maul- und Klauenseuche, der Klassischen Schweinepest, Salmonellose der Rinder und Rindertuberkulose ein nur schwer kalkulierbares epidemiologisches Risiko dar, welches analysiert und Maßnahmen zur Vermeidung entwickelt werden müssen.

Bakterielle Krankheits- und Zoonoseerreger in Gülle

Zu den wichtigsten bakteriellen Zoonoseerregern, die von den Beständen über den Kot ausgeschieden werden, zählen die Salmonellen. Die wichtigste Infektionsquelle für den Menschen sind klinisch inapparent infizierte Rinder, Schweine sowie Geflügel. Salmonellen weisen eine ausgeprägte Tenazität auf und können in der Umwelt wochen- bis monatelang infektiös bleiben. In einer Studie von Strauch (1996) konnten Salmonellen in 183 zufällig ausgewählten Herden und aus Beständen mit bekannter Salmonellose nachgewiesen werden. Die nachgewiesene Menge an Salmonellen in der Gülle lag hier bei 10 bis 10^4 KbE pro Milliliter Gülle. In anderen Studien konnten weitere bakterielle Krankheits- und Zoonoseerreger wie *Campylobacter*, enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC), *C. burnetii*, *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) und *Mycobacterium tuberculosis* sowie multiresistente Erreger in Gülle nachgewiesen werden (Bonetta et al., 2011; Klein et al., 2010; McLaughlin et al., 2009; Sahlström 2003). In den Fokus der Öffentlichkeit gerieten u. a. humane Infektionen mit pathogenen *Escherichia (E.) coli*, insbesondere EHEC, da sie besonders schwerwiegende Krankheitsverläufe verursachen. Ebenfalls eine wichtige Rolle spielen multiresistente Erreger, insbesondere der Methicillin resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) sowie sog. extended-spectrum-beta-lactamase (ESBL) produzierende Bakterien. In einer Studie konnten ESBL-Erreger in 46,7 % der

untersuchten Kotproben von Mastschweinen nachgewiesen werden (von Salviati et al., 2015). Neuere Untersuchungen zum Vorkommen von ESBL-Bakterien in Biogasanlagen zeigen, dass multiresistente ESBL-produzierende *E. coli* nicht nur in der Beschickungsgülle, sondern auch in den Gärprodukten nachgewiesen werden können (Schauss et al., 2015). In der Gruppe der Mykobakterien finden sich bedeutsame tier- und humanpathogene Vertreter, deren Ausscheidung über Kot und Harn ebenfalls eine wichtige Rolle in der Epidemiologie dieser Bakterien hat. Sie besitzen aufgrund ihres besonderen Zellwandaufbaus eine ausgeprägte Tenazität und können daher bei der Verwendung von kontaminierter Gülle in Biogasanlagen ein epidemiologisches Risiko darstellen. Untersuchungen zur Tenazität von *MAP* zeigten, dass auch nach dem Pasteurisierungsvorgang noch kultivierbare Erreger vorhanden waren, was auf eine ausgesprochen hohe Thermostabilität schließen lässt (Shankar et al., 2010). Dies bedeutet, dass sowohl bei einer mesophilen als auch einer thermophilen Betriebsweise einer Biogasanlage über zusätzliche Inaktivierungsmaßnahmen nachgedacht werden muss, um eine zuverlässige Inaktivierung von *MAP* gewährleisten zu können. Ein weiterer wichtiger bakterieller Zoonoseerreger, der direkt über Gülle oder indirekt über den Biogasprozess in die Umwelt gelangen kann, ist das obligat intrazelluläre Bakterium *C. burnetii*. Bei Schafen, Ziegen und Rindern löst es die Coxiellose und beim Menschen das sogenannte Q-Fieber (Query-Fieber) aus. In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass Gülle aus Coxiellose-positiven Tierbeständen hohe Erregerkonzentrationen enthalten kann, vor allem während der Ablammsaison (Bouvery et al., 2003; Roest et al., 2012; Roest et al., 2011). Bei einem Ausbruch in den Niederlanden, bei dem eine große Zahl von Menschen erkrankten, konnte ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Nutzung von Kot und Harn aus *Coxiella burnetii*-positiven Ziegenbeständen und den humanen Infektionen nachgewiesen werden (Hermans et al., 2014). Zum Vorkommen und zur Tenazität anderer obligat intrazellulärer bakterieller Infektionserreger, wie z.B. Chlamydien in Gülle und anderen tierischen Fäkalien, ist bisher nur wenig bekannt.

Virale Krankheits- und Zoonoseerreger in Gülle

Unter den viralen Infektionserregern besonders hervorzuheben sind Erreger der hochkontagiösen Maul- und Klauenseuche (MKS), der Klassischen Schweinepest (KSP) sowie der der Aviären Influenza (AI), da sie aufgrund ihrer hohen Kontagiosität ein besonders hohes epidemiologisches Risiko bei der Verwertung von Gülle darstellen (de Rueda et al., 2015). Bøtner und Belsham (2012) führten aus diesem Grund Inaktivierungsversuche für diese hochkontagiösen viralen Erreger in Gülle durch. Dabei konnten sie nachweisen, dass das MKS-Virus bei 20 °C nach drei Wochen in Rindergülle und in Schweinegülle nach zwei Wochen noch infektiös war. Das KSP-Virus war in Schweinegülle über zwei Wochen bei 20 °C und mehr als sechs Wochen bei 5 °C infektiös.

Das eng mit dem KSPV verwandte BVD-Virus war in Rindergülle bei einer Temperatur von 20 ° für drei Tage und bei 5 °C für drei Wochen mittels Zellkultur nachweisbar. In allen Untersuchungen zeigte sich eine eindeutige Temperatur-Zeit-abhängige Inaktivierung der untersuchten Viren.

Detaillierte Informationen zu den in dieser Arbeit untersuchten bakteriellen und viralen Pathogenen sind im Folgenden dargestellt.

2.2. Informationen zu den verwendeten bakteriellen Pathogenen

2.2.1. *Mycobacteria*

Tuberkulose ist eine weltweit vorkommende Infektionskrankheit, die Menschen und Tiere gleichermaßen befällt. Sie ist nach wie vor die bedeutendste Infektion bei Menschen, wobei die Inzidenz der Erkrankung mit etwa 95 % bei Menschen in Entwicklungsländern am höchsten ist. Tuberkulosen werden von den Spezies des *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) ausgelöst zu denen *Mycobacterium (M.) tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. canettii*, *M. pinnipedii*, *M. mungi* und *M. orygis* gehören (Alexander et al., 2010; Ingen et al., 2012; Thoen et al., 2009).

Mikrobielle Eigenschaften und Taxonomie

Vertreter des Genus *Mycobacterium* sind grampositive, gerade oder leicht gebogene, säurefeste, unbewegliche Stäbchenbakterien und gehören zur Abteilung der *Actinobacteria* und sie haben eine Größe zwischen 0,2-0,7 x 1,0-10 µm. Die Zellwand besteht aus einem Peptidoglycan-Arabinogalactan-Polymer und enthält kovalent gebundene, langkettige gesättigte Fettsäuren, die Mykolsäuren (bestehend aus 60 – 90 C Atomen), die durch verschiedene extrahierbare Lipide ergänzt werden. Dieser Zellwandaufbau ist eine wirkungsvolle Permeabilitätsbarriere und der Grund für die hohe Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen oder Antibiotika (Bange et al., 2012; Brennan und Nikaido 1995; Hoffmann und Engelhardt 2009).

Diagnostik

Als Nachweismethoden kommen sowohl der mikroskopische als auch der kulturelle Erregernachweis in Frage. Ebenso finden molekularbiologische, PCR-basierte Verfahren Anwendung. Dem mikroskopischen Erregernachweis liegt die Säurefestigkeit bzw. die Alkohol-Säurefestigkeit der Mykobakterien zugrunde. Die Ziehl-Neelsen Färbung oder aber auch die Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen (z. B. Auramin) können Mykobakterien sichtbar machen. Um Mykobakterien im Präparat zuverlässig nachzuweisen, sind >10⁴ Mykobakterien pro Milliliter nötig. Daher lassen sich falsch negative Ergebnisse nicht sicher

ausschließen. Zudem erlauben mikroskopische Untersuchungen nur die Aussage „säurefeste Stäbchenbakterien“. Eine genauere Spezieszuordnung lässt sich rein morphologisch nicht sicher vornehmen (Bange et al., 2012; Sattelmair 2005). Der kulturelle Nachweis gilt nach wie vor als Goldstandard. Für den kulturellen Nachweis wird je ein festes und ein flüssiges Spezialmedium (Löwenstein-Jensen-Medium, Herrold's Egg Yolk Medium [MAP]) beimpft, bis zu acht Wochen (je nach Spezies) bebrütet und wöchentlich auf Wachstum kontrolliert (Bange et al., 2012; Böttger 2001; Graber 2012). Identifiziert werden die Mykobakterien anhand ihres Wachstumsverhaltens, ihrer Koloniemorphologie sowie durch bestimmte physiologische Leistungen. Bei menschlichen Infektionen kann die Identifizierung bis zur Speziesebene (Primärkultur und Resistenzbestimmung eingeschlossen) dadurch zwei bis drei Monate dauern (Bange et al., 2012; Böttger 2001). Der Einsatz molekularbiologischer, PCR-basierter Verfahren kann den Nachweis erheblich beschleunigen. Mithilfe der klassischen PCR oder real-time Varianten können spezifische Gene der einzelnen Subspezies gesucht werden und eine Identifizierung ermöglichen wie beispielsweise die Regions of difference (RDs). In den Genomen der Mitglieder des MTC stellen die RDs Sequenzen mit einer Länge von 2 – 12,7 kb dar und sind unterschiedlich deletiert. Durch verschiedene Hybridisierungstechniken, PCR-Ansätze und Vergleiche von Genomsequenzen in 100 klinischen MTC-Isolaten konnten 14 RDs identifiziert werden, wodurch die Differenzierung der einzelnen Spezies erfolgen kann (Brosch et al., 2002; Mostowy et al., 2002).

2.2.2. Bovine Tuberkulose: *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium caprae*

M. bovis und *M. caprae* sind die Ursache der sog. Rindertuberkulose und klassische Zoonoseerreger. Sie sind weltweit verbreitet und zeigen ein sehr breites Wirtsspektrum. Deshalb sind sie in der Lage, sowohl Haus- und Wildsäugetiere als auch den Menschen zu infizieren. Aufgrund ihres Pathogenitätspotenzials werden beide Spezies im Rahmen der Laborsicherheit der Risikogruppe 3 zugeordnet (de la Rúa-Domenech 2006).

Epidemiologie/Risikofaktoren

Deutschland besitzt seit 1997 den Status „amtlich anerkannt frei von Rindertuberkulose“. Dieser Status sieht laut Artikel 2 (d) der Direktive 64/432/EEC vor, dass 99,9 % der Rinderherden für sechs zusammenhängende Jahre nachweislich frei von boviner Tuberkulose sein müssen (Moser et al., 2014). Diesen Status konnte Deutschland bisher dauerhaft behalten, was zur Folge hatte, dass die Rindertuberkulose lange Jahre aus dem Blickfeld von Tierärzten, Landwirten und der Öffentlichkeit geriet. In den letzten Jahren nahmen die Zahlen der bestätigten Infektionen jedoch wieder zu. In den Jahren 2010 bis 2016 lagen die Zahlen der gemeldeten und bestätigten Fälle bei 150 (TSIS - TierSeuchenInformationssystem 2017).

Im Tiergesundheitsjahresbericht (2015) zeigte sich, dass die Zahl der Meldungen mit 12 Fällen im Vergleich zum Jahr 2014 (13 Fälle) auf dem etwa gleichen Niveau blieb. Die Betrachtung der Verteilung des Ausbruchsgeschehens auf Bundeslandebene zeigte, dass sich acht der Ausbruchsbestände in Bayern, zwei in Niedersachsen und jeweils ein Fall in Baden-Württemberg und Mecklenburg-Vorpommern befanden. Im Zuge der Speziesidentifizierung konnte in sieben Fällen *M. caprae* und in drei Fällen *M. bovis* identifiziert werden. Bei den anderen beiden Fällen wurde keine Spezifizierung vorgenommen. Ein epidemiologischer Zusammenhang konnte für die Fälle in Niedersachsen und Mecklenburg-Vorpommern nachgewiesen werden. Die Infektionen wurden in vier Fällen bei Schlachttieruntersuchungen, bei drei Fällen im Zuge der amtlichen Fleischuntersuchung und bei drei Fällen bei Kontaktuntersuchungen detektiert. Die anderen beiden Ausbrüche wurden aufgrund klinischer Symptome und einer nicht näher beschriebenen Pflichtuntersuchung entdeckt. Somit lag der Anteil an Betrieben mit positivem Tuberkulose-Nachweis bei 0,007 %, was deutlich unterhalb des o. g. geforderten Grenzwertes von 0,1 % liegt.

Die Infektion von Rindern untereinander findet zwar vorwiegend aerogen statt, aber auch durch direkten Kontakt bzw. peroral durch infektiöse Milch oder kontaminiertes Futter und Wasser. Die wichtigsten Infektionsquellen für den Menschen sind der Genuss von Rohmilch und Rohmilchprodukten von Kühen mit Eutertuberkulose sowie die aerogene Übertragung durch das Einatmen von erregerehaltigem Stallstaub. Des Weiteren scheiden infizierte Tiere die Erreger auch über Kot, Urin, Genitalsekrete oder Bronchialschleim aus, was wiederum zu einer hohen Erregerkonzentration von Aerosolen in der Umgebung dieser Tiere führen kann (Bange et al., 2012; Böttger 2001; Sattelmair 2005). Perkutane Übertragungen von *M. bovis* durch Inokulation oder bei Verletzungen mit kontaminierten Gegenständen (Schlachtung, veterinärmedizinische Untersuchungen) sind ebenfalls möglich (Diel et al., 2011).

Tenazität

Mykobakterien können sich in der Außenwelt zwar nicht replizieren, jedoch zeigen sie aufgrund ihres hohen Lipidgehalts in der Zellwand eine ausgeprägte Widerstandsfähigkeit gegenüber Umwelteinflüssen. So zeigen sie z. B. eine hohe Toleranz gegenüber Austrocknung und sind in der Lage über Monate hinweg ihre Infektiosität zu behalten (Bange et al., 2012; Böttger 2001). Des Weiteren besitzen sie eine hohe Resistenz gegenüber kationischen Detergenzien und andere Desinfektionsmittel. Hammer et al. (2015) zeigten, dass es bei *M. bovis* und *M. caprae* bei einer Temperatur von 62,5 °C einen sogenannten „breakpoint“ gibt, der zu einer deutlichen Inaktivierung führt. Zusätzlich führten sie Inaktivierungsversuche bei 65, 62,5 und 60 °C mit Heißhaltezeiten von je 15, 20 und 25 s durch. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass bei 65 °C die D-Werte für alle Stämme im

Bereich von sieben bis acht Sekunden und bei 62,5 °C bei 15 und 20 s lagen. Bei einer Temperatur von 60 °C konnten sie zum Teil keine Inaktivierung mehr nachweisen bzw. erst nach 40 bis 130 Sekunden.

Viele der betrachteten Studien belegen zudem einen Zusammenhang zwischen der Überlebensdauer von *M. bovis* und Umweltfaktoren wie höhere Umgebungstemperaturen, zunehmende Intensität von Sonneneinstrahlung und höherer Feuchtigkeitsverlust durch Verdunstung (Duffield und Young 1985; Fine et al., 2011). Neben der Temperatur spielt die Dauer der Lagerung ebenfalls eine wichtige Rolle.

So konnte in einer sehr frühen Studie von Williams und Hoy (1930) gezeigt werden, dass *M. bovis* in Kot, der auf Weideland ausgebracht wurde, für fünf Monate über den Winter, für zwei Monate während des Frühlings und für vier Monate während des Herbstes persistieren kann. Im Sommer dagegen konnten bereits nach zwei Monaten keine lebenden Bakterien mehr nachgewiesen werden. Lagerte man die Proben hingegen unter kühlen, dunklen und gleichbleibenden Bedingungen, so gelang der Nachweis in Kot von infizierten Tieren auch noch nach zwölf Monaten. Eine Studie aus dem Jahr 2011 zeigte, dass bei experimentell mit *M. bovis* inokulierten Substraten wie Wasser, Heu, Erde und Mais unter natürlichen Wetterbedingungen über längere Zeiträume noch kultivierbare Erreger nachweisbar waren: bis 88 Tage in Erde, 58 Tage in Wasser und Heu sowie 43 Tage auf Mais (Fine et al., 2011). Andere Autoren wie Palmer und Whipple (2006) untersuchten das Überleben von *M. bovis* auf Futtermittel für Weißwedelhirsche (z. B. Äpfel, Mais, Karotten, Zuckerrüben, Kartoffeln und Heu) und isolierten *M. bovis* noch nach 112 Tagen auf Äpfeln, Mais und Kartoffeln. Duffield und Young (1985) konnten in ihrer Studie, mit artifiziiell inokulierter trockener und feuchter Erde sowie Rinderfaeces, nach vier Wochen keine *M. bovis* Kolonien mehr nachweisen.

2.2.3. *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*

Die Johne'sche Krankheit (Paratuberkulose) ist eine chronische granulomatöse, nicht therapierbare Enteritis der Wiederkäuer, die durch *MAP* verursacht wird. Abhängig von der Infektionsdosis und dem Alter des Tieres liegt die Inkubationszeit zwischen mehreren Wochen und Jahren (Sorge 2013). Der Erreger kommt weltweit vor und zeichnet sich durch ein - selbst für Mykobakterien - außerordentlich langsames Wachstum aus (Lamont et al., 2012). Die primäre Isolierung kann bis zu 12-16 Wochen dauern. Zudem benötigt *MAP* - als einziger Vertreter der Gattung *Mycobacterium* den Zusatz von Mycobactin zum Nährmedium. Diese Mycobactin-Abhängigkeit kann jedoch bei längerer Subkultivierung verloren gehen (Sorge 2013; Valentin-Weigand 2011).

Epidemiologie

Infektionen mit *MAP* haben eine große ökonomische Bedeutung, da es bereits im subklinischen Verlauf zu Leistungseinbußen bei infizierten Rindern führen kann, die sich im Progress noch weiter verstärken. Oft erfolgt die Infektion bereits im Jungtieralter, klinische Symptome treten jedoch erst beim adulten Tier auf (drei bis sieben Jahre). Dennoch findet die Erregerausscheidung bereits im subklinischen Stadium intermittierend über Kot, Milch, Kolostrum und Sperma statt. Die Übertragung erfolgt hauptsächlich auf fäkal-oralem Weg, aber auch Infektionen über Aerosole sind möglich (Eisenberg et al., 2010; Valentin-Weigand 2011). Die Prävalenzen von *MAP* sind sehr unterschiedlich. Die Prävalenz innerhalb der infizierten Herden liegt im Durchschnitt zwischen drei bis fünf Prozent (Sorge et al., 2011).

Im Jahr 2015 wurden dem Tierseuchen-Nachrichtensystem insgesamt 563 Paratuberkulose-Fälle gemeldet wovon 536 Rinder, 11 Schafe, 14 Ziegen und zwei andere Tierarten / Boviden waren. Bei Rindern ist Paratuberkulose in ganz Deutschland verbreitet und zeigt seit dem Jahr 2000 einen ansteigenden Trend.

Grundsätzlich sind alle Wiederkäuer für Infektionen mit *MAP* empfindlich. Es gibt jedoch auch Berichte über Infektionen beim Schwein, Hund, Esel und Affen. In Schottland wurde außerdem eine vergleichsweise hohe Prävalenz bei Wildkaninchen festgestellt, die also als mögliches Wildtierreservoir für *MAP* in Frage kommen könnten (Valentin-Weigand 2011). Ein zoonotisches Potenzial wird für *MAP* diskutiert, da verschiedene Studien Hinweise einer Beteiligung von *MAP* am Morbus Crohn des Menschen gefunden haben (Waddell et al., 2008).

Tenazität

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass *MAP* den Pasteurisierungsprozess überlebt. Bei einer Initialkonzentration von über 100 Bakterien pro Milliliter, konnten vermehrungsfähige *MAP* sowohl in pasteurisierter Milch, Milchpulver für Babynahrung, Roh- und Frischkäse als auch in Rindfleisch, der Umwelt sowie im Trinkwasser nachgewiesen werden (Aboagye und Rowe 2011; Lavers et al., 2012; Sung und Collins 1998). Bekannt ist außerdem, dass *MAP* auch nach einer High-Temperature-Short-Time Pasteurisation (HTST, 15 s bei 72 °C) funktionsfähig und kultivierbar bleibt. Die Ergebnisse von Shankar et al. (2010) zeigten, dass 67 % (18/27) der pasteurisierten Proben in der Kultur noch positiv waren.

Obwohl von *MAP* durch die HTST 5 log₁₀ Stufen und mehr inaktiviert werden können, ist es empfehlenswert, die Effizienz der HTST durch zusätzliche Behandlungen wie Homogenisierung, Bactofugation oder Mikrofiltrierung zu steigern bzw. zu verbessern. (Hammer et al., 2014).

Weitere Studien beschäftigten sich mit dem Vorkommen und Nachweis von *MAP* auf landwirtschaftlich genutzten Flächen. Salgado et al. (2011) fanden heraus, dass *MAP* in Sickerwasser im Frühjahr häufiger nachzuweisen war, als im Herbst. Des Weiteren wiesen sie nach, dass nach dem Ausbringen von Gülle unter Feldbedingungen, *MAP* tendenziell häufiger auf Gras, Grasschnitt sowie in den oberen Lagen von Weideland als im Untergrund nachzuweisen war. Dieser Umstand wurde dadurch belegt, dass lediglich drei der 126 untersuchten Untergrundkulturen *MAP* positiv waren. Somit besteht ein deutliches Übertragungs- und Infektionsrisiko für Weidetiere. Zudem kann Weideland durch erregerhaltigen Regenwasserabfluss kontaminiert werden.

2.2.4. *Coxiella burnetii*

Taxonomie

Das durch *Coxiella burnetii* hervorgerufene Q-Fieber (Query-Fieber oder Queensland-Fieber) ist eine ubiquitär vorkommende Zoonose mit komplexen Infektionswegen. Erstmals beschrieben wurde das Q-Fieber von Holbrook Derrick 1937 als Erkrankung beim Menschen in Brisbane, Queensland in Australien (Derrick 1983; Maurin und Raoult 1999). Aufgrund der Tatsache, dass der Erreger sich nur intrazellulär vermehren kann, wurde er zunächst den Rickettsien zugeordnet und als *Rickettsia burnetii* bezeichnet (Burnet und Freeman 1983). Auf Basis von kulturellen und biochemischen Eigenschaften wurde es von Philip in *Coxiella burnetii* umbenannt (Philip 1948).

Laut den Angaben des National Center for Biotechnology Information (NCBI) liegt derzeit folgende Klassifizierung vor:

Eubacteria

Proteobacteria

Gammaproteobacteria

Legionellales

Coxiellaceae

Coxiella

Coxiella burnetii

Morphologie und Pathogenität

C. burnetii ist ein kleines, polymorphes, gramnegatives Bakterium mit einer Länge von 0,4 - 1,0 μm und einem Durchmesser von 0,3 - 0,5 μm . Besondere Charakteristika sind der hohe GC-Gehalt von 43 % und das Überleben in Phagolysosomen. Dort herrscht ein pH-Wert von 4,5, der für den Metabolismus des Erregers notwendig ist (Lin et al., 1997).

Coxiellen sind obligat intrazelluläre Erreger, die sich nicht durch Zweiteilung vermehren, sondern einen Entwicklungszyklus im Phagolysosom der Wirtzelle durchlaufen.

Während seines Entwicklungszyklus tritt *C. burnetii* in zwei verschiedenen morphologischen Formen auf:

- Der Small Cell Variant (SCV), die metabolisch inaktiv, hochinfektiös und sehr widerstandsfähig ist.
- Der Large Cell Variant (LCV), die metabolisch aktiv und vermehrungsfähig ist.

Immer wieder diskutiert werden sporenähnliche Partikel, die sogenannten Spore Like Particles (SLP), die für die außerordentlich hohe Tenazität des Erregers verantwortlich gemacht werden (Straubinger und Selbitz 2011; Tigertt et al., 1961).

Die bisher bekannten Virulenzfaktoren bei *C. burnetii* sind Lipopolysaccharide (LPS) (Hackstadt 1990). Aufgrund von Strukturveränderungen in der Zellwand treten zwei Phasen auf. Dieses Phänomen ist ähnlich der rauen und glatten Variation der Enterobakterien und beruht auf einem partiellen Verlust des LPS (Hackstadt et al., 1985; Toman 1996). Im infizierten Wirt und der Natur tritt Phase I, die virulente Form, auf und besitzt ein stark verzweigtes LPS. Phase II, die avirulente Form, tritt nach 5 – 15 Passagen in der Zellkultur oder embryonierten Hühnereiern auf. Phase II ist weniger infektiös und weist eine gering verzweigte Struktur des LPS auf (Straubinger und Selbitz 2011; Tigertt et al., 1961). Die Aufnahme von *C. burnetii* erfolgt in der Regel aerogen und wird von den Makrophagen der Lunge phagozytiert. Nach Aufnahme des Erregers in Phagosomen der Wirtszelle, kommt es innerhalb der Phase II von *C. burnetii* zu einer vollständigen Verschmelzung von Phagosom und Lysosom. Nach der Verschmelzung etabliert sich eine mit Coxiellen gefüllte Vakuole (Hackstadt und Williams 1981).

Epidemiologie

C. burnetii wurde vermutlich kurz nach Ende des 2. Weltkrieges nach Deutschland eingeschleppt (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) 2010; Hilbert 2016). Hier wird die erste beschriebene Endemie in Süddeutschland (Bayern, Baden-Württemberg) von 1948 bis 1950 beschrieben. Es kam zu etwa 3000 humanen Erkrankungen und 20 Todesfällen. Für den Zeitraum zwischen 1948 und 1999 liegen Berichte von 40 Ausbrüchen in Süddeutschland (Bayern, Baden-Württemberg, Hessen, Rheinland-Pfalz) vor (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) 2010; Hellenbrand et al., 2001; Hilbert 2016). Eine komplette und detaillierte Übersicht über alle Q-Fieber Ausbrüche ist kaum machbar, da aufgrund der unspezifischen Krankheitssymptomatik beim Mensch und Tier die Dunkelziffer recht groß sein könnte (Hilbert 2016; Runge und Ganter 2008). Laut EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) (2010) muss zwar jeder Ausbruch von mehr als zwei Fällen von den örtlichen Behörden untersucht, aber nicht publiziert werden. In Deutschland ist laut Tierseuchengesetz der Nachweis von *C. burnetii* meldepflichtig. Beim Menschen gilt die Meldepflicht nach dem Infektionsschutzgesetz (IfSG § 7, Abs. 9) jedoch nur dann, wenn es

tatsächlich Hinweise auf eine akute Infektion gibt. Eine exemplarische Übersicht zu gemeldeten und bestätigten humanen Q-Fieber Fällen findet sich in Tabelle 1. Zusätzlich ist in Tabelle 2 exemplarisch eine Auswahl an publizierten Q-Fieber-Ausbrüchen dargestellt.

Tabelle 1: Gemeldete und bestätigte Q-Fieber Fälle beim Menschen

Land	2008			2007		
	Fälle gesamt	Bestätigte Fälle	Fälle/100.000	Fälle gesamt	Bestätigte Fälle	Fälle/100.000
Deutschland	370	370	0,5	83	83	0,1
Niederlande	1013	1011	6,2	168	168	1,03
Spanien	119	119	0,3	159	159	-
UK	40	40	<0,1	62	62	0,1

An das ECDC gemeldete und bestätigte Q-Fieber Fälle beim Menschen, 2007 – 2008 (Quelle: EFSA, 2010)

Tabelle 2: Zahlen humaner Q-Fieber-Ausbrüche in Deutschland

Jahr	Bundesland	Infektionsquelle	Fallzahl	Risikofaktoren
1982/1983	Thüringen	Wiederkäuer	156	direkter/indirekter Tierkontakt
04/1992 - 05/1992	Berlin	Schafe	80	direkter/indirekter Tierkontakt
1994	NRW	Schafe	>18	aerogene Exposition
01/1996 - 06/1996	Hessen	Schafe	56	direkter/indirekter Tierkontakt
1997	BW	Damwild	12	Tierkontakt
05/1999 - 08/1999	NRW	Schafdung	82	aerogene Exposition
12/2000 - 05/2001	NRW, Hessen	Schafe	75	Staubexposition
2001	Bayern	Schafe	3	Staubexposition
2003	NRW	Schafe	299	Tierkontakt
2003	BW	Rinder	8	Tierkontakt
07/2005 - 08/2005	Thüringen	Schafe	>331	aerogene Exposition
01/2008 - 03/2008	Hessen	Schafe	>46	aerogene Exposition
2008	Bayern	Schafe	>56	aerogene Exposition
2009	Westfalen	Schafe	5	Tierkontakt
2010	BW	k. A.	235	direkter Tierkontakt, Schafe, Ziegen

Darstellung ausgewählter Zahlen (in Anlehnung an EFSA, 2010)

Grundsätzlich kann jede infizierte Tierart eine mögliche Infektionsquelle für den Menschen sein, da *C. burnetii* ein großes Wirtsspektrum besitzt, zu welchen neben Arthropoden auch Vögel und Wildtiere gehören (Schliesser 1991). Das Hauptreservoir stellen domestizierte Wiederkäuer dar, wobei insbesondere kleine Wiederkäuer wie Schafe und Ziegen am häufigsten für Infektionen beim Menschen verantwortlich sind. Der weltweit größte Q-Fieber-Ausbruch bisher war die große Epidemie in den Niederlanden. Er ereignete sich zwischen den Jahren 2007 und 2010 mit 4000 gemeldeten humanen Erkrankungsfällen. Während dieser Ausbrüche zeigten epidemiologische Studien, dass mit *C. burnetii* infizierte Ziegen die primäre Quelle für humanes Q-Fieber darstellten (Hogerwerf et al., 2011; Hogerwerf et al., 2012; Karagiannis et al., 2009; Maurin und Raoult 1999; Van der Hoek et al., 2010). Zwischen dem Auftreten von Q-Fieber sind saisonale Unterschiede zu beobachten. In Europa liegt der saisonale Höhepunkt im Frühjahr und Frühsommer. In Deutschland könnte dieser Höhepunkt durch den im Frühjahr vorkommenden Hauptvektor *Dermacentor marginatus* (Schafszecke) begründet sein. *C. burnetii* zirkuliert in Naturherden zwischen Wildsäugetieren (Hauptreservoir) und Zecken, die nicht nur einen Vektor, sondern auch ein Reservoir darstellen (Liebisch et al., 1978). Die in Deutschland im Frühjahr auftretenden adulten Zecken saugen an größeren Wirtstieren, zu denen auch Rinder, Schafe und Ziegen zählen und können diese dadurch infizieren. Der Mensch kann sich aerogen über das Einatmen erregerehaltigen Staubes bzw. infizierten Zeckenkot anstecken oder durch den Kontakt mit infizierten Tieren, insbesondere in der Ablammsaison (Hellenbrand et al., 2001). Denn besonders im Anfangsstadium der Coxielleninfektion werden fast alle Körperparenchyme besiedelt, was wiederum eine Erregerausscheidung in Speichel, Milch, Kot, Harn und besonders großen Mengen in Fruchtwasser, Lochialflüssigkeit und Eihäuten nach sich zieht (Schaal 1985; Straubinger und Selbitz 2011). Im Jahr 2003 erkrankten etwa 300 Menschen in Nordrhein-Westfalen nach dem Besuch eines Bauernmarktes, weil dort ein infiziertes Schaf Zwillinglämmer zur Welt gebracht hatte (Porten et al., 2006b).

Nach derzeitigem Kenntnisstand hat die alimentäre Übertragung keine größere Bedeutung (Kimmig und Wagner-Wiening 2009). Dennoch gibt es Studien, die der alimentären Übertragung von Erregern ein nicht vernachlässigbares Risiko beimessen (Hilbert 2016; Karagiannis et al., 2009; Porten et al., 2006a). Dennoch wird vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) das Erhitzen von Rohmilch aus infizierten Rinder-, Schaf- und Ziegenbeständen empfohlen.

Zudem wird *C. burnetii* laut der Biostoffverordnung (BioStoffV) als infektiöses Agens der Risikogruppe 3 klassifiziert. Ferner stufen die Centers for Disease Control and Prevention (CDC) den Erreger aufgrund seiner Eigenschaften wie etwa der weltweiten Verfügbarkeit, der aerogenen Übertragung, der hohen Umweltstabilität sowie der sehr niedrigen

aerogenen Infektionsdosis (<10 Erreger) als bioterroristisches Agens der Gruppe B ein (Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2015; Frangoulidis 2012).

Tenazität

Wie die seuchenhaften Q-Fieber-Ausbrüche der letzten Jahre belegen, ist *C. burnetii* im Vergleich zu anderen Bakterien außerordentlich widerstandsfähig gegenüber Umwelteinflüssen, was die Verbreitung des Erregers begünstigt. Die hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen zeigt sich insbesondere in getrockneten Materialien. In Staub und trockener Wolle und einer Umgebungstemperatur von 4 °C liegt die Überlebensdauer zwischen ein und zwei Jahren. Steigt die Temperatur auf 20 °C, reduziert sich die Dauer auf sieben bis neun Monate (BfR 2010). Auch Philip (1963) zeigte, dass *C. burnetii* in der Lage ist, seine Vermehrungsfähigkeit bei 15 – 20 °C für sieben bis zehn Monate in Wolle, für mehr als einen Monat in Frischfleisch im Kühlhaus und mehr als 40 Monate in Magermilch bei Raumtemperatur zu behalten (Hilbert 2016; Philip 1963). In Tabelle 3 sind Daten zur Tenazität von Coxiellen in verschiedenen Umgebungen exemplarisch zusammengefasst.

Tabelle 3: Tenazität von *C. burnetii* in ausgewählten Milieus

	Temperatur	Tenazität
Organe	32 °C	49 – 182 d
Wasser	20 °C	160 d
Milch	4 – 6 °C	90 – 273 d
Butter, Weichkäse	20 °C	42 d
Staub/Wolle (trocken)	4 °C	1 – 2 Jahre
	20 °C	7 – 9 Monate
Zeckenkot (trocken)	4 °C	1 – 2 Jahre

nach Schliesser (1991)

Enright et al. (1957a, b) führten Studien die zur Etablierung von Empfehlungen zur Desinfektion von Milch zur Prophylaxe von Q-Fieber-Infektionen des Menschen durch. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass 143 °F (61,67 °C) über 30 min unzureichend für die Eliminierung lebensfähiger Coxiellen ist, wohingegen 145 °F (62,78 °C) über 30 min die Erreger sicher inaktiviert. Zudem konnten sie zeigen, dass die Standardpasteurisation bei 161 °F (71,67 °C) über 15 Sek. lebensfähige Coxiellen in Vollmilch zuverlässig inaktiviert. Auf Grundlage dieser Untersuchungen gelten laut Bundesgesetzblatt (BgbI) die heutigen Temperatur-Zeit-Kombinationen: 62 – 65 °C (30 – 32 min), 72 – 75 °C (15 – 30 Sek.),

Hoherhitzung im kontinuierlichen Durchfluss auf +85 °C bis +127 °C (mind. vier Sekunden), Ultraschallhitzung 135 – 150 °C (effektive Heißhaltezeit eine Sekunde).

Diagnostik

Der direkte Nachweis von *C. burnetii* erfolgt mikroskopisch, mittels Anzucht in der Zellkultur, mit molekularbiologischen Methoden oder über indirekte Nachweisverfahren mittels serologischen Antikörpernachweisen.

Für die Mikroskopie von histologischen Schnitten oder Originalausstrichen werden Färbungen nach Stamp, Gimenez, Giemsa und Köster oder Immunfluoreszenz Färbungen verwendet. Für die kulturelle Anzucht des Erregers in Zellkulturen eignen sich beispielsweise Buffalo-Green-Monkey-Kidney-Zellen (BGM), L-929 Fibroblasten oder Vero-Zellen. Die Anzucht darf nur in Laboratorien der Schutzstufe 3 erfolgen. Ein schnellerer und sensitiverer Nachweis kann mit Hilfe molekularbiologischer Methoden wie der PCR erfolgen. Entweder wird mit klassischer Gel-basierter Technik, oder mit Hilfe von real-time Varianten gearbeitet, bei welchen Coxiella-spezifischen Gene wie *IS1111* oder *com1* gesucht werden (Hoover et al., 1992; Klee et al., 2006; Lorenz et al., 1998; Seshadri et al., 2003). Aber auch serologische Methoden wie der ELISA oder der indirekte Immunfluoreszenztest (IFT) eignen sich zum Nachweis (Straubinger und Selbitz 2011).

2.2.5. Chlamydien

Taxonomie

Chlamydien wurden Anfang des 20. Jahrhunderts erstmals von Halberstädter und Von Prowazek (1907) als Erreger des Trachoms beschrieben (Hoffmann 2007). Lange Zeit wurden sie aufgrund ihrer geringen Größe für Viren gehalten und erst 1966 in die Ordnung der Chlamydiales den Bakterien zugeteilt (Lenzko 2012; Page 1966). Da ständig neue Chlamydienpezies, insbesondere in Umweltproben, gefunden werden unterliegt die Taxonomie einem steten Wandel. Die Sequenzanalysen der 16S- und 23S rRNA Gene sowie des *ompA*-Genes von Everett et al. (1999) führte zur Begründung einer neuen Chlamydientaxonomie. Die Unterteilung der *Chlamydiaceae* in zwei Genera wurde jedoch 2011 wieder aufgehoben und wieder im Genus *Chlamydia* vereint (Kuo und Stephens 2011).

Morphologie und Pathogenität

Chlamydien sind obligat intrazelluläre gram-negative Bakterien, gehören zur Familie der *Chlamydiaceae* und haben ein breites Krankheitsspektrum bei Menschen, Säugetieren und Vögeln. Sie sind unbeweglich und kokkoid und zeichnen sich durch ihren einzigartigen biphasischen Entwicklungszyklus aus. Dieser ist durch zwei unterschiedliche morphologische Formen charakterisiert: Die kleinen, extrazellulären infektiösen

Elementarkörperchen (EK; 0,3 µm) und die intrazellulären, nicht infektiösen, metabolisch aktiven Retikularkörperchen (RK; 0,5 – 1,6 µm) (Longbottom und Coulter 2003).

Der Entwicklungszyklus startet mit der Aufnahme in die Zelle der EK durch Endozytose. Die EKs werden im Endosom in die metabolisch aktiven RKs transformiert, wo sie sich zügig vermehren und vergrößern und das Endosom dadurch vergrößern. Nach etwa 24 bis 48 h – abhängig von der Spezies – differenzieren sich viele RKs wieder zu infektiösen EKs, die durch die Ruptur der Wirtszelle freigesetzt werden und Nachbarzellen infizieren (Longbottom und Coulter 2003; Moulder 1991; Ward 1988). Die medizinisch bedeutsamsten Spezies bei Mensch und Tier sind *Chlamydia (C.) trachomatis*, *C. pneumoniae*, *Chlamydophila (Ch.) psittaci*, *Ch. abortus* und *Simkania negevensis* (Straube 2009).

Epidemiologie

Chlamydien werden über Milch, Harn und Kot ausgeschieden und von anderen Tieren oral aufgenommen. Die Übertragung beim Menschen findet hauptsächlich über die Inhalation kontaminierter Aerosole statt. Epidemiologisch betrachtet spielen diese Übertragungswege jedoch eine untergeordnete Rolle. Besonders hohe Erregermengen werden beim Verlammen über die ausgestoßene Frucht, die Fruchthüllen und die Lochialflüssigkeit ausgeschieden.

Ch. psittaci und *Ch. abortus* sind als Zoonoseerreger klassifiziert. Infektionen beim Menschen mit *Ch. psittaci* ist als Ornithose eine meldepflichtige Erkrankung (§ 7 Infektionsschutzgesetz). *C. trachomatis* hingegen ist nur für den Menschen infektiös.

Ch. abortus kommt weltweit vor und führt insbesondere bei Schafen und Ziegen zu Aborten. Bei Rindern treten vor allem Fertilitätsstörungen auf. Das bedeutendste Erregerreservoir für *Ch. abortus* ist jedoch das Schaf (Behrens et al., 2001). Der positive Nachweis von Chlamydien bei Schafen, Ziegen und Rindern ist in Deutschland meldepflichtig. Bei Schafen und Ziegen führt der Erreger in der zweiten Trächtigkeitshälfte zu Aborten (enzootischer Schafabort), aber auch zu Frühgeburten und der Geburt lebensschwacher Lämmer. In der Regel entwickelt sich bei den Tieren eine Immunität, welche ein wiederholtes Verlammen verhindert. Der Infektionsprozess geht in den Schafherden innerhalb weniger Ablampperioden in ein latentes Stadium über (Salinas et al., 2009; Straube 2009; Straubinger und Selbitz 2011). Über Infektionen des Menschen, die Kontakt mit abortierenden Wiederkäuern hatten, existieren mehrere Fallberichte, wobei die Zahlen der gemeldeten Infektionen mit *Ch. abortus* beim Menschen sehr niedrig sind (Walder et al., 2005; 2003). Gefährdet sind vor allem schwangere Frauen, bei denen durch *Ch. abortus* respektive *Ch. psittaci* systemische Infektionen auftreten können. Im ersten Trimester führen Infektionen meist zum Abort, spätere Infektionen zu Früh- oder Totgeburten (Hyde und Benirschke 1997).

Tenazität

Chlamydien zeigen eine Abnahme der Tenazität mit zunehmender Temperatur. Untersuchungen konnten zeigen, dass Chlamydien bei -20 °C ein Jahr, bei Raumtemperatur (22 °C) einen Monat und bei 56 °C für fünf min überlebensfähig sind. Wohingegen *Ch. psittaci* auf Federn und in Kotstaub seine Infektiosität über Wochen nicht verliert (Hoffmann 2007; Page und Grimes 1984; Storz und Krauss 1985). Behrens et al. (2001) wiesen nach, dass bei Raumtemperatur infektiöse Elementarkörperchen nach 48 bis 72 h inaktiviert werden. UV-Strahlung beschleunigt diesen Prozess. Wird der Erreger erhitzt, so lassen sich bei einer Temperatur von 60 °C nach 10 min keine infektiösen Chlamydien mehr nachweisen. Bei normalen Umgebungstemperaturen bleiben die EK in Nachgeburten, Vaginalsekret oder Einstreu für ca. zehn bis 25 Tage infektiös. In verseuchten Ställen konnten infektiöse Chlamydien jedoch erst nach fünf Wochen nicht mehr nachgewiesen werden (Behrens et al., 2001).

Diagnostik

Der direkte Nachweis von Chlamydien erfolgt mikroskopisch, mittels Anzucht in der Zellkultur, mit molekularbiologischen Methoden oder über indirekte Nachweisverfahren mittels serologischen Antikörpernachweisen. Für die Anzucht in Zellkulturen eignen sich HeLa-Zellen, McCoy-Zellen oder BGM-Zellen. Vorteil dieser Methode ist der Nachweis lebens- und vermehrungsfähiger Chlamydien. Handelt es sich um große Erregermengen, so kann der Antigennachweis direkt aus Tupfer- bzw. Organausstrichen mittels einer modifizierten Ziehl-Neelsen-Färbung erfolgen. Bei dieser Art von Färbung stellen sich die Chlamydieneinschlüsse rot dar. Um eine Differenzierung zu Coxiellen zu ermöglichen können Immunfluoreszenzfärbungen zum Einsatz kommen. Ebenso können molekularbiologische Methoden wie die multiplex - oder real-time PCR zum Einsatz kommen (Berri et al., 2009; Kreizinger et al., 2015). Indirekt können Chlamydien auch über eine Antikörperbestimmung nachgewiesen werden (Straubinger und Selbitz 2011).

2.3. Übersicht der verwendeten viralen Pathogene

2.3.1. Equines Rhinitis A Virus

In der vorliegenden Arbeit wurde das Equine Rhinitis A Virus (ERAV) als Surrogatvirus zum MKS-Virus verwendet, da das Arbeiten mit dem MKSV aufgrund seiner hohen Kontagiosität nur in Laboratorien der Sicherheitsstufe 4 gestattet ist. Das ERAV ist ubiquitär verbreitet und besitzt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ein breites Wirtsspektrum. Von Bedeutung ist auch die sehr enge phylogenetische Verwandtschaft mit dem hochkontagiösen Virus der MKSV. Aufgrund dessen soll die Übertragbarkeit der Ergebnisse dieser Arbeit gewährleistet werden.

Taxonomie

Das ERAV (früher als equines Rhinovirus 1 bezeichnet) ist ein unbehülltes Virus und besitzt eine Positivstrang-RNA als Genom und gehört zum Genus *Aphthovirus* innerhalb der Familie *Picornaviridae*. Diese Familie wird aktuell in 26 Gattungen eingeteilt. Aufgrund dieser Vielzahl werden die Picornaviren in viele Subtypen unterteilt, da sie sich durch eine große Oberflächenvarianz und der damit einhergehenden antigenetischen Variabilität auszeichnen. Die Einteilung der *Picornaviridae* erfolgt in zwei große Untergruppen, da deren molekulare Eigenschaften eng mit der Pathogenese verknüpft sind. Die Untergruppe der säurestabilen Erreger ist in der Lage, das saure Milieu des Magens ohne Infektiositätsverlust zu überstehen und infiziert den Organismus daher bevorzugt über den Verdauungstrakt. Bei der zweiten Untergruppe, den säurelabilen Vertretern, manifestiert sich die Infektion bevorzugt über den Hals-Nasen-Rachen-Raum. Weitere, in der Familie *Picornaviridae* vorkommende Vertreter sind Enteroviren, Hepatoviren, Rhinoviren und Cardioviren (Hoferer 2001; Tuthill et al., 2009). Das ERAV ist das einzige nicht-Maul- und-Klauenseuche-Virus des Genus *Aphthovirus*. Zudem beinhaltet das Genus auch die verschiedenen Serotypen des Maul- und-Klauenseuche-Virus (MKS-V). Hinzu kommt die hohe Ähnlichkeit der Nukleotidsequenz des ERAV Genoms mit dem des MKS-Virus (Haas 2011; Li et al., 1996; Wutz et al., 1996). Darüber hinaus teilen das MKS-Virus und ERAV zahlreiche biochemische Eigenschaften wie beispielsweise die Säurelabilität (Li et al., 1996).

Epidemiologie

Das ERAV ist ubiquitär verbreitet und ist nicht obligat an eine Spezies gebunden. So sind neben Pferden auch Kaninchen, Meerschweinchen, Dromedare, Affen und der Mensch empfindlich für Infektionen (Plummer 1963). Seroprävalenzraten für equine Rhinitisviren liegen zwischen 20 und 90 % (Haas 2011). Bei ERAV-spezifischen Antikörpern in Pferdezüchtern korreliert die Seroprävalenz mit dem Alter der Tiere und liegt zwischen 16 – 19 Prozent. Es wird vermutet, dass die Erstinfektion in den meisten Fällen vermutlich innerhalb der ersten zwei Lebensjahre stattfindet (Black et al., 2007; Kriegshäuser et al., 2005; Studdert und Gleeson 1978). Ausgeschieden wird das Virus von infizierten Pferden über den Kot und Harn sowie über den Rachenraum. Zudem wird eine Übertragung durch Aerosole vermutet (Haas 2011; Plummer 1963). Aufgrund des breiten Wirtsspektrums, das auch den Menschen einschließt, empfiehlt das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit daher, dass das ERAV als Spender- und Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten der Risikogruppe 2 zugeordnet wird (§ 5, Abs. 1 GenTSV i. V. m. den Kriterien im Anhang I GenTSV).

Tenazität

Wie alle unbehüllten Viren, weist das ERAV, wie auch sein enger Verwandter das MKSV, eine besonders ausgeprägte Tenazität auf, wobei beide Viren eine Säurelabilität aufweisen. In Studien mit MKSV, die sich mit der Sensitivität gegenüber verschiedenen Temperatur-Zeit-Kombinationen beschäftigten, zeigte sich, dass das Virus (Ausgangstitel $10^{4.5}$ Viren pro Milliliter) bei 5 °C mehr als 14 Wochen infektiös blieb und bei 20 °C nur noch zwei Wochen. Es kann deshalb von einer Temperatur-Zeit-abhängigen Reduktion der Infektiosität ausgegangen werden. Weitere Faktoren von denen die Tenazität abhängig ist, sind neben dem physikalischen Aufbau der Viruspartikel, u. a. auch organische Begleitsubstanzen, der pH-Wert, physikalische Eigenschaften der Oberfläche, Temperaturschwankungen, Lichteinstrahlung oder der Feuchtigkeitsgehalt. Die Anwesenheit von Proteinen kann eine schützende Wirkung auf die Viren ausüben (Uhlenhaut 2005).

In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das MKSV in Ausscheidungen sehr lange infektiös bleiben kann. Dazu wurden MKSV (Initialtitel $10^{4.8}$ TCID₅₀/50 µl) in Schweine- und Rindergülle unter anaeroben Bedingungen über mehrere Wochen bei verschiedenen Temperaturen gelagert und in regelmäßigen Abständen beprobt. Das Ergebnis zeigte einen deutlich Temperatur-Zeit-abhängigen Infektiositätsverlust. In Schweinegülle konnten bei 40 °C (10 h), 45 °C (5 h), 50 °C (1 h), 55 °C (1 h) keine infektiösen Viren mehr nachgewiesen werden. Bei geringeren Lagerungstemperaturen von MKSV in Schweinegülle bei 5 °C waren nach > 14 Wochen bzw. 20 °C nach zwei Wochen keine infektiösen Viren detektierbar. In Rindergülle konnten bei einer Temperatur von 55 °C nach > 1 h keine infektiösen MKSV nachgewiesen werden und bei 20 °C betrug die Zeit bis zum Infektiositätsverlust 3 Wochen respektive > 24 h bei 35 Grad Celsius (Biermann et al., 1990; Bötner und Belsham 2012; Haas et al., 1995; Uhlenhaut 2005).

Diagnostik

ERAV kann von Tupferproben aus der Nase, Blut-, Faeces- und Urinproben isoliert werden. Der direkte Nachweis von ERAV erfolgt in Zellkulturen, mit molekularbiologischen Methoden oder über indirekte Nachweisverfahren mittels serologischer Untersuchungen. Für die Anzucht in Zellkulturen eignen sich sowohl equine Zelllinien wie equine foetal kidney (EFK), als auch RK-13 (rabbit kidney) und African green monkey (Vero) Zelllinien. Vorteil dieser Methode ist der Nachweis lebens- und vermehrungsfähiger Viren. Der molekularbiologische Nachweis kann mittels einer RT-PCR erfolgen. Für serologische Untersuchungen können Virusneutralisationsassays (gepaarte serologische Tests) verwendet werden. Ebenfalls können Antigen ELISAs für den Nachweis viraler Antigene eingesetzt werden. Ein Impfstoff ist derzeit nicht verfügbar (Haas 2011).

2.3.2. Bovines Virusdiarrhoe Virus/Mucosal Disease

Das zu den Pestiviren gehörende Bovine Virusdiarrhoe Virus (BVDV)/Mucosal Disease (MD) ist weltweit verbreitet und neben dem eng verwandten Klassischen Schweinepestvirus (KSPV) eine der wirtschaftlich bedeutsamsten Infektionskrankheiten. Beide, BVDV und KSPV, verursachen eine Vielzahl von Erkrankungen bei Nutztieren. In dieser Arbeit wurde das BVDV als Surrogatvirus für das KSPV verwendet, da BVDV auch in der Lage ist auch Nicht-Wiederkäuer zu infizieren und dadurch ein breiteres Wirtsspektrum besitzt. Dies ist im Hinblick auf das epidemiologische Potential für diese Arbeit von Bedeutung.

Seit 2004 ist BVD/MD in Deutschland eine anzeigepflichtige Tierseuche. Die Verordnung zum Schutz der Rinder vor einer Infektion mit dem Bovinen Virusdiarrhoe-Virus (BVDV) legt fest, dass alle Rinder entweder bis zur Vollendung des sechsten Lebensmonats oder aber vor dem Verbringen aus einem Bestand auf BVDV zu testen sind, so dass persistent infizierte Rinder identifiziert werden können, um so BVDV-unverdächtige Bestände zu schützen.

Taxonomie

Das BVDV ist ein behülltes Virus, mit einer positiven Einzelstrang-RNA als Genom. Es gehört zur Familie *Flaviviridae*. Diese Familie besteht aus drei Genera: dem *Pestivirus*, *Flavivirus* und *Hepacivirus*. Zum Genus *Pestivirus* gehören neben BVDV auch das Border Disease Virus (BDV) und das KSPV. Das BVDV wird in zwei Genotypen eingeteilt: BVDV-1 und BVDV-2 (Schweizer und Peterhans 2014). Innerhalb dieser beiden Gruppen werden jeweils mehrere Subgruppen unterschieden, welche durch kleine Buchstaben fortlaufend beschrieben werden, wie beispielsweise BVDV-1a (Polak et al., 2014; Thiel und König 2011). Die beiden Spezies BVDV-1 und BVDV-2 unterscheiden sich unter anderem in ihren Nukleotidsequenzen und antigenetischen Eigenschaften, sowie in ihrer Wirkung auf die Wirtszelle. Zudem existieren zwei sogenannte Biotypen: cytopathogene (cp) und nicht-cytopathogene (ncp) Stämme (Brownlie 1990). Das cp BVDV führt in der Zellkultur zur Vakuolisierung und Lyse der Zellen, wohingegen das ncp BVDV nicht zellschädigend ist (Schweizer und Peterhans 2014; Underdahl et al., 1957). In der Natur kommt das ncp BVDV häufiger vor und ist für den Großteil der BVD-bedingten Schäden verantwortlich. Dennoch besitzen die beiden Genotypen Gemeinsamkeiten, denn sowohl BVDV-1 als auch BVDV-2 sind in der Lage schwere Erkrankungen auszulösen, wobei in 70 bis 90 % der Fälle ein asymptomatischer Verlauf zu beobachten ist. Das ncp BVDV wird häufig bei akuten Infektionen nachgewiesen und doch scheint es gleichzeitig auch für persistente Infektionen verantwortlich zu sein. Das cp BVDV wird vor allem bei der tödlich verlaufenden Form der MD nachgewiesen. Die Virulenz der ncp-Form ist nicht geringer, als die cp-Form des Virus. Zu Beginn der 90er Jahre wurde das Severe Acute BVD (ncp BVDV-2) nachgewiesen, dessen beider Biotypen sowohl wenig aggressive, als auch hochaggressive Stämme

besitzt. Alle hochvirulenten BVDV-2 Stämme sind dabei von nicht-cytopathogener Natur. Durch genetische Rekombination ist es möglich, dass aus ncp Viren cp Viren hervorgehen. Durch die Mutation des cp Virus besitzt es dieselben antigenetischen Eigenschaften wie das ncp Virus, aus dem es hervorging. Diese Tatsache ist besonders in Bezug auf die Entstehung von MD relevant, da eine persistierende Infektion mit ncp BVDV die notwendige Voraussetzung für die Entstehung der MD ist. Diese, immer tödlich verlaufende, Infektionskrankheit tritt bei Rindern üblicherweise im Alter von sechs Monaten bis zwei Jahren auf (Thiel und König 2011; Wegmüller 2006).

Epidemiologie

Epidemiologisch betrachtet ist das BVDV ausgesprochen erfolgreich. Aufgrund seiner weltweiten Verbreitung, sowie des hohen Durchseuchungsgrads besitzt es unter den tierpathogenen Viren eine Sonderstellung. Die Seroprävalenz in Deutschland lag vor Einführung des effizienten Bekämpfungsprogramms bei etwa 60 - 90 Prozent. Das Virus ist unter natürlichen Bedingungen in der Lage Rinder, Schafe, Ziegen, Wildwiederkäuer und Schweine zu infizieren. Der Erfolg des Erregers ist durch die Kombination zweier bekannter Strategien begründet: Zum einen die „hit and run“ und zum anderen die „infect and persist“ Strategie (Schweizer und Peterhans 2014). Beide Strategien werden von Viren häufig angewendet, jedoch äußerst selten in Kombination. Im Falle von BVDV äußert sich die „hit and run“-Strategie über eine transiente Infektion, die oft asymptomatisch verläuft. Durch die Bildung von Antikörpern sind die Tiere für den Rest ihres Lebens vor einer BVD-Erkrankung geschützt. Die zweite Strategie, „infect and persist“, ist bei BVDV insoweit einzigartig, da das Virus das Immunsystem des Wirts vollständig umgeht. Dies ist dadurch möglich, dass es den Fetus bereits vor Erreichen der Immunkompetenz infiziert. Das Trächtigkeitsstadium spielt jedoch eine wichtige Rolle bei der Infektion, aber sie beeinträchtigt die Entwicklung des Fetus nicht. Je nach Trächtigkeitsstadium kann sich zwischen dem 40. und 120. Trächtigkeitstag eine persistierende Infektion (PI) etablieren, weshalb der Fetus eine Immuntoleranz gegenüber dem Virus entwickelt (Thiel und König 2011; Wegmüller 2006). Diese PI-Tiere scheiden das Virus lebenslang in großen Mengen nicht nur über Kot und Speichel, sondern auch über andere Körpersekrete aus und stellen somit ein wichtiges Virusreservoir dar. Der Anteil an PI-Tieren der gesamten Rinderpopulation in Deutschland lag bis vor wenigen Jahren bei etwa ein bis zwei Prozent. Die Aufnahme des Virus erfolgt hauptsächlich oronasal. Doch seit Ende 2010 wird der BVD-Status neugeborener Kälber mittels Ohrstanzgewebeproben festgestellt. So wird der Status des Kalbes schon in den ersten Lebenstagen und gleichzeitig auch der Muttertiere bestimmt (Drössler et al., 2010). Bedeutend für die Epidemiologie und Bekämpfung des Virus ist, dass es nicht obligat wirtsgebunden ist und neben Rindern auch Schafe, Ziege, Schweine oder Weißwedelhirsche infizieren kann (Passler und Walz 2010; Ridpath und Passler 2016;

Schweizer und Peterhans 2014). Die Bekämpfung von BVD/MD kann über eine Impfung mit Tot- oder Lebendimpfstoffen erfolgen. Weltweit wird die Impfpolitik verschieden gehandhabt. Der Einsatz von Impfstoffen bei BVDV ist nach wie vor umstritten. Hierzu trägt zum einen die große antigene Vielfalt bei und zum anderen können deshalb fetale Infektionen trotz Impfung nicht verhindert werden (Bachofen et al., 2008; Schweizer und Peterhans 2014). Das Entscheidende bei Impfungen gegen BVD/MD ist, diaplazentare Infektionen zu verhindern, weshalb bei der Impfung von tragenden Tieren Vorsicht geboten ist, da Lebendimpfstoffe zu diaplazentaren Infektionen führen können. Zudem scheiden – mit dem Lebendimpfstoff - geimpfte Tiere ebenfalls Erreger aus, die dann wieder auf empfängliche Tiere übertragen werden können (Schweizer und Peterhans 2014; Thiel und König 2011).

Tenazität

Wie alle behüllten Viren weisen Pestiviren eine geringere Tenazität auf, als unbehüllte Viren und können so durch milde Desinfektionsmittel inaktiviert werden. Bei einem Desinfektionsmittel, welches zu $\geq 90 - \leq 100$ (% w/w) aus Ethanol besteht, beträgt die Inaktivierungszeit 30 Sekunden. Die thermische Stabilität des BVDV ist so gering, dass bereits nach vier Tagen bei 37 °C bzw. nach 45 min bei 56 °C keine Infektiosität mehr nachweisbar ist (Wegmüller 2006). Bøtner und Belsham (2012) wiesen in ihrer Studie nach, dass das BVDV (Initialkonzentration $10^{5.2}$ TCID₅₀/50 µl) in Rindergülle bei einer Temperatur von 5 °C nach drei Wochen, bei 20 °C nach drei Tagen und bei 35 °C nach drei Stunden inaktiviert werden kann. Bei Temperaturen von 40 ° bis 55 °C lag die Inaktivierungsdauer zwischen fünf und 50 Minuten. Zusätzlich wurde BVDV in Eagles's minimum essential medium (EMEM) mit derselben Initialkonzentration wie in Rindergülle suspendiert. Die Ergebnisse zeigten hier eine deutlich verlängerte Periode bis zur Inaktivierung: 5 °C (> 6 Wochen), 20 °C (> 2 Wochen), 35 °C (> 5 h), 40 °C (> 2 h), 45 °C (> 60 min), 50 °C (> 50 min), 55 °C (> 40 min) (Bøtner und Belsham 2012). Alle Studien zeigen eine deutliche Temperatur-Zeit-abhängige Inaktivierung der Viren.

Wie zu Beginn dieses Kapitels erwähnt, wurde in dieser Arbeit das BVDV als Surrogatvirus für KSPV verwendet. Der Vollständigkeit halber werden auch Studien zur thermalen Inaktivierung mit dem KSPV dargestellt. In der Studie von (Bøtner und Belsham 2012), welche u. a. mit dem KSPV durchgeführt wurde zeigte sich, dass KSPV unter anaeroben Bedingungen zwei Wochen bei 20 °C und mehr als sechs Wochen bei 5 °C in Schweinegülle überlebt.

Eine Studie mit KSPV in Schinken zeigte, dass bereits nach einer Minute bei 71 °C sowohl in frischem, als auch in Dosenschinken kein Virus mehr nachweisbar war. In Dosenschinken wurde das Virus bei einer Innentemperatur von 65 °C nach 90 Minuten inaktiviert (Stewart et al., 1979). Zudem überlebt das KSPV - abhängig vom Stamm und

des initialen Virustiters - auch längere Perioden in Faeces. In einer Studie von Weesendorp et al. (2008) wurden Faeces und Urin von experimentell mit KSPV inokulierten Schweinen zwischen Tag 5 und 36 nach Inokulation gesammelt und bei 5, 12, 20 und 30 °C gelagert. Abhängig von der Temperatur, Substrat (Faeces, Urin) und Virustyp (moderat virulent, **hochvirulent**) war das KSPV zwischen wenigen Stunden und 66 Tagen überlebensfähig. Je höher die Temperatur, umso geringer war die Überlebensdauer: Bei 30 °C waren es in Faeces 0,6 (**0,85**), in Urin 1,6 (**1,4**) Tage. Betrug die Lagertemperatur der Faeces 20 °C bzw. 5 °C so waren nach 3,5 (**4,8**) bzw. 47 (**66**) Tagen keine Erreger mehr nachweisbar. Lag die Lagertemperatur des Urins zwischen 20 °C und 5 °C so waren nach 2,1 (**1,8**) bzw. 23 (**20**) Tagen keine KSPV mehr nachzuweisen.

Diagnostik

Der direkte und auch sensitivste Nachweis gelingt durch die Virusisolierung/Virusvermehrung in Zellkulturen. Als Zelllinien eignen sich neben BT- (Bovine turbinate, Nasenmuschel), Btest (Bovine testicle, Hoden), MDBK (Madin Darby Bovine kidney, Nieren) und PK-15- (Porcine kidney, Nieren) Zellen. Für die Identifikation eines BVDV-Isolats kann der Nachweis der viralen Antigene in den infizierten Kulturzellen beispielsweise mittels Immunfluoreszenz erfolgen. Aus der Virusvermehrung ergibt sich noch ein weiterer Vorteil: es steht genügend Material für weitergehende Untersuchungen wie die Differenzierung von BVDV-1 und BVDV-2 und die molekulare Charakterisierung zur Verfügung. Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis des Erregers stellen ELISA-Verfahren dar, welche sich durch einen hohen Probendurchsatz und kurze Bearbeitungszeiten hervorheben. Allerdings unterliegen sie in ihrer Sensitivität der Virusvermehrung. Ein Verfahren, welches sich ebenfalls durch seine Sensitivität und geringeren Zeitaufwand auszeichnet, ist die Real Time Reverse Transkription/Polymerasekettenreaktion (Real-Time-RT-PCR). Geeignetes Probenmaterial sind Blut-, Tupfer-, Milch- und Ohrstanzproben (Thiel und König 2011).

3. Material und Methoden

3.1. Verwendete Bakterien- und Virusstämme sowie Zelllinien

Nachfolgend sind in Tabelle 4 bis Tabelle 6 die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien- und Virusstämme sowie Zelllinien aufgeführt.

Tabelle 4: Zusammenstellung der verwendeten Bakterienstämme

Spezies	Bezeichnung	Herkunft	Einstufung nach Schutzstufe
<i>Mycobacterium bovis</i>	10-11014-00074	LGL Oberschleißheim, Rind	3
<i>M. bovis</i>	10-11014-00073	LGL Oberschleißheim, Rind	3
<i>M. caprae</i>	13-0108370-001	LGL Oberschleißheim, Rotwild	3
<i>M. caprae</i>	11/0028	LGL Oberschleißheim, Rotwild	3
<i>M. caprae</i>	11/152461	LGL Oberschleißheim, Rind	3
<i>M. caprae</i>	12/52799	LGL Oberschleißheim, Rind	3
<i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	1351 (DSM 44135)	DSMZ Braunschweig, Rind	2
<i>Coxiella burnetii</i>	Z104/13 „Junica“	Institut für Hygiene & Infektionskrankheiten der Tiere, JLU Gießen, Schaf	3
<i>Chlamydophila abortus</i>	OCLH196	Hoelzle et al., 2000, Schaf	2

Tabelle 5: Zusammenstellung der verwendeten Viren

Viruspezies	Isolat-Bezeichnung	Herkunft
Bovines Virusdiarrhoe Virus	Oregon C24V	VemieVeterinär-Chemie, Impfstamm
Equines Rhinitis A Virus	-	Stammsammlung des Fachgebiets Infektions- und Umwelthygiene; Pferd

Tabelle 6: Zusammenstellung der verwendeten Zelllinien

Zellen	Gewebe	Spezies	Herkunft
Buffalo-Green-Monkey-kidney Zellen (BGM-Zellen)	Niere	Affe	Friedrich-Löffler-Institut Greifswald, Insel Riems
Vero-Zellen	Niere	Affe	ATCC CCL-81
Porcine-kidney Zellen (PK-15)	Niere	Schwein	FLI Greifswald, Insel Riems

3.2. Vermehrung der Bakterien

Mykobakterien – *M. bovis*, *M. caprae*, *M. avium* ssp. *paratuberculosis*

Löwenstein-Jensen Nährboden mit Glycerin und Polymyxin B, Amphotericin B, Carbenicillin,

Trimethoprim Laktat (PACT) (Oxoid, Wesel, Deutschland)

Stonebrink Medium mit Pyruvat und PACT (Oxoid, Wesel, Deutschland)

Herrold's Egg Yolk Agar mit Amphotericin, Nalidixinsäure, Vancomycin und Mycobactin J (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg Deutschland)

Die Isolate *M. bovis* und *M. caprae* wurden auf Schrägagar nach Löwenstein-Jensen und Stonebrink alle sechs bis acht Wochen subkultiviert.

Das *M. avium* ssp. *Paratuberculosis*-Isolat wurde auf Herrold's Egg Yolk Medium (HEYM mit Mycobactin) alle acht bis zehn Wochen subkultiviert.

Alle Arbeiten mit *M. bovis* und *M. caprae* erfolgten unter Stufe 3 – Laborbedingungen.

3.3. Vermehrung der Viren und der obligat intrazellulären Bakterien

3.3.1. Kultivierung von Säugerzellen

Zellkulturmedium

500 ml Minimum Essential Medium (MEM) Flüssigmedium mit Earle's Salzen, mit 2,2 g/l NaHCO₃, mit stabilem Glutamin (500 ml) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) wurde supplementiert mit

0,2 % Penicillin/Streptomycin (Konz. Stammlösung 10.000 U/ml) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

0,4 % Amphotericin B (Konz. Stammlösung 100 µg/ml) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

0,2 % Gentamycinsulfat (Konz. Stammlösung 10.000 µg/ml) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

10 % Fötale Kälberserum (FKS) inaktiviert (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

1 % nicht essentielle Aminosäuren (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

Für die Vermehrung des ERAV wurden Vero-Zellkulturen verwendet, für das BVDV wurde mit PK-15 Zellen gearbeitet. Die beiden obligat intrazellulären Bakterien *C. burnetii* und *Chlamydomphila abortus* wurden BGM-Zellen verwendet. Für das BVDV wurde mit PK-15

Zellen gearbeitet. Sobald die Zellen zu einem konfluenten Zellrasen ausgewachsen waren (ca. drei bis vier Tage), erfolgte entweder eine Subkultivierung oder Erhaltung der Zellen. Die Beurteilung erfolgte mit einem inversen Mikroskop.

Subkultivierung von Zellen

Zellkulturmedium

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) Dulbecco ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

Trypsin-EDTA (0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA - Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

Die verwendeten Zellkulturen wurden in regelmäßigen Abständen (ca. drei bis vier Tage) passagiert. Dazu wurden die Zellen enzymatisch mit Hilfe von Trypsin/EDTA aus dem Monolayer gelöst. Hierfür wurde zunächst das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen mit Trypsin/EDTA (1:10) für drei bis zehn min bei 37 °C inkubiert. Das Trypsin/EDTA wurde durch Zugabe von frischem Anzuchtmedium inaktiviert. Die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung nach Zugabe von Zellkulturmedium wieder inkubiert.

Einfrieren von Zellen

Zellkulturmedium

10 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

Trypsin-EDTA (0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt, mit mindestens der doppelten Menge an Anzuchtmedium suspendiert und bei 300 x g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium (Medium + DMSO) resuspendiert. Die Zellzahl lag bei 10^6 bis 10^7 Zellen pro Milliliter. Von dieser Zellsuspension wurden etwa 1,5 ml in sterile Einfrier-Gefäße pipettiert. Diese wurden dann für etwa 15 min im Kühlschrank bei 4 °C zwischengelagert, um das Eindringen des Einfriermediums in die Zellen zu gewährleisten und dann bei -80 °C eingefroren.

3.3.2. Infektion der Zellen

Equines Rhinitis A Virus, Bovines Virusdiarrhoe Virus

Zellkulturmedium

2 % Fötale Kälberserum (FKS) inaktiviert (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

Die Virusvermehrung erfolgte in mittleren Zellkulturflaschen (75 cm²). Es wurden Zellkulturen die, zu mind. 80 % konfluent waren, verwendet. Das Medium wurde entfernt und die Zellkulturen mit zwei Milliliter des ERAV- bzw. BVDV Inokulums infiziert. Der Titer

des Inokulums lag beim ERAV zwischen 10^7 und 10^8 Viren pro Milliliter und beim BVDV zwischen 10^5 und 10^6 Viren pro Milliliter. Die Flaschen wurden kurz geschwenkt und für eine Stunde bei 37 °C (5 % CO₂) inkubiert. Anschließend wurde frisches Zellkulturmedium hinzugefügt und die Flaschen wieder bei 37 °C (5 % CO₂) für vier bis sieben Tage (ERAV) respektive bis zu zehn Tagen (BVDV) inkubiert und täglich auf cytopathische Effekte (cpE) mit Hilfe des Lichtmikroskopes kontrolliert. Bei einem cpE > 75 % wurden die Zellkulturflaschen bei -80 °C eingefroren. Um die Viren freizusetzen, wurden die Zellkulturflaschen dreimal eingefroren und wieder aufgetaut. Anschließend wurde die Virus-Zellsuspension bei 1700 x g für 15 min zentrifugiert um die Viren von den Zelltrümmern zu trennen. Die virushaltigen Überstände wurden aliquotiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Coxiella burnetii

Zellkulturmedium

3 % fötalem Kälberserum (FKS) inaktiviert (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

Die Vermehrung von *C. burnetii* wurde im Labor unter Sicherheitstufe 3 Bedingungen durchgeführt. Hierzu wurde 500 µl Coxiellensuspension in die vorbereiteten Zellkulturflaschen pipettiert und für eine Stunde bei 37 °C (5 % CO₂) inkubiert. Anschließend wurde frisches Zellkulturmedium hinzugefügt. Nach einer Inkubation von sieben Tagen bei 37 °C (5 % CO₂) und täglicher lichtmikroskopischer Kontrolle wurden die infizierten Zellen mittels Gefrier-Tauen (2 x) aufgeschlossen und die Zelltrümmer abzentrifugiert (300 x g, 5 min, 4 °C). Das entstandene Lysat wurde als Inokulum für weitere Zellkulturflaschen (75 cm²) verwendet. Nach jeweils vier Tagen erfolgte ein Mediumwechsel, bei dem die Überstände der infizierten Zellen geerntet wurden und bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Chlamydophila abortus

Zellkulturmedium

3 % fötalem Kälberserum (FKS), inaktiviert (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

Die Bakterienvermehrung erfolgte in mittleren Zellkulturflaschen (75 cm²). Es wurden Zellkulturen die, zu mind. 80 % konfluent waren, verwendet. Das Medium wurde entfernt und die Zellkulturen mit zwei Milliliter des *Ch. abortus*-Inokulums infiziert. Die Flaschen wurden kurz geschwenkt und für eine Stunde bei 37 °C (5 % CO₂) inkubiert. Anschließend wurde frisches Zellkulturmedium hinzugefügt und die Zellkulturflaschen wieder bei 37 °C (5 % CO₂) für drei bis vier Tage inkubiert. Der cpE wurde täglich lichtmikroskopisch kontrolliert. Bei einem cpE von > 75 % wurden die Zellkulturflaschen bei -80 °C eingefroren. Um die Chlamydien aus den Zellen freizusetzen, wurden die Zellkulturflaschen dreimal eingefroren

und wieder aufgetaut. Anschließend wurde die Virus-Zellsuspension bei 1700 x g für 15 min zentrifugiert um die Viren von den Zelltrümmern zu trennen. Die bakterienhaltigen Überstände wurden aliquotiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

3.4. Methoden zur Inaktivierung: Lagerung und thermische Inaktivierung

Für die Evaluierung der Hygienisierungseffekte durch Temperatur und Lagerung im Labormaßstab, wurden neben der rein thermischen Inaktivierung auch die Auswirkungen der Lagerdauer bei verschiedenen Umgebungstemperaturen untersucht (Lagerungsversuche). Zusätzlich wurde der Einfluss der Gärrest-Zusammensetzung auf das Inaktivierungsverhalten der verwendeten Pathogene analysiert. Eine Übersicht über die Zusammensetzung der verwendeten Substrate ist in Tabelle 7 dargestellt. Die Ergebnisse der Analyse durch die Landesanstalt für Landwirtschaftliche Chemie sind in Tabelle 8 dargestellt. Die Substrate wurden von Biogasanlagen aus dem Umland bezogen. Die Lagerungsversuche wurden sowohl mit Mykobakterien als auch mit Viren durchgeführt und fanden unter Berücksichtigung der jeweiligen Schutzstufen statt, denen die einzelnen Erreger zugeordnet sind. Zudem wurde jeder Versuch dreimal wiederholt.

Tabelle 7: Zusammensetzung der verwendeten Substrate

Substrate	Zusammensetzung
Substrat 1 (S1)	60 % Schweinegülle 40 % nachwachsende Rohstoffe
Substrat 2 (S2)	60 % Rindergülle 40 % Gemisch aus Pferde-, Rinder-, Geflügelmist, nachwachsende Rohstoffe
Substrat 3 (S3)	100 % nachwachsende Rohstoffe

Tabelle 8: Analyse der Gärreste unverdünnt und 1:20 verdünnt

Substrat	Ausgangswert			1:20 verdünnt		
	N ges. %	NH ₄ -N %	pH	N ges. %	NH ₄ -N %	pH
S1	0,69	0,43	7,9	0,027	0,012	8,0
S2	0,71	0,36	8,3	0,033	0,014	8,5
S3	0,44	0,12	7,7	0,025	0,008	8,3

3.4.1. Inaktivierung von *M. bovis*, *M. caprae*, *M. avium* ssp. *paratuberculosis*

Der Einfluss des Gärrests auf das Inaktivierungsverhalten wurde zunächst nur für die beiden *M. bovis* Feldisolate untersucht um zu evaluieren, ob Gärreste eine Rolle bei der Inaktivierung von Mykobakterien spielen.

Versuchsvorbereitung

PBS Dulbecco ohne Ca²⁺/Mg²⁺ (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

Cryo Tube™ Vials (NUNC™ Brand Products, Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

Für den Lagerungsversuch wurden definierte Keimsuspensionen der beiden *M. bovis* Stämme hergestellt. Hierfür wurden zunächst zwei Impfösen Koloniematerial in 2 ml PBS re-suspendiert. Anschließend wurden jeweils 100 µl der Mykobakteriensuspensionen in Reaktionsgefäße pipettiert, in die je 900 µl der drei Substrate (S1 – S3, 1:5 mit PBS vorverdünnt) vorgelegt wurde. Die Bestandteile der einzelnen Substrate sind in Tabelle 7 und Tabelle 8 aufgeführt. Als Kontrolle wurde eine rein in PBS suspendierte Mykobakteriensuspension mitgeführt.

Der Lagerungsversuch wurde bei drei Temperaturen durchgeführt: 4 °C (±1), 20 °C (±1) und 37 °C (±1). Die Probenahmen fanden nach 7, 14 und 21 Tagen statt.

Die gelagerten Proben wurden vor der Entnahme mit einer Impföse durchmischt und jeweils zwei Impfösen auf Stonebrink und Löwenstein-Jensen-Nährböden ausgestrichen. Die Ausstriche erfolgten jeweils im Dreifachansatz. Die Nährböden wurden bei 37 °C inkubiert und regelmäßig auf Wachstum kontrolliert. Bewertet wurden die Nährböden nach Koloniewachstum: nicht nachweisbar (keine Kolonien), gering-, mittel- und hochgradiges Wachstum.

Thermische Inaktivierungsversuche im Wasserbad bei Temperaturen von 70 °C

PBS Dulbecco ohne Ca²⁺/Mg²⁺ (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

Cryo Tube™ Vials (NUNC™ Brand Products, Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

Aufgrund der hohen Thermotoleranz von Mykobakterien wurden die thermischen Inaktivierungsversuche bei 70 °C begonnen. Um den Einfluss der Zusammensetzung des Gärsubstrats auf das Inaktivierungsverhalten zu ermitteln, wurden zunächst nur die beiden *M. bovis* Feldisolate untersucht um mit diesen Daten die weiteren Versuche zu planen. Hierfür wurden zunächst zwei Impfösen Koloniematerial in 2 ml PBS re-suspendiert. Anschließend wurden jeweils 100 µl der Mykobakteriensuspension in Reaktionsgefäße pipettiert, in die je 900 µl der drei Substrate (1:5 mit PBS vorverdünnt) vorgelegt wurde. Als Kontrolle wurde eine rein in PBS suspendierte Mykobakteriensuspension mitgeführt. In Tabelle 7 und Tabelle 8 sind die einzelnen Bestandteile der Substrate dargestellt. Die

Probenahmen erfolgten nach 15, 30, 60, 120 und 240 Minuten. Die Proben wurden vor der Entnahme mit einer Impföse durchmischt und jeweils zwei Impfösen auf Stonebrink-Nährböden überimpft. Die Nährböden wurden bei 37 °C inkubiert und regelmäßig auf Wachstum kontrolliert. Bewertet wurden die Nährböden nach Koloniewachstum: nicht nachweisbar (keine Kolonien), gering-, mittel- und hochgradiges Wachstum.

Thermische Inaktivierungsversuche im Wasserbad bei Temperaturen von 60, 55 und 50 °C
PBS Dulbecco ohne Ca²⁺/Mg²⁺ (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
Cryo Tube™ Vials (NUNC™ Brand Products, Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

Aufgrund des im Vorfeld durchgeführten Versuchs mit den beiden *M. bovis* Feldisolaten bei 70 °C in den drei Substraten und der Ergebnisse, wurde in den nachfolgenden Testansätzen auf den Zusatz von Gärsubstraten verzichtet. Es wurden nun alle sechs Mykobakterienstämme in die Untersuchungen miteinbezogen. Hierfür wurden zwei Impfösen Koloniematerial in 2 ml PBS re-suspendiert. Davon wurde 1 ml im Wasserbad bei 50, 55 und 60 °C inkubiert. Die Probenentnahme erfolgte bei 50 °C nach 30, 60, 240 min, bei 55 °C und 60 °C nach 15, 30, 60, 120 und 240 Minuten. Für die semiquantitative Bestimmung wurden die Proben im Dreifachansatz auf Stonebrink- bzw. Löwenstein-Jensen-Nährböden ausgestrichen, bei 37 °C bebrütet, regelmäßig auf Wachstum kontrolliert und am Ende der Inkubationsdauer bewertet. Aufgrund der Ergebnisse wurde bei 50 °C die Dauer der thermischen Inaktivierung ausgedehnt und Proben nach 6, 12, 24 und 48 Stunden entnommen.

Thermische Inaktivierung von *M. avium* ssp. *paratuberculosis*
PBS Dulbecco ohne Ca²⁺/Mg²⁺ (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
Herrold's Egg Yolk Agar (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

Aufgrund der bekannten, sehr hohen Thermotoleranz von *MAP* wurde auf Temperaturen unter 70 °C verzichtet. Dazu wurden ebenfalls Suspensionen in PBS hergestellt. Hierfür wurden zwei Impfösen Bakterienmaterial in 2 ml PBS re-suspendiert. Die Proben wurden bei 70 °C erhitzt und nach 30, 60, 240 min beprobt. Jeweils zwei Impfösen wurden im Dreifachansatz auf Herrold's Egg Yolk Agar (HEYM) ausgestrichen und bei 37 °C bebrütet und regelmäßig auf Wachstum kontrolliert. Aufgrund der Ergebnisse wurden weitere Versuche bei 70 und 80 °C durchgeführt: Beprobte wurde nach 30, 60 und 240 min, bei 70 °C zusätzlich nach 6 und 12 Stunden.

3.4.2. Inaktivierung von *C. burnetii* und *Ch. abortus*

Für die thermische Inaktivierung von *C. burnetii* wurden die eingefrorenen Überstände der im Vorfeld vermehrten Coxiellen aufgetaut und je 2 ml in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert. Die thermische Inaktivierung erfolgte bei 50, 60 und 70 °C. Beprobte wurden bei 50 und 60 °C nach 30 und 60 min, bei 70 °C nach 15 und 30 Minuten. Zu jedem Zeitpunkt wurde 1 ml für die spätere molekularbiologische Untersuchung entnommen.

Für die Inaktivierung von *C. burnetii* gab es zwei Versuchsdesigns, welche in Tabelle 9 dargestellt sind. Zum quantitativen Nachweis von *C. burnetii* wurde zunächst eine quantitative real-time PCR (qPCR) etabliert. Die Vorgehensweise sowie die PCR-Protokolle sind im Folgenden aufgeführt.

Tabelle 9: Darstellung des Versuchsdesigns für *C. burnetii*

Versuchsdesign 1	Versuchsdesign 2
<ul style="list-style-type: none"> - Thermische Inaktivierung ohne anschließende Kultivierung des thermisch behandelten Materials 	<ul style="list-style-type: none"> - Thermische Inaktivierung mit anschließender Kultivierung des thermisch behandelten Materials
<ul style="list-style-type: none"> - Entnahme von 1 ml je Zeitpunkt 	<ul style="list-style-type: none"> - Entnahme von 400 µl je Zeitpunkt für den kulturellen Nachweis - Entnahme von 1 ml je Zeitpunkt für die molekularbiologische Untersuchung
<ul style="list-style-type: none"> - Einfrieren der thermisch behandelten Coxiellensuspensionen und einer unbehandelten als Kontrolle bis zur molekularbiologischen Untersuchung 	<ul style="list-style-type: none"> - 96-Loch Platten mit BGM-Zellen - 4 Vertiefungen mit je 100 µl der thermisch behandelten Coxiellensuspension - Kontrolle: <ul style="list-style-type: none"> 4 Vertiefungen mit unbehandelter Coxiellensuspension, 4 Vertiefungen als Zellkontrollen - Inkubation von sieben Tagen (37 °C, 5 % CO₂) s. Kapitel 3.3.2 - Einfrieren der Proben bis zur molekularbiologischen Untersuchung

Aufbereitung der Proben für die PCR

GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

Für die DNA-Extraktion wurden die thermisch behandelten und unbehandelten Proben (Kontrollen) aufgetaut und zentrifugiert (17.000 x g, 45 min, 4 °C). Für die anschließende DNA-Extraktion wurde ein Kit verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen.

Standard PCR-Protokoll

Primer: Synthese durch metabion international AG, Planegg/Steinkirchen(Deutschland)

Polymerase-Mix: Maxima Hot Start PCR Master Mix (2 X) (Fa. Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland)

Für die PCR-Reaktion betrug das Ansatzvolumen 25 µl, die Primerkonzentration lag bei 20 pmol je Ansatz. Das Standardprotokoll sowie die verwendeten Primer sind Tabelle 10 und Tabelle 11 zu entnehmen.

Tabelle 10: Standard PCR-Protokoll

Anzahl Zyklen	Temperatur	Zeit
1	95 °C	4 min
30	95 °C	30 Sek.
	52 °C ¹	
	72 °C	45 Sek.
1	72 °C	10 min
	4 °C	∞

¹ Primerabhängige Annealingtemperatur

Tabelle 11: Übersicht der verwendeten Primer

Name	Amplifikatgröße	Nukleotidsequenz	Annealing-temp.	Anzahl Zyklen
Transposon	687 bp		52 °C	30
Trans1		5'-TATGTATCCACCGTAGCCAGTC-3'		
Trans2		5'-CCCAACAACACCTCCTTATTC-3'		
Cox-F	295 bp	5'-GTCTTAAGGTGGGCTGCGTG-3' (219-238)	60 °C	40
Cox-R		5'-CCCCGAATCTCATTGATCAGC-3' (493-513)		

Gelelektrophorese

TAE-Puffer (50 X)	2 M Tris (Roth, Karlsruhe), 1 M Essigsäure (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 0,05 M EDTA-Na ₂ (Promega, Mannheim, Deutschland), pH-8 Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
DNA-Standard:	1 kb-ladder (Fermentas, Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland)
Auftragspuffer	6 X DNA Loading Dye (Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland)

Im Anschluss an die Amplifizierungsreaktion wurden 15 µl des PCR-Produkts mit 3 µl Auftragspuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte über 45 min bei 75 Volt. Ausgewertet wurden die Gele in einer UV-Auswerteinheit.

Aufbereitung der Proben für die PCR

Vor der eigentlichen DNA-Extraktion wurden die Überstände der Proben eines jeden Zeitpunkts zentrifugiert (17.000 x g, 45 min, 4 °C). Für die anschließende DNA-Extraktion wurde ein Kit verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen.

StepOne Real-Time-PCR

PCR-Protokoll

Primer: Synthese durch metabion international AG, Planegg/Steinkirchen (Deutschland)

Fast SYBR® Green Master Mix Real-Time PCR Master Mix (Applied Biosystems™, Darmstadt, Deutschland)

Step One Real-Time-PCR System (Applied Biosystems™, Darmstadt, Deutschland)

Der quantitative Nachweis von *C. burnetii* wurde mittels einer Real-Time-PCR durchgeführt. Die Konzentration der Cox-Primer betrug je 20 pmol je Ansatz. In Tabelle 11 (Seite 37)

findet sich eine Zusammenstellung der Primer. Das Thermoprotokoll ist nachfolgend in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Thermoprotokoll StepOne Real-Time-PCR

Anzahl Zyklen	Temperatur	Zeit
1	95 °C	20 Sek.
40	95 °C 60 °C	3 Sek. 30 Sek.
1 (Melt Curve)	95 °C	15 Sek.
1 (Melt Curve)	60 °C	1 min
1 (Melt Curve)	95 °C	15 Sek.

Zellkulturtests zur Bestimmung zytotoxischer Effekte

Zellkulturmedium

PBS Dulbecco ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

Um den Titer der obligat intrazellulären Chlamydien und den Virustiter von ERAV bzw. BVDV nach Suspensierung mit den ausgewählten Substraten sicher bestimmen zu können, sollte das Nachweissystem, die Zellkulturen, nicht durch zellschädigende Substratbestandteile beeinträchtigt werden. Es wurden zellkulturverträgliche Konzentrationen bestimmt. Im Vorfeld wurden deshalb zunächst die pH-Werte der jeweiligen Substrate im unverdünnten Zustand ermittelt. Im nächsten Schritt wurden die Substrate in PBS im Verhältnis 1:5, 1:10 und 1:20 aufgeschwemmt. Die Suspensionen wurden über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank gelagert, damit größere Bestandteile sedimentieren konnten. Nach 24 h wurden durch einen Zentrifugationsschritt (4600 x g, 4 °C, 10 min) größere Partikel beseitigt und die jeweiligen Überstände in \log_{10} -Schritten von 10^0 bis 10^{-7} in PBS verdünnt. Für jede Verdünnungsstufe wurden jeweils vier Vertiefungen der Mikrotiterplatte verwendet. Von den Testsuspensionen wurden je Verdünnungsstufe 100 μl auf frisch ausgesäte Vero-Zellen in 24-Loch-Mikrotiterplatten aufgetragen. Zusätzlich wurden Zellkontrollen mitgeführt. Die Platten wurden dann bei 37 °C (5 % CO_2) zunächst für eine Stunde inkubiert, frisches Zellkulturmedium hinzugefügt und anschließend wieder inkubiert.

Mikroskopische Auswertung

Die Zellen wurden täglich auf zytotoxische Wirkungen lichtmikroskopisch untersucht. Nach sieben Tagen wurden die Platten zunächst optisch ausgewertet. Zusätzlich wurden die Zellen mit Kristallviolett angefärbt und mikroskopisch auf zytotoxische Effekte überprüft. Die Färbung erfolgte jeweils nach 4 h, 24 h und nach fünf Tagen. Die Zellen wurden zunächst für fünf bis zehn min mit Methanol fixiert, die Färbung erfolgte mit 0,5- %iger Kristallviolettlösung für 90 Sekunden. Um eine optische Bewertung der Schädigungen vornehmen zu können, wurden verschiedene Kategorien festgelegt. Viele abgekugelte, tote Zellen bzw. ein zerstörter Zellrasen sowie stark granuliert Vero-Zellen wurden als starke Schädigung eingestuft. Als mittlere Zellschäden wurden stark granuliert Zellen und zusätzliche deutliche Zellgrenzen bewertet. Als leichte Zellschädigungen galten eine leichte Granulierung und etwas deutlichere Zellgrenzen.

Interferenztest: Zellsensibilität gegenüber Viren – Interferenz

Um die Verminderung der Sensibilität gegenüber den Viren zu bestimmen, wurden zusätzlich zur zytotoxischen Wirkung der Substrate vergleichende Virustitrationen an Zellen, denen die verdünnten Substrate zugesetzt wurden, sowie unbehandelten Zellen, durchgeführt.

Dazu wurden je 100 µl des jeweiligen Substrates in der niedrigsten, nicht zytotoxischen Verdünnung auf Monolayer-Kulturen (ERAV: Vero, BVDV: PK-15) auf je 6 Vertiefungen einer 96-Loch Mikrotiterplatte aufgetragen. Nach Inkubation für 1 h bei 37 °C (5 % CO₂) wurde der Überstand verworfen und ein Teil der Platten unbehandelt im Brutschrank belassen.

Im Anschluss wurde zunächst das ERAV von 10⁰ bis 10⁻⁸ titriert und auf eine unbehandelte und behandelte Zellkultur aufgetragen. Pro Verdünnungsstufe wurden 6 Vertiefungen beimpft. Dieser Vorgang wurde für alle drei Substrate sowie die Kontrollplatte (mit Zellkulturmedium) durchgeführt. Das BVDV wurde von 10⁰ bis 10⁻⁷ titriert. Die weitere Vorgehensweise entsprach der des ERAV. Vergleichende Untersuchungen wurden auch für die Chlamydien durchgeführt. Es erwies sich jedoch als nicht möglich einen genauen Titer zu bestimmen.

Thermische Inaktivierung von *Ch. abortus*

Wie bereits oben erwähnt, sollten die Versuche mit Chlamydien mit dazu dienen, ein Zellkultursystem zu entwickeln, mit welchem auch der Einfluss von verschiedenen Gärsubstraten untersucht werden kann, ohne zytotoxische Effekte durch das Substrat zu verursachen. Für die Versuche wurde zunächst mit Substrat 2 gearbeitet, da dieses Substrat eine heterogene Mischung aus verschiedenen tierischen Nebenprodukten war und

vermutet wurde, dass diese Zusammensetzung den größtmöglichen Einfluss auf die Inaktivierung haben könnte.

Das Substrat wurde hierzu am Vortag des jeweils geplanten Versuches im Verhältnis 1:20 angesetzt, gut durchmischt und über Nacht bei 4 °C sedimentiert. Am Versuchstag wurde das angesetzte Substrat zunächst zentrifugiert (4600 x g, 10 min, 4 °C). Dieses Mischungsverhältnis und Vorgehen erwies sich als nicht zytotoxisch für die Zellen und wurde daher für alle Versuche mit Chlamydien und Viren verwendet.

Versuchsvorbereitung

MEM Flüssigmedium mit Earle's Salzen, mit 2,2 g/l NaHCO₃, mit stabilem Glutamin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

PBS Dulbecco ohne Ca²⁺/Mg²⁺ (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

Deckgläschen (Ø 10 mm) (Hecht GmbH & Co KG, Sondheim, Deutschland)

Das Substrat wurde wie oben beschrieben angesetzt und vorbereitet. Zusätzlich wurden BGM-Zellen in mit Deckgläschen bestückte 24-Loch Platten im Verhältnis 1:10 eingesät.

Versuchsdurchführung

Das vorbereitete Substrat wurde mit Chlamydien suspension im Verhältnis 1:1 angesetzt. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit Zellkulturmedium. Für jede Temperatur wurden 2 ml angesetzt. Die so vorbereiteten Chlamydien-Substrat Suspensionen wurden bei 40, 50 und 60 °C erhitzt und nach 5, 10, 15, 60 und 120 min beprobt. Zu jedem Zeitpunkt wurden 400 µl entnommen und je 100 µl in die 24-Loch Platten pipettiert. Die beimpften Platten wurden für 1 h bei 37 °C (5 % CO₂) inkubiert, anschließend wurde frisches Medium (2 % FKS) hinzugefügt, die Platten wieder inkubiert und regelmäßig mit einem Inversmikroskop im Durchlicht auf einen cpE kontrolliert. Die Fixierung und Färbung erfolgte mit einer Methanol-4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)-Lösung (0,1 mg/ml).

Durchführung der DAPI-Färbung

Zunächst wurde eine 0,5- %ige DAPI-Stammlösung (5 mg/ml) in Aqua dest. hergestellt. Diese wurde in 0,2 ml Portionen aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren. Vor Beginn der Färbung wurden 0,2 ml Portionen mit 10 ml Methanol (Endkonzentration 0,1 mg/ml) aufgefüllt. Da DAPI sehr sensitiv auf Licht reagiert, wurde die Lösung - vor Licht geschützt - bis zur weiteren Verwendung gelagert. Für die Färbung wurden die Deckgläschen mit der Methanol-DAPI-Lösung für 15 min bei 37 °C in den Brutschrank gestellt und anschließend ausgewertet.

3.4.3. Inaktivierung von Viren: ERAV und BVDV

Inaktivierung durch Lagerung bei fünf unterschiedlichen Temperaturen

Nachdem die Vorversuche zur Bestimmung der zellkulturverträglichen Konzentration der einzelnen Substrate abgeschlossen waren, wurden die einzelnen Substrate (S1 – S3, 1:20 mit PBS vorverdünnt) und das als Kontrolle verwendete MEM Zellkulturmedium mit Virus-Suspension versetzt (Verhältnis 1:1). Als Temperaturen wurden für jedes Virus 4 °C, RT (20 °C), 37, 40 und 42 °C gewählt. In Tabelle 13 sind die Versuchsdesigns im Einzelnen dargestellt.

Tabelle 13: Versuchsdesign Lagerungsversuche ERAV und BVDV

Temperatur	Dauer	Substrat	Virus
4 °C RT (20 °C) 37 °C 40 °C 42 °C	15 Tage Beprobung nach 0, 3, 7, 10, 15 Tagen	S1	ERAV
		S2	
		S3	
		MEM Zellkulturmedium	
		MEM Zellkulturmedium	BVDV
4 °C RT (20 °C) 37 °C 40 °C 42 °C	10 Tage Beprobung nach 0, 3, 7, 10 Tagen	S1	ERAV
		S2	
		S3	
		MEM Zellkulturmedium	
		MEM Zellkulturmedium	BVDV

Für jede Temperatur und jedes Substrat wurde in einem Dreifachansatz gearbeitet.

Bei jeder Probenahme wurde 1 ml Substrat-Virus suspension entnommen, von 10^0 bis 10^{-7} titriert und auf 96-Loch Mikrotiterplatten aufgetragen. Je Verdünnungsstufe wurden 6 Vertiefungen beimpft. An jedem Versuchstag wurde eine Viruskontrolle titriert und aufgetragen. Die Platten wurden für vier bis sieben Tage (ERAV) bzw. 10 bis 15 (BVDV) in den Brutschrank bei 37 °C (5 % CO₂) gestellt und regelmäßig lichtmikroskopisch auf zytopathische Effekte kontrolliert.

Inaktivierung durch Lagerung bei 40 °C – Keimträgermethode

Meat extract, 1%ig, pH 7 (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)

Natriumchlorid (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)

Dinatriumhydrogenphosphat (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)

Kaliumdihydrogenphosphat (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)

Bioabfall-Maissilage

Rindergülle (Meiereihof, Universität Hohenheim, Deutschland)

Substrat aus Laborbiogasanlagen (Fachgebiet Infektions- und Umwelthygiene, Universität Hohenheim, Deutschland)

Polycarbonatmembran, Porengröße 0,01 µm (Pieper Filter GmbH; Bad Zwischenahn, Deutschland)

Zeta Plus 1 MDS Virosorb-Membran 90 mm (3 M, Neuss, Deutschland)

In Anlehnung an den Hohenheimer Biogasertragstest (Helffrich and Oechsner 2003a) wurden sogenannte Batch-Versuche durchgeführt. Um mit geringen Virusmengen arbeiten zu können, wurde eine spezielle „Keimträgermethode“ verwendet. Hierbei wurden Viren auf eine Virosorb-Membran aufgebracht und in Polycarbonatfolien eingeschweißt. Durch die Semipermeabilität der Membran wurde der Stoffaustausch mit der Umgebung gewährleistet, aber das Virus nicht in die Umgebung abgegeben.

Herstellung der Keimträger und Adsorption des Virus

Vor Beginn des Versuches wurden zunächst die Virosorb-Membranen für die Virusadsorption und die Polycarbonat-Membranen vorbereitet. Die Virosorb-Membranen wurden mit einem Durchmesser von 12 mm ausgestanzt. Die dazugehörigen Polycarbonatfolien wurden aus den Bögen zugeschnitten und die Bruchkanten sofort verschweißt. Beides wurde vor Versuchsbeginn autoklaviert. Das Beladen der Keimträger erfolgte über sterile Filtrationsvorsätze, die auf 10 ml Einmalspitzen geschraubt wurden.

Nach dem Auftauen des Virus wurde die 1:10 Verdünnung mit Phosphatbeladungspuffer (pH 7) Kaliumdihydrogenphosphat (9,07 g/l), di-Natriumhydrogenphosphat (11,87 g/l) hergestellt. Je 10 ml dieser Verdünnung wurden mit 10 ml Spritzen durch die Filtrationsvorsätze auf die Virosorb-Membranen gebracht. Um eine optimale Anhaftung des Virus an die Membran zu gewährleisten, wurden langsam je 10 ml dieser Verdünnung mit Hilfe von Einwegspritzen auf die Membranen aufgetragen. Nachdem die Suspensionen die Filtrationsvorsätze passiert hatten, wurden diese aufbewahrt und gepoolt und später ebenfalls titriert. Die Virosorb-Membranen wurden anschließend in den vorbereiteten Polycarbonat-Zuschnitten eingeschweißt, bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt. Als Kontrollen dienten die zurückbehaltene Virussuspension, die gepoolten Filtrate sowie eine Direktelution (Anfangskontrolle) und eine Abschlusskontrolle, die am Ende des Versuches eluiert wurden. Für die Bestimmung des Titters wurde 1 ml der reinen Virussuspension titriert und nach Inkubation ausgewertet.

Elution der Viruspartikel von den Keimträgern

Nach Beendigung des Versuches (Versuchsablauf s. o.) wurden die eingeschweißten Keimträger jeweils mit destilliertem Wasser abgespült, mit sterilen Pinzetten geöffnet und die Membranen in die vorbereiteten Gefäße mit 1 %igem Meat-Extrakt (pH 7) gelegt. Die so vorbereiteten Membranen wurden für fünf min auf Eis im Ultraschallbad beschallt, im Anschluss 15 min bei 1700 x g (4 °C) zentrifugiert und bis zur Titration bei 4 °C aufbewahrt.

Versuchsablauf

Der Lagerungsversuch wurde über sieben Tage bei einer Temperatur von 40 °C mit den hergestellten Keimträgern durchgeführt. In Tabelle 14 ist das Versuchsdesign aufgeführt. Jeweils drei Keimträger kamen in je eine Flasche mit frischem Substrat aus eigenen Laborbiogasanlagen. Als Kontrolle diente je eine Flasche mit Zellkulturmedium. Für jeden Zeitpunkt der thermischen Inaktivierungsperiode wurde eine Flasche mit Substrat und eine Flasche mit Zellkulturmedium verwendet. Drei der Keimträger wurden bei jeder Probenahme des Versuches eluiert und titriert (10^0 bis 10^{-8}) und auf 96-Loch Mikrotiterplatten aufgetragen. Für jede Verdünnungsstufe wurden 6 Vertiefungen beimpft.

Tabelle 14: Versuchsdesign Lagerungsversuch mit Keimträgern

Temperatur	Dauer	Substrat	Virus
40 °C	7 Tage Beprobung nach 0, 3, 7 Tagen	Substrat aus Laborbiogasanlagen MEM Zellkulturmedium	ERAV

Inaktivierung von Viren durch den Biogasprozess im Labormaßstab: Batch-Versuch (vgl. Hohenheimer-Biogasertragstest)

Die Vorbereitung der Keimträger erfolgte nach dem oben beschriebenen Protokoll. Für die Versuchsdurchführung wurden Glasspritzen (Häberle Labortechnik) mit einem Gesamtvolumen von 100 ml mit je 20 ml Fermentermaterial aus eigenen thermophil (53 °C) betriebenen Laborbiogasanlagen befüllt. Zusätzlich wurden sie mit insgesamt 8 - 10 ml frischem Material beschickt (Abbildung 1, Seite 44). Das frische Material bestand aus einer Kombination von 5 ml Rindergülle und 5 ml nachwachsende Rohstoffen sowie Bioabfällen. Beim Einbringen der Keimträger in die präparierten Glasspritzen musste die vollständige Bedeckung mit dem Substrat gegeben sein. Damit eine optimale Verteilung erfolgen konnte, wurden die Spritzen einige Male gedreht. Die Zeitpunkte der Keimträgerentnahmen wurden bis auf zwei Modifikationen simultan zu den Vorversuchen im Wasserbad gewählt. So fanden die Entnahmen nach 15 min, 30 min, 1 h, 2 h und 24 h statt. Die Spritzen waren während des Versuches in einen Brutschrank bei 53 °C (+/- 1,5 °C) untergebracht. Um einen möglichst stabilen Biogasprozesses zu gewährleisten, wurde für jeden Zeitpunkt eine

Spritze verwendet. Auch hier wurde wieder im Dreifachansatz gearbeitet. Zur Kontrolle des Titerverlustes durch die Verwendung des Keimträgersystems wurde zum einen zu Beginn eine Direktelution mit zwei Keimträgern durchgeführt, welche den Titerverlust durch die Adsorption der Viren auf die Virosorb-Membran widerspiegelte. Als abschließende Kontrolle des Titerverlustes durch die reine Lagerung wurden die bei 4 °C gelagerten mit Virus adsorbierten Keimträger nach 24 h eluiert. Für die Titrationsen wurden 96-Loch Mikrotiterplatten verwendet und 6 Vertiefungen je Verdünnungsstufe angesetzt. Um die Genauigkeit der Methode zu analysieren, wurden drei technische Replikate im Abstand von einem Tag durchgeführt.

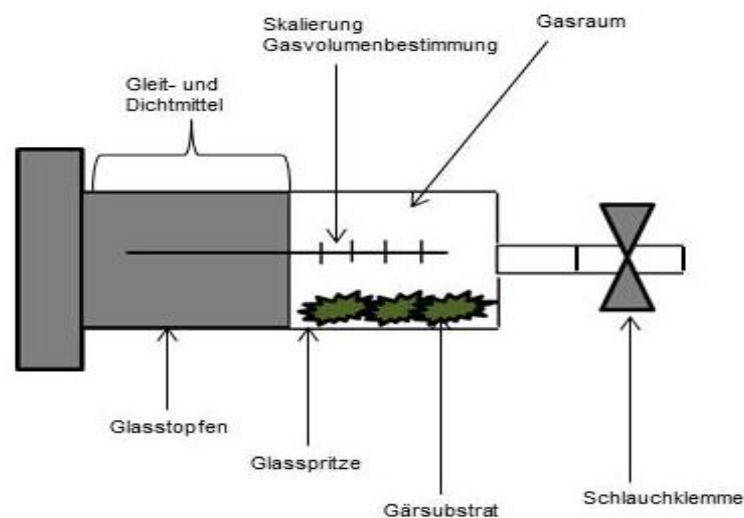


Abbildung 1: Schematische Darstellung der verwendeten Glasspritzen

(N. Hartmann 2015)

Inaktivierung durch thermische Behandlung

Um den Einfluss der Temperatur auf die Reduktion des Virustiters zu analysieren, wurden die quantifizierten Virussuspensionen unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt. Der Einfluss der Zusammensetzung der Gärsubstrate auf das Inaktivierungsverhalten wurde durch die Verwendung der drei verschiedenen Substrate untersucht.

Das Versuchsdesign ist in Tabelle 15 abgebildet.

Tabelle 15: Versuchsdesign thermische Inaktivierung für ERAV und BVDV

Temperatur	Dauer	Substrat	Virus
40 °C 50 °C 55 °C	120 Minuten Beprobung nach 0, 15, 30, 60,120	S1 S2 S3 MEM Zellkulturmedium	ERAV
40 °C 45 °C 50 °C	Minuten	S2 MEM Zellkulturmedium	BVDV

Die vorverdünnten Substrate (1:20) wurden mit Virus-Suspension (1:1) versetzt. Als Positivkontrolle diente ein Ansatz mit Zellkulturmedium.

Je Probenahme wurden 3 ml je Substrat-Virussuspension entnommen. Die jeweils entnommenen Aliquote wurden von 10^0 bis 10^{-7} titriert und im Doppelansatz auf 96-Loch Mikrotiterplatten gebracht. Für jede Verdünnungsstufe erfolgte ein 6-facher Ansatz auf der Platte. Zusätzlich wurden Zell- und Viruskontrollen mitgeführt. Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu analysieren, wurden zwei, respektive drei technische Replikate im Abstand von zwei Wochen durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Inaktivierung von Bakterien durch Lagerung und thermische Behandlung

4.1.1. Einfluss der Lagerung auf die Reduktion von *M. bovis*

Die Ergebnisse des Lagerungsversuches sind in den Tabellen 16 – 18 dargestellt. Um die Ergebnisse transparenter zu machen wurde eine semiquantitative Einteilung des Kolonie-Wachstums vorgenommen.² Es zeigte sich, dass bei den in PBS suspendierten Mykobakterien zu jeder Zeit und Temperatur mittelgradiges respektive nach 21 d immer noch ein geringgradiges Wachstum vorhanden war. Bei den in Substrat suspendierten Erregern zeigten sich sowohl substrat- als auch speziesspezifische Unterschiede. Bei Substrate 2 und 3 ist zu sehen, dass bei allen drei Temperaturen nur noch mittelgradiges bzw. gar kein Wachstum mehr stattfand. Bei Substrat 1 hingegen konnte bei Temperaturen um 4 respektive 20 °C noch ein Wachstum nachgewiesen werden. Bei 37 °C war bis auf eine Ausnahme ebenfalls kein Wachstum mehr nachweisbar.

Tabelle 16: Ergebnisse der Lagerung bei 4 °C für *M. bovis*

Pathogen	Lagerzeit	Substrat			
		PBS	S1	S2	S3
<i>M. bovis</i> 10-11014-00074	7 d	+	+	n. n.	n. n.
	14 d	+	+	n. n..	n. n.
	21 d	+	+	(+)	(+)
<i>M. bovis</i> 10-11014-00073	7 d	+	n. n.	n. n.	n. n.
	14 d	+	+	n. n.	n. n.
	21 d	(+)	(+)	(+)	n. n.

² Semiquantitative Einteilung des Kolonie-Wachstums: n. n.: nicht nachweisbar; +: mittelgradiges Wachstum; (+): geringgradiges Wachstum

Tabelle 17: Ergebnisse der Lagerung bei 20 °C für *M. bovis*³

Pathogen	Lagerzeit	Substrat			
		PBS	S1	S2	S3
<i>M. bovis</i> 10-11014-00074	7 d	+	+	n. n.	n. n.
	14 d	+	+	(+)	n. n.
	21 d	+	+	(+)	(+)
<i>M. bovis</i> 10-11014-00073	7 d	+	+	n. n.	n. n.
	14 d	+	+	n. n.	n. n.
	21 d	(+)	(+)	(+)	n. n.

Tabelle 18: Ergebnisse der Lagerung bei 37 °C für *M. bovis*³

Pathogen	Lagerzeit	Substrat			
		PBS	S1	S2	S3
<i>M. bovis</i> 10-11014-00074	7 d	+	n. n.	n. n.	n. n.
	14 d	+	n. n.	n. n.	n. n.
	21 d	+	n. n.	n. n.	n. n.
<i>M. bovis</i> 10-11014-00073	7 d	+	n. n.	+	n. n.
	14 d	+	(+)	n. n.	n. n.
	21 d	+	n. n.	n. n.	n. n.

³ Semiquantitative Einteilung des Kolonie-Wachstums: n. n.: nicht nachweisbar; +: mittelgradiges Wachstum; (+): geringgradiges Wachstum

4.1.2. Einfluss der thermischen Inaktivierung auf *M. bovis*, *M. caprae*, *MAP*

Um den Pasteurisierungserfolg in Abhängigkeit des Substrates nachzuweisen, wurden die beiden *M. bovis* Isolate in Substrat suspendiert und erhitzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 dargestellt. Die Zusammensetzung sowie die chemische Analyse der Substrate ist in Tabelle 7 und Tabelle 8 (Seite 32) detailliert aufgeführt. Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte konnten Mykobakterien nachgewiesen werden.

Tabelle 19: Ergebnisse thermische Inaktivierung bei 70 °C für *M. bovis*⁴

Pathogen	Substrat	30 min	60 min	240 min
<i>M. bovis</i> 10-11014-00074	1	n. n.	n. n.	n. n.
<i>M. bovis</i> 10-11014-00073	1	n. n.	n. n.	n. n.

Die Ergebnisse der thermischen Inaktivierung für *MAP* sind in Tabelle 20 und Tabelle 21 dargestellt. Es zeigte sich, dass *MAP* eine sehr hohe Thermotoleranz besitzt, da sich bei 70 °C auch nach 240 Minuten kaum eine Reduktion des Kolonie-Wachstums zeigte. Erst nach 360 min konnte eine vollständige Reduktion erreicht werden. Die Ergebnisse des 80 °C Versuches kamen zum gleichen Ergebnis.

Tabelle 20: Ergebnisse thermische Inaktivierung bei 70 °C für *MAP*^{4,5}

Pathogen	Substrat	0 min	30 min	60 min	240 min	360 min
<i>MAP</i>	PBS	+++	+++	++	++	n. n.
	PBS	+++	+++	+++	+++	n. n.
	PBS	+++			++	n. n.

⁴ Semiquantitative Einteilung des Kolonie-Wachstums von *MAP*: n. n.: nicht nachweisbar; n. d.: nicht durchgeführt; +++: hochgradiges Wachstum; ++: mittelgradiges Wachstum; + geringgradiges Wachstum

⁵ Dargestellt sind die Mittelwerte der Versuchswiederholungen

Tabelle 21: Ergebnisse thermische Inaktivierung bei 80 °C für *MAP*^{6,7}

Pathogen	Substrat	0 min	30 min	60 min	240 min	360 min
<i>MAP</i>	PBS	+++	+++	+++	+++	n. d.
	PBS	+++	+++	+++	+++	n. d.

Die Ergebnisse der Inaktivierungsversuche mit den sechs Feldisolaten, die sich aus *M. bovis* bzw. *M. caprae* zusammensetzten, sind in den Tabellen 22 – 24 dargestellt.⁶ Zusätzlich wurde ein 48 h Versuch bei 50 °C durchgeführt. Bei Temperaturen von ≥ 60 °C über eine Dauer von 30 min konnten keine Mykobakterien mehr nachgewiesen werden. Bei Temperaturen um 55 °C war eine Reduktion der Erregerzahl erst nach 4 h (240 min) nachweisbar. Die Betrachtung der Inaktivierungsperiode bei 50 °C zeigte, dass auch nach 48 h noch vermehrungsfähige Erreger nachzuweisen waren.

Tabelle 22: Ergebnisse thermische Inaktivierung bei 60 °C für *M. bovis* und *M. caprae*^{6,7}

Pathogen	Substrat	30 min	60 min	240 min
<i>M. bovis</i> 10-11014-00074	PBS	n. n.	n. n.	n. n.
<i>M. bovis</i> 10-11014-00073		n. n.	n. n.	n. n.
<i>M. caprae</i> 13-0108370-001		n. n.	n. n.	n. n.
<i>M. caprae</i> 11/0028		n. n.	n. n.	n. n.
<i>M. caprae</i> 11/152461		n. n.	n. n.	n. n.
<i>M. caprae</i> 12/52799		n. n.	n. n.	n. n.

⁶ Semiquantitative Einteilung des Kolonie-Wachstums: n. n.: nicht nachweisbar; +++: hochgradiges Wachstum; ++: mittelgradiges Wachstum; + geringgradiges Wachstum

⁷ Dargestellt sind die Mittelwerte der Versuchswiederholungen

Tabelle 23: Ergebnisse thermische Inaktivierung bei 55 °C für *M. bovis* und *M. caprae*^{8,9}

Pathogen	Substrat	30 min	60 min	240 min
<i>M. bovis</i> 10-11014-00074	PBS	+++	+++	+
<i>M. bovis</i> 10-11014-00073		+++	++	+
<i>M. caprae</i> 13-0108370-001		++	++	+
<i>M. caprae</i> 11/0028		+++	+++	n. n.
<i>M. caprae</i> 11/152461		+++	+++	+
<i>M. caprae</i> 12/52799		+++	+++	++

Tabelle 24: Ergebnisse thermische Inaktivierung bei 50 °C für *M. bovis* und *M. caprae*^{8,9}

Pathogen	Substrat	30 min	60 min	240 min	360 min	720 min	24 h	48 h
<i>M. bovis</i> 10-11014-00074	PBS	+++	+++	++	+++	++	+++	++
<i>M. bovis</i> 10-11014-00073		+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
<i>M. caprae</i> 13-0108370-001		+++	+++	+++	+++	++	+++	n. n.
<i>M. caprae</i> 11/0028		+++	+++	+	+++	+++	+++	+
<i>M. caprae</i> 11/152461		+++	+++	++	+++	+++	+++	++
<i>M. caprae</i> 12/52799		+++	+++	+++	+++	+++	+++	++

⁸ Semiquantitative Einteilung des Kolonie-Wachstums: n. n.: nicht nachweisbar; +++: hochgradiges Wachstum; ++: mittelgradiges Wachstum; + geringgradiges Wachstum

⁹ Dargestellt sind die Mittelwerte der Versuchswiederholungen

4.1.3. Einfluss der thermischen Inaktivierung auf *C. burnetii* und *Ch. abortus*

Um die Thermotoleranz intrazellulärer Bakterien zu untersuchen, wurden Pasteurisierungsversuche mit *C. burnetii* und *Ch. abortus* durchgeführt. Die Ergebnisse der Bestimmung des Coxiellen-Gehalts mittels Standard-PCR und Transposase Primern mit anschließender Gelelektrophorese sind in Abbildung 2 und Abbildung 3 dargestellt.

Kritische Betrachtung der gewählten Methode für *C. burnetii*

Das gewählte Nachweissystem erwies sich als ungeeignet. Der kulturelle Nachweis des thermisch behandelten Materials lieferte keine belastbaren Ergebnisse und wird deshalb nicht dargestellt. Der molekularbiologische Nachweis erbrachte keine signifikanten Reduktionen. Die Ergebnisse der quantitativen real-time PCR können nicht auf die Praxis angewendet werden und sind deshalb nicht dargestellt. Um belastbare Daten zu erhalten muss das Nachweissystem angepasst und neu etabliert werden.

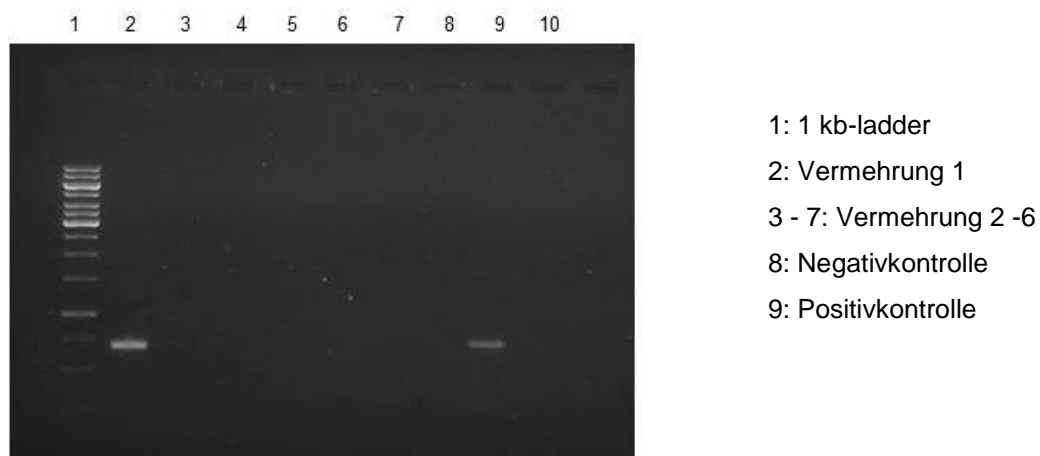


Abbildung 2: Ergebnisse der einzelnen Vermehrungen von *C. burnetii*

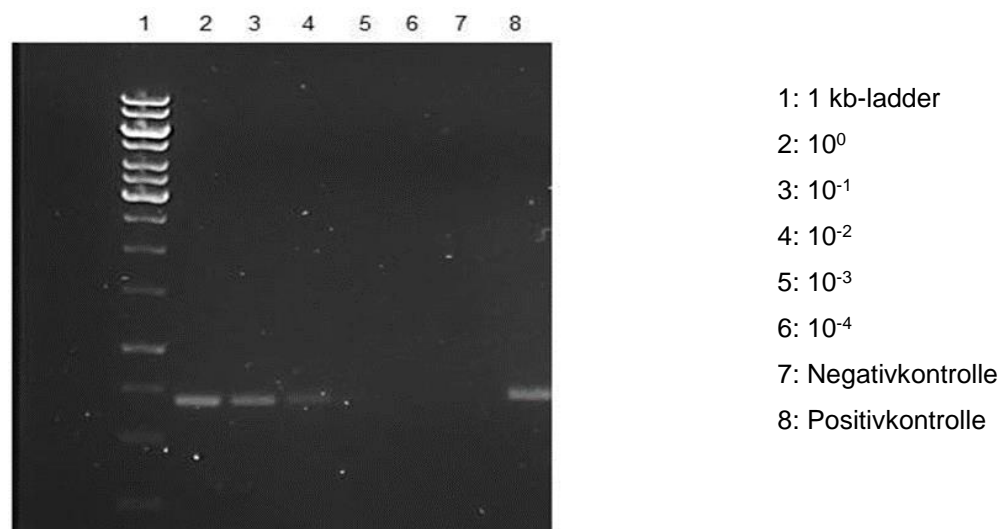


Abbildung 3: Ergebnisse der \log_{10} Verdünnungsreihe von *C. burnetii*

(Vermehrung 1)

4.1.4. Einfluss der thermischen Inaktivierung auf *Ch. abortus*

Um den Einfluss der Temperatur auf die Reduktion von Chlamydien zu analysieren, wurden die *Ch. abortus*-Suspensionen unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt. Die Ergebnisse der thermischen Inaktivierung sind in Tabelle 25 (qualitativer Nachweis) dargestellt. In Abbildung 4 und Abbildung 5 ist der Vergleich einer infizierten und einer mit der Nullprobe infizierten BGM-Zellkultur dargestellt.

Tabelle 25: Thermische Inaktivierung von *Ch. abortus* bei 40, 50 und 60 °C¹⁰

Pathogen	Temperatur	5 min	10 min	15 min	60 min	120 min
<i>Ch. abortus</i>	40 °C	+	-	-	-	-
	50 °C	-	-	-	-	-
	60 °C	-	-	-	-	-

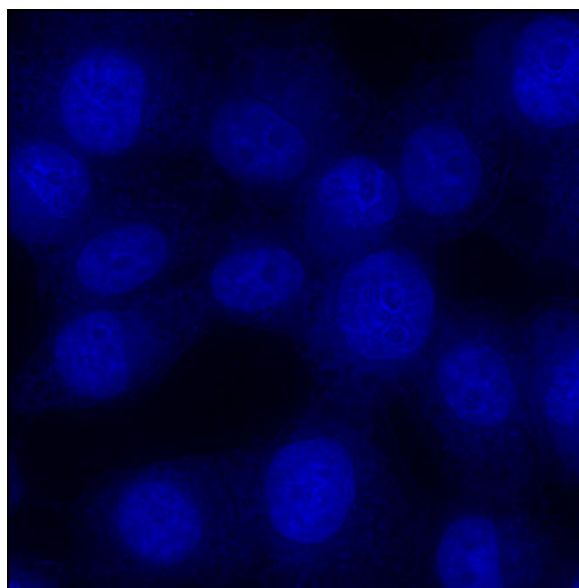


Abbildung 4: Nicht infizierte BGM-Zellkultur
(Färbung: DAPI)

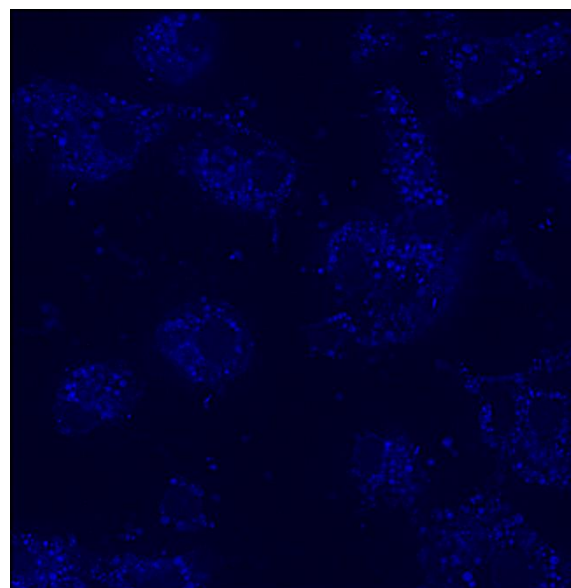


Abbildung 5: Mit *Ch. abortus* infizierte BGM-Zellkultur.

(Färbung: DAPI)

¹⁰ Qualitativer Nachweis von *Ch. abortus*: +: Wachstum nachweisbar; -: kein Wachstum nachweisbar

4.2. Inaktivierung von Viren durch Lagerung und thermische Behandlung

4.2.1. Einfluss der Lagerung auf die Reduktion von ERAV und BVDV

Die Ergebnisse der Lagerung für ERAV sind in Abbildung 6 bis Abbildung 8 sowie Tabelle 26 dargestellt. Die Zusammensetzung sowie die chemische Analyse der Substrate ist in Tabelle 7 und Tabelle 8 (Seite 32) detailliert aufgeführt. Bei Temperaturen von 4 und 20 °C kam es zu keiner signifikanten Virusreduktion innerhalb des Versuchszeitraums von 10 Tagen. Dagegen konnte bei Temperaturen über 37 °C bereits nach drei Tagen eine signifikante Virusreduktion nachgewiesen werden.¹¹ Ein Einfluss des Substrates auf die Reduktion des Titers wurde bei diesen Versuchen nicht gefunden.

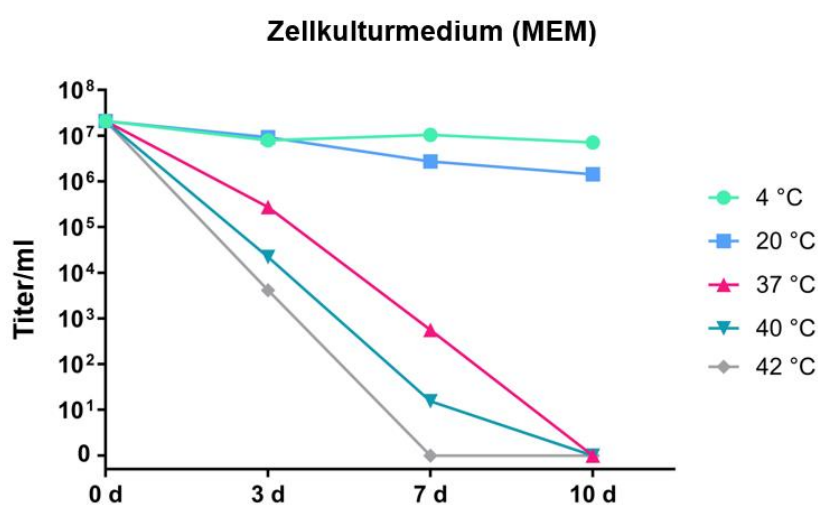


Abbildung 6: Verlauf des Virustiters von ERAV über zehn Tage.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchswiederholungen

¹¹ Signifikante Virusreduktion: Reduktion des Virustiters um 4 \log_{10} Stufen

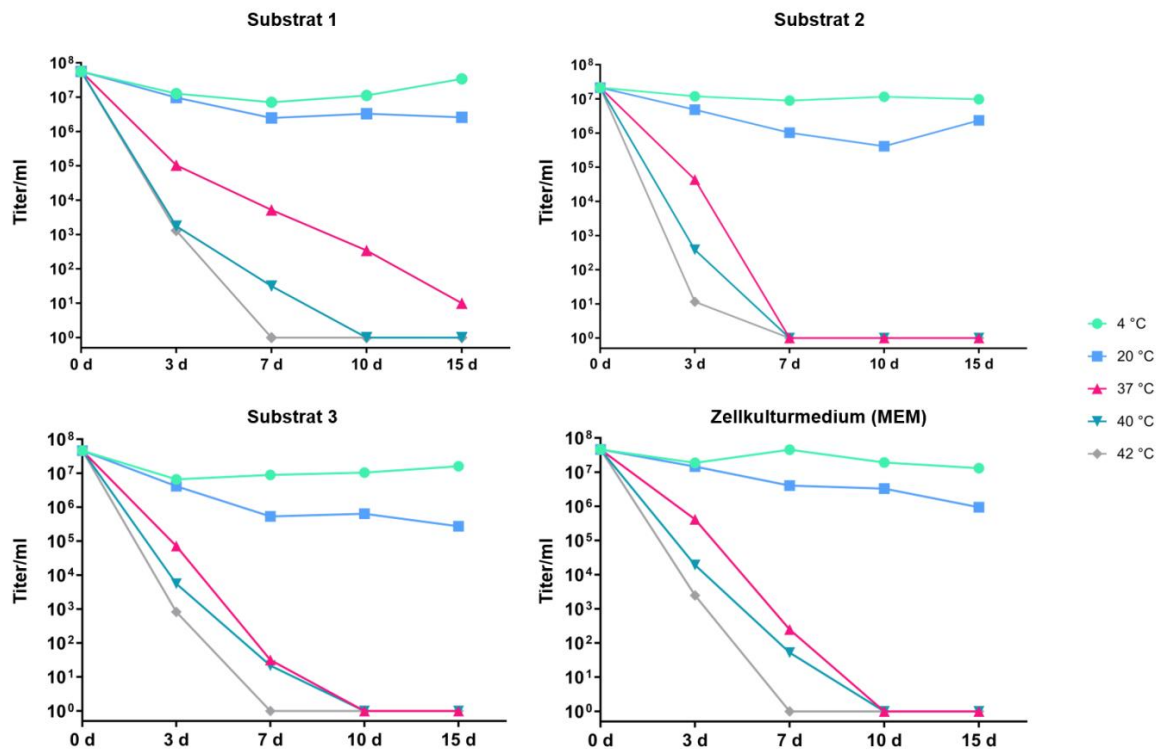


Abbildung 7: Verlauf des Virustiters von ERAV über 15 Tage

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchswiederholungen

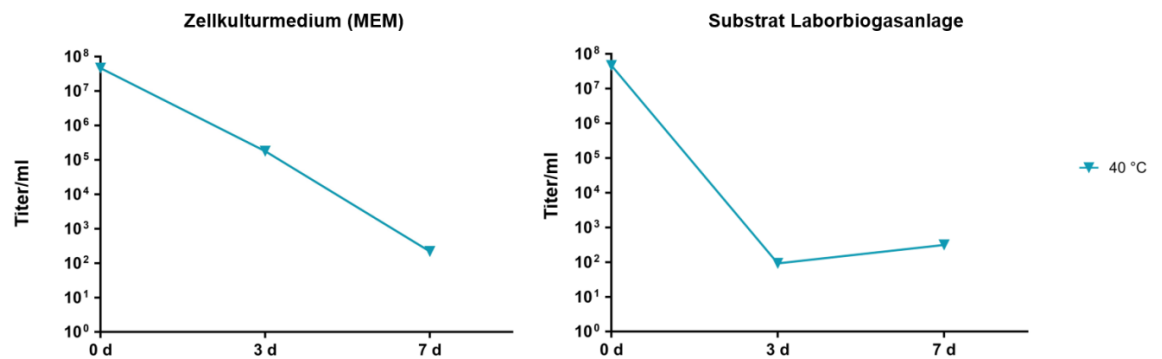


Abbildung 8: Verlauf des Virustiters von ERAV über sieben Tage.

Darstellung des Keimträgerversuchs bei 40 °C ($\pm 1,5$). Für jeden Zeitpunkt und jedes Substrat wurden drei Keimträger verwendet und anschließend den Mittelwert gebildet.

Tabelle 26: Reduktion von ERAV durch die Lagerung in Substrat 1 - 3

Substrat	Zeit (in Tagen)	Temperatur	Reduktion (in log ₁₀ Stufen)
S1	3	40, 42 °C	4
	3	37 °C	2
	7	40, 42 °C	7
	7	37 °C	4
	3, 7	4, 20 °C	n. s.*
S2	3	42 °C	6
	3	40 °C	4
	3	37 °C	2
	7	37, 40, 42 °C	7
	3, 7	4, 20 °C	n. s.
S3	3	42 °C	4
	3	40 °C	3
	3	37 °C	2
	7	42 °C	7
	7	37, 40 °C	6
	3, 7	4, 20 °C	n. s.
Zellkulturmedium (MEM)	3	42 °C	4
	3	40 °C	3
	3	37 °C	1,5
	7	42 °C	7
	7	37, 40 °C	5
	3, 7	4, 20 °C	n. s.

*n. s. nicht signifikant

Die Ergebnisse der Lagerung für BVDV sind in Abbildung 9 und Abbildung 10 dargestellt. Bei Temperaturen von 4 und 20 °C kam es zu keiner signifikanten Virusreduktion innerhalb des Versuchszeitraums von 10 respektive 15 Tagen.¹² Dagegen konnte bei Temperaturen über 37 °C bereits nach drei Tagen eine signifikante Virusreduktion nachgewiesen werden.

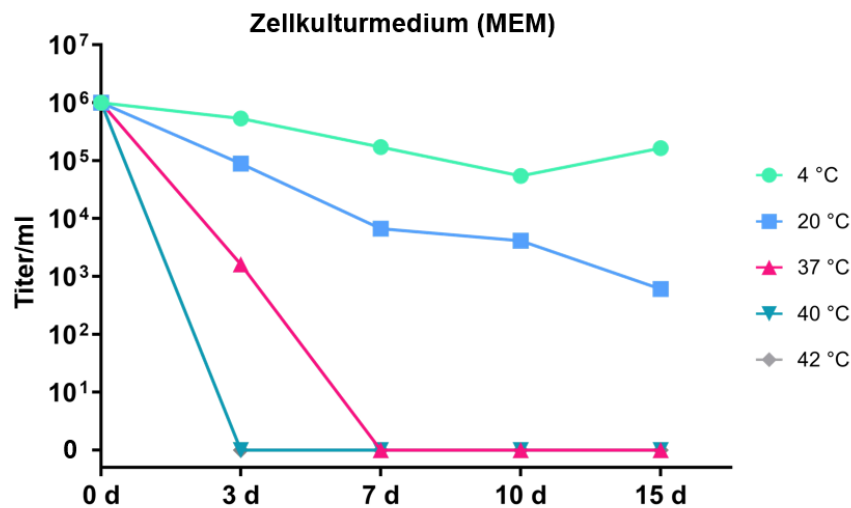


Abbildung 9: Verlauf des Virustiters von BVDV über 15 Tage

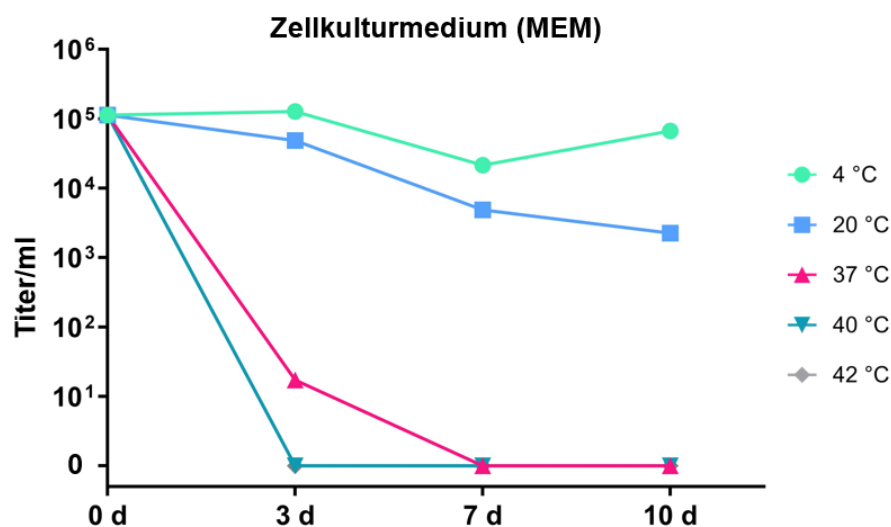


Abbildung 10: Verlauf des Virustiters von BVDV über zehn Tage

¹² Signifikante Virusreduktion: Reduktion des Virustiters um 4 \log_{10} Stufen

Inaktivierung von Viren durch den Biogasprozess im Labormaßstab: Batch-Versuch (vgl. Hohenheimer-Biogasertragstest)¹³

Die Ergebnisse der thermischen Inaktivierung des im Labormaßstab simulierten Biogasprozesses sind in Abbildung 11 dargestellt. Es zeigte sich, dass bei einer Temperatur von 53 °C und einem Zeitraum zwischen zwei und 24 h eine signifikante Virusreduktion stattfand.

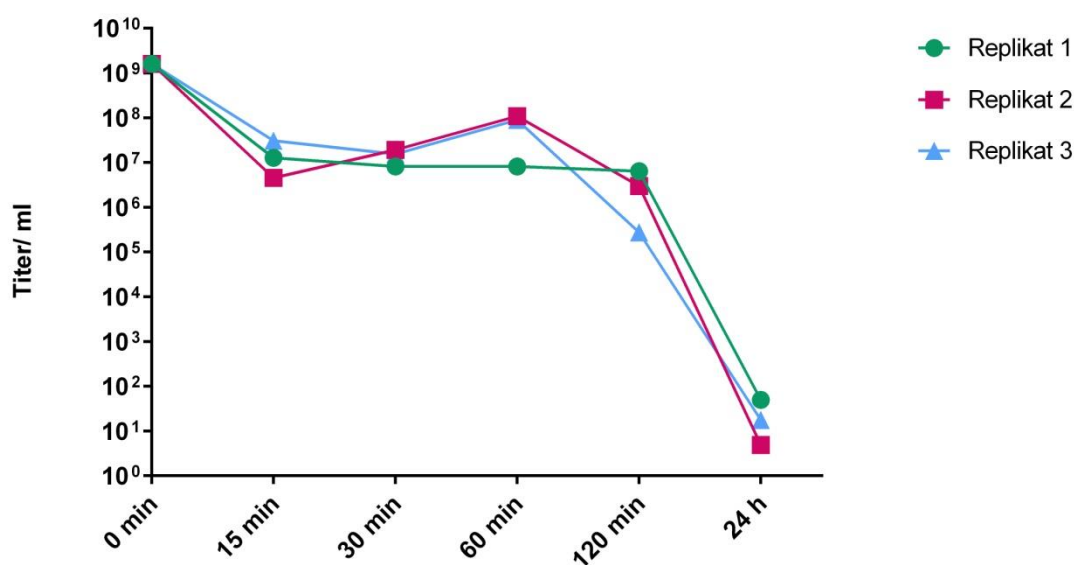


Abbildung 11: Verlauf des Virustiters von ERAV im Biogasprozess.

Die Temperatur betrug während des Versuches 53 °C (± 1.5). Für jede Beprobung wurde mit jeweils drei Keimträgern pro Glasspritze gearbeitet.

¹³ vgl. (Helffrich and Oechsner 2003b)

4.2.2. Einfluss der thermischen Inaktivierung auf ERAV und BVDV

Die Ergebnisse der thermischen Inaktivierung für ERAV und BVDV sind in Abbildung 12 und Abbildung 13 dargestellt. Die Zusammensetzung sowie die chemische Analyse der Substrate ist in Tabelle 7 und Tabelle 8 (Seite 32) detailliert aufgeführt.

Bei ERAV kam es bei Temperaturen von 40 und 50 °C unabhängig vom verwendeten Substrat zu keiner signifikanten Reduktion¹⁴ des Virustiters innerhalb des Versuchszeitraums von 120 Minuten. Erst ab einer Temperatur von 55 °C reduzierte sich der Virustiter innerhalb von 15 min signifikant. Für ERAV konnte zu keiner Zeit ein Einfluss des Substrates festgestellt werden. Die Ergebnisse des BVDV zeigten eine deutliche Temperaturabhängigkeit der Virusreduktion. Während bei 40 °C lediglich eine Virusreduktion um 2 log₁₀ Stufen feststellbar war, fand bei 45 °C in der gleichen Zeit eine Reduktion um 6 log₁₀ Stufen statt. Bei 50 °C konnte dieser Effekt bereits nach 60 min nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte sich ein Reduktions-Effekt des Substrates bei BVDV.

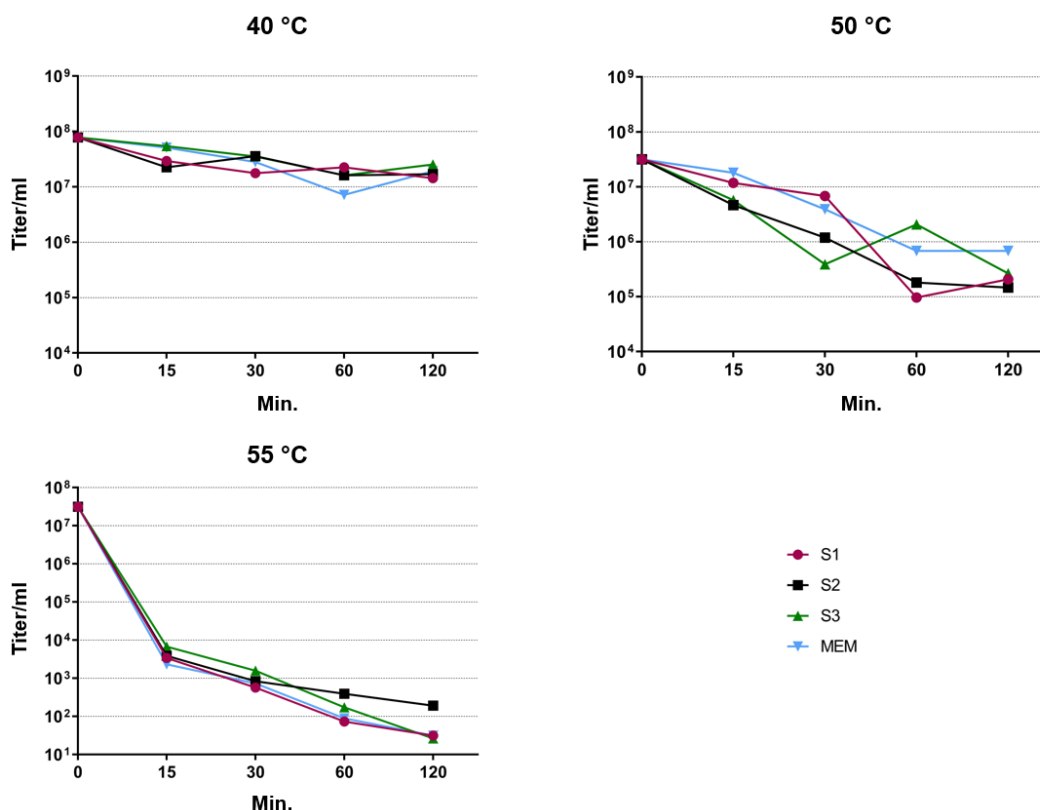


Abbildung 12: Verlauf des Virustiters von ERAV bei drei Temperaturen

¹⁴ Signifikante Virusreduktion: Reduktion des Virustiters um 4 log₁₀ Stufen

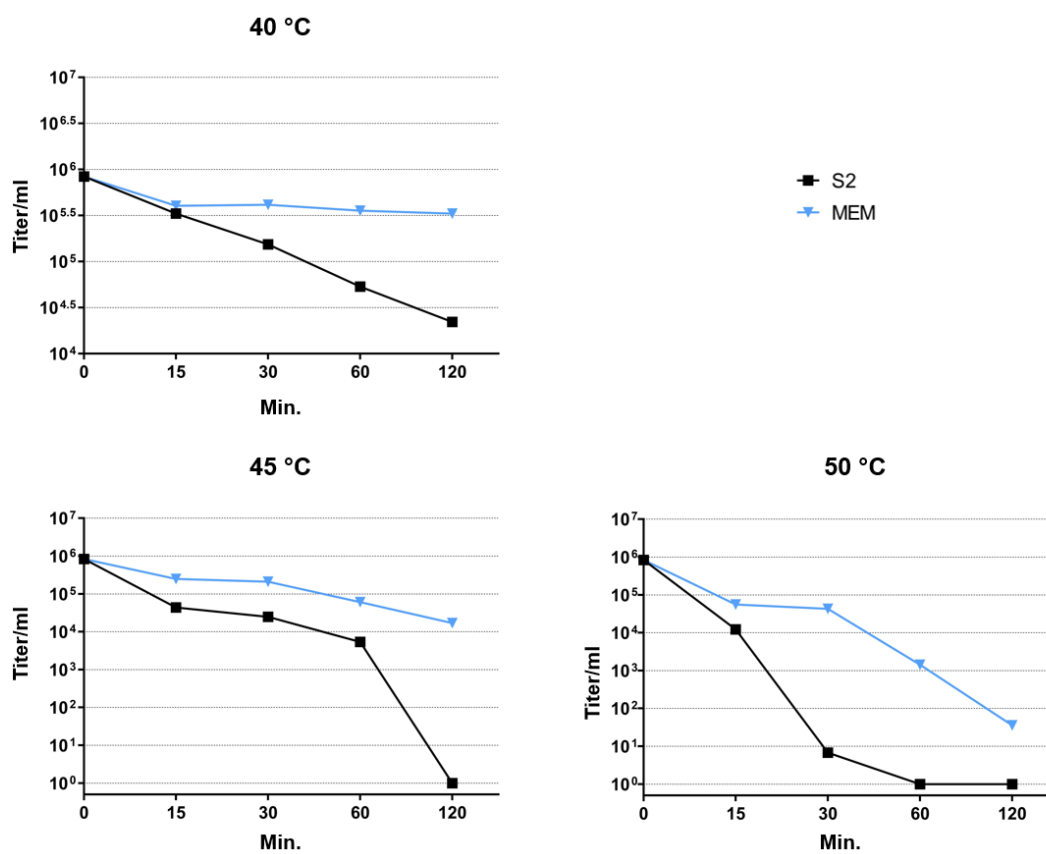


Abbildung 13: Verlauf des Virustiters von BVDV bei drei Temperaturen

5. Diskussion

Mit der Zielführung eine geeignete Vorgehensweise für die Inaktivierung tier- und humanpathogener Infektions- und Zoonoseerreger zu finden, wurde das Potential biotechnologischer Methoden zur Inaktivierung untersucht, um Handlungsmöglichkeiten für den Seuchenfall zu schaffen. Ziel war es, das Verhalten seuchenrelevanter und bisher in dieser Art nicht untersuchte, bestandsrelevante Erreger wie *C. burnetii*, *Ch. abortus* und Mykobakterien sowie ausgewählte Viren zu untersuchen. Der Fokus lag insbesondere auf den Erregern der Rindertuberkulose *M. bovis* und *M. caprae*. Ebenfalls in die Untersuchungen miteinbezogen wurde der Erreger der Paratuberkulose *M. avium* ssp. *paratubercuolis* (MAP) aufgrund seiner besonders hohen Thermostabilität. Neben bakteriellen Tierseuchenerregern sind auch virale Tierseuchenerreger von großer Bedeutung. Hierzu zählen Ausbrüche mit den Erregern der Maul- und Klauenseuche (MKS), der Klassischen Schweinepest (KSP) oder der Aviären Influenza (AI). Diese Erreger sind nicht nur in Bezug auf die landwirtschaftliche Nutzung und dem Recycling von Wirtschaftsdüngern von Bedeutung, sondern auch hinsichtlich der Verwertung tierischer Produkte in der Lebensmittelindustrie. Ein Augenmerk wurde hier auf den Vorgang der Pasteurisierung und die gängigen geltenden Vorschriften gelegt. Um den Bezug zur landwirtschaftlichen Praxis und der Zielstellung dieser Arbeit herzustellen wurde das Hauptaugenmerk auf die Optimierung des Biogasprozesses hinsichtlich Temperatur und Verweilzeit sowie die Auswirkungen der Zusammensetzung einzelner Substrate auf das Inaktivierungsverhalten der Erreger gelegt. Als weitere Möglichkeit der Reduktion respektive Inaktivierung von Pathogenen wurde die Lagerung von mit Pathogenen kontaminierten Substraten bei definierten Temperaturen und Zeitintervallen untersucht. Die Erregernachweise erfolgten sowohl kulturell (Goldstandard) als auch molekularbiologisch. Die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen werden im Folgenden anhand von Fachliteratur diskutiert.

Inaktivierung von Bakterien und Viren durch Lagerung und thermische Behandlung

Um zu evaluieren, ob und wie sich die Lagerdauer, die Zusammensetzung der Substrate sowie die Temperatur auf die Reduktion von Mykobakterien auswirkt oder es zu einer Vermehrung (Wiederverkeimung) kommt, wurden die beiden *M. bovis* Feldisolate (*M. bovis* 10-11014-00074 und 10-11014-00073) für insgesamt 21 Tage bei 4, 20, und 37 °C in drei Substraten (S1 – S3) gelagert. Um den Einfluss der Substrate darstellen zu können, wurden die Feldisolate in PBS suspendiert und unter gleichen Versuchsbedingungen gehalten. In PBS suspendiert, waren über die gesamte Versuchslaufzeit bei allen Temperaturen Mykobakterien nachweisbar. Zwischen S1 – S3 gab es substrat- und temperaturspezifische Unterschiede. Bei 4 und 20 °C konnten in S1 über die ganze Laufzeit Mykobakterien nachgewiesen werden. In S2 waren nach 21 d vereinzelt Kolonien vorhanden. Bei den

Beprobungen nach sieben und 14 Tagen konnten allerdings keine Erreger nachgewiesen werden. Möglicherweise konnten sich die Mykobakterien nach 21 d an das neue Milieu anpassen und waren deshalb nachweisbar. In S3 konnte nur bei *M. bovis* (10-11014-00074) noch Kolonien nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass es intraspezifische Unterschiede gibt, die bei der Auswahl der Methode der Inaktivierung berücksichtigt werden müssen. Bei 37 °C waren bereits nach sieben Tagen keine nachweisbaren Erreger mehr vorhanden. Dieses Ergebnis zeigte sich auch für S2 und S3. Möglicherweise wurden die Kulturen bei 37 °C von schneller wachsenden Bakterien, die in den einzelnen Substraten enthalten waren, verdrängt. Eine Dekontamination des Materials wurde im Vorfeld getestet, jedoch ohne signifikantes Ergebnis, weshalb bei den Versuchen auf eine vorherige Dekontamination verzichtet wurde. Zudem sollte der Bezug zur Praxis bestehen bleiben, da dort ebenfalls keine Dekontaminationen durchgeführt werden. Des Weiteren sollte mit diesem Versuch gezeigt werden, dass die Lagerung die Aufgabe der Dekontamination (Reduktion der Pathogene auf ein Minimum) des Materials übernimmt. Dennoch zeigen diese Ergebnisse sowohl eine temperatur- als auch substratabhängige Erregerreduktion und keine Vermehrung während der Lagerung. Die Abhängigkeit von Umweltfaktoren wie Temperatur, Sonneneinstrahlung und Feuchtigkeitsverlust zeigte sich auch in anderen Studien (Bange et al., 2012; Böttger 2001; Duffield und Young 1985; Fine et al., 2011). Auch in einer sehr frühen Studie von Williams und Hoy (1930) wurde eine temperaturabhängige Reduktion mit *M. bovis* kontaminiertem Rinderfaeces auf Weideland nachgewiesen. Sie konnten Erreger über fünf Monate im Winter, zwei Monate im Frühling und vier Monate im Herbst nachweisen. Im Sommer waren bereits nach zwei Monaten keine vermehrungsfähigen Erreger nachweisbar. Unter kühlen und dunklen Bedingungen konnten sie über 12 Monate vermehrungsfähige Mykobakterien nachweisen. Die Substratzusammensetzung respektive die Art des kontaminierten Materials spielte in den Studien ebenfalls eine Rolle. Fine et al. (2011) zeigten, dass kultivierbare Erreger nach 88 d in Erde, 58 d in Wasser und Heu sowie 43 d auf Mais nachweisbar waren. Duffield und Young (1985) konnten in ihrer Studie mit artifiziell inokulierter trockener und feuchter Erde sowie Rinderfaeces erst nach vier Wochen keine *M. bovis* Kolonien mehr nachweisen. Eine Möglichkeit, weshalb in diesen Studien über längere Zeiträume vermehrungsfähige Erreger nachgewiesen werden konnten, könnte an der Auswahl der Substrate liegen. Die in dieser Arbeit verwendeten Substrate waren stets Kombinationen aus tierischen und pflanzlichen Komponenten (S1: 60 % Schweinegülle, 40 % nachwachsende Rohstoffe; S2: 60 % Rindergülle, 40 % Gemisch aus Pferde-, Rinder-, Geflügelmist, nachwachsende Rohstoffe; S3: 100 % nachwachsende Rohstoffe). Die pH-Werte aller drei Substrate lagen im leicht alkalischen Bereich von 7,7 bis 8,3 und sind daher als unproblematisch einzustufen. Die enthaltene bakterielle Flora könnte maßgeblich am Ergebnis beteiligt sein, da sie die

Mykobakterien unterdrückt und an der Vermehrung hindert. Um daraus Richtwerte für die Lagerung zu etablieren sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

Vergleichend zu den Lagerungsversuchen mit Bakterien wurden diese mit Viren durchgeführt. Verwendet wurden hierfür das ERAV und das BVDV. Beide Viren dienen als Surrogatviren für hochkontagiöse Viren. Das ERAV wurde anstelle des Maul- und Klauenseuche Virus verwendet, da mit letzterem aufgrund seiner hohen Kontagiosität nur in Laboratorien der Sicherheitsstufe 4 gearbeitet werden darf. Aufgrund der sehr engen phylogenetischen Verwandtschaft und den zahlreichen gemeinsamen biochemischen Eigenschaften (z. B. Säurelabilität) wurde das ERAV als geeignet erachtet, da sich die Ergebnisse auf das MKS Virus übertragen lassen (Haas 2011; Li et al., 1996; Wutz et al., 1996). Das BVDV wurde als Surrogatvirus für das kontagiöse Klassische Schweinepestvirus verwendet, da sie ebenfalls sehr eng miteinander verwandt sind und die Ergebnisse daher ebenfalls übertragbar sind. Das BVDV war auch dahingehend interessant, da es in der Lage ist sowohl Wiederkäuer als auch Nicht-Wiederkäuer zu infizieren und dadurch ein breiteres Wirtsspektrum besitzt als das KSP Virus. Deshalb ist es im Hinblick auf das epidemiologische Potential von Bedeutung (Ridpath und Passler 2016; Wegmüller 2006).

Um nun zu evaluieren, ob und wie die Lagerdauer, die Zusammensetzung der Substrate sowie die Temperatur sich auf die Reduktion viraler Pathogene auswirkt, wurde zunächst das ERAV für insgesamt 15 d bei fünf Temperaturen (4, 20, 37, 40 und 42 °C) in drei Substraten (S1 – S3) gelagert. Die Lagerung sollte als alternative Möglichkeit einer signifikanten Virusreduktion (Reduktion mindestens um 4 log₁₀ Stufen) untersucht werden. Um mit Substraten in Zellkulturen arbeiten zu können, wurden Verdünnungen hergestellt, die sich als nicht zytotoxisch erwiesen. Diese wurden ebenfalls chemisch analysiert, um den Vergleich zu den unverdünnten Substraten herstellen zu können. Die Analysen ergaben bei einer Verdünnung von 1:20 pH-Werte zwischen 8,0 und 8,5. Im Vergleich zum unverdünnten Substrat stiegen die Werte nur unwesentlich an. Die N- und die NH₄-N-Gehalte waren erwartungsgemäß stark verringert (vgl. N-Gehalt unverdünnt: 0,44 – 0,71; N-Gehalt verdünnt: 0,025 – 0,033). Die niedrigsten N-Gehalte wies Substrat 3 auf, was aufgrund der rein pflanzlichen Zusammensetzung nicht weiter überraschend ist. Um einen Einfluss der Substrate nachzuweisen, wurde auch in diesem Versuch eine Kontrolle in Zellkulturmedium mitgeführt. Quantifizierte Virussuspensionen (ERAV:10^{7,5-8} Viren pro Milliliter) wurden mit dem vorverdünnten Substrat (1:20) respektive Zellkulturmedium über einen Zeitraum von 15 d bei fünf Temperaturen gelagert und nach drei, sieben, zehn und 15 Tagen beprobt und der Titer bestimmt. Über die Versuchsdauer hinweg konnte, bis auf die niedrigen Temperaturen (4 und 20 °C), eine signifikante Reduktion des Virustiters nachgewiesen werden. Jedoch erfolgte die Virusreduktion hauptsächlich durch die

Temperatur und nicht das Substrat. Eine substratspezifische Reduktion des Titers konnte nicht nachgewiesen werden. Lagen die Temperaturen bei 40 und 42 °C, so konnte bei ERAV eine signifikante Virusreduktion nach drei Tagen festgestellt werden. Um vergleichen zu können, ob es Unterschiede zwischen Versuchsergebnissen mit auf Keimträgern adsorbierten Viren und direkt in Substrat suspendierten Viren gibt, wurde ein Versuch mit ERAV gemacht. Zudem sollte überprüft werden, ob es allein durch die Methodik der Virusadsorption auf Keimträger zu Titerverlusten kommen kann. Der Ausgangstiter betrug auch mit dieser Methode $10^{7.5}$ Viren je Milliliter. Die Keimträger wurden bei 40 °C für sieben Tage in Rindergülle respektive Zellkulturmedium gelagert. Nach drei Tagen zeigte sich eine signifikante Virusreduktion bei den in Rindergülle gelagerten Keimträgern. Bei den in Zellkulturmedium gelagerten Keimträgern konnte erst nach sieben Tagen ein signifikanter Titerverlust festgestellt werden. Bei den in Rindergülle gelagerten Keimträgern war bei sieben Tagen ein Anstieg des Titers von 10^2 auf $10^{2.5}$ Viren je ml zu verzeichnen. Dies könnte neben einer tatsächlichen Virusvermehrung auch ein methodisches Problem gewesen sein. Auffällig war die deutliche Substratabhängigkeit der Viren, die nur in diesem Versuch nachgewiesen werden konnte. Waren die Viren direkt in Substrat suspendiert, so konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Ein Grund hierfür könnte das geschütztere Umfeld für die Viren innerhalb der Keimträger sein und eine damit verbundene höhere Reisolierungsrate: Der Stoffaustausch ist durch die Semipermeabilität der Keimträgerfolien gewährleistet und die Viren können durch die sichere Adsorption auf den Keimträgermembranen besser isoliert werden und weisen dadurch auch einen leichten Titeranstieg auf im Vergleich zu den direkt in Substrat suspendierten Viren.

Aufgrund der festgestellten Substratunabhängigkeit bei ERAV wurden für die Versuche mit BVDV keine unterschiedlichen Substrate verwendet. Zudem ergaben Versuche mit Keimträgern, dass sich das BVDV nicht für diese Methodik eignete (zu hoher Titerverlust durch das Adsorbieren auf Keimträger). Die Versuche wurden mit in Zellkulturmedium suspendiertem BVDV durchgeführt. Die quantifizierten (10^{5-6} Viren je Milliliter) Virussuspensionen wurden für 10 respektive 15 d bei fünf Temperaturen gelagert (4, 20, 37, 40 und 42 °C). Die Ergebnisse zeigen eine deutlich schnellere Reduktion im Vergleich zum ERAV: Bereits nach drei Tagen konnten bei 40 und 42 °C keine Viren mehr nachgewiesen werden. Bei 37 °C waren nach sieben Tagen keine Viren mehr nachzuweisen. Bei 4 und 20 °C konnte über den Versuchszeitraum (10 und 15 d) keine signifikante Reduktion des Virustiters nachgewiesen werden. Wegmüller (2006) zeigte in seiner Studie, dass die thermische Stabilität von BVDV so gering ist, dass bereits nach vier Tagen bei 37 °C keine der vorliegenden Viren mehr nachweisbar waren. Diese Erkenntnisse decken sich mit den in dieser Arbeit gemachten. Bötner und Belsham (2012) wiesen in ihrer Studie nach, dass das BVDV (Initialkonzentration $10^{5.2}$ TCID₅₀/50 µl) in Rindergülle bei einer Temperatur von 5 °C nach drei Wochen, bei 20 °C nach drei Tagen

und bei 35 °C nach drei Stunden inaktiviert werden kann. Bei Temperaturen von 40 ° bis 55 °C lag die Inaktivierungsdauer zwischen 50 und fünf Minuten. Zusätzlich wurde BVDV in Eagles's Minimum Essential Medium (EMEM) mit derselben Initialkonzentration wie in Rindergülle suspendiert. Die Ergebnisse zeigten hier eine deutlich verlängerte Periode bis zur Inaktivierung: 5 °C (> 6 Wochen), 20 °C (> 2 Wochen), 35 °C (> 5 h), 40 °C (> 2 h), 45 °C (> 60 min), 50 °C (> 50 min), 55 °C (> 40 min). Ein Grund für die Unterschiede zwischen ERAV und BVDV könnte auf die morphologischen Eigenschaften (behüllt – unbehüllt) zurückzuführen sein. Was beide jedoch gemeinsam haben ist der konstant hohe Titer bei niedrigen Temperaturen. Der Zusammenhang niedrige Temperatur – geringerer Titerverlust konnte auch in einer anderen Studie bewiesen werden. In einer Studie mit dem MKS Virus zeigte sich, dass das Virus (Ausgangstiter $10^{4.5}$ Viren pro Milliliter) in Schweinegülle bei 5 °C für mehr als 14 Wochen infektiös blieb und bei 20 °C für zwei Wochen. In der gleichen Studie wurde das MKS-Virus auch in Rindergülle untersucht und bei 20 °C waren nach drei Wochen keine Viren mehr detektierbar. Vergleichend hierzu testeten sie es in Zellkulturmedium und wiesen bei 5 °C nach neun Wochen und bei 20 °C nach neun Tagen keine Viren mehr nach (Biermann et al., 1990; Bøtner und Belsham 2012; Haas et al., 1995; Uhlenhaut 2005). Diese und die eigenen Ergebnisse zeigen, dass die Reduktion des Virustiters stark von der Temperatur abhängig ist. Zudem zeigen die Studien einen Einfluss der Substrate, in denen die Viren suspendiert sind. Neben der Anwesenheit von Proteinen, welche die Viren schützen können, spielen auch Parameter wie Feuchtigkeit, Temperaturschwankungen und der pH-Wert eine Rolle während der Lagerung. Daher empfiehlt es sich bei der Festlegung von Richtwerten für die Lagerung generelle Aussagen über die Tenazität bzw. Stabilität der Infektiosität von Viren nicht pauschal zu treffen. Denn die jeweilige Morphologie, die physikalischen sowie die biochemischen Eigenschaften des jeweiligen Virus sind immer im Zusammenhang mit den vorherrschenden Umweltbedingungen zu betrachten.

Um den Einfluss des Biogasprozesses auf die Reduktion des Virustiters zu analysieren, wurde ein sogenannter Batch-Versuch in Anlehnung an den Hohenheimer Biogasertragstest durchgeführt (Helffrich und Oechsner 2003a). Hierfür wurde der Biogasprozess im Labormaßstab mittels Glasspritzen simuliert. Für diesen Versuch wurde die Keimträgermethode angewandt, da eine Re-Isolation der Viren aus dem Substrat nicht möglich gewesen wäre, da für diesen Versuch unverdünntes Substrat aus eigenen thermophil betriebenen Laborbiogasanlagen verwendet wurde. Dies war nötig, um den Biogasprozess so praxisnah wie möglich zu gestalten. Aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche, wurde nur mit dem ERAV gearbeitet. Die Keimträger wurden für insgesamt 24 h bei 53 °C (± 1.5) °C gelagert und nach 15, 30, 60, 120 min und 24 h entnommen. Um den Biogasprozess nicht zu unterbrechen, wurde für jede Entnahme eine eigene Glasspritze verwendet. Die Ergebnisse zeigten, dass bei allen drei Wiederholungen

zwischen 120 min und 24 h eine signifikante Reduktion stattfand und der Titer bei 10^{1-0} Viren je ml bei der letzten Probenahme lag. Für den Tierseuchenfall könnte die Empfehlung demnach lauten, die Verweildauer des Substrats in der Anlage auf mindestens 24 h anzuheben. Um eine noch größere Sicherheit zu gewährleisten sowie speziesspezifische Unterschiede mit zu berücksichtigen sollte ein Sicherheitspuffer von +4 h in Betracht gezogen werden. Zur Absicherung dieser Ergebnisse sollten dennoch weitere Studien folgen und weitere Untersuchungen nachgestellt werden.

Um den Pasteurisierungserfolg in Abhängigkeit des Substrates nachzuweisen, wurden zunächst die beiden *M. bovis* Isolate in Substrat suspendiert und erhitzt. Verwendet wurde hierfür Substrat 2, da es eine sehr heterogene Mischung aus Rindergülle, Pferde-, Rinder- und Geflügelmist sowie pflanzlichen Anteilen war und deshalb einen starken Einfluss auf die Reduktion der Mykobakterien vermutet wurde. Um den Effekt des Substrates zweifelsfrei nachweisen zu können, wurden die Mykobakterien in PBS suspendiert und ebenfalls auf 70 °C für 240 min erhitzt und dazwischen nach 30 und 60 min beprobt. Jedoch konnten zu keinem Zeitpunkt weder in S2 noch in PBS Mykobakterien nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden thermische Inaktivierungsversuche mit dem Erreger der Paratuberkulose *MAP* durchgeführt. Dieser besitzt eine bekannte und sehr hohe Thermotoleranz, die noch über der von *M. bovis* und *M. caprae* liegt (Valentin-Weigand 2011). Aufgrund der Ergebnisse mit den beiden *M. bovis* Isolaten wurde in diesem Versuch der Pasteurisierungserfolg nicht in Abhängigkeit des Substrates untersucht, sondern der Hygienesierungseffekt durch Pasteurisation. Zudem werden Biogasanlagen nicht in diesen Temperaturbereichen betrieben, da kein stabiler Prozess mehr möglich wäre, weil die für den Prozess notwendige Bakterienflora bei diesen Temperaturen nicht überleben würde. Zusätzlich hatte der Verzicht auf das Substrat einen positiven Effekt auf den kulturellen Nachweis, da das Kontaminationsrisiko der Nährböden durch das Substrat über die lange Bebrütungsdauer erheblich gesenkt werden konnte. Für den Versuch wurde *MAP* in PBS suspendiert und für 360 min bei 70 bzw. 80 °C erhitzt und nach 30, 60, 240 und 360 Minuten Proben entnommen. Bei einer Temperatur von 70 °C waren die Nährböden bei 240 min beinahe vollständig mit Kolonien bewachsen, wohingegen nach 360 min auf keiner der Nährböden Kolonien zu finden waren. Ähnlich verhielt es sich bei einer Temperatur von 80 °C: bis 240 min waren die Nährböden vollständig bewachsen. Der Versuch wurde jedoch nach 240 min beendet, da die praktische Relevanz bei dieser Temperatur und Dauer des Versuches nicht mehr gegeben war und die Prozesskosten in der Praxis zu hoch wären. Mehrere andere Studien konnten ebenfalls zeigen, dass *MAP* den Pasteurisierungsprozess überleben kann. Bei Initialkonzentrationen von 100 Bakterien pro Milliliter, konnten vermehrungsfähige *MAP* sowohl in pasteurisierter Milch, Milchpulver für Babynahrung, Roh- und Frischkäse als auch in Rindfleisch, der Umwelt sowie im

Trinkwasser nachgewiesen werden (Aboagye und Rowe 2011; Lavers et al., 2012; Sung und Collins 1998). Außerdem ist bekannt, dass *MAP* auch nach einer High-Temperature-Short-Time Pasteurisation (HTST, 15 s bei 72 °C) funktionsfähig und kultivierbar bleibt. Die Ergebnisse der Studie von Shankar et al. (2010) zeigten, dass 67 % (18/27) der pasteurisierten Proben in der Kultur noch positiv waren. Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen im Vergleich zu den in den Studien gefundenen, könnten intraspezifischen Unterschieden geschuldet sein. Die in dieser Arbeit verwendeten Isolate waren Feldisolate, die im Vergleich zu Laborstämmen eventuell eine höhere Tenazität besitzen könnten. Diese Tatsache sollte bei der Inaktivierung durch Pasteurisierung nicht unberücksichtigt bleiben. Um für den Tierseuchenfall Richtwerte herausgeben zu können, wären weitere Untersuchungen mit verschiedenen Isolaten sinnvoll. Und obwohl von *MAP* durch die HTST 5 log₁₀ Stufen und mehr inaktiviert werden können, ist es empfehlenswert, die Effizienz der HTST durch zusätzliche Behandlungen wie Homogenisierung, Bactofugation oder Mikrofiltrierung zu steigern bzw. zu verbessern (Hammer et al., 2014).

Anhand dieser gewonnenen Erkenntnisse wurden thermische Inaktivierungsversuche mit *M. bovis* und *M. caprae* durchgeführt. Hier wurden die Erreger ebenfalls in PBS suspendiert und verschiedenen Temperaturen für definierte Zeiträume ausgesetzt. Begonnen wurde mit einer Temperatur von 60 °C, da die Ergebnisse des substratabhängigen Pasteurisierungserfolges gezeigt hatten, dass bei 70 °C keine Mykobakterien mehr nachweisbar waren. Doch auch bei 60 °C konnten zu keinem Zeitpunkt (30, 60, 240 min) mehr vermehrungsfähige Mykobakterien nachgewiesen werden. Daher wurde die Temperatur im nächsten Schritt auf 55 °C gesenkt. Hier konnten auch noch nach 240 min vermehrungsfähige Erreger nachgewiesen werden. Die Anzahl der Kolonien war aber deutlich geringer als bei den Proben nach 30 und 60 Minuten. Ausnahme hier bildete ein *M. caprae* Isolat (11/0028), ein aus Rotwild isoliertes Feldisolat. Um den Bezug zur Praxis herzustellen, wo thermophile Anlagen im Bereich von 50 bis 55 °C betrieben werden, da der Biogasprozess mit steigenden Temperaturen zunehmend instabiler wird, wurde die Temperatur erneut um 5 °C gesenkt und dafür jedoch die Periode der thermischen Inaktivierung verlängert. Während der Versuchsdurchläufe bei 50 °C wurden nach 30, 60, 240, 360, 720 min, 24 und 48 h Proben entnommen. Alle Proben waren nach 48 h bis auf ein *M. caprae* Isolat (13-0108370-001) positiv. Diese Ergebnisse zeigen die ausgeprägte Thermotoleranz bei Mykobakterien und die z. T. intraspezifischen Unterschiede. Die Empfehlung für eine sichere Inaktivierung wäre zum einen eine Temperatur von 60° für 30 bis 60 Minuten respektive eine Temperatur von 55 °C über sechs bis acht Stunden. Für die Etablierung von Richtwerten sind weitere Untersuchungen notwendig. Ein Grund für die ausgeprägte Widerstandsfähigkeit könnte der hohe Lipidgehalt in der Zellwand der Mykobakterien sein. Zudem wurden in dieser Arbeit nur Feldisolate verwendet, die durch ihre Anpassung an Umwelteinflüsse höhere Resistenzen entwickelt haben könnten.

Untersuchungen von Hammer et al. (2015) mit *M. bovis* und *M. caprae* zeigten, dass es bei 62,5 °C zu einer deutlichen Inaktivierung kommt. Zusätzlich führten sie Erhitzungsversuche bei 65 und 60 °C mit Heißhaltezeiten von 15, 20 und 25 s durch. Sie ermittelten D-Werte für alle Stämme bei 65 °C im Bereich von sieben bis acht Sekunden und bei 62,5 °C zwischen 15 und 20 Sekunden. Bei 60 °C fand zum Teil erst nach 40 und 130 s eine Inaktivierung statt. Anhand der eigenen Ergebnisse und der anderen Studien zeigte sich, dass zur sicheren Inaktivierung Temperaturen von mindestens 60 °C ratsam sind und die Heißhaltezeiten nicht zu kurz sein sollten.

Um die Thermotoleranz intrazellulärer Bakterien zu untersuchen, wurden Pasteurisierungsversuche mit *C. burnetii* und thermische Inaktivierungsversuche mit *Ch. abortus* durchgeführt. Bei *C. burnetii* wurde die Substratabhängigkeit nicht untersucht, da befürchtet wurde, dass das Substrat bei der PCR zu Interferenzen führen könnte und so die Ergebnisse verfälscht respektive überhaupt nicht auswertbar wären. *C. burnetii* wurde ausgewählt, da es in den letzten Jahren immer wieder zu seuchenhaften Q-Fieber-Ausbrüchen kam und Coxiellen im Vergleich zu anderen Bakterien außerordentlich widerstandsfähig gegenüber Umwelteinflüssen sind, was die Verbreitung dieses Erregers begünstigt. Pasteurisierungsversuche von Enright et al. (1957a, b) zeigten, dass 61,67 °C für 30 min unzureichend für die Eliminierung lebensfähiger Coxiellen ist, wohingegen bei 62,78 °C für 30 min die Erreger sicher inaktiviert werden. Außerdem konnten sie zeigen, dass die Standardpasteurisation bei 71,67 °C für 15 Sek lebensfähige Coxiellen in Vollmilch zuverlässig inaktiviert. Auf Grundlage dieser Untersuchungen gelten laut Bundesgesetzblatt (BgbI) die heutigen Temperatur-Zeit-Kombinationen: 62 – 65 °C (30 – 32 Minuten), 72 – 75 °C (15 – 30 Sekunden), Hoherhitzung im kontinuierlichen Durchfluss auf 85 °C bis 127 °C (mind. vier Sekunden), Ultrahoherhitzung 135 – 150 °C (effektive Heißhaltezeit eine Sekunde). An diesen Temperaturwerten orientierte sich der Versuchsaufbau für diese Arbeit. Vor den Pasteurisierungsversuchen wurde *C. burnetii* vermehrt und der Gehalt an Coxiellen mittels einer Standard PCR und Transposase Primern und anschließender Gelelektrophorese bestimmt. Die Probe mit dem höchsten Coxiellengehalt wurde in Zellkultmedium suspendiert und auf 50, 60 und 70 °C erhitzt. Die Probeentnahmen wurden der Temperatur entsprechend angepasst: bei den beiden niedrigeren Temperaturen wurde nach 30 und 60 min beprobt, bei 70 °C nach 15 bzw. 30 Minuten. Damit sollte sichergestellt werden, dass falls Reduktionen bereits nach 15 min eintreten, diese auch nachgewiesen werden können. Für den Nachweis wurden zwei Ansätze gewählt: Zum einen, der alleinige molekularbiologische Nachweis des thermisch behandelten Materials und zum anderen die Kombination aus Kultur und anschließender PCR des kultivierten Materials. Doch trotz dieser Kombination war es nicht möglich belastbare Ergebnisse zu erhalten, die aussagekräftig genug für die Praxis waren. Für zukünftige Untersuchungen sollte das Kultursystem dahingehend verbessert werden, dass

bereits aus der Kultur eine zumindest semiquantitative Bestimmung des Coxiellengehalts möglich ist, da die Kultur nach wie vor als der Goldstandard zu sehen ist. Zusätzlich wären Lagerungsversuche in verschiedenen Substraten und bei unterschiedlichen Temperaturen interessant, da die Tenazität von Coxiellen sowohl in feuchten als auch trockenen Milieus sehr hoch ist. Beispielsweise in Organen (32 °C) sind sie zwischen 49 – 182 d nachweisbar, in Staub bzw. Wolle sind sie zwischen ein bis zwei Jahre (4 °C) bzw. sieben bis neun Monate (20 °C) immer noch nachzuweisen (BfR 2010; Schliesser 1991). Was sie mit anderen Erregern gemein haben, ist die Abnahme der Tenazität mit steigenden Temperaturen, was für die Inaktivierung im Seuchenfall ein wichtiger Hinweis ist. Die Empfehlung für die Praxis im Tierseuchenfall sollte in jedem Fall eine Pasteurisierung des kontaminierten Materials sein, um das Risiko einer weiteren Verbreitung auf ein Minimum zu reduzieren.

Für die Untersuchungen mit dem ebenfalls obligat intrazellulären Bakterium *Ch. abortus* wurden thermische Inaktivierungsversuche in Abhängigkeit des Substrates durchgeführt. Die Abhängigkeit von Substraten wurde untersucht, da der Nachweis nur kulturell erfolgte und das bereits für die Viren etablierte Zellkultursystem verwendet werden konnte (Verdünnung der Substrate 1:20). Die Chlamydien wurden in den vorverdünnten Substraten (1:20) suspendiert und bei 40, 50 und 60 °C erhitzt und zu fünf Zeitpunkten beprobt (5, 10, 15, 60, 120 min). Im Anschluss wurden die thermisch behandelten Suspensionen kultiviert und mittels einer DAPI-Färbung angefärbt. Standardmäßig ist es üblich, Chlamydien mittels einer ZIEHL-NEELEN-Färbung anzufärben (Chlamydieneinschlüsse stellen sich rot dar). Diese Färbung lieferte hier keine verwertbaren Ergebnisse, weshalb verschiedene Färbemethoden getestet wurden. Bei der DAPI-Färbung waren Einschlüsse sichtbar. Dennoch sollten für zukünftige Untersuchungen auf die klassischen und langjährig etablierten Färbemethoden (z. B. ZIEHL-NEELEN, Giemsa) zurückgegriffen werden, um die wissenschaftliche Evidenz der Ergebnisse nicht herabzusetzen. Es konnten nur bei 40 °C nach fünf min noch Chlamydien nachgewiesen werden. Bei allen anderen Zeitpunkten und Temperaturen waren keine Chlamydien mehr nachweisbar. Andere Studien zeigten, dass Chlamydien bei Raumtemperatur (22 °C) für einen Monat und bei 56 °C für fünf min überlebensfähig sind. Wohingegen *C. psittaci* auf Federn und Kotstaub seine Infektiosität über Wochen nicht verliert (Hoffmann 2007; Page und Grimes 1984; Storz und Krauss 1985). Behrens et al. (2001) konnten bei einer Temperatur von 60 °C nach 10 Minuten keine infektiösen Chlamydien mehr nachweisen. Aufgrund dessen wäre es interessant verschiedene Isolate zu untersuchen, um zu sehen, ob es Unterschiede hinsichtlich der Thermotoleranzen gibt. Da die Körpertemperatur bei Schafen im Mittel bei 39,5 °C, bei Ziegen bei 40 °C liegt, sind die Ergebnisse dieser Arbeit dahingehend interessant, weil bei 40 °C nach fünf Minuten keine Erreger mehr nachgewiesen werden konnten. Für weitere Untersuchungen wäre daher ein Vergleich mit *C. psittaci* interessant, da die

Körpertemperatur von Vögeln im Mittel bei 42,5 °C liegt. Die Versuche müssten dann jedoch unter Laborbedingungen der Sicherheitsstufe 3 erfolgen.

Um den Pasteurisierungserfolg in Abhängigkeit des Substrates auch bei Viren nachzuweisen, wurden ERAV und BVDV in Substrat suspendiert und erhitzt. Die Temperaturbedingungen wurden für die beiden Viren aufgrund ihrer Morphologie (behüllt/unbehüllt) angepasst. Die quantifizierte Virussuspension ($10^{7,5-8}$ Viren je Milliliter) von ERAV wurde in 1:20 vorverdünntem Substrat (S1 – S3) sowie in Zellkulturmedium suspendiert und bei drei Temperaturen 40, 50 und 55 °C über einen Zeitraum von 120 min erhitzt. Die Beprobung erfolgte nach 0, 15, 30, 60 und 120 Minuten. Bei 40 ° und 50 °C konnte keine signifikante Reduktion des Titers festgestellt werden. Bei einer Temperatur von 55 °C hingegen war ein signifikanter Titerverlust bereits nach 15 min nachweisbar. Am Ende des Versuches (120 min) lag der Titer noch zwischen $10^{1,5-2}$ Viren je Milliliter. Die Reduktion erfolgte allein durch die Temperatur und ein Einfluss des Substrates konnte zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden. Eventuell könnte es am alkalischen pH-Wert (8,0 – 8,5) der Substrate gelegen haben. Ein eher saures Milieu hätte die Inaktivierung, aufgrund der Säurelabilität von ERAV, möglicherweise beschleunigen können. In einer Studie von (Haas et al., 1995) wurde das eng mit dem ERAV verwandte MKS-Virus in Schweinegülle ebenfalls bei verschiedenen Temperaturen erhitzt. Sie konnten bei 40 °C nach 10 h, bei 45 °C nach 5 h, bei 50 und 55 °C nach 1 h keine Viren mehr nachweisen. Die Unterschiede in der Inaktivierungsdauer zwischen dieser Studie und der eigenen Arbeit lassen sich eventuell durch den unterschiedlich hohen Ausgangstiter erklären. In dieser Arbeit lag der Ausgangstiter zwischen $10^{7,5-8}$ Viren je Milliliter, bei der Studie von Haas et al. (1995) war der Titer bei $10^{4,8}$ Viren je Milliliter. Bei der Festlegung von Richtwerten für die Praxis sollte dieser Umstand ebenfalls stets berücksichtigt werden und die Periode der thermischen Inaktivierung dementsprechend angepasst sein. Für die sichere Inaktivierung von ERAV, das als Surrogatvirus für das MKS-Virus verwendet wurde, ist eine Temperatur von 55 °C und einer Verweilzeit von mindestens vier bis sechs Stunden anzustreben. Um diese Ergebnisse weiter abzusichern, sind weitere Untersuchungen empfehlenswert. Aufgrund der durch ERAV gewonnenen Erkenntnisse, wurde für BVDV nur mit einem Substrat gearbeitet. Hierfür wurde S2 verwendet, da es sich um eine sehr heterogene Mischung aus Rindergülle, Rinder-, Pferde-, Geflügelmist und nachwachsender Rohstoffe handelte und daher der größtmögliche Einfluss auf die Reduktion des Virustiters angenommen wurde. Der pH-Wert des 1:20 verdünnten Substrates lag im alkalischen Bereich bei 8,5. In Anlehnung an Daten aus der Literatur (Biermann et al., 1990; Bøtner und Belsham 2012; Haas et al., 1995) wurden die quantifizierten (10^{5-6} Viren je Milliliter) Substrat-Virussuspensionen und das in Zellkulturmedium suspendierte BVDV bei 40, 45 und 50 °C für insgesamt 120 min erhitzt und dazwischen Proben entnommen (0, 15, 30, 60, 120 min). Bei einer Temperatur von 40 °C konnte zwar keine signifikante Virusreduktion, dafür aber

eine Substratabhängigkeit nachgewiesen werden. Bei 45 °C konnte nach 60 min eine signifikante Reduktion des Titers bei den in S2 suspendierten BVD-Viren gezeigt werden. Bei der höchsten getesteten Temperatur (50 °C) trat die signifikante Virusreduktion der in Substrat suspendierten Viren bereits nach 30 min ein. Die beinahe vollständige Reduktion (10^0 Viren je Milliliter) trat nach 60 min ein. Die in Zellkulturmedium suspendierten Viren zeigten eine signifikante Reduktion zwischen 60 und 120 min thermischer Behandlung. Die Unterschiede zwischen Substrat und Zellkulturmedium zeigen sich bei dem Versuch mit BVDV sehr deutlich. Zu diesem Ergebnis kommen auch Bøtner und Belsham (2012) in ihrer Studie. Sie untersuchten die Inaktivierungsdauer von BVDV ebenfalls in Rindergülle und Zellkulturmedium. Bei 40 °C konnten sie in Gülle nach 50 min, in Medium nach >2 h keine Viren mehr nachweisen. Ähnlich verhielt es sich bei den anderen Temperaturen: Bei 45 °C waren in Gülle nach 20 min, in Medium nach >60 min, bei 50 °C in Gülle nach fünf min, in Medium nach >50 min keine Viren mehr nachweisbar. Die Unterschiede in der Dauer der Inaktivierungsperiode bei den eigenen Ergebnissen können neben den unterschiedlichen Initialtitern, auch das ausgewählte Isolat und methodische Schwächen sein. Dennoch zeigen sich Gemeinsamkeiten hinsichtlich des Inaktivierungsverhaltens. Die schnellere Inaktivierung des BVDV im Vergleich zum ERAV ist auch dem morphologischen Aufbau der beiden Viren geschuldet. Unbehüllte Viren, zu denen auch das ERAV zählt, haben per se eine höhere Widerstandskraft gegenüber Umwelteinflüssen als behüllte Viren (Haas et al., 1995; Uhlenhaut 2005). Die Kombination aus Hitze und Substrat setzt dem BVDV daher mehr zu, als dem ERAV. Die Empfehlung für die vollständige Inaktivierung wäre auch hier eine Temperatur von mindestens 50 °C über einen Zeitraum von mindestens zwei bis vier Stunden. Zur Absicherung der Ergebnisse wären weitere Untersuchungen dennoch sinnvoll. Viele der gewonnenen Ergebnisse lassen sich auf die Praxis übertragen und anwenden, wobei einige Ergebnisse Fragen hinsichtlich der zuverlässigen Inaktivierung allein durch eine thermische Inaktivierung aufwerfen. Als Beispiel wären hier die Mykobakterien zu nennen. Aus der Literatur ist ihre hohe Thermostabilität respektive die hohe Tenazität gegenüber verschiedensten Umwelteinflüssen bekannt (Bange et al., 2012; Böttger 2001; Duffield und Young 1985; Fine et al., 2011; Hammer et al., 2015; Tracy et al., 2006; Williams und Hoy 1930). Im Falle eines Tierseuchenfalls ist die Inaktivierung über den Biogasprozess nicht als trivial zu sehen. Es sollte abgewogen werden, ob allein die längere Verweildauer mit einer anschließenden Lagerung ein ausreichendes Maß an Sicherheit für Mensch und Tier bietet oder grundsätzlich eine zusätzliche Pasteurisierung vor dem eigentlichen Biogasprozess erfolgen sollte um auch die Gefahr einer aerogenen Übertragung auf ein Minimum zu reduzieren. Diese Maßnahme wäre auch im Allgemeinen eine Strategie zur Verringerung von Gefährdungspotentialen und Gesundheitsrisiken. Aufgrund der Vielfalt mikrobieller Risiken, die durch die Verwendung organischer Abfall- und Reststoffe aus Tierhaltungsbetrieben sowohl überbetrieblich als auch überregional

entstehen können, könnte die zusätzliche verpflichtende Pasteurisierung des Materials vorhandene Infektketten schließen und die Gefahr neuer epidemiologischer Infektionskreisläufe bannen. Aufgrund des hohen technischen Aufwands einer vorgeschalteten Pasteurisierung käme als Alternative in Betracht, die Biogasanlagen die nicht rein pflanzlich beschickt werden, grundsätzlich im thermophilen Bereich zu betreiben und nicht kontinuierlich zu beschicken, damit eine definierte Verweildauer des Materials gewährleistet werden kann. Um die Ergebnisse dieser Arbeit und der bereits in vorangegangenen Studien erhobenen weiter zu untermauern und konkrete Richtlinien für die Praxis daraus zu erarbeiten, sind weitere Forschungen notwendig, denn: „Der unermesslich reichen, stets sich erneuernden Natur gegenüber wird der Mensch, soweit er auch in der wissenschaftlichen Erkenntnis fortgeschritten sein mag, immer das sich wundernde Kind bleiben und muss sich stets auf neue Überraschungen gefasst machen.“ (Max Planck)

6. Literaturverzeichnis

Aboagye G, Rowe M (2011) Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw water and water treatment operations for the production of potable water. *Water Res* 45:3271-3278

Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, van Helden PD, Warren RM, van Pittius, Nicolaas C Gey (2010) Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerging infectious diseases* 16:1296-1300

Bachofen C, Stalder H, Braun U, Hilbe M, Ehrensperger F, Peterhans E (2008) Co-existence of genetically and antigenically diverse bovine viral diarrhoea viruses in an endemic situation. *Vet Microbiol* 131:93-102.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.02.023>

Bange FC, Hahn H, Kaufmann SHE, Ulrichs T (2012) 41 Mykobakterien. In: Suerbaum S, Hahn H, Burchard G-, Kaufmann SHE, Schulz T (eds) *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer, Berlin-Heidelberg, pp 341-355

Behrens H, Ganter M, Hiepe T (2001) 3.2.20 Chlamydieninfektionen. In: Martin Ganter(ed) *Lehrbuch der Schafkrankheiten.*, 4th edn. Georg Thieme Verlag, pp 261-268

Berri M, Rekiki A, Boumedine KS, Rodolakis A (2009) Simultaneous differential detection of *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila pecorum* and *Coxiella burnetii* from aborted ruminant's clinical samples using multiplex PCR. *BMC Microbiol* 9:130-2180-9-130.
doi:10.1186/1471-2180-9-130 [doi]

BfR (2010) Q-Fieber: Übertragung von *Coxiella burnetii* durch den Verzehr von Lebensmitteln tierischer Herkunft unwahrscheinlich
Stellungnahme Nr. 018/2010 des BfR. In: . Available via Internet.
http://www.bfr.bund.de/cm/343/q_fieber_uebertragung_von_coxiella_burnetii_durch_den_verzehr_von_lebensmitteln_tierischer_herkunft_unwahrscheinlich.pdf. 09/2015 2015

Biermann U, Herbst W, Schliesser T (1990) The persistence of bovine enterovirus and pseudorabies virus in liquid cattle manure at different storage temperatures. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 103:88-90

Black WD, Wilcox RS, Stevenson RA, Hartley CA, Ficorilli NP, Gilkerson JR, Studdert MJ (2007) Prevalence of serum neutralising antibody to equine rhinitis A virus (ERAV), equine rhinitis B virus 1 (ERBV1) and ERBV2. *Vet Microbiol* 119:65-71.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.08.031>

Bonetta S, Ferretti E, Bonetta S, Fezia G, Carraro E (2011) Microbiological contamination of digested products from anaerobic co-digestion of bovine manure and agricultural by-products. *Lett Appl Microbiol* 53:552-557

Bøtner A, Belsham GJ (2012) Virus survival in slurry: analysis of the stability of foot-and-mouth disease, classical swine fever, bovine viral diarrhoea and swine influenza viruses. *Vet Microbiol* 157:41-49

Böttger E (2001) Die Familie der Mycobacteriaceae. *Medizinische Mikrobiologie* 8:407-434

Bouvery NA, Souriau A, Lechopier P, Rodolakis A (2003) Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: excretion routes. *Vet Res* 34:423-433

- Brennan PJ, Nikaido H (1995) The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem* 64:29-63
- Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST (2002) A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3684-3689. doi:10.1073/pnas.052548299 [doi]
- Brownlie J (1990) Pathogenesis of mucosal disease and molecular aspects of bovine virus diarrhoea virus. *Vet Microbiol* 23:371-382
- Burnet F, Freeman M (1983) Experimental Studies on the Virus of " Q" Fever. *Rev Infect Dis*:800-808
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2015) Bioterrorism Agents/Diseases. In: . Available via Internet. <http://emergency.cdc.gov/agent/agentlist.asp>. 05.08.2015 2015
- de la Rúa-Domenech R (2006) Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 86:77-109. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2005.05.002>
- de Rueda C, de Jong MC, Eble PL, Dekker A (2015) Quantification of transmission of foot-and-mouth disease virus caused by an environment contaminated with secretions and excretions from infected calves. *Vet Res* 46:43-015-0156-5. doi:10.1186/s13567-015-0156-5 [doi]
- Derrick E (1983) " Q" fever, a new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation. *Rev Infect Dis*:790-800
- Diel R, Loytved G, Nienhaus A, Castell S, Detjen A, Geerdes-Fenge H, Haas W, Hauer B, Königstein B, Maffei D, Magdorf K, Priwitzer M, Zellweger J-, Loddenkemper R (2011) Neue Empfehlungen für die Umgebungsuntersuchungen bei Tuberkulose. *Pneumologie* 65:359-378. doi:10.1055/s-0030-1256439
- Drössler, Meinzer, Dres. Hartmann, Isa, Miller, Schneider, Seeger (2010) BVD Bekämpfung mit Hilfe von Ohrstanzproben: Die häufigsten Fragen und ihre Antworten (FAQ, Stand: 12.2010) . In: . Staatliches Tierärztliches Untersuchungsamt Aulendorf – Diagnostikzentrum; Landeskontrollverband BW Abteilung Tierkennzeichnung; Tiergesundheitsdienst der Tierseuchenkasse BW. Available via Internet. <http://www.stua-aulendorf.de/pdf/faq-bvd.pdf>. 18.12.2014 2014
- Duffield B, Young D (1985) Survival of *Mycobacterium bovis* in defined environmental conditions. *Vet Microbiol* 10:193-197
- EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) (2010) Scientific Opinion on Q fever. *EFSA Journal* 8:1595-n/a. doi:10.2903/j.efsa.2010.1595
- Eisenberg S, Nielen M, Santema W, Houwers D, Heederik D, Koets A (2010) Detection of spatial and temporal spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment of a cattle farm through bio-aerosols. *Vet Microbiol* 143:284-292
- Enright JB, Sadler WW, Thomas E (1957a) Thermal inactivation of *Coxiella burnetii* and its relation to pasteurization of milk. *Pub, Health Service Publication No.517.Pub.Health Monograph No, 47.*

- Enright JB, Sadler WW, Thomas R (1957b) Q fever and milk pasteurization. US Public Health Rep 72:947
- Everett KD, Bush RM, Andersen AA (1999) Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. Int J Syst Bacteriol 49 Pt 2:415-440. doi:10.1099/00207713-49-2-415 [doi]
- Fine AE, Bolin CA, Gardiner JC, Kaneene JB (2011) A Study of the Persistence of Mycobacterium bovis in the Environment under Natural Weather Conditions in Michigan, USA. Vet Med Int 2011:765430. doi:10.4061/2011/765430 [doi]
- Frangoulidis D (2012) Einsatz molekularer Typisierungsmethoden zur Untersuchung von Q-Fiebersausbrüchen. Wehrmed 4:07.05.2015
- Graber P (2012) Update Tuberkulose 2012. In: . Quelle: www.arosa-museum.ch. Wichtige Aufgaben des Hausarztes. Available via Internet. http://www.aerztekongress-arosa.ch/fileadmin/PDF/Tbc_Update_Handout.pdf. 2015
- Haas L (2011) Familie Picornaviridae. In: Selbitz H, Truyen U, Valentin-Weigand P (eds) Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions-und Seuchenlehre, 9. Auflage edn. Enke Verlag, Stuttgart, pp 644-647
- Haas B, Ahl R, Bohm R, Strauch D (1995) Inactivation of viruses in liquid manure. Rev Sci Tech 14:435-445
- Hackstadt T (1990) The role of lipopolysaccharides in the virulence of Coxiella burnetii. Ann N Y Acad Sci 590:27-32
- Hackstadt T, Peacock MG, Hitchcock PJ, Cole RL (1985) Lipopolysaccharide variation in Coxiella burnetii: intrastain heterogeneity in structure and antigenicity. Infect Immun 48:359-365
- Hackstadt T, Williams JC (1981) Biochemical stratagem for obligate parasitism of eukaryotic cells by Coxiella burnetii. Proc Natl Acad Sci U S A 78:3240-3244
- Halberstädter L, Von Prowazek S (1907) Zur Aetiologie des Trachoms. Dtsch Med Wochenschr 33:1285-1287
- Hammer P, Richter E, Rüscher-Gerdes S, Walte H, Kiesner C (2015) Inaktivierung von Mycobacterium bovis subsp. caprae bei der Kurzzeiterhitzung von Milch. 15 Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie Tagungsunterlagen:43-43
- Hammer P, Kiesner C, Walte H-C (2014) Short communication: Effect of homogenization on heat inactivation of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in milk. J Dairy Sci 97:2045-2048. doi:http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7361
- Helffrich D, Oechsner H (2003a) Hohenheimer Biogasertagstest. Landtechnik 58:148-149
- Helffrich D, Oechsner H (2003b) Hohenheimer Biogasertagstest. Landtechnik 58:148-149
- Hellenbrand W, Breuer T, Petersen L (2001) Changing epidemiology of Q fever in Germany, 1947-1999. Emerg Infect Dis 7:789-796. doi:10.3201/eid0705.010504 [doi]

- Hermans T, Jeurissen L, Hackert V, Hoebe C (2014) Land-applied goat manure as a source of human Q-fever in the Netherlands, 2006-2010. PLoS One 9:e96607. doi:10.1371/journal.pone.0096607 [doi]
- Hilbert A (2016) *Coxiella burnetii*–Epidemiologische Untersuchungen zum Vorkommen und zur Verbreitung in Schaf- und Rinderbeständen in Deutschland
- Hoferer M (2001) Seuchenhygienische Untersuchungen zur Inaktivierung ausgewählter Bakterien und Viren bei der mesophilen und thermophilen anaeroben alkalischen Faulung von Bio- und Küchenabfällen sowie anderen Rest- und Abfallstoffen tierischer Herkunft: Studies on the inactivation of specific bacteria and viruses during mesophilic and thermophilic anaerobic alkaline cofermentation of biological and kitchen wastes as well as other leftovers and waste products from animals. Shaker
- Hoffmann C, Engelhardt H (2009) Enthüllt: die äußere Membran von Mykobakterien.
- Hoffmann G (2007) Untersuchungen zum Vorkommen von Chlamydien in Eileiter und Uterus des Schweines und deren mögliche Bedeutung für das Infertilitätsgeschehen.
- Hogerwerf L, Borlee F, Still K, Heederik D, van Rotterdam B, de Bruin A, Nielen M, Wouters IM (2012) Detection of *Coxiella burnetii* DNA in inhalable airborne dust samples from goat farms after mandatory culling. Appl Environ Microbiol 78:5410-5412. doi:10.1128/AEM.00677-12 [doi]
- Hogerwerf L, van den Brom R, Roest HI, Bouma A, Vellema P, Pieterse M, Dercksen D, Nielen M (2011) Reduction of *Coxiella burnetii* prevalence by vaccination of goats and sheep, The Netherlands. Emerg Infect Dis 17:379-386. doi:10.3201/eid1703.101157 [doi]
- Hoover TA, Vodkin MH, Williams JC (1992) A *Coxiella burnetii* repeated DNA element resembling a bacterial insertion sequence. J Bacteriol 174:5540-5548
- Hyde SR, Benirschke K (1997) Gestational psittacosis: case report and literature review. Infectious Diseases in Clinical Practice 6:519-524
- Ingen Jv, Rahim Z, Mulder A, Boeree MJ, Simeone R, Brosch R, Soolingen Dv (2012) Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies.
- Karagiannis I, Schimmer B, Van Lier A, Timen A, Schneeberger P, Van Rotterdam B, De Bruin A, Wijkmans C, Rietveld A, Van Duynhoven Y (2009) Investigation of a Q fever outbreak in a rural area of The Netherlands. Epidemiol Infect 137:1283-1294
- Kimmig P, Wagner-Wiening C (2009) 27.5 *Coxiella burnetii*. In: Neumeister B, Geiss H, Braun R, Kimmig P (eds) Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie - Mykologie - Virologie - Parasitologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York, pp 628-632
- Klee SR, Tyczka J, Ellerbrok H, Franz T, Linke S, Baljer G, Appel B (2006) Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. BMC Microbiol 6:2. doi:1471-2180-6-2 [pii]
- Klein M, Brown L, Tucker RW, Ashbolt NJ, Stuetz RM, Roser DJ (2010) Diversity and abundance of zoonotic pathogens and indicators in manures of feedlot cattle in Australia. Appl Environ Microbiol 76:6947-6950. doi:10.1128/AEM.01095-10 [doi]
- Kreizinger Z, Szeredi L, Bacsadi A, Nemes C, Sugar L, Varga T, Sulyok KM, Szigeti A, Acs K, Tobias E, Borel N, Gyuranecz M (2015) Occurrence of *Coxiella burnetii* and Chlamydiales species in abortions of domestic ruminants and in wild ruminants in

Hungary, Central Europe. *J Vet Diagn Invest* 27:206-210.
doi:10.1177/1040638714563566 [doi]

Kriegshäuser G, Deutz A, Kuechler E, Skern T, Lussy H, Nowotny N (2005) Prevalence of neutralizing antibodies to Equine rhinitis A and B virus in horses and man. *Vet Microbiol* 106:293-296. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.12.029

Kuo C, Stephens R (2011) Family I. Chlamydiaceae. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 4:845-862

Lamont EA, Bannantine JP, Armién A, Ariyakumar DS, Sreevatsan S (2012) Identification and characterization of a spore-like morphotype in chronically starved *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cultures. *PLoS one* 7:e30648

Lavers C, Keefe G, McKenna S, Chaffer M (2012) Evaluation of environmental culture to determine herd status for Johne's disease on Atlantic Canadian dairy farms. *Proc 11 Intern Colloq Paratuberculosis*. doi:Nielsen, S. S., & Bakker, D. (2012). *International Consortia - International Johne's Disease Initiatives - EU JD Tools*. Abstract from 11th International Colloquium on Paratuberculosis, Sydney, Australia.

Lenzko H (2012) Verbreitung von Chlamydien in thüringischen Schafbeständen.

Li F, Browning GF, Studdert MJ, Crabb BS (1996) Equine rhinovirus 1 is more closely related to foot-and-mouth disease virus than to other picornaviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:990-995

Liebisch A, Burgdorfer W, Rahman M (1978) Epidemiologische Untersuchungen an Schafzecken (*Dermacentor marginatus*) auf Infektionen mit Rickettsien. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 85:121-126

Lin Z, Yang S, Mallavia LP (1997) Codon usage and nucleotide composition in *Coxiella burnetii*. *Gene* 198:171-180. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00312-0

Longbottom D, Coulter LJ (2003) Animal Chlamydioses and Zoonotic Implications. *J Comp Pathol* 128:217-244. doi:http://dx.doi.org/10.1053/jcpa.2002.0629

Lorenz H, Jager C, Willems H, Baljer G (1998) PCR detection of *Coxiella burnetii* from different clinical specimens, especially bovine milk, on the basis of DNA preparation with a silica matrix. *Appl Environ Microbiol* 64:4234-4237

Maurin M, Raoult D (1999) Q fever. *Clin Microbiol Rev* 12:518-553

McLaughlin MR, Brooks JP, Adeli A (2009) Characterization of selected nutrients and bacteria from anaerobic swine manure lagoons on sow, nursery, and finisher farms in the Mid-South USA. *J Environ Qual* 38:2422-2430

Moser I, Köhler H, Menge C (2014) Die Tuberkulose des Rindes – überraschend wieder oder immer noch präsent? *Tierärztliche Praxis Großtiere* 4

Mostowy S, Cousins D, Brinkman J, Aranaz A, Behr MA (2002) Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Infect Dis* 186:74-80. doi:JID020012 [pii]

Moulder JW (1991) Interaction of chlamydiae and host cells in vitro. *Microbiol Rev* 55:143-190

- Page L, Grimes J (1984) Avian chlamydiosis (ornithosis). Diseases of poultry, 8th ed. MS Hofstad, ed. Iowa State University Press, Ames, IA:283-308
- Page LA (1966) Interspecies transfer of psittacosis-LGV-trachoma agents: pathogenicity of two avian and two mammalian strains for eight species of birds and mammals. Am J Vet Res 27:397-407
- Palmer MV, Whipple DL (2006) Survival of Mycobacterium bovis on feedstuffs commonly used as supplemental feed for white-tailed deer (Odocoileus virginianus). J Wildl Dis 42:853-858
- Passler T, Walz PH (2010) Bovine viral diarrhoea virus infections in heterologous species. Animal Health Research Reviews 11:191-205
- Philip C (1963) Recent advances in knowledge of tick-associated rickettsia-like organisms. J Egypt Public Health Assoc 38:61-100
- Philip CB (1948) Comments on the Name of the Q Fever Organism. Public Health Rep 63
- Plummer G (1963) An equine respiratory enterovirus. Archiv für die gesamte Virusforschung 12:694-700
- Polak MP, Kuta A, Rybałowski W, Rola J, Larska M, Żmudziński JF (2014) First report of bovine viral diarrhoea virus-2 infection in cattle in Poland. The Veterinary Journal 202:643-645. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.09.026>
- Porten K, Rissland J, Tigges A, Broll S, Hopp W, Lunemann M, Van Treeck U, Kimmig P, Brockmann SO, Wagner-Wiening C (2006a) A super-spreading ewe infects hundreds with Q fever at a farmers' market in Germany. BMC infectious diseases 6:147
- Porten K, Rissland J, Tigges A, Broll S, Hopp W, Lunemann M, van Treeck U, Kimmig P, Brockmann SO, Wagner-Wiening C, Hellenbrand W, Buchholz U (2006b) A super-spreading ewe infects hundreds with Q fever at a farmers' market in Germany. BMC Infect Dis 6:147. doi:1471-2334-6-147 [pii]
- Ridpath JF, Passler T (2016) Editorial: Control of pestivirus infections in the management of wildlife populations. Frontiers in Microbiology 7
- Roest H, van Gelderen B, Dinkla A, Frangoulidis D, van Zijderveld F, Rebel J, van Keulen L (2012) Q fever in pregnant goats: pathogenesis and excretion of Coxiella burnetii.
- Roest HD, A., van Rotterdam B, de Bruin A, Dercksen Dea (2011) Survival of *Coxiella burnetii* in dairy goat manure. 11/CVI0212.
- Runge M, Ganter M (2008) Q-Fieber. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 3:185-189
- Sahlström L (2003) A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. Bioresour Technol 87:161-166. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00168-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00168-2)
- Salgado M, Collins MT, Salazar F, Kruze J, Bolske G, Soderlund R, Juste R, Sevilla IA, Biet F, Troncoso F, Alfaro M (2011) Fate of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis after application of contaminated dairy cattle manure to agricultural soils. Appl Environ Microbiol 77:2122-2129. doi:10.1128/AEM.02103-10 [doi]

- Salinas J, Caro MR, Vicente J, Cuello F, Reyes-Garcia AR, Buendía AJ, Rodolakis A, Gortázar C (2009) High prevalence of antibodies against Chlamydiaceae and *Chlamydia abortus* in wild ungulates using two "in house" blocking-ELISA tests. *Vet Microbiol* 135:46-53. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.10.001>
- Sattelmair H (2005) Die Tuberkulose des Rindes: ein Beitrag zur Geschichte der Haustierkrankheiten. na
- Schaal EH (1985) Rickettsien. In: Blobel H, Schliesser T (eds) *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren*. VEB Gustav Fischer Verlag, pp 552-649
- Schauss T, Glaeser SP, Gütschow A, Dott W, Kämpfer P (2015) Improved detection of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in input and output samples of German biogas plants by a selective pre-enrichment procedure. *PloS one* 10:e0119791
- Schliesser T (1991) Zur Epidemiologie und Bedeutung des Q-Fiebers bei Tieren. *Wien.Tieraerztl.Monschr* 78:7-12
- Schweizer M, Peterhans E (2014) Pestiviruses. *Annu.Rev.Anim.Biosci.* 2:141-163
- Seshadri R, Paulsen IT, Eisen JA, Read TD, Nelson KE, Nelson WC, Ward NL, Tettelin H, Davidsen TM, Beanan MJ, Deboy RT, Daugherty SC, Brinkac LM, Madupu R, Dodson RJ, Khouri HM, Lee KH, Carty HA, Scanlan D, Heinzen RA, Thompson HA, Samuel JE, Fraser CM, Heidelberg JF (2003) Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5455-5460. doi:[10.1073/pnas.0931379100](https://doi.org/10.1073/pnas.0931379100) [doi]
- Shankar H, Singh SV, Singh PK, Singh AV, Sohal JS, Greenstein RJ (2010) Presence, characterization, and genotype profiles of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from unpasteurized individual and pooled milk, commercial pasteurized milk, and milk products in India by culture, PCR, and PCR-REA methods. *International Journal of Infectious Diseases* 14:e121-e126. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2009.03.031>
- Sorge U (2013) Paratuberkulose-ein Update zur Epidemiologie und zu Kontrollansätzen. *Veterinär-Spiegel* 23:122-126
- Sorge U, Lissemore K, Godkin A, Jansen J, Hendrick S, Wells S, Kelton D (2011) Changes in management practices and apparent prevalence on Canadian dairy farms participating in a voluntary risk assessment-based Johne's disease control program. *J Dairy Sci* 94:5227-5237
- Stewart WC, Downing DR, Carbrey EA, Kresse JI, Snyder ML (1979) Thermal inactivation of hog cholera virus in ham. *Am J Vet Res* 40:739-741
- Storz J, Krauss H (1985) Chlamydia. *Handbook of bacterial infection in animals*, Fischer Verlag, Jena, Germany:447-513
- Straube E (2009) Mykoplasmen und obligat intrazelluläre Bakterien 27.2 *Chlamydia* spp. *Chlamydia* spp. und *Simkania* sp. In: Neumeister B, Geiss H, Braun R, Kimmig P (eds) *Mikrobiologische Diagnostik Bakteriologie - Mykologie - Virologie - Parasitologie*, 2.th edn. Georg Thieme Verlag Stuttgart - New York, pp 610-619

- Straubinger R, Selbitz H- (2011) Obligat intrazelluläre Bakterien. In: Selbitz H-, Truyen U, Valentin-Weigand P (eds) Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 9th edn. Enke, pp 330-342
- Strauch D (1996) Hygieneaspekte bei der Cofermentation. Internationale Erfahrungen mit der Verwertung biogener Abfälle zur Biogasproduktion, Vorträge und Podiumsdiskussion im Rahmen Schlussbericht 11 der Fachtagung am 16.6.1995 im Interuniversitären Forschungsinstitut für Agrarbiotechnologie, Tulln Umweltbundesamt, Wien, Österreich:53-92
- Studdert M, Gleeson L (1978) Isolation and characterisation of an equine rhinovirus. Zentralblatt fuer Veterinaermedizin Reihe B 25:225-237
- Sung N, Collins MT (1998) Thermal tolerance of Mycobacterium paratuberculosis. Appl Environ Microbiol 64:999-1005
- Thiel H-, König M (2011) 27.3.10 Familie *Flaviviridae*. In: Selbitz H-, Truyen U, Valentin-Weigand P (eds) Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 9. Auflage edn. Enke Verlag, Stuttgart, pp 604-616
- Thoen CO, LoBue PA, Enarson DA, Kaneene JB, de Kantor IN (2009) Tuberculosis: a re-emerging disease in animals and humans.
- Tigertt WD, Benenson AS, Gochenour WS (1961) Airborne Q fever. Bacteriol Rev 25:285-293
- Toman R (1996) Structural study on a lipopolysaccharide from *Coxiella burnetii* strain Nine Mile in avirulent phase II. Carbohydr Res 283:175-185
- TSIS - TierSeuchenInformationssystem (2017) Tuberkulose der Rinder (*Mycobacterium bovis* und *Mycobacterium caprae*). In: . Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit. Available via Internet. https://tsis.fli.de/Reports/Info_SO.aspx?ts=204&guid=b5d13e19-bebd-411e-b994-3efbcdec6c7f. 01/2017
- Tuthill TJ, Harlos K, Walter TS, Knowles NJ, Groppelli E, Rowlands DJ, Stuart DI, Fry EE (2009) Equine rhinitis A virus and its low pH empty particle: clues towards an aphthovirus entry mechanism? PLoS pathogens 5:e1000620
- Uhlenhaut C (2005) Tenazität von Viren – Stabilität und Erhalt der Infektiosität von Viren. Proceedings: Biologische Gefahren in Deutschland - Kongressbericht der GERMAN BIOSAFETY 2005:15.06.2015. doi:urn:nbn:de:0257-10017251
- UNDERDAHL NR, GRACE OD, HOERLEIN AB (1957) Cultivation in tissue-culture of cytopathogenic agent from bovine mucosal disease. Proc Soc Exp Biol Med 94:795-797
- Valentin-Weigand P (2011) 14.8 Gattung Mycobacterium. In: Selbitz H-, Truyen U, Valentin-Weigand P (eds) Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 9. Auflage edn. Enke Verlag, Stuttgart, pp 308-318
- Van der Hoek W, Dijkstra F, Schimmer B, Schneeberger P, Vellema P, Wijkmans C, Ter Schegget R, Hackert V, Van Duynhoven Y (2010) Q fever in the Netherlands: an update on the epidemiology and control measures. Euro Surveill 15:19520

von Salviati C, Laube H, Guerra B, Roesler U, Friese A (2015) Emission of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from pig fattening farms to surrounding areas. *Vet Microbiol* 175:77-84

Waddell LA, Rajić A, Sargeant J, Harris J, Amezcua R, Downey L, Read S, McEwen SA (2008) The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* spp. paratuberculosis: a systematic review. *Canadian Journal of Public Health/Revue Canadienne de Sante'e Publique*:145-155

Walder G, Hotzel H, Brezinka C, Gritsch W, Tauber R, Würzner R, Ploner F (2005) An unusual cause of sepsis during pregnancy: recognizing infection with *Chlamydothila abortus*. *Obstetrics & Gynecology* 106:1215-1217

Walder G, Meusburger H, Hotzel H, Oehme A, Neunteufel W, Dierich MP, Würzner R (2003) *Chlamydothila abortus* pelvic inflammatory disease. *Emerg Infect Dis* 9:1642-1644. doi:10.3201/eid0912.020566 [doi]

Ward M (1988) The chlamydial developmental cycle. *Microbiology of chlamydia*:71-95

Weesendorp E, Stegeman A, Loeffen WLA (2008) Survival of classical swine fever virus at various temperatures in faeces and urine derived from experimentally infected pigs. *Vet Microbiol* 132:249-259. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.05.020


Wegmüller M (2006) BVD-Info.CH. In: . Institut für Veterinär-Virologie, Universität Bern. Available via Internet. <http://www.bvd-info.ch/tieraerzte/>. Zugriff, 16.12.2014

Williams RS, Hoy W (1930) The viability of *B. tuberculosis* (bovinus) on pasture land, in stored faeces and in liquid manure. *J Hyg* 30:413-419

Wutz G, Auer H, Nowotny N, Grosse B, Skern T, Kuechler E (1996) Equine rhinovirus serotypes 1 and 2: relationship to each other and to aphthoviruses and cardioviruses. *J Gen Virol* 77 (Pt 8):1719-1730

Anhang

Prüfbericht 1 – unverdünntes Substrat

UNIVERSITÄT HOHENHEIM		
LANDESANSTALT FÜR LANDWIRTSCHAFTLICHE CHEMIE Emil-Wolff-Straße 12, 70599 Stuttgart Boden-/Düngemitteluntersuchung Tel.: (0711) 4 59 - 22672		
Datum: 14.07.2014		
Prüfbericht		
<hr/>		
Labor-Nr.: 2014/1D00861	Bezeichnung der Probe: 1 A Gärsubstrat	
Untersuchungsparameter:	Ergebnis:	
Gesamt-Stickstoff (N), n.Kjeldahl	0,46 %	
Ammonium-Stickstoff (NH ₄ -N), Destillation	0,21 %	
pH-Wert	7,7	
<hr/>		
Labor-Nr.: 2014/1D00862	Bezeichnung der Probe: 2 B Gärsubstrat	
Untersuchungsparameter:	Ergebnis:	
Gesamt-Stickstoff (N), n.Kjeldahl	0,69 %	
Ammonium-Stickstoff (NH ₄ -N), Destillation	0,43 %	
pH-Wert	7,9	
<hr/>		
Labor-Nr.: 2014/1D00863	Bezeichnung der Probe: 3 C Gärsubstrat	
Untersuchungsparameter:	Ergebnis:	
Gesamt-Stickstoff (N), n.Kjeldahl	0,71 %	
Ammonium-Stickstoff (NH ₄ -N), Destillation	0,36 %	
pH-Wert	8,3	
<hr/>		
Labor-Nr.: 2014/1D00864	Bezeichnung der Probe: 4 D Gärsubstrat	
Untersuchungsparameter:	Ergebnis:	
Gesamt-Stickstoff (N), n.Kjeldahl	0,76 %	
Ammonium-Stickstoff (NH ₄ -N), Destillation	0,40 %	
pH-Wert	8,1	
<hr/>		
Labor-Nr.: 2014/1D00865	Bezeichnung der Probe: 5 E Gärsubstrat	
Untersuchungsparameter:	Ergebnis:	
Gesamt-Stickstoff (N), n.Kjeldahl	0,44 %	
Ammonium-Stickstoff (NH ₄ -N), Destillation	0,12 %	
pH-Wert	7,7	
<hr/>		
Labor-Nr.: 2014/1D00866	Bezeichnung der Probe: 6 F Gärsubstrat	
Untersuchungsparameter:	Ergebnis:	
Gesamt-Stickstoff (N), n.Kjeldahl	0,57 %	
Ammonium-Stickstoff (NH ₄ -N), Destillation	0,26 %	
pH-Wert	8,0	
<hr/>		
Anmerkung: Gehalte sind auf die Frischsubstanz bezogen.		

Prüfbericht 2 – verdünntes Substrat

UNIVERSITÄT HOHENHEIM		
LANDESANSTALT FÜR LANDWIRTSCHAFTLICHE CHEMIE Emil-Wolff-Straße 12, 70599 Stuttgart Boden-/Düngemitteluntersuchung Tel.: (0711) 4 59 - 22672		
Datum: 26.01.2015		
Prüfbericht		
<hr/>		
Labor-Nr.: 2015/1D00959	Bezeichnung der Probe: 1 Substrat B	
Untersuchungsparameter:	Ergebnis:	
Gesamt-Stickstoff (N), n.Kjeldahl	0,027 %	
Ammonium-Stickstoff (NH ₄ -N), Destillation	0,012 %	
pH-Wert	8,0	
Elektr. Leitfähigkeit	16,6 mS/cm	
Salzgehalt ber. als KCl aus der Leitfähigkeit	8,7 g/l	
<hr/>		
Labor-Nr.: 2015/1D00960	Bezeichnung der Probe: 2 Substrat C	
Untersuchungsparameter:	Ergebnis:	
Gesamt-Stickstoff (N), n.Kjeldahl	0,033 %	
Ammonium-Stickstoff (NH ₄ -N), Destillation	0,014 %	
pH-Wert	8,5	
Elektr. Leitfähigkeit	16,3 mS/cm	
Salzgehalt ber. als KCl aus der Leitfähigkeit	8,6 g/l	
<hr/>		
Labor-Nr.: 2015/1D00961	Bezeichnung der Probe: 3 Substrat F	
Untersuchungsparameter:	Ergebnis:	
Gesamt-Stickstoff (N), n.Kjeldahl	0,025 %	
Ammonium-Stickstoff (NH ₄ -N), Destillation	0,008 %	
pH-Wert	8,3	
Elektr. Leitfähigkeit	16,1 mS/cm	
Salzgehalt ber. als KCl aus der Leitfähigkeit	8,4 g/l	

**Eidesstattliche Versicherung gemäß § 7 Absatz 7 der Promotionsordnung der
Universität Hohenheim zum Dr. rer. nat.**

1. Bei der eingereichten Dissertation zum Thema

Untersuchungen zum Potential biotechnologischer Methoden zur Inaktivierung von tier-
und humanmedizinischen Krankheitserregern der Schutzstufe 3

handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner
unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus
anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.

3. Ich habe nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung oder
-beratung in Anspruch genommen.

4. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und der strafrechtlichen Folgen einer
unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärung bestätige ich: Ich versichere an Eides Statt,
dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erkläre und nichts verschwiegen habe.

Ort und Datum

Unterschrift

Danksagung

Nun am letzten Abschnitt eines langen Weges angekommen, sitze ich nun hier und überlege mir den passenden Text, der dem ganzen Weg den ich gegangen bin und den Menschen, die ihn mit mir gegangen sind gerecht wird. Denn eines ist sicher, eine Doktorarbeit ist wie im Namen bereits enthalten: Arbeit. Doch Arbeit ist nur der eine Teil. Der andere Teil besteht aus Disziplin (vor allem gegen Ende) und Leidenschaft. Getreu dem Motto: Do it with passion or not at all. Im Laufe der Doktorarbeit kommt man oftmals an den Punkt, an dem man sich fragt: Lohnt sich das? Und in diesen Situationen war es hilfreich zu wissen, dass auch Alice zunächst tief fallen musste um ins Wunderland zu kommen. Zum Glück hatte ich das große Glück stets Menschen um mich zu haben, die mich bedingungslos unterstützt haben.

An dieser Stelle sage ich DANKE, danke Mama und Papa, dass ihr mich immer und ausnahmslos unterstützt habt und mir diesen Weg ermöglicht habt. Auch meinem Bruderherz Michael gilt mein zutiefst empfundener Dank. Danke, dass ihr niemals an mir zweifelt. Höchstens mal verzweifelt ☺

Ein großer Dank geht an meinen Freund und die große Liebe meines Lebens Christian. Du hast mich immer unterstützt und deine Liebe verleiht mir Flügel. Jeden Tag. Danke für deine Geduld und dein Talent, Word dazu zu bringen, genau das zu tun, was es tun soll.

Ich bedanke mich an dieser Stelle auch bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. vet. Ludwig E. Hölzle, zum einen für die Möglichkeit im Fg. Infektions- und Umwelthygiene bei Nutztieren zu promovieren, zum anderen, dass Sie mir durch die Wahl des Themas die Möglichkeit des Arbeitens im Biosafety Level 3 Labor gegeben haben! Zudem für die konstruktive Kritik, die zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen hat. Auch ein Dankeschön an Frau Dr. med. vet. Katharina Hölzle für die hilfreichen Anmerkungen zu meiner Arbeit. Zudem danke ich Prof. Dr. Artur J. P. Pfitzner für die Übernahme der Betreuung meiner Dissertation. Außerdem bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Ute Mackenstedt, dass Sie sich bereit erklärt hat, meine Prüfungskommission zu komplettieren. Ein Dank geht auch an Herrn Dr. med. vet. Werner Philipp für die Begleitung und Tipps im Rahmen des Projektes.

Danke sage ich auch zu meinen lieben TA's Silvia Speck und Christa Schäfer! Ohne eure Unterstützung hätte ich mich vierteilen müssen, um das alles in dieser Zeit zu schaffen. Außerdem bedanke ich mich bei allen anderen Mitarbeitern im Institut, besonders bei Elisabeth Blaschke, die mir im S3 Labor und auch in anderen belangen des Lebens mit wertvollem Rat zur Seite stand. Aber auch bei Uwe Pätzold und Beate Filohn und nicht zuletzt bei meinem Doktorandenkollegen Thorben.

Auch nicht zu vergessen, die Mädels des Doktorandenzimmer 1: Christina, Steffi und Annike. Wir waren eine coole Runde. Und meiner lieben Maren, für die Freundschaft und das Korrekturlesen dieser Arbeit. Danke auch an meine liebe Jennifer Grünow, für deine Freundschaft und deine wertvollen Anmerkungen zu dieser Arbeit. Und Nicola Lindner, für den letzten Schliff mit deinem glänzenden British English.

Ein letzter Dank geht an meine Freunde, die mich abgelenkt, zum Lachen gebracht, Party gemacht oder mir einfach nur zugehört haben und mir die häufigen Abwesenheiten während der Fertigstellung dieser Arbeit nachgesehen haben. Special thanks to my person and best friend Teodora Buga. I'm blessed to have you in my life.

Und am Ende danke ich mir selbst, dass ich diesen Marathon beendet habe und ins Ziel eingelaufen bin.