

Entwicklung und Validierung eines fluoreszenzmikroskopischen
Schnellnachweisverfahrens für lebensfähige
Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* (MAP) –
Zellen in Milch und Säuglingsanfangsnahrung

Sandra Weirich



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Michael Bülte

**Entwicklung und Validierung eines fluoreszenzmikroskopischen
Schnellnachweisverfahrens für lebensfähige
Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* (MAP) – Zellen
in Milch und Säuglingsanfangsnahrung**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med.vet.

Beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Sandra Weirich

Tierärztin aus Zweibrücken

Gießen 2012

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Michael Bülte
Prof. Dr. Sabine Wensch

Tag der Disputation: 02. Oktober 2012

Die Dissertation wurde von Oktober 2009–September 2011 durch ein Graduiertenstipendium der
Justus-Liebig-Universität Giessen gefördert.

Für Robert

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	IV
Sonderzeichen	V
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis.....	VII
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	2
2.1 Mykobakterien.....	2
2.2 <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> (MAP)	2
2.2.1 Taxonomie und Eigenschaften.....	2
2.2.2 Tenazität und Verbreitung	3
2.3 Paratuberkulose.....	4
2.4 Paratuberkulose Bekämpfungsprogramme	5
2.5 Vorkommen von MAP in Lebensmitteln.....	11
2.5.1 MAP-Exposition über Milch und Milchprodukte.....	12
2.5.2 Einfluss der Pasteurisation auf MAP-Zellen	15
2.6 MAP und Morbus Crohn	17
2.7 Nachweismethoden für MAP in Milch.....	18
2.7.1 Kulturelle Anzucht.....	19
2.7.2 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis.....	20
2.7.3 Phagen-Assay	22
2.7.4 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)	24
3 Material und Methoden	27
3.1 Arbeitskonzept.....	27
3.2 Labormaterialien.....	28
3.3 Referenz- und Kontrollstämmen.....	30
3.4 Milch und Säuglingsanfangsnahrung bei den Einmischversuchen.....	30
3.5 Versuchsaufbau.....	31
3.5.1 Anzucht der MAP-Referenzstämmen.....	31

Inhaltsverzeichnis

3.5.2	Herstellung der MAP-Bakteriensuspension.....	32
3.5.3	Herstellung der Verdünnungsreihe	32
3.5.4	Molekularbiologische Überprüfung der Verdünnungsreihe.....	33
3.5.5	Kontrolle der tatsächlichen Bakterienzahl in den Verdünnungsstufen	34
3.5.6	Artifizielle Kontamination von Milch und Säuglingsanfangsnahrung	39
3.5.7	CTC- und Auramin Orange-Färbung.....	40
3.5.8	<i>BacLight</i> TM -Färbung.....	43
3.5.9	Kulturelle Anzucht.....	47
3.5.10	Molekularbiologische Untersuchungen	49
3.5.11	<i>FASTPlaqueTB</i> TM (FPTB)-Assay.....	50
3.5.12	Untersuchung von Säuglingsanfangsnahrung aus dem deutschen Handel	54
3.5.13	Statistische Auswertung.....	54
4	Ergebnisse	55
4.1	Vorversuche	55
4.2	Hauptversuche	58
4.2.2	Korrelationsanalysen der eingesetzten Methoden.....	60
4.2.3	Nachweisgrenzen der eingesetzten Methoden	63
4.2.4	CTC-Färbung.....	65
4.2.5	<i>BacLight</i> TM -Färbung.....	65
4.2.6	<i>FASTPlaqueTB</i> TM -Assay	66
4.2.7	Kulturelle Anzucht.....	67
4.2.8	Molekularbiologische Ergebnisse	71
4.3	Untersuchung von Säuglingsanfangsnahrung aus dem Handel	74
5	Diskussion	76
5.1	Analyse der Vorversuche und der fluoreszenzmikroskopischen Färbemethoden	76
5.1.1	CTC-/AO-Färbung.....	76
5.1.2	<i>BacLight</i> TM -Färbung.....	78
5.2	Analyse der Hauptversuche	79
5.2.1	Ermittlung der Einmischkonzentration	79

Inhaltsverzeichnis

5.2.2	<i>FASTPlaqueTB™</i> -Assay	81
5.2.3	Molekularbiologische Ergebnisse (Untersuchungen der Plaques des FPTB-Assay).....	82
5.2.4	Kulturelle Anzucht.....	82
5.3	Analyse der Untersuchung von Säuglingsanfangsnahrung aus dem deutschen Handel.	85
6	Schlussfolgerungen	86
7	Zusammenfassung	87
8	Summary	88
9	Anhang	89
9.1	Nährmedien und Puffer.....	89
9.1.1	Herrold's Egg Yolk-Medium.....	89
9.1.2	Middlebrook 7H10-Festnährmedium	89
9.1.3	Middlebrook 7H9-Flüssignährmedium.....	91
9.1.4	Enzymatischer Lysispuffer	92
9.2	Schaubilder Versuchsaufbau	93
10	Literaturverzeichnis	95
	Danksagung.....	118
	Erklärung.....	119

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CTC	5-Cyano-2,3-di-(p-tolyl)-Tetrazolium Chlorid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
Dtl.	Deutschland
<i>et al.</i>	und andere (lat.: et alii)
evtl.	eventuell
Fa.	Firma
g	Gramm
HPC	N-Hexadecylpyridiniumchlorid
h	Stunde(n)
i. d. R.	in der Regel
Inc.	Incorporated
KbE	Kolonie-bildende Einheiten
l	Liter
MAP	<i>Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis</i>
ml	Milliliter
mM	Milli Mol
n	Anzahl
n. d.	not detectable = nicht nachweisbar
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
p	probability (Wahrscheinlichkeit)
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PFU	Plaque forming units
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
s	Sekunde(n)
s.	siehe
S.	Seite
spp.	Spezies (Plural)
ssp.	Subspezies
VBNC	eviable but non-culturable
vs.	versus
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

SONDERZEICHEN

®	geschütztes Warenzeichen
™	geschütztes Warenzeichen (engl. trademark)
μl	Mikroliter
° C	Grad Celsius
%	Prozent
+	positiv, plus
-	negativ, minus
>	größer als
≥	größer als oder gleich
<	kleiner als
≤	kleiner als oder gleich

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des <i>FASTPlaque</i> TB-Assay.....	24
Abb. 2:	CTC- und Auramin Orange-Färbung aus artifiziell mit MAP kontaminierter Milch, keine Vorbehandlung der Milch.....	57
Abb. 3:	CTC- und Auramin Orange-Färbung aus artifiziell mit MAP kontaminierter Milch, nach Vorbehandlung der Milch mit Proteinase K und PMSF	57
Abb. 4:	Nachweisgrenzen für die kombinierte CTC-/AO-Färbung, <i>BacLight</i> TM -Färbung, den FPTB-Assay und die kulturelle Anzucht für die unterschiedlichen Matrices	64
Abb. 5:	Auswertbare kontaminierte Platte, mit stecknadelspitzgroßen, runden, weißen, glänzenden Kolonien: artifiziell kontaminierte Säuglingsanfangsnahrung, Dekontamination mit NOA-Supplement, Verdünnungsstufe 10^{-4}	66
Abb. 6:	Nicht auswertbare Platte, kontaminiert mit stecknadelspitzgroßen, weißen, glänzenden Kolonien: artifiziell kontaminierte Rohmilch, Dekontamination mit NOA-Supplement, Verdünnungsstufe 10^{-6}	67
Abb. 7:	Koloniemorphologie des MAP-Stammes D 8168/02 auf Middlebrook 7H10-Agar, Anzucht aus der Verdünnungsreihe.....	68
Abb. 8:	Koloniemorphologie des MAP-Stammes D 8168/02 auf Herrold's Egg Yolk-Medium, Einmischversuch in Säuglingsanfangsnahrung.....	69
Abb. 9:	Anzahl der kontaminierten Middlebrook 7H10-Platten bei der Anzucht aus FPTB-Medium Plus unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufen und des Zeitpunktes der Kontamination.....	69
Abb. 10:	Anzahl der kontaminierten Middlebrook 7H10-Platten bei der Anzucht aus H-Milch unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufen und des Zeitpunktes der Kontamination.....	70
Abb. 11:	Anzahl der kontaminierten HEYM-Röhrchen bei der Anzucht aus Rohmilch und Säuglingsanfangsnahrung unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufen und des Zeitpunktes der Kontamination.....	70
Abb. 12:	Amplifikationssignale der Real-Time PCR (Marker F57) der dekadischen Verdünnungsreihe des MAP-Stammes „Niebüll“, Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-7}	72
Abb. 13:	Standardkurve der dekadischen Verdünnungsreihe des MAP-Stammes „Niebüll“ ...	72
Abb. 14:	Untersuchte Säuglingsanfangsnahrung aus dem deutschen Handel: Plaques mit stecknadelspitzgroßen, weißen Kolonien in der Mitte	75
Abb. 15:	Versuchsaufbau zum Nachweis von MAP-Zellen in FPTB-Medium Plus	93
Abb. 16:	Versuchsaufbau zum Nachweis von MAP-Zellen in Milch (H-Milch).....	93
Abb. 17:	Versuchsaufbau zum Nachweis von MAP-Zellen in Milch (Rohmilch).....	94
Abb. 18:	Versuchsaufbau zum Nachweis von MAP-Zellen in Säuglingsanfangsnahrung	94

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1:	Nationale Kontrollprogramme zur Erfassung der Paratuberkulose (EU-Länder).....	8
Tab. 2:	Nationale Kontrollprogramme zur Erfassung der Paratuberkulose (Nicht-EU-Länder).10	
Tab. 3:	Kultureller und molekularbiologischer Nachweis von <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> (MAP) in Kuhmilch (Quelle: modifiziert nach Grant, 2010)	13
Tab. 4:	Nachweis von <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> (MAP) in Käse aus dem Handel (Quelle: Slana <i>et al.</i> , 2008a).....	14
Tab. 5:	Übersicht der Pasteurisierungsbedingungen in den verschiedenen Studien.....	16
Tab. 6:	Arbeitskonzept zu den Einmischversuchen: verwendete Matrices und Methoden zum Nachweis von <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> (MAP).....	27
Tab. 7:	Eigenschaften der verwendeten Filtersätze	38
Tab. 8:	Einbezogene Verdünnungsstufen (VST) bei den verschiedenen Nachweismethoden ...	39
Tab. 9:	Korrelationsanalyse (logarithmierte Daten): „optische Dichte“ vs. „Zählkammer“, unter Berücksichtigung der verwendeten Stämme	58
Tab. 10:	Korrelationsanalyse (logarithmierte Daten): „optische Dichte“ vs. „kulturelle Anzucht aus der Verdünnungsreihe“, unter Berücksichtigung der verwendeten Stämme	59
Tab. 11:	Korrelationsanalyse (logarithmierte Daten): „Zählkammer“ vs. „kulturelle Anzucht aus der Verdünnungsreihe“, unter Berücksichtigung der verwendeten Stämme	59
Tab. 12:	Korrelationsanalyse (logarithmierte Daten): „Kulturelle Anzucht aus der Verdünnungsreihe“ vs. „CTC-Färbung“, unter Berücksichtigung der verwendeten Stämme.....	60
Tab. 13:	Korrelationsanalyse der Einmischversuche (n=40) ohne Milch in FPTB-Medium Plus, logarithmierte Daten	61
Tab. 14:	Korrelationsanalyse der Einmischversuche in H-Milch (n=16), logarithmierte Daten	62
Tab. 15:	Korrelationsanalyse der Einmischversuche in Rohmilch (n=32), logarithmierte Daten	62
Tab. 16:	Korrelationsanalyse der Einmischversuche in Säuglingsanfangsnahrung (n=16), logarithmierte Daten	63
Tab. 17:	Logistische Regressionsanalysen für die kombinierte CTC-/AO-Färbung, BacLight™- Färbung, den FPTB-Assay und die kulturelle Anzucht für die unterschiedlichen Einmischversuche; Schätzwert für eine 95 %ige Nachweiswahrscheinlichkeit.....	64
Tab. 18:	Ergebnisse der molekularbiologisch mittels Real-Time PCR auf MAP-DNS getesteten Plaques und der getesteten ganz/teilweise lysierten Bereiche beim FPTB-Assay, unterteilt nach Einmischversuchen	73

Tabellenverzeichnis

Tab. 19:	Ergebnisse des molekularbiologisch auf MAP-DNS getesteten Agars beim FPTB-Assay, unterteilt nach Einmischversuchen.....	74
Tab. 20:	Anzahl der Plaques pro Platte beim FPTB-Assay der untersuchten Säuglingsanfangsnahrung aus dem Handel	75

1 EINLEITUNG

Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* (MAP) ist der Erreger der Paratuberkulose (Johne'sche Krankheit), einer ansteckenden, chronischen Darmentzündung der Wiederkäuer. An Paratuberkulose infizierte bzw. erkrankte Tiere scheiden den Erreger intermittierend über Kot, Milch und Sperma aus (Larsen *et al.*, 1981). Die Herdenprävalenz in Milchviehherden in Europa und den USA wird von Tiwari *et al.* (2006) mit 7–66 % angegeben. Seit Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts wird in der Fachliteratur eine Mitbeteiligung von MAP an der Entstehung von Morbus Crohn, einer chronischen Darmentzündung beim Menschen, kontrovers diskutiert. Insbesondere Milch und Milchprodukte gelten für den Menschen als zentrale Expositionsquelle. Das Vorkommen von vermehrungsfähigen MAP-Zellen in wärmebehandelter (pasteurisierter) Milch beträgt weltweit circa 1–3 % (Grant, 2010). MAP-DNS konnte in im Handel erhältlichem Käse (Stephan *et al.*, 2007) und in Säuglingsnahrungsmitteln (Hruska *et al.*, 2005 und 2011) molekularbiologisch nachgewiesen werden. Da in Milch, je nach eingesetztem Pasteurisationsverfahren und Ausgangskeimzahl, möglicherweise nicht alle MAP-Zellen vollständig abgetötet werden, ist es besonders wichtig, lebensfähige MAP-Zellen schnell und sicher nachweisen zu können. Dies ist umso bedeutsamer, da der Nachweis von MAP-Zellen aus der Matrix Milch mittels kultureller Anzucht (Gold-Standard) einige Schwierigkeiten bereitet. Die kulturelle Anzucht ist aufgrund des langsamen Wachstums (mehrere Wochen bis Monate) und der hohen Nährmedienansprüche von MAP zeitaufwendig und kostenintensiv. Durch den notwendigen Dekontaminationsschritt zur Abtötung der in Rohmilch vorhandenen Begleitkeimflora fällt die Zahl der nachgewiesenen MAP-Zellen möglicherweise zu niedrig aus (Grant *et al.*, 2005). Nach erfolgter Pasteurisation können lebensfähige, aber nicht kultivierbare Zellen (englisch: viable but non-culturable cells; VBNC-Zellen) in der Milch vorhanden sein, die mittels kultureller Anzucht nicht erfasst werden können (Gunasekera *et al.*, 2002).

Das Ziel dieser Doktorarbeit bestand deshalb in der Entwicklung einer einfachen, schnellen und kostengünstigen fluoreszenzmikroskopischen Methode zum Nachweis lebensfähiger MAP-Zellen. Dazu sollte die Kombination aus CTC- (5-Cyano-2,3-di-(p-tolyl)-Tetrazolium Chlorid) und Auramin Orange-Färbung genutzt werden, um sowohl die Gesamtzellzahl an Mykobakterien als auch differenziert den Anteil der respiratorisch aktiven Zellen zu erfassen. Zur Validierung der kombinierten CTC- und Auramin Orange-Färbemethode wurden parallel dazu eine weitere fluoreszenzmikroskopische Färbemethode (BacLight™-Färbung), die kulturelle Anzucht und der FASTPlaqueTB™-Assay eingesetzt.

Da eine Exposition von Säuglingen bezüglich MAP über die Nahrungsmittelkette nicht ausgeschlossen werden kann, wurde außerdem ein repräsentatives Spektrum an Säuglingsanfangsnahrungsmitteln aus dem deutschen Handel auf das Vorkommen von MAP-Zellen untersucht.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Mykobakterien

Mykobakterien gehören zur Ordnung Actinomycetales. Zur Familie *Mycobacteriaceae* gehört nur die Gattung *Mycobacterium* (M.). Mykobakterien sind kurze, z. T. leicht gebogene Stäbchen mit einer Größe von 0,2–0,7 x 1,0–10 µm. Das Wachstum ist aerob, manche Arten zeigen Pigmentbildung. Charakteristisch ist die Säure-Alkohol-Festigkeit, d. h. nach Anfärbung mit Anilinfarbstoffen können Mykobakterien mit Salzsäure-Alkohol nicht wieder entfärbt werden (Holt *et al.*, 1994). Die Säurefestigkeit wird durch den komplexen Zellwandaufbau bedingt. Die Zellwand besteht zu einem Großteil aus hochmolekularen Lipiden, darunter die für Mykobakterien charakteristischen Mykolsäuren. Die dicke, wachsartige Zellwand verleiht den Mykobakterien zahlreiche weitere Eigenschaften, beispielsweise Widerstandsfähigkeit gegenüber Chemikalien wie Chlor (Whan *et al.*, 2001), Hydrophobie (Mc Neil *et al.*, 1991), gesteigerte Widerstandsfähigkeit gegenüber physikalischen Einflüssen wie Hitze/Pasteurisation (Grant *et al.*, 1996 und 1998a). Die komplexe Zellwand bietet Mykobakterien einerseits Schutz, andererseits können Nährstoffe teilweise nicht so schnell aufgenommen werden, was ein langsames Wachstum bedingt (Domingue und Woody, 1997).

Zu den über 140 Arten der Familie *Mycobacteriaceae* gehören schnell und langsam wachsende Spezies. Zu den langsam wachsenden Arten gehören unter anderem wichtige tier- und/oder humanpathogene Spezies, wie *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae* und *M. avium* ssp. *paratuberculosis* (Holt *et al.*, 1994).

2.2 *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP)

2.2.1 Taxonomie und Eigenschaften

MAP gehört zum *M. avium*-Komplex (Thorel *et al.*, 1990) und wurde erstmals 1912 von Twort und Ingram isoliert und kultiviert. Forschern der Universität von Minnesota gelang es, das komplette Genom des MAP-Stammes ATCC® BAA-968™ zu entschlüsseln, welches seit 2004 in der Gen-Datenbank hinterlegt ist (GenBank database, Zugangsnummer AE016958).

MAP-Stämme werden in zwei Gruppen eingeteilt (Typ I und II). Die Einteilung basiert auf einer molekularbiologischen Charakterisierung mittels Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE), Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)-Analyse, basierend auf dem Insertionselement IS900 (IS900-RFLP) und PCR (Collins *et al.*, 1990; Pavlik *et al.*, 1999; Stevenson *et al.*, 2002; Whittington *et al.*, 2000; Castellanos *et al.*, 2007). Typ I-Stämme, auch als Schaf- oder S-Typ bezeichnet, haben ein enges Wirtsspektrum (Collins *et al.*, 1990). Ein Sub-Typ der Typ I-Stämme wird als Typ I/III oder Intermediate-Typ bezeichnet und wurde bei Schafen und Ziegen isoliert (de Juan *et al.*, 2006a). Typ I- und I/III-Stämme wachsen sehr langsam und

sind schwierig zu kultivieren (de Juan *et al.*, 2006b). Typ II-Stämme, auch als Rinder (cattle)- oder C-Typ bezeichnet, wurden erstmals bei Rindern beschrieben, konnten dann aber bei einer Vielzahl von Wirten isoliert werden (Pavlik *et al.*, 1999; Stevenson *et al.*, 2002).

MAP zeigt das langsamste Wachstum aller kultivierbaren Mykobakterien. Die Anzucht von Feldstämmen dauert Monate bis Jahre, die Subkultivierung von Laborstämmen nimmt mehrere Wochen in Anspruch (de Juan *et al.*, 2006b; Whittington *et al.*, 2011). Bei optimalen Wachstumsbedingungen beträgt die Generationszeit über 20 Stunden (Lambrecht *et al.*, 1988). Das extrem langsame Wachstum wird bedingt durch die Unfähigkeit, den Eisen-Chelatbildner Mykobaktin J zu synthetisieren (Merkal und Mc Cullough, 1982). Die Mykobaktin J-Abhängigkeit kann als diagnostisches Kriterium herangezogen werden, um MAP von anderen langsam wachsenden *Mycobacteria* ssp. abzugrenzen. Um ein optimales Wachstum von MAP-Kolonien zu erhalten wird empfohlen, Mykobaktin J in einer Konzentration von 1 µg/ml dem Nährmedium zuzugeben (Lambrecht und Collins, 1992).

Ein weiteres Charakteristikum von MAP ist die Bildung Zellwand-defekter Formen, sogenannter Sphäroblasten. Der Nachweis von Sphäroblasten ist aufgrund der langwierigen Kultivierung und des speziellen Nährmedienbedarfs schwierig (Hines und Styer, 2003). Überdies können Sphäroblasten nicht mit der Ziehl-Neelsen-Färbung angefärbt werden. Zellwand-defekte MAP-Zellen können *in vitro* hergestellt werden (Hines und Styer, 2003), wurden aber auch im Darmgewebe von Patienten mit Morbus Crohn nachgewiesen (Chiodini *et al.*, 1986; Hulten *et al.*, 2000). Die Rolle solcher Zellwand-defekter Formen im Krankheitsgeschehen ist nach wie vor unklar.

2.2.2 Tenazität und Verbreitung

MAP ist weltweit verbreitet und besitzt aufgrund der dicken, wachsartigen Zellwand eine außergewöhnlich hohe Tenazität. In Schafkot auf Weiden können MAP-Zellen bis zu 55 Wochen überdauern, sofern die Flächen komplett im Schatten liegen. Auf kahl geweideten Flächen, wo eine UV-Einstrahlung stattfindet, können die MAP-Zellen hingegen nur zwei Wochen überdauern (Whittington *et al.*, 2004). In Rinderkot kann MAP, je nach Umweltbedingungen 152 bis 246 Tage überleben (Lovell *et al.*, 1944). In fließenden Gewässern überdauern MAP-Zellen bis zu 163 Tage, in stehenden Gewässern bis zu 270 Tage (Larsen *et al.*, 1956).

Das Wirtsspektrum ist breit gefächert und umfasst neben Wiederkäuern (Chiodini *et al.*, 1984; Weber und Gürke, 1992; Godfroid *et al.*, 2000; Manning *et al.*, 2003; Sivakumar *et al.*, 2005) auch verschiedene andere Säugetier- und Vogelarten (Corn *et al.*, 2005). Nur Wiederkäuer erkranken klinisch an Paratuberkulose. MAP wurde auch in Kot und Gewebeproben von Kaninchen (Greig *et al.*, 1997), Füchsen (Beard *et al.*, 2001), Waschbären und Wildkatzen (Corn *et al.*, 2005), Ratten und Waldmäusen, Dohlen und Saatkrähen (Beard *et al.*, 2001; Deutz *et al.*, 2005) sowie Primaten (Mc Clure *et al.*, 1987; Zwick *et al.*, 2002) nachgewiesen. Diese Tiere

stellen möglicherweise ein bedeutsames Reservoir für MAP dar und könnten zur Verbreitung des Erregers beitragen (Daniels *et al.*, 2003). MAP wurde außerdem bei Protozoen, Nematoden und Insekten nachgewiesen, die als Vektoren dienen könnten (Rowe und Grant, 2006). Protozoen kommen ubiquitär in der Umwelt vor. Es ist bekannt, dass Mykobakterien die Phagozytose von Protozoen überleben können und dann in intrazellulären Vakuolen überdauern (Harb *et al.*, 2000). In der Literatur ist beschrieben, dass es unter Laborbedingungen zur Phagozytose von MAP-Zellen in *Acanthamoeba (A.) castellanii* und *A. polyphaga* kam, in denen die MAP-Zellen intrazellulär lange Zeit (3-10 Wochen) überlebten (Whan, 2003; Mura *et al.*, 2006). Da pathogene Amöben wie *A. castellanii* in der Lage sind in intestinale Epithelzellen vorzudringen, könnten sie möglicherweise auf diese Weise zuvor phagozytierte MAP-Zellen in einen Wirt einschleusen (Cirillo *et al.*, 1997; Barker und Brown, 1994). Die Aufnahme von MAP-Zellen durch Larven von Schaf-Nematoden (*Haemonchus contortus*, *Ostertagia circumcincta* und *Trichostrongylus colubriformis*) und Fliegen (*Scatophaga* spp., *Calliphora vicina* und *Lucilia sericata*), die als Vektoren in Betracht kommen, konnte in zwei Studien gezeigt werden (Lloyd *et al.*, 2001; Fischer *et al.*, 2004).

2.3 Paratuberkulose

Paratuberkulose (Johne'sche Krankheit) ist eine chronische Darmerkrankung der Wiederkäuer, die durch *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) hervorgerufen wird. Es handelt sich um eine unheilbare granulomatöse Enteritis, bei der besonders im Ileum und terminalen Jejunum, teilweise aber auch im Dickdarm die Schleimhaut „hirnwindungsartig“ verdickt und entzündet ist (Buergelt *et al.*, 1978). Durch die geschädigte Darmwand kommt es zu Proteinverlusten und Malabsorption von Nährstoffen, was zu Gewichtsverlust der Tiere und herabgesetzter Milchleistung führt. Das klinische Bild der Paratuberkulose beim Rind ist geprägt durch anhaltenden wässrigen Durchfall bei erhaltenem Appetit und fortschreitender Abmagerung. Die Erkrankung verläuft stets tödlich (Cocito *et al.*, 1994; Klee, 2006). Bei kleinen Wiederkäuern und Wildwiederkäuern manifestiert sich die Paratuberkulose in chronischer Abmagerung, Durchfall tritt hingegen selten auf (Robbe-Austerman, 2011).

Mit MAP infizierte Tiere (subklinisch und klinisch) scheiden den Erreger intermittierend über Kot, Milch und Sperma aus (Sweeney *et al.*, 1992a). Die Einschleppung der Paratuberkulose in eine Herde erfolgt meist über den Zukauf eines klinisch inapparent infizierten Tieres (Sweeney, 1996). MAP kann horizontal und vertikal übertragen werden (Olsen *et al.*, 2002). Infizierte Tiere scheiden MAP mit dem Kot aus und kontaminieren ihr Umfeld, wodurch sich das Risiko erhöht, dass die Paratuberkulose im Betrieb weiter verbreitet wird (Fecteau *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2011). Kälber sind für eine Infektion besonders empfänglich (Larsen *et al.*, 1975). Als wichtigster Übertragungsweg gilt dabei die Aufnahme des Erregers über kotverschmierte Zitzen, erregerehaltiges Kolostrum sowie die orale Aufnahme aus der kontaminierten Umgebung

(Sweeney, 1996). Eine intrauterine Übertragung wurde insbesondere bei klinisch kranken Tieren beschrieben (Seitz *et al.*, 1989; Sweeney *et al.*, 1992b). Klinische Krankheitsanzeichen treten erst nach einer Inkubationszeit von zwei bis fünf Jahren auf (Whitlock und Buergelt, 1996; Fecteau und Whitlock, 2010). Die Diagnostik der Paratuberkulose ist problematisch. Es existiert bislang kein Testverfahren, mit dem infizierte Tiere in allen Krankheitsstadien sicher erkannt werden können (Collins, 1996). Insbesondere klinisch inapparent infizierte Tiere sind schwer zu diagnostizieren, da MAP intermittierend ausgeschieden wird, und die Immunantwort im Laufe der Erkrankung variiert (Coussens, 2001).

Die Paratuberkulose ist nahezu weltweit verbreitet. Schweden gilt nach einem umfangreichen Sanierungsprogramm als paratuberkulosefrei (Engvall *et al.*, 1994). Die Angaben zur Herdenprävalenz in Europa schwanken zwischen 7 % und > 50 % (Boelaert *et al.*, 2000; Elschner, 2005; Gasteiner *et al.*, 1999; Lillini *et al.*, 2005; Nielsen und Toft, 2009). Die Angaben zur Herdenprävalenz in den USA liegen zwischen 5 % und 43 % (Dargatz *et al.*, 2001; Obasanjo *et al.*, 1997; Roussel *et al.*, 2005; Thorne und Hardin., 1997). Ein direkter Vergleich der Prävalenzdaten ist allerdings aufgrund verschiedener Faktoren wie Unterschiede bei den Nachweisverfahren (mit variierender Sensitivität und Spezifität), Stichprobenumfang/-art und der unterschiedlichen *intra*-Herdenprävalenz schwierig. Die Paratuberkulose ist in Deutschland eine meldepflichtige Tierkrankheit. Nationales Referenzlabor für Paratuberkulose ist das Friedrich-Löffler-Institut (FLI). Im Jahr 2010 wurden 429 Fälle bzw. Ausbrüche vom FLI erfasst und im Tiergesundheitsjahresbericht 2010 veröffentlicht, darunter 411 Fälle beim Rind, 16 bei Schafen/Ziegen, ein Fall bei Wildwiederkäuern und ein sonstiger Fall. Genaue Prävalenzdaten der Paratuberkulose auf Einzeltier- und Herdenebene sind jedoch nicht bekannt, da sich die Angaben für Deutschland auf einige regionale Studien (Hacker *et al.*, 2004; Luyven *et al.*, 2002) sowie die Meldestatistik des FLI beschränken. Da ein Großteil der Tiere subklinisch infiziert ist und somit nicht erkannt wird, ist davon auszugehen, dass die Dunkelziffer der mit MAP infizierten Tiere deutlich höher liegt (Kennedy und Benedictus, 2001).

2.4 Paratuberkulose Bekämpfungsprogramme

In Deutschland besteht keine Paratuberkulose-Bekämpfungspflicht. Die im Jahr 2005 vom Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft veröffentlichten Leitlinien für den Umgang mit der Paratuberkulose in Wiederkäuerbeständen (Paratuberkulose-Leitlinie) dienen aber als Orientierungshilfe für die freiwillige Bekämpfung der Erkrankung auf Länderebene (Anonymous, 2005).

Die Leitlinie basiert auf drei Säulen von Maßnahmen:

- I) Hygienemaßnahmen in jedem Bestand zur Vermeidung der Weiterverbreitung von MAP.

- II) Bestandsüberwachung (klinische Überwachung sowie serologische und bakteriologische Untersuchungen).
- III) Vorbereitung einer flächendeckenden, bundesweiten Überwachung bzw. Erfassung der Verbreitung der Paratuberkulose.

Die Ziele der Leitlinie sind:

- Eine Vereinheitlichung der Maßnahmen in Deutschland.
- Reduzierung der Klinik und somit der Schäden einer Infektion in den Betrieben.
- Eindämmung der Weiterverbreitung der Erreger.
- Senkung der Prävalenz der Paratuberkulose.

Im Hinblick auf diese Ziele werden in der Paratuberkulose-Leitlinie Maßnahmen beschrieben, um ein auf die jeweilige Situation angepasstes Hygiene- und Betriebsmanagement zu etablieren. Da 40–50 % des Infektionsrisikos im Abkalbebereich und 15–25 % im Milchkälberbereich liegt, kann die Infektionskette innerbetrieblich insbesondere durch Stallbau- und Managementmaßnahmen unterbrochen werden (Wittkowski *et al.*, 2011). Prinzipiell sind Rinder getrennt von Schafen und Ziegen zu halten, auf eine räumliche Trennung nach Aufzuchtalter und –phasen muss strikt geachtet werden. Abkalbeboxen müssen räumlich getrennt vom übrigen Bestand sein und nach jeder Abkalbung gereinigt und desinfiziert werden. Neugeborene Kälber sollten vor dem ersten Stehversuch vom Muttertier getrennt werden und nur mit dem Kolostrum der eigenen Mutter und im Anschluss daran mit Milchaustauscher gefüttert werden. Generell sollten die Kälber in der Aufzuchtphase getrennt von Jungtieren und adulten Tieren aufgestellt werden. Es sollte ausreichend bestandseigene Nachzucht betrieben werden, um Zukäufe möglichst zu vermeiden. Falls Zukäufe getätigt werden, sollten diese nur aus Betrieben mit bekanntem Paratuberkulose-Status erfolgen. Alle Tiere im Bestand müssen regelmäßig klinisch beobachtet werden. Treten im Bestand Durchfälle auf, die länger als fünf Tage bestehen, sind sie diagnostisch abzuklären. Alle klinisch auffälligen Tiere müssen unverzüglich aus dem Bestand entfernt werden. Abhängig von den durchgeführten Maßnahmen erfolgt eine Einteilung des Betriebes in Status I (Basismaßnahmen) bis IV (Paratuberkulose-unverdächtig). Status IV kann ein Betrieb nur erlangen, wenn alle empfohlenen Hygienemaßnahmen eingehalten werden, alle Tiere nach einem vorgegebenen Schema beprobt wurden und mindestens fünf Jahre serologisch und klinisch oder bakteriologisch (einschließlich PCR-Befunden) negativ auf MAP getestet wurden. Zur Aufrechterhaltung dieses Status müssen die serologischen oder bakteriologischen (einschließlich PCR-) Untersuchungen fortgesetzt werden (Anonymous, 2005).

Innerhalb der EU haben neben Deutschland viele weitere Länder nationale/regionale Programme zur Bekämpfung der Paratuberkulose entwickelt (s. Tab. 1); außerhalb der EU gibt es in Australien, Kanada, Neuseeland, Norwegen und den USA Bekämpfungs-/Zertifizierungsprogramme (s. Tab. 2).

Der Fokus aller Bekämpfungsprogramme liegt auf der Erkennung infizierter Herden und der Entfernung von Ausscheidern aus solchen Herden. Daneben spielen Hygiene- und Managementmaßnahmen sowie die Beratung der Landwirte eine Rolle. Da die meisten Programme freiwillig sind und die Kosten überdies überwiegend von den Landwirten getragen werden müssen, ist die Akzeptanz zur Teilnahme nach wie vor eher gering. Problematisch ist außerdem, dass die Prävalenz in einem Großteil der infizierten Herden äußerst gering ist (Muskens *et al.*, 2000). Vor dem Hintergrund der eher geringen Sensitivität einiger Testverfahren gestaltet sich eine Zertifizierung der Herden mit dem Status „Paratuberkulose-frei“ abhängig von dem eingesetzten Testverfahren als schwierig (Kalis *et al.*, 2004).

Im Hinblick auf den Verbraucherschutz ist das niederländische Paratuberkuloseprogramm herauszuheben. Neben dem freiwilligen „Dutch certification-and-surveillance programme for MAP free herds“ startete 2006 das zunächst freiwillige „Bulk milk quality assurance programme (BMQAP)“, bei dem die Landwirte wählen können, ob sie die serologischen Tests der Tiere durch eine Untersuchung aller laktierender Tiere der Herde mittels Milch-ELISA ersetzen. Das dreistufige niederländische Programm sieht wie folgt aus:

- Die Klassifikation der Herde basiert auf Einzeltier Blut-ELISA aller Tiere über drei Jahre oder Milch-ELISA aller laktierenden Kühe.
- Die Überwachung negativ getesteter Herden basiert auf Einzeltier Blut-ELISA aller Tiere über drei Jahre oder Milch-ELISA aller laktierenden Kühe, alle zwei Jahre.
- Zur Kontrolle positiv getesteter Herden gibt es drei Möglichkeiten:
 - 1) Einzeltier Blut-ELISA aller Tiere über drei Jahre, jährlich
 - 2) Milch-ELISA aller laktierenden Kühe, jährlich
 - 3) kulturelle Einzeltier-Kotuntersuchung aller Tiere über zwei Jahre, alle zwei Jahre.

Die Herden können folgenden Status erlangen:

- Ganze Herde negativ getestet → Status A.
- ≥ 1 positives Testergebnis, positive Tiere aus der Herde entfernt → Status B.
- ≥ 1 positives Testergebnis, positive Tiere nicht aus der Herde entfernt → Status C.

Das niederländische Paratuberkuloseprogramm war zunächst freiwillig, allerdings drängte die Milchindustrie sehr zu einer Teilnahme: 2008 wurden alle Milchviehhalter, die Milch an Molkereien lieferten, aufgefordert, bis 2010 an dem Paratuberkuloseprogramm teilzunehmen. Seit 2011 müssen Herden den Status „A“ oder „B“ haben, um Milch an Molkereien liefern zu dürfen. Da 2008 die Laborkosten für die Tests zeitweise von der Milchindustrie subventioniert wurden, nahm die Bereitschaft, am BMQAP teilzunehmen stark zu, so dass im September 2009 95% der circa 19600 Milchviehherden entweder am BMQAP oder am „Zertifizierungs-und-Überwachungsprogramm für MAP freie Herden“ teilnahmen. Dieses Beispiel verdeutlicht, dass die Milchindustrie die Paratuberkulose durchaus als ernstzunehmendes Problem einschätzt.

Tab. 1: Nationale Kontrollprogramme zur Erfassung der Paratuberkulose (EU-Länder)

Land/Programm	Merkmale	Anmerkungen	Quelle
Dänemark freiwilliges Kontrollprogramm „Operation Paratuberculosis“	<u>Tierart:</u> Milchvieh <u>Beprobung:</u> 4 x pro Jahr	Einteilung der Kühe in 3 Kategorien: 1) ELISA negative Kühe → „grüne Kühe“ 2) Kühe, bei denen ein ELISA Testergebnis positiv war → „gelbe Kühe“ 3) Kühe bei denen mehrere ELISA Testergebnisse positiv waren → „rote Kühe“	Kudahl <i>et al.</i> (2008) Nielsen (2011) Nielsen (2009) Nielsen <i>et al.</i> (2007) Nielsen und Toft (2006)
England mehrere Initiativen, u.a. Paratuberkuloseprogramm der National Milk Laboratories (NML)	<u>Tierart:</u> Milchvieh <u>Beprobung:</u> 4 x pro Jahr	Einteilung der Kühe in 3 Kategorien: 1) ELISA negative Kühe → „grüne Kühe“ 2) Ein ELISA Ergebnis positiv → „gelbe Kühe“, Managementmaßnahmen sollten ergriffen werden, um eine Übertragung zu verhindern, da sie "rot" werden könnten 3) Kühe mit ELISA positiven Testergebnissen → "rote Kühe"	http://www.nmr.co.uk/johnes-screening/ http://www.myhealthyherd.co.uk/
Frankreich regionale Kontrollprogramme, seit 2000 freiwilliges nationales Zertifizierungsprogramm	<u>Tierart:</u> Milchvieh <u>Beprobung:</u> jährlich	- keine Risikoabschätzung im Betrieb - geimpfte Tiere sind ausgeschlossen - Testung aller Rinder ≥ 2 Jahre, Nachuntersuchung nach 1 Jahr; danach werden alle 2 Jahre alle Rinder im Alter von 2–5 Jahren getestet	http://www.afssa.fr/Documents/S-ANT-Ra-Paratuberculose.pdf
Italien - Richtlinien vom nationalen Referenzzentrum; - freiwilliges Zertifizierungs- programm in den Provinzen von Lodi und Mailand	<u>Tierart:</u> Milchvieh <u>Beprobung:</u> jährlich	Ermittlung des Herdenstatus: 1) Status „nicht infizierte Herde“ → Level 1–4 2) Status „infizierte Herde“ - Das Zertifizierungsprogramm ist angelehnt an das amerikanische Modell	Arrighi <i>et al.</i> (2007) http://www.izsler.it

Tab. 1: Fortsetzung

Land/Programm	Merkmale	Anmerkungen	Quelle
Niederlande - Dutch certification-and-surveillance programme for MAP free herds - Seit 2006 Bulk milk quality assurance programme (BMQAP)	<u>Tierart:</u> Milchvieh <u>Beprobung:</u> jährlich	Herdenstatus A, B oder C: A → Ganze Herde negativ getestet B → ≥ 1 Testergebniss positiv, positive Tiere aus der Herde entfernt C → ≥ 1 Testergebniss positiv, positive Tiere nicht aus der Herde entfernt	Collins <i>et al.</i> (2005) Van Maanen <i>et al.</i> (2002) Weber (2009)
Österreich Überwachungsprogramm zur Bekämpfung der klinischen Paratuberkulose bei Wiederkäuern	<u>Tierart:</u> Rinder, Schafe, Ziegen, Farmwild <u>Beprobung:</u> jährlich	- positiv getestete Tiere müssen binnen 3 Werktagen getötet werden, anschließend müssen Desinfektions- und Managementmaßnahmen vollzogen werden - Impfung verboten - Paratuberkulose ist in Österreich anzeigepflichtig	Khol und Baumgartner (2009) Geisbauer und Duenser (2009) Bundesgesetzblatt für die Republik Österreich, Jahrgang 2006
Schweden Überwachungs- und Zertifizierungsprogramm	<u>Tierart:</u> Rinder, Schafe <u>Beprobung:</u> jährlich	- Paratuberkulose-Prävalenz nahe Null - wird Paratuberkulose bei einem Tier nachgewiesen muss die Herde gekeult werden - Impfung verboten - seit 2008 aktive Überwachung an Schlachthöfen - Fleischrinderherden werden überwacht+zertifiziert - Milchrinderherden werden überwacht, nehmen aber nicht am Zertifizierungsprogramm teil	Frössling <i>et al.</i> (2009) Sternberg und Viske (2003) Sternberg-Lewerin <i>et al.</i> (2007) http://www.sva.se/upload/pdf/rapport/2/Surveillance-08-web.pdf
Spanien Initiative zur Bekämpfung der Paratuberkulose im Baskenland	<u>Tierart:</u> Rinder	- Keulung positiv getesteter Tiere - in der Provinz Guipúzcoa Impfung der Tiere	Juste <i>et al.</i> (2002) Diéguez <i>et al.</i> (2007)

Tab. 2: Nationale Kontrollprogramme zur Erfassung der Paratuberkulose (Nicht-EU-Länder)

Land/Programm	Merkmale	Anmerkungen	Quelle
Australien Australia's National Johne's Disease Control Program (NJDCCP)	<u>Tierart:</u> Rinder, Schafe, Ziegen, Alpakas, Hirsche	- Markt-Sicherungsprogramme: setzen auf Testung der Tiere, Keulung positiv getesteter Tiere, Quarantäne nach Zukauf, Meldung von Verdachtsfällen, Beratung der Farmer - ABC-Score für Rinder, Schafe, Alpakas	Citer und Kennedy (2009) Keatinge <i>et al.</i> (2009) Watt <i>et al.</i> (2009) http://www.animalhealthaustralia.com.au/programs/jd/jd_home.cfm http://www.cattlecouncil.com.au
Kanada - Canadian Johne's Disease Initiative - Regionale Programme z. B. in Ontario, Quebec, Neufundland	<u>Tierart:</u> Milchvieh <u>Beprobung:</u> jährlich	- Schulungen für die Landwirte - In Ontario ist die Teilnahme am regionalen Programm seit 2010 für alle Milch abliefernden Betriebe Pflicht	Barker (2009) Kelton <i>et al.</i> (2009) http://www.johnes.ca
Neuseeland mehrere Initiativen, u. a. das Paratuberkuloseprogramm des Johne's Disease Research Consortium	<u>Tierart:</u> Rinder, Schafe, Ziegen, Hirsche	- positiv getestete Tiere sollen aus der Herde entfernt werden (Empfehlung) - Datenbank für Hirsche mit makroskopisch sichtbaren Läsionen beim Schlachten - Farmhirsche werden z. T. geimpft	Burton (2006) Mackintosh <i>et al.</i> (2009)
Norwegen Verpflichtendes Überwachungs- und Bekämpfungsprogramm	<u>Tierart:</u> Rinder, Schafe, Ziegen, Lamas, Alpakas <u>Beprobung:</u> jährlich	- Schafen/Ziegen: Maßregelungen bzgl. Verkauf /Transport positiv getesteter Tiere - Schafe/Ziegen werden geimpft - Keulung positiv getesteter Rinder - bei Rindern wurde MAP seit 2003 nicht mehr nachgewiesen	Tharaldsen <i>et al.</i> (2003) Kampen <i>et al.</i> (2007) http://www.vetinst.no
USA Voluntary Bovine Johne's Disease Control Program	<u>Tierart:</u> Rinder <u>Beprobung:</u> jährlich	Ermittlung des Herdenstatus: 1) Status „nicht infizierte Herde“ → Level 1-4) Status „infizierte Herde“ → Level A-D	Charter (2006) Charter <i>et al.</i> (2009) Collins (2007) http://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_diseases/johnes/

2.5 Vorkommen von MAP in Lebensmitteln

Neben direktem Kontakt zu mit *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) infizierten Tieren, ist eine Exposition des Menschen gegenüber MAP über Lebensmittel tierischer und pflanzlicher Herkunft sowie Wasser möglich. Im Fokus stehen insbesondere Milch und Milchprodukte, auf diese wurde unter Nr. 3.4.1 genauer eingegangen.

Fleisch kann möglicherweise mit MAP kontaminiert sein und so in die menschliche Nahrungsmittelkette gelangen (Eltholth *et al.*, 2009). Bei infizierten Tieren kann es zu einer Verbreitung von MAP-Zellen ins Gewebe über den Blutstrom kommen, außerdem können erregerehaltige Lymphknoten, beispielsweise in Hackfleisch mitverarbeitet werden und so in die Nahrungsmittelkette gelangen. Daneben ist eine Sekundärkontamination der Schlachttierkörper mit Kot möglich (Grant, 2010). Am Schlachthof konnte MAP in Dänemark und Nordamerika in circa 16 % und in den USA in circa 34 % der untersuchten Schlachttierkörper nachgewiesen werden (Mc Kenna *et al.*, 2004; Okura *et al.*, 2011; Wells *et al.*, 2009). Im Jahr 2007 wurden von Jaravata *et al.* 200 Rinderhackfleisch-Proben aus kanadischen Supermärkten untersucht, in keiner der Proben konnte MAP mittels PCR nachgewiesen werden. MAP ist möglicherweise in geringer Anzahl im Fleisch infizierter Tiere vorhanden. Mutharia *et al.* (2010) zeigten aber, dass die MAP-Zellen inaktiviert werden, wenn das Fleisch durchgebraten wird. Whittington *et al.* (2010) bestätigten diesen Sachverhalt. In artifiziell mit MAP kontaminiertem Lammfleisch konnte MAP durch Hitze beim Kochen inaktiviert werden.

Der Eintrag von MAP-Zellen in Wasser erfolgt insbesondere über den Eintrag von Kot infizierter Tiere ins Oberflächenwasser. Aufgrund ihrer außergewöhnlich hohen Tenazität können MAP-Zellen lange Zeit in der Umwelt überdauern. MAP wurde mehrfach in Flüssen, Seen und in deren Sediment nachgewiesen, teilweise auch im Wasser von Einzugsgebieten zur Trinkwasseraufbereitung (Pickup *et al.*, 2005; Pickup *et al.*, 2006; Whan *et al.*, 2005). MAP-Zellen sind aufgrund der hydrophoben Eigenschaften der Zellwand überwiegend an Partikel im Wasser gebunden, mit denen sie während der Wasserreinigung (Filtration) entfernt werden (Torvinen *et al.*, 2004). Allerdings besitzt MAP eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber Chlor, das häufig zur Trinkwasseraufbereitung eingesetzt wird. Somit ist nicht auszuschließen, dass Wasser eine Expositionsquelle für den Menschen darstellt. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften von MAP-Zellen werden diese möglicherweise auch in Aerosolen angereichert und können dann mit dem Wind über gewisse Distanzen verbreitet werden (Corner *et al.*, 2004; Eisenberg *et al.*, 2010).

In Salat, Tomaten und Radieschen sowie deren Stängeln und Blättern, die vier Wochen auf Erde kultiviert wurden, die artifiziell mit MAP kontaminiert worden war, konnte MAP nachgewiesen werden (Pavlik *et al.*, 2002). Dies verdeutlicht, dass auch Pflanzen potentielle Expositionsquellen für den Menschen darstellen, wenn sie auf Böden wachsen, auf denen es beispielsweise durch

Düngung mit Gülle von infizierten Tieren oder durch kontaminiertes Oberflächenwasser zu einem Eintrag von MAP kam.

Vor dem Hintergrund einer möglichen Exposition des Menschen über Lebensmittel und Wasser ist allerdings anzumerken, dass sowohl in der Umwelt als auch in der Nahrungsmittelkette vielfältige Verdünnungseffekte auftreten und bei der Be-/Verarbeitung der Lebensmittel meist eine beachtliche Keimreduzierung stattfindet. Da MAP-Zellen sich überdies nur im Wirt vermehren können, ist bei einer Exposition des Menschen eher von geringen Erregerzahlen auszugehen (Hammer, 2011).

2.5.1 MAP-Exposition über Milch und Milchprodukte

Paratuberkulose ist bei Rindern weltweit verbreitet. Die Herdenprävalenz in Milchviehherden in Europa und den USA wird von Tiwari *et al.* (2006) mit 7–66 % angegeben. Da subklinisch und klinisch mit MAP infizierte Tiere den Erreger über Kot und Milch in die Umgebung ausscheiden, gelten insbesondere Milch und Milchprodukte für den Menschen als zentrale Expositionsquelle bzgl. MAP. Es gibt zwei mögliche Eintragswege für MAP-Zellen in Milch: (1) An Paratuberkulose infizierte bzw. erkrankte Tiere scheiden MAP über die Milch aus (Larsen *et al.*, 1981, Taylor *et al.*, 1981, Sweeney *et al.*, 1992a). Dabei können selbst subklinisch infizierte Tiere den Erreger in geringen Mengen (2–8 KBE/50 ml) über die Milch ausscheiden (Sweeney *et al.*, 1992a). (2) Ein weiterer Eintragsweg stellt die fäkale Sekundärkontamination der Milch beim Melken dar. Die in der Milch vorkommende Anzahl von MAP-Zellen ist hierbei abhängig von der die Milch verunreinigenden Kotmenge sowie der darin enthaltenen Erregerzahl. Erkrankte Tiere können mit dem Kot bis zu 10^{12} MAP-Zellen/g ausscheiden, persistent infizierte Tiere bis zu 10^8 MAP-Zellen/g (Chiodini *et al.*, 1984). Die Wahrscheinlichkeit der Ausscheidung steigt dabei mit dem Fortschreiten der Erkrankung. Eine Übersicht zum kulturellen und molekularbiologischen Nachweis von MAP-Zellen in Kuhmilch ist in Tab. 3 wiedergegeben.

Tab. 3: Kultureller und molekularbiologischer Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in Kuhmilch (Quelle: modifiziert nach Grant, 2010)

Kuhmilch	Land ¹⁾	Anzahl Proben	Davon positiv (in %)		Quelle
			PCR	Kultur	
Rohmilch (Einzeltier)	-	26	n. d. ²⁾	35	Taylor <i>et al.</i> (1981)
	US	77	n. d. ²⁾	11,6	Sweeny <i>et al.</i> (1992a)
	US	126	n. d. ²⁾	8,3	Streeter <i>et al.</i> (1995)
	DK	11	18,0	45,0	Giese und Ahrens (2000)
	US	211	33,0	4,0	Pillai und Jayarao (2002)
	US	1493	13,5	2,8	Jayarao <i>et al.</i> (2004)
	CZ	483	n. d. ²⁾	18,4	Ayele <i>et al.</i> (2005)
	CH	84	3,6	n. d. ²⁾	Bosshard <i>et al.</i> (2006)
	CZ	342	32,5	0	Slana <i>et al.</i> (2008b)
Rohmilch (Tankmilch, Farm-Level)	ES	200	9,0	n. d. ²⁾	Sevilla <i>et al.</i> (2002)
	US	52	68,0	0	Stabel <i>et al.</i> (2002)
	CH	501	22,4	n. d. ²⁾	Stephan <i>et al.</i> (2002)
	US	20	50,0	5,0	Pillai und Jayarao (2002)
	US	29	27,5	20,6	Jayarao <i>et al.</i> (2004)
	CH	100	3,0	n. d. ²⁾	Bosshard <i>et al.</i> (2006)
	IR	110	11,0	n. d. ²⁾	Haghkhah <i>et al.</i> (2008)
	CZ	5	88,0	0	Slana <i>et al.</i> (2008b)
Rohmilch (Verarbeitungs-Level)	GB	244	7,8	1,6	Grant <i>et al.</i> (2002a)
	IE	310	n. d. ²⁾	0	O' Doherty <i>et al.</i> (2002)
	IE	389	12,9	0,3	O' Reilly <i>et al.</i> (2004)
	NZ	175	n. d.	0,6	Perace <i>et al.</i> (2005)
Pasteurisierte Milch	GB	312	7,0	0	Millar <i>et al.</i> (1996)
	GB	567	11,8	1,8	Grant <i>et al.</i> (2002a)
	CA	710	15,0	0	Gao <i>et al.</i> (2002)
	IE	77	n. d. ²⁾	0	O' Doherty <i>et al.</i> (2002)
	IE	357	9,8	0	O' Reilly <i>et al.</i> (2004)
	US	702	64,0	2,8	Ellingson <i>et al.</i> (2005)
	CZ	244	n. d. ²⁾	1,6	Ayele <i>et al.</i> (2005)
	AR	70	n. d. ²⁾	2,9	Paolicchi <i>et al.</i> (2005)
	IT	22	4,5	0	Lillini <i>et al.</i> (2007)

¹⁾ international übliche Abkürzung (Ländercodes nach ISO 3166)

²⁾ n. d.: nicht durchgeführt

Auch in im Handel erhältlichem Käse konnte MAP molekularbiologisch und z. T. auch kulturell nachgewiesen werden (s. Tab. 4). Bei der Herstellung von Käse werden zwei Methoden eingesetzt, um eventuell vorhandene Mikroorganismen zu eliminieren/reduzieren. (1) Einsatz pasteurisierter Milch zur Käseherstellung. (2) Reifungsdauer von mind. 60 Tagen bei 2° C. Wichtige Parameter während der Reifung sind ein niedriger pH-Wert und eine hohe Salzkonzentration (Spahr und Schaftroth, 2001). Zwei Studien belegen, dass MAP-Zellen 28–45 Tage in im Laborversuch hergestelltem Käse überleben können (Sung und Collins, 2000; Spahr und Schaftroth, 2001). Donaghy *et al.* (2004) zeigten, dass es, zumindest bei einigen MAP-Stämmen, zu einer Anreicherung von MAP-Zellen im Käsebruch kommt. Dies wird überwiegend auf die hydrophoben Eigenschaften der Mykobakterien-Zellwand zurückgeführt, wodurch es zu Interaktionen mit den Casein-Micellen kommt.

Tab. 4: Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in Käse aus dem Handel (Quelle: Slana *et al.*, 2008a)

Käse- typ	Milch	Land	Nachweis- methode	Anzahl Proben	davon positiv	in %	NaCl- Gehalt	pH-Wert	Quelle
Hart- käse	k. A.	Tschechi- sche Republik	IS900- PCR	23	4	17	1,0 %	5,4	Ikononopoulos <i>et al.</i> , 2005
			Kultur		0	0			
Schnitt- käse	Kuh- Milch	Tschechi- sche Republik	IS900- PCR	5	1	20	1,9 %	5,2	Ikononopoulos <i>et al.</i> , 2005
			Kultur		0	0			
		Schweiz	Real Time- PCR (F57)	133	6	4	n. b.	5,6	Stephan <i>et al.</i> , 2007
			Kultur		0	0			
	Schf/ Zg- Milch	Griechen- land	IS900- PCR	42	21	50	2,5 %	4,1	Ikononopoulos <i>et al.</i> , 2005
			Kultur		2	5			
Weich- käse	Kuh- Milch	Tschechi- sche Republik	IS900- PCR	14	0	0	1,0 %	4,1	Ikononopoulos <i>et al.</i> , 2005
			Kultur		0	0			
		Schweiz	Real Time- PCR (F57)	9	0	0	n. b.	n. b.	Stephan <i>et al.</i> , 2007
			Kultur		0	0			
Quark	k. A.	USA	IS900- PCR	98	23	23	n. b.	n. b.	Clark Jr. <i>et al.</i> , 2006
			Kultur		0	0			

k. A.: keine Angaben; n. b.: nicht bekannt; Schf/Zg-Milch: Schaf-/Ziegen-Milch

Des Weiteren konnte MAP in Säuglingsnahrungsmitteln nachgewiesen werden. In der Tschechischen Republik wurden 51 Milchpulver-Proben aus dem Handel (zehn verschiedene Produzenten aus sieben europäischen Ländern) getestet. Mittels PCR-Nachweis konnte in 49 % der Proben (Nachweis von IS900) bzw. 35,3 % der Proben (Nachweis von F57) MAP-DNS nachgewiesen werden (Hruska *et al.*, 2005). Die Konzentration an MAP-DNS lag im Bereich von $4,8 \times 10^1$ bis $3,3 \times 10^4$ Zellen pro Gramm getrockneter Säuglingsnahrung (Hruska *et al.*, 2011). In Deutschland wurden über einen Zeitraum von circa einem Jahr 59 Säuglingsfertignahrungsmittel untersucht, die das gesamte in Deutschland angebotene Warenspektrum repräsentierten. Dabei wurden in drei der Proben vermehrungsfähige MAP-Zellen nachgewiesen (Akineden *et al.*, 2006).

2.5.2 Einfluss der Pasteurisation auf MAP-Zellen

In der Milchindustrie werden bei der Pasteurisation überwiegend Temperatur-Zeit-Kombinationen eingesetzt, die ursprünglich entwickelt wurden, um *Mycobacterium bovis* abzutöten. Für die Erhitzung der Milch stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, darunter indirekte Verfahren wie Platten- oder Röhrenwärmeaustauscher bzw. direkte Erhitzung über Heißdampfinjektion (am Gebräuchlichsten).

Bei den Wärmebehandlungsverfahren unterscheidet man:

a) Pasteurisierung

- Dauererhitzung: 62–65° C für 30 Minuten (kaum noch gebräuchlich)
- Kurzzeiterhitzung: 72–75° C für 15–30 Sekunden
- Hocherhitzung: circa 127° C für 4 Sekunden (→Extended Shelf Life- (ESL-) Milch)

b) Ultrahocherhitzung (UHT): 135–155° C für 1–4 Sekunden

c) Sterilisierung: 110–120° C für 10–20 Minuten bei Überdruck

Der Verbraucher kauft in Deutschland in aller Regel wärmebehandelte Milch. Hierfür müssen die Bestimmungen der VO (EG) Nr. 854/2004 bezüglich der Vorschriften für die Wärmebehandlung eingehalten werden. Der Verzehr von Rohmilch spielt mengenmäßig in Deutschland kaum eine Rolle, sie wird eigentlich nur in Form von Vorzugsmilch oder Milch-ab-Hof bzw. über Milchprodukte wie Rohmilchkäse konsumiert.

Vor dem Hintergrund eines möglichen kausalen Zusammenhangs zwischen MAP und Morbus Crohn beim Menschen, haben sich in den letzten Jahren zahlreiche Arbeitsgruppen mit dem Effekt der Pasteurisation auf MAP-Zellen beschäftigt. Die Diskussion, ob MAP-Zellen eine Pasteurisierung überleben können, ist kontrovers: Einige Forschungsgruppen beschreiben eine Reduzierung der MAP-Zellen um mehr als sieben Zehnerpotenzstufen, andere hingegen berichten, dass MAP-Zellen eine Pasteurisation überleben können. Es ist allerdings schwierig, die vorhandenen Studien bezüglich des Effekts der Pasteurisation auf die Überlebensfähigkeit von MAP-Zellen miteinander zu vergleichen, weil unterschiedliche Verfahren zur Hitzeinaktivierung

eingesetzt wurden (s. Tab. 5). Grant *et al.* (2005) führen die zum Teil sehr unterschiedlichen Ergebnisse der einzelnen Arbeitsgruppen insbesondere auf Unterschiede bei der Dekontamination der Milch und den Einsatz unterschiedlicher Pasteurisierungsanlagen bei den Versuchen zurück. Die Mehrzahl der Studien beschreibt, dass MAP hitzeresistenter als andere Mykobakterien ist. Diese Eigenschaft der MAP-Zellen wird auf ihre sehr dicke, wachsartige Zellwand, die über 60 % Lipide enthält, zurückgeführt (Rowe und Grant, 2006). Erfolgte eine Wärmebehandlung der Milch bei 72° C für 15 Sekunden, ließen sich bei einer Einmischkonzentration von 10^7 KbE/ml in 85 % der Proben vermehrungsfähige MAP-Zellen nachweisen, bei einer Einmischkonzentration von 10^4 KbE/ml konnten in 58 % der Proben vermehrungsfähige MAP-Zellen nachgewiesen werden (Grant *et al.*, 1996). Erfolgte bei Einmischversuchen die Wärmebehandlung bei 72–75° C für 15–30 Sekunden bzw. bei 90° C für eine Sekunde, enthielten circa ein Drittel der Proben vermehrungsfähige MAP-Zellen (Hammer *et al.*, 2002). Gao *et al.* (2002) konnten bei Einmischversuchen MAP-Zellen in pasteurisierter Milch nachweisen, wenn die Ausgangszahlen in der Milch über 10^5 KbE/ml lagen. In der Studie führte eine Hitzebehandlung von 63° C für 30 Minuten bzw. 72° C für 15 Sekunden zu einer Reduzierung lebensfähiger MAP-Zellen um 5–6 Zehnerpotenzstufen. Diese Studien machen deutlich, dass bei einer hohen Ausgangsbelastung der Milch einige MAP-Zellen die Pasteurisierung überleben können. Zu beachten ist auch die Tendenz von MAP-Zellen, aufgrund der lipophilen Zellwandstruktur Aggregate zu bilden. Grant *et al.* (2005) konnten zeigen, dass meist diejenigen MAP-Zellen überleben, die sich in der Mitte von Aggregaten befinden. Geht der Pasteurisation eine Homogenisierung voraus, überleben weniger MAP-Zellen (Grant *et al.*, 2005).

Tab. 5: Übersicht der Pasteurisierungsbedingungen in den verschiedenen Studien

Testung kommerziell erhältlicher, pasteurisierter Milch	Pasteurisierung von Rohmilch (kommerzielle Pasteurisierungs- anlage)	Einmischversuche (kommerzielle bzw. Pilot- Pasteurisierungs- anlage)	Einmischversuche (im Labor simulierte Pasteurisierungs- bedingungen)
- Ellingson <i>et al.</i> (2005) - Gao <i>et al.</i> (2002) - Grant <i>et al.</i> (2002a) - Millar <i>et al.</i> (1996) - O' Reilly <i>et al.</i> (2004)	- Grant <i>et al.</i> (2002b) - Hammer <i>et al.</i> (2002) - Mc Donald <i>et al.</i> (2003)	- Pearce <i>et al.</i> (2001)	- Chiodini und Hermon-Taylor (1993) - Grant <i>et al.</i> (1996) - Grant <i>et al.</i> (1998a) - Keswani und Frank (1998) - Meylan <i>et al.</i> (1996) - Stabel <i>et al.</i> (1997) - Sung und Collins (1998)

2.6 MAP und Morbus Crohn

Seit Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts wird in der Fachliteratur ein möglicher kausaler Zusammenhang zwischen Paratuberkulose bei Wiederkäuern und Morbus Crohn (MC) beim Menschen diskutiert. Bei Morbus Crohn treten vergleichbare pathomorphologische Veränderungen auf wie bei der Paratuberkulose. MAP konnte in unterschiedlichen Bereichen der menschlichen Nahrungsmittelkette und bei einem hohen Prozentsatz der MC-Patienten nachgewiesen werden. Chiodini *et al.* gelang es 1984 erstmals, MAP aus dem Darmgewebe von Morbus Crohn-Patienten zu isolieren, und 2004 gelang Naser *et al.* der Nachweis von MAP aus dem Blut von MC-Patienten. In den letzten Jahrzehnten zeigte sich weltweit eine Zunahme der Inzidenz bei Morbus Crohn. Daten liegen für Europa u.a. für Schottland vor, wo die Inzidenz von MC bei Kindern seit 1993 um 30 % zunahm (Armitage *et al.*, 2001). Es ist denkbar, dass eine genetische Disposition eine Rolle spielt: Für diese Theorie spricht, dass Eltern und Geschwister, in deren Familien bereits Morbus Crohn-Erkrankungen auftraten, ein 3-20 Mal höheres Risiko tragen, an MC zu erkranken als die übrige Population (Satsangi *et al.*, 1997). Umfangreiche Studien mit Zwillingen in verschiedenen Ländern konnten dies bestätigen (Orholm *et al.*, 2000; Thompson *et al.*, 1996; Tysk *et al.*, 1988). In einer Studie von Kirkwood *et al.* aus dem Jahr 2009 konnte MAP kulturell und molekularbiologisch in Darmbiopsaten und Blutproben von Kindern mit Symptomen von IBD (Inflammatory Bowel Disease) nachgewiesen werden. In die Studie wurden 142 Kinder im Alter von 1,5-17,8 (Ø 11,6) Jahren vor Beginn einer Behandlung einbezogen, die nach Diagnosestellung in drei Gruppen [Morbus Crohn (MC)-Patienten (n=62), Colitis Ulcerosa (CU)-Patienten (n=26), Kontrollgruppe (n=54)] eingeteilt wurden. Ein molekularbiologischer Nachweis von MAP gelang signifikant häufiger bei MC-Patienten (39 % der Darmbiopsate, 16 % der Blutproben) als bei der Kontrollgruppe (15 % der Darmbiopsate, kein Nachweis im Blut). Auch bei den CU-Patienten konnte MAP bei 32 % (Darmbiopsate) bzw. bei 8 % (Blutproben) der Patienten nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte in 4 von 10 Fällen MAP auch kulturell bei MC-Patienten nachgewiesen werden. Nach wie vor ist allerdings unklar, ob der Zusammenhang zwischen MAP und Morbus Crohn kausal oder zufällig bedingt ist. Eine Fall-Kontroll-Studie von Füllgrabe (2008) lässt nicht auf ein ausschließliches Vorkommen von MAP bei Morbus Crohn-Patienten schließen. Untersucht wurden im Rahmen der Studie 120 humane Darmbiopsat-Proben, aus vier verschiedenen Darmabschnitten, von 32 Probanden (12 Morbus Crohn (MC)-Patienten, 8 Colitis Ulcerosa (CU)-Patienten, 12 Kontrollprobanden). Alle Proben wurden molekularbiologisch mittels Triplex Real-Time PCR nach Schönenbrücher *et al.* (2008) und nested PCR bezüglich der MAP-spezifischen Marker IS900, F57 und ISMav2 untersucht. Außerdem wurden alle Darmbiopsate kulturell angezüchtet. MAP-DNS konnte in den Anreicherungskulturen von 4 MC-Patienten, 2 CU-Patienten, und 9 Kontrollprobanden molekularbiologisch nachgewiesen werden. Auch der Aspekt, dass eine antibiotische Therapie bei

einem Teil der Morbus Crohn-Patienten nicht anspricht (Selby *et al.*, 2007) und eine immunsuppressive Behandlung nicht, wie man es vermuten würde, zu einer Verschlechterung des Krankheitsbildes führt, spricht gegen einen kausalen Zusammenhang zwischen MAP und Morbus Crohn. Darüber hinaus gibt es bislang keinerlei Hinweise, dass Risikogruppen, wie beispielsweise Landwirte und Bewohner ländlicher Gegenden mit intensiver Rinderhaltung, ein gesteigertes Risiko hätten, an Morbus Crohn zu erkranken (Jones *et al.*, 2006).

Verbesserte Isolierungstechniken sowie die Fortentwicklung molekularbiologischer Methoden weisen momentan darauf hin, dass MAP, zumindest bei einer Subpopulation von MC-Patienten, in einem komplexen Zusammenspiel von genetischen, immunologischen, infektiösen und umweltbedingten Faktoren bei der Entstehung dieser Erkrankung eine Rolle spielt.

2.7 Nachweismethoden für MAP in Milch

MAP wurde erstmals 1935 aus drei von vier Milchproben von klinisch an Paratuberkulose erkrankten Kühen isoliert (Alexejeff-Goloff, 1935). In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche Methoden zum Nachweis von MAP in Milch entwickelt; am häufigsten eingesetzt werden die kulturelle Anzucht und die PCR (Slana *et al.*, 2008a).

Der Nachweis lebensfähiger MAP-Zellen bereitet insbesondere in Milchproben Schwierigkeiten, weil dort in aller Regel nur eine sehr geringe Anzahl MAP-Zellen vorkommt. Bevor die Nachweismethode bei Milch erfolgreich eingesetzt werden kann, sind zunächst einige Arbeitsschritte notwendig, wie beispielsweise die Zentrifugation und eine chemische Dekontamination von Rohmilch. Die Zentrifugation wird genutzt, um MAP-Zellen im Pellet anzureichern. 69,4 % der MAP-Zellen finden sich nach der Zentrifugation der Milch im Pellet (Grant *et al.*, 1998b). Einmischversuche in Milch und Kolostrum belegen, dass nach Fraktionierung 80–90 % der MAP-Zellen im Pellet und 10–20 % im sahnigen Fettring zu finden sind (Van Brandt *et al.*, 2010). Die Dekontamination der Rohmilch dient dazu, die Begleitkeimflora in der Milch abzutöten. Dies ist unabdingbar, da eventuell vorhandene, schnell wachsende Mikroorganismen die MAP-Zellen überwuchern würden und somit eine Auswertung der Proben nicht möglich wäre. Allerdings hat die Dekontamination auch reduzierende Effekte auf die Lebensfähigkeit vorhandener MAP-Zellen. Deshalb ist es schwierig, die richtige Balance zwischen der Inaktivierung unerwünschter Mikroorganismen in der Milchprobe und der Schädigung vorhandener MAP-Zellen durch das Dekontaminationsmittel zu finden (Dundee *et al.*, 2001). Grant und Rowe (2004) weisen darauf hin, dass die Anzahl der nachgewiesenen MAP-Zellen in Milchproben nach einer Dekontamination zu niedrig ausfällt.

Grundsätzlich lassen sich die Nachweisverfahren in indirekte und direkte Nachweismethoden einteilen. Ein Überblick mit Augenmerk auf die Sensitivität und Spezifität der Methoden findet sich in dem Review-Artikel von Slana *et al.* (2008a).

Bei den indirekten Nachweismethoden wird der Nachweis von Antikörpern in der Milch mittels ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) durchgeführt. Bei diesem Test werden spezifische Antigene (z. B. Lipoarabinomannan) zum Nachweis der MAP-Antikörper eingesetzt. Je nach eingesetztem ELISA stellen die Ergebnisse stets einen Kompromiss zwischen Sensitivität und Spezifität dar (Geue *et al.*, 2007). Kommerziell erhältliche Test-Kits weisen eine hohe Spezifität auf (> 99 %), die Sensitivität ist mit nur circa 28 % allerdings sehr gering (Collins *et al.*, 2005). Vorteilhaft beim ELISA-Test sind die geringen Kosten und das schnelle Ergebnis. Geue *et al.* (2007) stellten allerdings die Brauchbarkeit der verfügbaren ELISA-Testsysteme für die Untersuchung von Tankmilchproben in Frage.

Zu den direkten Methoden zum Nachweis von MAP in Milch zählen die kulturelle Anzucht, die Fluoreszenzmikroskopie, der Phagen-Assay und die PCR.

2.7.1 Kulturelle Anzucht

MAP ist ein sehr langsam wachsendes Bakterium und schwierig zu kultivieren (s. Nr. 3.2.1). Die kulturelle Anzucht gilt dennoch als „Gold-Standard“ (Referenzmethode) zum Nachweis von MAP-Zellen (Slana *et al.*, 2008a; Whittington, 2010). Vorteilhaft sind die hohe Spezifität von annähernd 100 % (Stephan, 2007), der Nachweis lebensfähiger MAP-Zellen und die Möglichkeit, gewachsene Kolonien für eine weitere Stamm-Charakterisierung heranzuziehen. Trotzdem wird immer wieder betont, dass weder die kulturelle Anzucht noch der molekularbiologische Nachweis von MAP eine exakte Erfassung der Zahl der MAP-Zellen in einer Probe ermöglichen (Anonymous, 2010; Grant, 2010).

Insbesondere in Milch bereitet der Nachweis lebensfähiger MAP-Zellen Schwierigkeiten, weil in nativen Proben in aller Regel nur eine sehr geringe Anzahl MAP-Zellen vorkommt und es aufgrund der lipophilen Zellwandstruktur der MAP-Zellen zur Aggregatbildung kommen kann, wodurch die Erfassung des tatsächlichen Zellgehaltes erschwert wird. Die Sensitivität wird von der Probenaufbereitung und der Reduzierung der Begleitkeimflora beeinflusst und ist mit nur circa 50 % außerordentlich gering (Stephan, 2007). Die Wachstumsrate von MAP-Zellen ist, verglichen mit der von anderen in der Milch vorkommenden Mikroorganismen, äußerst gering. Eine erfolgreiche Kultivierung von MAP ist daher nur möglich, wenn die Probe zuvor einer Dekontamination unterzogen wurde (Dundee *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2005; Grant und Rowe, 2004; Stabel *et al.*, 1997) und/oder den Nährmedien ein Antibiotika-Gemisch zugesetzt wurde, um ein Überwuchern der Begleitmikroflora zu verhindern (Anonymous, 2010; Whittington, 2010; Gill *et al.*, 2011). Zur Dekontamination von Milch wird eine fünfstündige Behandlung mit 0,75 % HPC (Hexadecylpyridiniumchlorid) empfohlen (Dundee *et al.*, 2001). Die Dekontamination hat allerdings reduzierende Effekte auf die Lebensfähigkeit möglicherweise vorhandener MAP-Zellen und es ist schwierig, die richtige Balance zwischen der Inaktivierung unerwünschter Mikroorganismen in der Milchprobe und der Schädigung vorhandener MAP-Zellen zu finden.

(Dundee *et al.*, 2001). Die in Milch ermittelte Anzahl der MAP-Zellen fällt möglicherweise bei vorausgegangener Dekontamination zu gering aus (Grant *et al.*, 2005). Ein weiteres Problem besteht darin, dass lebensfähige, aber nicht kultivierbare (englisch: viable but non-culturable) Zellen (VBNC-Zellen) mittels kultureller Anzucht nicht erfasst werden können. Viele Bakterien nutzen den VBNC-Status, um sich widrigen Umweltbedingungen anzupassen und zu überleben. So können beispielsweise Nährstoff-/ Sauerstoffmangel, Bestrahlung, Chemikalien (Chlor u. a.), aber auch Hitzeeinwirkung (z. B. bei der Pasteurisation von Milch) zur Entstehung von VBNC-Zellen führen (Day und Oliver, 2004; Gunasekera *et al.*, 2002). Durch die Anfärbung von VBNC-Zellen konnte gezeigt werden, dass sie in der Lage sind, Farbstoffe zu reduzieren (weist auf eine metabolische Aktivität hin) bzw. die Aufnahme von Farbstoffen zu unterdrücken (weist auf eine intakte Zellwand hin). Obwohl solche Zellen als lebensfähig gelten, können sie nicht angezüchtet werden. Das unterscheidet sie von sogenannten schlafenden Zellen. Diese können ihre Kultivierbarkeit wieder erlangen, wenn ausreichend Nährstoffe vorhanden sind und die Wachstumsbedingungen günstig sind, wohingegen VBNC-Zellen dazu nicht in der Lage sind (Kaprelyants *et al.*, 1993; Kell *et al.*, 1998). Überdies ist die kulturelle Anzucht von MAP-Zellen aufgrund des langsamen Wachstums und der hohen Nährmedienansprüche zeitaufwendig und kostenintensiv. Die kulturelle Anzucht von MAP erfolgt üblicherweise auf einem eigelhaltigen Nährmedium mit Mykobaktinzusatz, teilweise wird zusätzlich ein Antibiotika-Gemisch zugegeben. Insbesondere wenn zuvor eine Dekontamination der Probe erfolgt, muss auf eigelhaltige Nährmedien zurückgegriffen werden, da diese die bakteriostatische Wirkung des Dekontaminationsmittels neutralisieren (Akineden *et al.*, 2011; Merkai und Curran, 1974; Stachelscheid, 1989). Zur Verfügung stehen sowohl verschiedene Fest- als auch Flüssignährmedien (Whittington, 2010; Whittington *et al.*, 2011). Zur Anzucht von MAP aus Milch ist das Herrold's Egg Yolk Medium (HEYM) am gebräuchlichsten (Slana *et al.*, 2008a). Zu beachten ist, dass nicht alle MAP-Stämme auf allen Nährmedien gleich gut wachsen. Insbesondere Schaf-Stämme (Typ I-Stämme) sind besonders schwierig zu kultivieren und erfordern lange Inkubationszeiten (de Juan *et al.*, 2006b; Whittington *et al.*, 2011). Die Anzucht von MAP erfolgt bei 37° C. Die Inkubationszeit beträgt üblicherweise 12–20 Wochen bei Festnährmedien und 8–12 Wochen bei Flüssignährmedien (Whittington, 2010). Abhängig vom MAP-Stamm bieten Flüssignährmedien eine höhere Sensitivität als Festnährmedien (Whittington, 2010). Allerdings neigen MAP-Zellen in Flüssignährmedien zur Aggregatbildung (Borrego *et al.*, 2000). Die Koloniemorphologie ist abhängig vom verwendeten Medium (Whittington *et al.*, 2011; Whittington, 2010).

2.7.2 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis

Die Fluoreszenzmikroskopie kann genutzt werden, um organische Proben zu analysieren. Da diese Proben im Allgemeinen nicht fluoreszieren, muss man sie mit einem fluoreszierenden

Farbstoff (Fluorochrom) anfärben. Sobald Moleküle einer fluoreszierenden Substanz Licht absorbiert haben, senden sie Strahlung gleicher oder längerer Wellenlänge aus. Die Zunahme der Wellenlänge bei der Fluoreszenz wird als „Stokesche Verschiebung“ bezeichnet. Durch Absorption von Photonen werden Elektronen aus dem Grundzustand auf ein höheres Energieniveau gehoben. Aus diesem sogenannten Anregungszustand kann ein Molekül auf unterschiedliche Weise wieder in den Grundzustand zurückkehren, ein möglicher Energieübergang ist dabei die Fluoreszenz. Da die absorbierte Energie über mehrere Stufen wieder abgegeben wird, ist das emittierte Fluoreszenzlicht energieärmer als die absorbierte Strahlung. Da sich anregendes und emittiertes Licht in ihrer Wellenlänge unterscheiden, ist es durch geeignete optische Filter möglich, angefärbte Strukturen wie Bakterienzellen zu detektieren. Bei einem Epifluoreszenzmikroskop erreicht man die Fluoreszenz des zu untersuchenden Präparates durch Anregung mittels Auflicht. Zur Anregung werden ein Anregungsfilter, ein dichromatischer Spiegel (Farbteiler) und ein Sperrfilter benötigt. Aus dem weißen Licht einer Xenon- oder Quecksilberdampfampe wird durch einen Anregungsfilter aus dem gesamten Wellenlängenspektrum der Lampe der Bereich, der zur Anregung des gewählten Fluorochroms erforderlich ist, herausgefiltert. Im Inneren des Mikroskops wird dieses Licht von einem dichromatischen Spiegel auf das Präparat reflektiert. Dichromatische Spiegel haben eine kritische Wellenlänge: Licht kleinerer Wellenlängen wird reflektiert, Licht größerer Wellenlängen durchgelassen. Der Spiegel wird so gewählt, dass die kritische Wellenlänge zwischen Anregungs- und Emissionsmaximum des Fluoreszenzfarbstoffes liegt. Dadurch wird das Anregungslicht durch das Objektiv zum Präparat gelenkt, während das langwelligere Fluoreszenzlicht den Spiegel passiert. Der im Abbildungsstrahlengang angebrachte Sperrfilter lässt nur den Wellenlängenbereich hindurch, der spezifisch für das verwendete Fluorochrom ist, und absorbiert gleichzeitig das vom Präparat ins Objektiv gestreute Anregungslicht. Anregungsfilter, dichromatischer Spiegel und Sperrfilter müssen für den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff genau aufeinander abgestimmt sein, um ein helles, kontrastreiches Fluoreszenzbild vor dunklem Hintergrund zu erhalten.

Mit dem Einsatz geeigneter Fluoreszenzfarbstoffe können verschiedene Fragestellungen bearbeitet werden. Eine Möglichkeit liegt in der Bestimmung der Gesamtzellzahl, d. h. der Summe aller lebens- und nicht lebensfähigen Zellen. Hierfür werden entweder Nukleinsäuren angefärbt oder Bestandteile der Zellwand. Reine Nukleinsäurefarbstoffe, wie z. B. Acridinorange und DAPI lagern sich in die Doppelhelix der DNS ein und färben somit alle vorhandenen Zellen (Kepner und Pratt, 1994). Werden hingegen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Auramin Orange bestimmte Bestandteile der Zellwand angefärbt (Mykolsäureschicht), kann man spezifisch säurefeste Bakterien nachweisen. Diese Färbemethode wurde erstmals 1938 durch Hagemann eingesetzt und von Richards *et al.* (1941) veröffentlicht. Sie ist heute weitverbreitet, um säurefeste Bakterien in zytologischen Abstrichen und histologischem Sektionsmaterial nachzuweisen. Cheng

et al. (2005) bewerteten die Verwendung von Auramin Orange als schnelle und sensitive Färbemethode mit hohem prädiktivem Wert in der Mykobakteriendiagnostik. Eine andere Möglichkeit bietet die Fluoreszenzmikroskopie über die Verwendung von Tetrazolium-Salzen zur Bestimmung des Anteils lebensfähiger Zellen. Bei dieser Färbemethode wird ein aktives Elektronentransportsystem der Zelle nachgewiesen. Zugrundeliegendes Prinzip ist hierbei, dass jede atmende Zelle über ein aktives respiratorisches Elektronentransportsystem verfügt. Innerhalb der Elektronentransportkette werden anfallende Wasserstoffionen durch Dehydrogenasen auf einen spezifischen Akzeptor übertragen, der dadurch reduziert wird. Anstelle der physiologischen Wasserstoffakzeptoren können auch künstliche Elektronenakzeptoren, wie z. B. 5-Cyano-2,3-di-(p-tolyl)-Tetrazolium Chlorid (CTC) eingesetzt werden. Dieser künstliche Elektronenakzeptor ist durch hydrophobe Gruppen lipophil und membranpermeabel und wird aufgrund der positiven Ladung von Zellen mit Membranpotential in deren Inneren angereichert. Das nichtfluoreszierende, wasserlösliche CTC wird dann in vitalen Zellen mit aktiven Mitochondrien zu einem fluoreszierenden, wasserunlöslichen Formazan-Kristall reduziert. CTC wurde bisher für die Untersuchung von Wasserproben (Rodriguez *et al.*, 1992; Schaule *et al.*, 1993) sowie zur Untersuchung von Milchproben zum Nachweis von *E. coli* O157:H7 (Yamaguchi *et al.*, 2003) und *Pseudomonas* spp. (Kitaguchi *et al.*, 2005) eingesetzt.

Eine weitere Möglichkeit, zwischen aktiven und inaktivierten Bakterien zu unterscheiden, bietet die Anfärbung mit Fluoreszenzfarbstoffen des kommerziell erhältlichen Live/Dead® *BacLight*™ Bacterial Viability Kit. Angefärbt wird mit dem grün fluoreszierenden Farbstoff SYTO® 9 und mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff Propidiumiodid. Während der Farbstoff SYTO® 9 membrangängig ist, und somit generell alle Bakterien der Population markiert, kann Propidiumiodid nur Bakterien mit defekter Zellmembran penetrieren und bewirkt dort in Anwesenheit beider Farbstoffe die Reduzierung von SYTO® 9. Somit fluoreszieren Bakterien mit intakter Zellmembran grün, wohingegen Bakterien mit zerstörter Zellmembran rot fluoreszieren. Nachteilig an diesem Kit ist allerdings, dass es nicht spezifisch für Mykobakterien ist, sondern alle Bakterienzellen, unabhängig von der Spezies, in einer Probe nachweist. Problematisch ist überdies, dass das Funktionsprinzip der *BacLight*™-Färbung nur auf der Membranintegrität vorhandener Zellen beruht. In einer Probe können aber lebende Zellen mit vorgeschädigter Zellwand vorhanden sein. Solche Zellen würden von dem Farbstoff Propidiumiodid angefärbt werden, wodurch es zu einer falschen Interpretation der Ergebnisse kommen würde (Produkt Information, Live/Dead® *BacLight*™ Bacterial Viability Kit, Firma Molecular Probes).

2.7.3 Phagen-Assay

Der *FASTPlaqueTB*™ (FPTB)-Assay wird seit einigen Jahren als schnelle und kostengünstige Methode zum Nachweis von MAP-Zellen in Nährmedium und Milch empfohlen (Foddai *et al.*, 2009; Foddai *et al.*, 2011). Ursprünglich wurde der FPTB-Assay entwickelt, um *Mycobacterium*

tuberculosis in menschlichem Sputum nachzuweisen (Park *et al.*, 2003). Die Methode basiert auf der Replikation von Phagen und der Entstehung von Plaques als Indikator für lebende Zielzellen. Da die eingesetzten Mykobakteriophagen (D29) auch andere *Mycobacteria* ssp. infizieren, muss der FPTB-Assay mit einem MAP-spezifischen Schnellnachweisverfahren kombiniert werden. Hierbei gibt es zwei verschiedene Ansätze: (1) Die entstandenen Plaques werden ausgestanzt und mittels MAP-spezifischer Real-Time PCR untersucht (Stanley *et al.*, 2007; Altic *et al.*, 2007; Foddai *et al.*, 2009). (2) Vor dem Phagen-Assay wird ein selektiver Arbeitsschritt in Form der Peptid-vermittelten magnetischen Separation (PMS) durchgeführt. Dieses Konzept wurde von Foddai *et al.* (2010a) entwickelt und bereits bei Experimenten bezüglich einer Hitzeinaktivierung von MAP-Zellen in Milch (Foddai *et al.*, 2010b) und zum Nachweis von MAP-Zellen in natürlich kontaminierter Tankmilch und in Rinderkotproben erfolgreich eingesetzt (Foddai *et al.*, 2011). Die Kombination PMS–Phagen-Assay hat den Vorteil, dass durch die Peptid-vermittelte magnetische Separation ein Großteil der in der Milch vorkommenden Begleitkeimflora entfernt wird (Foddai *et al.*, 2011). Dadurch kann auf eine chemische Dekontamination der Milch verzichtet werden, die bekannterweise negative Effekte auf die Lebensfähigkeit der MAP-Zellen hat (Dundee *et al.*, 2001). Beide kombinierten Verfahren ermöglichen den schnellen und spezifischen Nachweis lebender MAP-Zellen in Milch in nur 36–48 Stunden. Das Prinzip des Phagen-Assay (s. Abb. 1) beruht darauf, dass in der Probe vorhandene Mykobakterienzellen von den zugegebenen Bakteriophagen infiziert werden. Nach Behandlung mit einer viruziden Lösung (Virusol) werden alle Bakteriophagen, die keine lebenden Zielzellen infizieren konnten, abgetötet. Nur die im Inneren von lebenden Mykobakterienzellen geschützten Bakteriophagen überleben und beginnen mit ihrer Replikation. Mit der Zelllyse werden die Phagen aus den Mykobakterienzellen ausgeschleust und befallen die umliegenden Sensorzellen. Bei diesen Sensorzellen handelt es sich um schnellwachsende *Mycobacterium smegmatis*-Zellen, die der Probe zuvor zugegeben wurden. In diesen Zellen durchlaufen die Phagen schnelle Vermehrungszyklen, bestehend aus Infektion, Replikation und Zelllyse. Dadurch entstehen in dem Bakterienrasen auf der Platte sogenannte Plaques, deren Anzahl mit der Zahl lebender Zielzellen, die Bakteriophagen enthielten, korreliert. Im Jahr 2009 wurde der Phagen-Assay von Foddai *et al.* zum Nachweis von MAP-Zellen in Milch modifiziert und optimiert. Diese Modifikationen tragen dazu bei, dass eine 100%-ige Korrelation zwischen den gezählten Plaques (PFU/ml) und den kulturell ermittelten MAP -Werten (KbE/ml) besteht und der Nachweis von < 10 PFU/ml MAP-Zellen in gespikter Milch gelingt (Foddai *et al.*, 2009; Foddai *et al.*, 2010a).

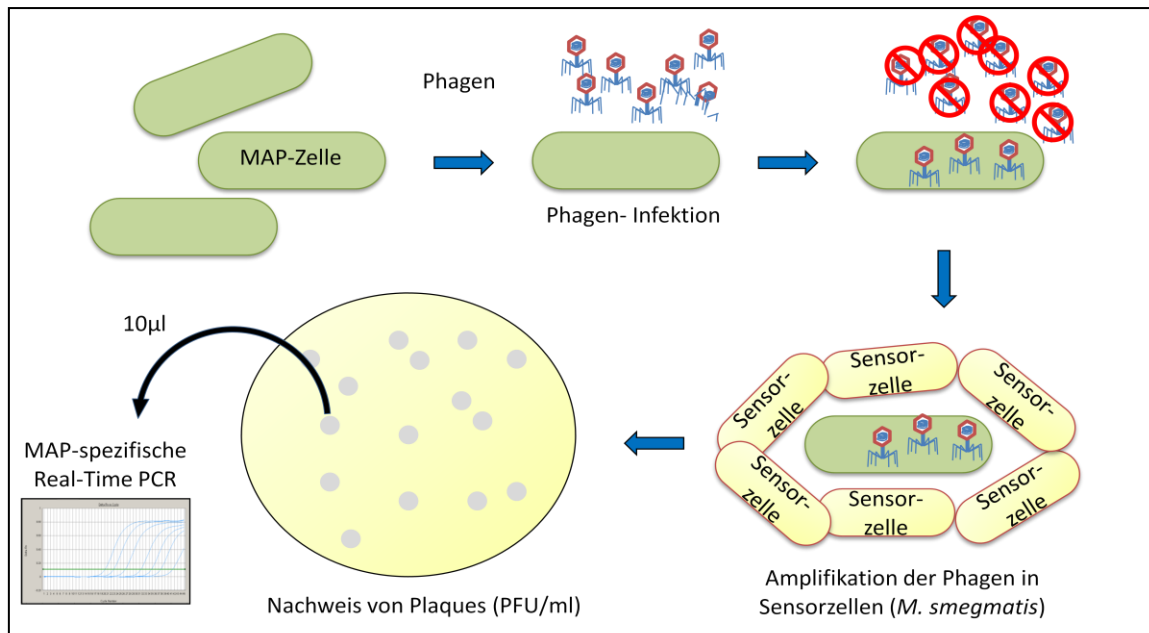


Abb. 1: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des FASTPlaqueTB-Assay

2.7.4 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Die PCR-Methode wurde 1985 in Kalifornien von Kary Mullis entwickelt. Die PCR ermöglicht in drei Schritten (Denaturierung, Annealing und Elongation) eine erfolgreiche DNS-Vervielfältigung. Seit der Entdeckung MAP-spezifischer DNS-Sequenzen werden molekularbiologische Methoden zum Nachweis von MAP in Milch und anderen Matrices eingesetzt. Basis war die Entdeckung des Insertionselementes IS900 im Jahr 1989 (Green *et al.*), das mit 14–20 identischen Kopien im MAP-Genom vorliegt (Tasara *et al.*, 2005). Lange Zeit wurde IS900 als hochspezifisch für MAP angesehen (Englund *et al.*, 1999; Moss *et al.*, 1991; Vary *et al.*, 1990). Mittlerweile sind aber Kreuzreaktionen zu anderen Mykobakterium-Spezies bekannt. Bei eng verwandten Mykobakterien-Spezies können so genannte „IS900 like-Sequenzen“ vorkommen, die zu falsch-positiven Ergebnissen führen können (Cousins *et al.*, 1999; Englund *et al.*, 2002; Naser *et al.*, 1999; Vansnick *et al.*, 2004). Englund *et al.* (2002) empfehlen deshalb die Überprüfung IS900-positiver Ergebnisse mittels Sequenzierung oder einem alternativen Marker. Als Alternative zum Insertionselement IS900 wurden zahlreiche weitere MAP-spezifische Zielregionen im MAP-Genom identifiziert, die für die molekularbiologische Diagnostik eingesetzt werden können, darunter F57 (Poupart *et al.*, 1993), HspX (Ellingson *et al.*, 1998) und ISMav2 (Strommenger *et al.*, 2001). Die beiden Marker F57 und HspX kommen jeweils als Einfachkopie im bakteriellen Genom von MAP vor, wohingegen von dem Marker ISMav2 mindestens drei identische Kopien existieren. Aufgrund der geringeren Anzahl an Kopien sind diese Marker zwar nicht so sensitiv wie die mehrfach enthaltene IS900-Sequenz, dafür sind sie aber hochspezifisch für MAP, was zu weniger falsch-positiven Ergebnissen führt (Coetsier *et al.*, 2000; Ellingson *et al.*, 1998; Poupart *et al.*, 1993; Strommenger *et al.*, 2001; Tasara *et al.*,

2005). Bei dem Marker *ISMav2* wurden allerdings auch Kreuzreaktionen mit anderen Mykobakterien-Spezies nachgewiesen (Möbius *et al.*, 2008). Insbesondere die Zielregion F57 gilt als geeignet für den spezifischen Nachweis von MAP, da sie bisher in keiner anderen Mykobakterien-Spezies nachgewiesen werden konnte (Poupart *et al.*, 1993; Coetsier *et al.*, 2000; Tasara und Stephan, 2005; Möbius *et al.*, 2008; Schönenbrücher *et al.*, 2008). Entscheidend zur Entdeckung neuer MAP-spezifischer Sequenzen beigetragen hat die komplette Entschlüsselung des Genoms des MAP-Stammes ATCC® BAA-968™ (Li *et al.*, 2005).

Ein weiterer wichtiger Schritt beim molekularbiologischen Nachweis von MAP war die Entwicklung der Real-Time PCR (quantitative Echtzeit-PCR). Diese Methode wird seit dem Jahr 2002 zum Nachweis von MAP in Milch eingesetzt (Khare *et al.*, 2004; O'Mahony und Hill, 2002 und 2004). Vorteilhaft sind der erheblich verminderte Zeit- und Arbeitsaufwand, da die aufwendige Agargelelektrophorese im Anschluss an den PCR-Lauf entfällt. Darüber hinaus ist die Kontaminationsgefahr der zu untersuchenden Probe deutlich reduziert. Die Quantifizierung bei der Real-Time PCR erfolgt durch kontinuierliche Messung des Fluoreszenzsignals während des PCR-Zyklus. Dabei kann man drei Phasen unterscheiden (Becker-Follmann und Baas, 2004): In der ersten Phase zu Beginn des Laufes wird das PCR-Signal von Hintergrundreaktionen überlagert. In der zweiten Phase erfolgt die exponentielle Amplifikation der DNS. Durch Definition eines Schwellenwertes („Threshold“) und Ermittlung von dessen Schnittpunkt mit der Fluoreszenzkurve erhält man den so genannten Ct-Wert (Threshold Cycle), der ein Maß für die anfängliche DNS-Menge in der Probe ist. Beim Ct-Wert handelt es sich um den PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz der Ziel-DNS die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Da der Ct-Wert umso kleiner ist, je größer die DNS-Ausgangskonzentration in der Probe war, ist eine quantitative Beurteilung anhand der Kinetik der PCR-Reaktionen möglich. In der dritten Phase kommt es schließlich zu einem Plateau, da sich die Menge der gebildeten PCR-Produkte gegen Ende des PCR-Laufes nicht mehr verändert.

Je nach Matrix können PCR-Inhibitoren zu falsch-negativen molekularbiologischen Ergebnissen führen (Al-Soud *et al.*, 2000; Bickley *et al.*, 1996). Deshalb ist die Verwendung einer internen Amplifikationskontrolle (IAK) essentiell zur richtigen Interpretation der Ergebnisse (Englund *et al.*, 2001; Herthnek und Bölske, 2006; Schönenbrücher *et al.*, 2008; Slana *et al.*, 2008b; Tasara und Stephan, 2005). Das Prinzip der IAK basiert auf der Zugabe einer heterologen DNS-Sequenz, die neben der Ziel-DNS-Sequenz vervielfältigt wird. Die IAK ermöglicht die Unterscheidung zwischen auswertbaren und falsch-negativen Ergebnissen. Bei einem positiven Ergebnis der IAK ist davon auszugehen, dass sich in der untersuchten Probe keine PCR-Inhibitoren befinden. Bei einem negativen PCR-Ergebnis handelt es sich also um ein tatsächlich negatives Ergebnis, sofern die IAK positiv ist (Hoorfar *et al.*, 2004).

Das institutseigene TaqMan® Real-Time PCR Verfahren nach Schönenbrücher *et al.* (2008) basiert auf einem Nachweis der MAP-spezifischen Zielregionen F57 und *ISMav2*. Die interne

Amplifikationskontrolle wird bei diesem Verfahren in einem vorgeschalteten PCR-Lauf synthetisiert, wobei das kommerziell erhältliche Plasmid pUC19 (M11662, Fa. Promega) verwendet wird. Die verwendeten Primer sind an ihrem 3'-Ende komplementär zum Plasmid pUC19 und das 5'-Ende ist passend zu dem Insertionselement F57 der Real-Time PCR. Die Real-Time PCR nach Schönenbrücher *et al.* (2008) weist eine hohe Sensitivität und Spezifität auf. Die Nachweiswahrscheinlichkeit von 100 % liegt bei 0,1 Pico-Gramm MAP-DNS pro PCR-Lauf.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Arbeitskonzept

Ziel der Dissertation war die Entwicklung und Validierung einer fluoreszenzmikroskopischen Färbemethode zum Schnelldachweis lebensfähiger *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP)-Zellen in Milch und Säuglingsanfangsnahrung. Hierfür wurden zunächst Vorversuche zur Entwicklung/Optimierung der eingesetzten fluoreszenzmikroskopischen Färbemethoden durchgeführt. Dabei standen die Ermittlung der optimalen Farbstoffkonzentration sowie eine Vorbehandlung der Milch zur Reduzierung der unspezifischen Hintergrundfluoreszenz durch Milchbestandteile im Vordergrund.

Im Anschluss folgten unterschiedliche Einmischversuche (s. Tab. 6), um MAP vergleichend mit verschiedenen Methoden in unterschiedlichen Matrices nachzuweisen. Zum Einsatz kamen dabei die entwickelte CTC- und Auramin Orange-Färbung, die kulturelle Anzucht (Gold-Standard), der sehr sensitive FASTPlaqueTB™ (FPTB)-Assay sowie eine weitere, kommerziell erhältliche fluoreszenzmikroskopische Färbemethode (BacLight™-Färbung). Der genaue Versuchsaufbau für die Hauptversuche ist im Anhang unter 9.2, Abb. 15–18 dargestellt.

Nachdem die Methoden etabliert und die jeweiligen Nachweisgrenzen bestimmt waren, wurde ein repräsentatives Spektrum von Säuglingsanfangsnahrung aus dem deutschen Handel auf das Vorkommen lebensfähiger MAP-Zellen untersucht. Hierbei kamen der FPTB-Assay und die kulturelle Anzucht zum Einsatz. Auf die fluoreszenzmikroskopischen Färbemethoden wurde verzichtet, da für diese Fragestellung die Nachweisgrenze zu hoch lag.

Tab. 6: Arbeitskonzept zu den Einmischversuchen: verwendete Matrices und Methoden zum Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP)

Einmischversuche	Nachweismethoden			
	CTC- und Auramin Orange-Färbung	BacLight™-Färbung	Kulturelle Anzucht	FPTB-Assay mit Real-Time PCR
Ohne Milch in FPTB-Medium Plus	X	X	X	X
In H-Milch (3,5 % Fett)	X	X	X	X
In Rohmilch	X		X	X
In Säuglingsanfangsnahrung			X	X

3.2 Labormaterialien

a) Allgemeine Laborausstattung:

- Abfüllgerät für Nährmedien (Petrischalen), Typ Tecnomat 125, Fa. Integra Bioscience
- Abfüllgerät für Flüssignährmedien, IQ 2000 Peristaltic Dispenser, Fa. Zinsser Analytic
- Analyse- und Präzisionswaage, Typ BP 41005, Fa. Satorius
- Automatischer Nährmediensterilisator und Tischautoklav, Typ Agarclav 5/10, Fa. Integra Bioscience
- Becherglas 100 ml, Fa. Simax
- Brutschrank (+ 37° C) Typ BVM 50, Fa. Memmert GmbH und CoKG
- Bunsenbrenner, Typ Gasi 3.340102, Fa. Schütt Labortechnik
- Dampfsterilisator, Typ H+P 500EV, Fa. Varioklav
- Diamantschreiber
- Eppendorfgefäß 1,5 ml SafeSeal, Fa. Sarstedt AG & Co.
- Falcon-Röhrchen 15 ml und 50 ml, Fa. Sarstedt
- Färbebank mit Abzugseinrichtung, Fa. Weseman
- Feinwaage, Typ BA 210 S – OD1/MCBB 100, Fa. Satorius
- Fluoreszenzmikroskop Axiostar plus, Carl Zeiss AG
- Glasfläschchen mit Schraubverschluss (25 ml)
- Glasflaschen Duran Schott (100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml), Fa. VWR International
- Immersionsöl Immersol™ 518 F, Carl Zeiss AG
- Kästen für Micro-Objekträger 100 PL, Fa. VWR International
- Kühltzentrifuge, Typ Multifuge 1 S-R, Fa. Heraeus Instruments
- Lichtmikroskop, Typ KF 2, Carl Zeiss AG
- Magnetrührer IKA-Combimag RCH
- Messpipetten aus Glas (1 ml und 10 ml), Fa. VWR International
- Messzylinder aus Glas (100 ml, 1000 ml), Fa. Duran Group GmbH
- Metallspatel
- Objektträger Marienfeld, Fa. Paul Marienfeld GmbH & Co.KG
- Parafilm PM-996, Fa. Menasta
- Petrischalen mit und ohne Nocken, Fa. Nerbe plus
- Pipettierhilfe Pipetus-Akku, Fa. VWR International
- Pipettenspitzen gestopft (10 µl, 100 µl), Fa. Nerbe Plus
- Pipettenspitzen gestopft, (1250 µl) extra long, Fa. Sarstedt
- Pipetten, Typ Research®, Varipip® (100-1000 µl, 10-100 µl, 0,5-10 µl), Fa. Eppendorf
- Platinösen, Volumen 0,5 µl, Fa. VWR International
- Reagenzglasschüttler, Typ 7-2020, Fa. neoLab

- Reagenzglasschüttler Vortex Genie 2, Model G-560 E, Fa. Scientific Industries Inc.
- Schüttelinkubator, Typ 3033, Fa. GFL (Gesellschaft für Labortechnik)
- Sicherheitsbrenner Schütt flammy L, Fa. Schütt Labortechnik GmbH
- Sicherheitswerkbank, Hera Safe KS 12, Fa. Kendro
- SiLibeads® Keramikkügelchen Typ ZY (1,4 – 1,6 mm), Fa. Sigmund Lindner
- Spectrophotometer Hitachi U-2000 Double-Beam UV/Vis
- Spritzen, 20 ml single use, Henry Schein Inc., Fa. VWR International
- Ständer für Kulturröhrchen, Fa. Roth
- Tischzentrifuge, Typ 5415C, Fa. Eppendorf
- Viereck-Küvetten 10 x 10 x 45 mm, Fa. Sarstedt
- Zählkammer C-Chip „Neubauer improved“, Fa. Peqlab
- Zentrifuge Megafuge 1.0, Fa. Thermo Scientific

b) Molekularbiologischer Bedarf:

- Falcon-Röhrchen 15 ml, Fa. Sarstedt
- Pasteurpipetten gestopft, Fa. VWR International
- PCR-Reaktionsgefäßständer, Fa. Eppendorf
- Pipetten, Typ Research®, Varipip® (100-1000 µl, 10-100 µl, 0,5-10 µl), Fa. Eppendorf
- Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl), Fa. Nerbe Plus
- Pipettenspitzen, (1250 µl) extra long, Fa. Sarstedt
- Platinösen, Volumen 0,5 µl, Fa. VWR International
- Eppendorfgefäß 1,5 ml SafeSeal, Fa. Sarstedt AG & Co.
- Real-Time Cyclers, Typ ABI PRISM 7000 Sequence, Fa. Applied Biosystems
- Sammelgefäße (2 ml) ohne Deckel
- Thermomixer, Typ 5436, Fa. Eppendorf
- Tischzentrifuge, Typ 5415C, Fa. Eppendorf
- UV-Kabinett, Typ 825-UCV/22, Fa. Plas-Labs

3.3 Referenz- und Kontrollstämme

- ***Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* ATCC® BAA-968™** (interne Bezeichnung: K10):

Herkunft: Rinderkot

Quelle: American Type Culture Collection, Manassas (USA)

- ***Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* DSMZ-Nr. 44133** (interne Bezeichnung: J 27):

Herkunft: Rinderkot

Quelle: Friedrich-Löffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Jena

- ***Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* D 8168/02** (interne Bezeichnung: MAP 423):

Herkunft: Rinderkot

Quelle: Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz, Koblenz

- ***Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* Niebüll** (interne Bezeichnung: „Niebüll“):

Herkunft: Milch

Quelle: Max Rubner-Institut, Kiel

- ***Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* DSMZ-Nr. 44135** (interne Bezeichnung: MAP 44135):

Herkunft: Rinderkot

Quelle: Institut für Mikrobiologie, Zentrum für Infektionsmedizin, Hannover

Für die Einmischversuche in FPTB-Medium Plus, H-Milch, Rohmilch und als Positivkontrolle wurden die Stämme ATCC® BAA-968™, DSMZ-Nr. 44133, D8168/02 und „Niebüll“ eingesetzt.

Die artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung erfolgte mit den Stämmen

ATCC® BAA-968™, DSMZ-Nr. 44135, D 8168/02 und „Niebüll“.

3.4 Milch und Säuglingsanfangsnahrung bei den Einmischversuchen

a) H-Milch

H-Milch aus dem Handel (von einer Charge), pasteurisiert, homogenisiert, Fettgehalt: 3,5 %.

b) Rohmilch

Die Rohmilch wurde von der Klinik für Wiederkäuer und Schweine der Justus-Liebig-Universität in Gießen zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um Milch von jeweils drei Paratuberkulose-unverdächtigen Kühen, die nicht antibiotisch vorbehandelt waren. Die Milch dieser drei Kühe wurde am Morgen des Versuchstags gemolken, gepoolt und in sterile 1,0 l Glasflaschen abgefüllt. Die Verarbeitung erfolgte innerhalb von max. einer Stunde, bei Kühlung von 4° C. Die Milch wurde mittels Real-Time PCR nach Schönenbrücher et. al. (2008) auf das Nicht-Vorhandensein von MAP-Zellen überprüft.

c) Säuglingsanfangsnahrung

Für die Einmischversuche wurde Säuglingsanfangsnahrung vom Typ „Pre“ aus dem Supermarkt verwendet. Die Marke und der Hersteller, die für alle acht Einmischversuche gleich waren, wurden im Vorfeld nach dem Zufallsprinzip ausgewählt.

Für die Hauptuntersuchung einer repräsentativen Anzahl von Säuglingsanfangsnahrung aus dem Handel wurden insgesamt 16 Produkte vom Typ „Pre“ und Typ „HA Pre“ bezogen. Die Mehrzahl der Produkte wurde von den Herstellern kostenlos zur Untersuchung zur Verfügung gestellt, die restlichen Produkte wurden zugekauft.

3.5 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau zum Nachweis von MAP-Zellen in FPTB-Medium Plus, H-Milch, Rohmilch und Säuglingsanfangsnahrung ist schematisch im Anhang (Nr. 9.2, Abb. 15–18) dargestellt.

3.5.1 Anzucht der MAP-Referenzstämme

Reagenzien und Chemikalien:

- BD Difco™ Middlebrook 7H9-Bouillon, Fa. Becton Dickinson, Herstellung in der institutseigenen Nährbodenküche, s. Anhang Nr. 9.1.3
 - Supplemente: BBL™ MGIT™ OADC-Supplement, Fa. Becton Dickinson
Mycobactin J-Supplement, Fa. Allied Monitor
Glycerin 85 % zur Analyse, Fa. Merck
- Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium mit Mykobaktin J (HEYM), Fa. Becton Dickinson, s. Anhang Nr. 9.1.1

Die kulturelle Anzucht der Stämme erfolgte in 10 ml Middlebrook 7H9-Flüssigmedium, das 10 % OADC Supplement, 2 µg/ml Mykobaktin J und 2,5 % Glycerin enthielt. Um die für MAP typische Klumpenbildung im Medium zu vermeiden, wurden 10–15 sterile Keramikkügelchen (SiLibeads®) pro Fläschchen zugegeben. Die Stämme wurden vier bis sechs Wochen bis zur stationären Phase in einem Schüttelinkubator bei 37° C kultiviert. Auf die Zugabe von Tween 80 (ein grenzflächenaktives Tensid, das die MAP-Klumpenbildung reduzieren soll) wurde verzichtet, weil bekannt ist, dass Tween 80 die Adsorption der Phagen beim FPTB-Assay hemmt (Foddai *et al.*, 2009). Außerdem wurden alle Stämme auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium (HEYM) mit Zusatz von Mykobaktin J, Amphotericin B, Nalidixinsäure und Vancomycin bei 37° C angezüchtet. Dazu wurde eine Kolonie von HEYM in 100 µl Natriumchlorid-Lösung eingerieben, auf ein HEY-Medium pipettiert und durch Schwenken des Röhrchens gleichmäßig auf dem Nährmedium verteilt. Die beimpften Medien wurden bei 37° C für die Dauer von 16 Wochen

bebrütet. Dabei wurden sie zunächst in Schräglage bei locker aufgesetztem Deckel inkubiert, bis sich keine Flüssigkeit mehr in den Röhrchen befand (circa eine Woche). Für die restlichen Wochen wurden die Röhrchen in senkrechter Position mit fest verschlossenem Deckel bebrütet. Alle HEYM wurden wöchentlich auf das Wachstum von MAP-Kolonien und auf Kontamination kontrolliert, in den ersten Wochen unter Zuhilfenahme einer Lupe. Kolonien von HEYM wurden, wenn erforderlich, zur erneuten Subkultivierung in Middlebrook 7H9-Flüssigmedium übertragen, indem jeweils ein bis drei Kolonien in das Flüssignährmedium eingerieben wurden.

3.5.2 Herstellung der MAP-Bakteriensuspension

Zur Herstellung der Bakteriensuspension wurde der jeweilige Prüfstamm nach Anzucht im Middlebrook 7H9-Flüssigmedium in ein 15 ml Falcon-Röhrchen pipettiert und 30 Minuten bei 900 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgekippt und das Pellet mit einer gestopften Pasteur-Pipette in 1 ml FPTB-Medium Plus (Biotec Laboratories Ltd.) resuspendiert. Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) konnte nicht zur Herstellung der Verdünnungsreihe eingesetzt werden, da sich in den Vorversuchen zeigte, dass PBS die Phagen hemmt. Die konzentrierte MAP-Suspension wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 6 sterilen Keramikkügelchen pipettiert. Durch dreimaliges zweiminütiges Vortexen wurde die Suspension gründlich durchmischt und damit die Aggregatbildung der MAP-Zellen minimiert. Anschließend wurde die optische Dichte (OD) mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 660 nm auf 10,00–10,30 % Transmission eingestellt. Erfahrungsgemäß liegt die Anzahl der MAP-Zellen dadurch bei circa 10^7 KBE/ml. Da dies nur ein ungefährender Richtwert ist, wurde die Anzahl der MAP-Zellen pro ml anschließend mittels Zählkammer überprüft. Dazu wurden 10 µl Bakteriensuspension aus der Verdünnungsstufe 10^{-2} im Doppelansatz in eine „Neubauer improved“-Zählkammer pipettiert und bei 40-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop gezählt. Das Zählgitter besteht bei der „Neubauer improved“-Zählkammer aus 9 Großquadraten von je 1 mm Kantenlänge und somit einer Fläche von je 1 mm^2 . Das zentrale Großquadrat ist bei der „Neubauer improved“-Zählkammer in 5 x 5 kleinere Gruppenquadrate mit je 0,2 mm Kantenlänge unterteilt. Die Fläche eines solchen Gruppenquadrats beträgt somit $0,04 \text{ mm}^2$. Bei der „Neubauer improved“-Zählkammer werden die Gruppenquadrate von dreifachen Begrenzungslinien umgeben. Die Kammertiefe beträgt 0,1 mm. Die Anzahl Bakterien pro ml berechnet sich nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Bakterien}}{\text{ml}} = \Sigma \text{ Zellen in 16 Gruppenquadraten} \times 15,625 \times \text{Vorverdünnung} \times 1000$$

3.5.3 Herstellung der Verdünnungsreihe

Die eingestellte Bakteriensuspension wurde dezimal in FPTB-Medium Plus verdünnt. Dazu wurden je 18 ml FPTB-Medium Plus in sieben sterile 50 ml Falcon-Röhrchen vorgelegt. 2 ml der

eingestellten Bakteriensuspension wurden in das erste Falcon-Röhrchen pipettiert (Verdünnungsstufe 10^{-1}) und durch Vortexen gründlich durchmischt. Durch Überführen von 2 ml aus der jeweils vorangegangenen Verdünnungsstufe und anschließendem Vortexen wurden die weiteren Verdünnungsstufen entsprechend hergestellt.

3.5.4 Molekularbiologische Überprüfung der Verdünnungsreihe

Um die Verdünnungsstufen der dekadischen Verdünnungsreihe zu überprüfen, wurde die Triplex Real-Time PCR nach Schönenbrücher *et al.* (2008) eingesetzt. Die DNS-Isolierung aus der Verdünnungsreihe (1 ml aus jeder Verdünnungsstufe) erfolgte durch ein einheitliches DNS-Extraktionsverfahren mittels DNeasy® Blood & Tissue Mini Kit (Fa. Qiagen) nach dem modifizierten Protokoll für grampositive Bakterien. Dazu wurde je 1 ml Probe aus jeder Verdünnungsstufe in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß für zehn Minuten bei 5000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit einer Pasteurpipette abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde in 180 µl enzymatischem Lysispuffer für grampositive Bakterien (Rezept s. Anhang Nr. 9.1.4) resuspendiert. Im Anschluss wurden die Proben für mindestens 1,5 Stunden oder über Nacht bei 37° C im Thermomixer unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach der Zugabe von 25 µl Proteinase K (Fa. Roche) und 200 µl Puffer AL erfolgte die Inkubation unter leichtem Schütteln für 1,5–3 Stunden bei 56° C im Thermomixer. Anschließend wurden die Proben zur Inaktivierung evtl. nicht vollständig lysierter Mykobakterien 15 Minuten bei 95–96° C im Thermomixer leicht schüttelnd erhitzt. Dann wurde das halbe Volumen (200 µl) absoluten Ethanols (96–100 %, Fa. Carl Roth) hinzugefügt. Die gesamte Flüssigkeit wurde nun in eine QIAamp-Spinsäule (im Sammelgefäß) überführt und 1 Minute bei 6.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule in ein neues Sammelgefäß eingesetzt. Nach der Zugabe von 500 µl Puffer AW1 auf die Säule wurde der Zentrifugationsschritt wiederholt. Die Säule wurde erneut in ein frisches Sammelgefäß eingesetzt, anschließend wurden 500 µl Puffer AW2 auf die Säule gegeben. Die Proben wurden drei Minuten bei 15.800 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Zur vollständigen Entfernung von Restpuffer und zur Trocknung des Filters folgte der Einsatz der Säule in ein neues Sammelgefäß und die Zentrifugation bei 15.800 x g für eine Minute. Zur Elution wurde die Säule in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gesetzt, 100 µl AE-Puffer direkt auf den Filter der Säule pipettiert und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde eine Minute bei 6.000 x g zentrifugiert und die Säule verworfen.

Das aufgefangene Eluat mit der DNS wurde in die Real-Time PCR nach Schönenbrücher *et al.* (2008) eingesetzt. Nachgewiesen wurden die MAP-spezifischen Zielregionen F57 und ISMav2. Um falsch-negative Ergebnisse auszuschließen wurde eine interne Amplifikationskontrolle mitgeführt. Die resultierenden Ct-Werte (Threshold Cycle) wurden wie folgt ausgewertet: Signalkurven, die unterhalb des Schwellenwertes lagen, wurden negativ gewertet. Sigmoide Signalkurven, die den Schwellenwert überschritten und deren Ct-Wert ≤ 38 war wurden als positiv

gewertet. Wurde der Ct-Wert von 38 überschritten, wurden die Signale als negatives Ergebnis gewertet. Generell wurde der PCR-Lauf nur ausgewertet, wenn die Signale der Positivkontrolle und der Aufbereitungskontrolle positiv waren und die Negativkontrolle, der Leerwert des Mastermixes und der Aufbereitungsleerwert kein Signal erbrachten. Außerdem musste die IAK bei negativen Proben ein positives Signal erzielen.

3.5.5 Kontrolle der tatsächlichen Bakterienzahl in den Verdünnungsstufen

Die Zahl der MAP-Zellen in der Verdünnungsreihe wurde mittels kultureller Anzucht und kombinierter CTC- und Auramin Orange-Färbung überprüft. Die mittels kultureller Anzucht auf Middlebrook 7H10-Agarplatten bestimmte Anzahl der lebenden MAP-Zellen wurde für den jeweiligen Versuch als endgültige Einmischkonzentration angegeben.

a) Kulturelle Keimzahlbestimmung:

Zur kulturellen Keimzahlbestimmung wurden aus den Verdünnungsstufen 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} je 100 µl Bakteriensuspension im Dreifachansatz auf Middlebrook 7H10-Agarplatten (Herstellung in der institutseigenen Nährbodenküche, Rezept s. Anhang Nr. 9.1.2) ausgespatelt. Als Positivkontrolle wurden 100 µl aus der Verdünnungsstufe 10^{-1} ausgespatelt, als Negativkontrolle 100 µl FPTB-Medium Plus. Die beimpften Platten wurden mit Parafilm umwickelt und zehn Wochen bei 37° C bebrütet. Die Platten wurden wöchentlich auf MAP-Wachstum und Kontamination kontrolliert. Bei Bedarf wurde die Parafilm-Umwicklung erneuert. Nach der zehnwöchigen Bebrütung wurden die MAP-Kolonien gezählt und die Kolonie-bildenden Einheiten pro ml (KbE/ml) berechnet. Zur Dokumentation wurden alle Platten mit einer Digitalkamera (Canon Power Shot) fotografiert. Zur Berechnung wurden nur diejenigen Platten herangezogen, die 1-150 klar voneinander trennbare Kolonien aufwiesen. Außerdem musste mindestens eine Verdünnungsstufe vorhanden sein, auf der zwischen 15 und 150 Kolonien vorhanden waren. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\bar{c} \cdot d \text{ mit } \bar{c} = \frac{\sum c}{n_1 \cdot 1 + n_2 \cdot 0,1}$$

$\bar{c}$: gewogenes (gewichtetes) arithmetisches Mittel

$\sum c$: Summe der Kolonien aller Platten, die zur Berechnung herangezogen wurden (niedrigste und nächst höhere auswertbare Verdünnungsstufe)

n_1 : Anzahl der Platten der niedrigsten Verdünnungsstufe

n_2 : Anzahl der Platten der nächst höheren Verdünnungsstufe

d: Faktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe (d.h. auf n_1 bezogene Verdünnungsstufe)

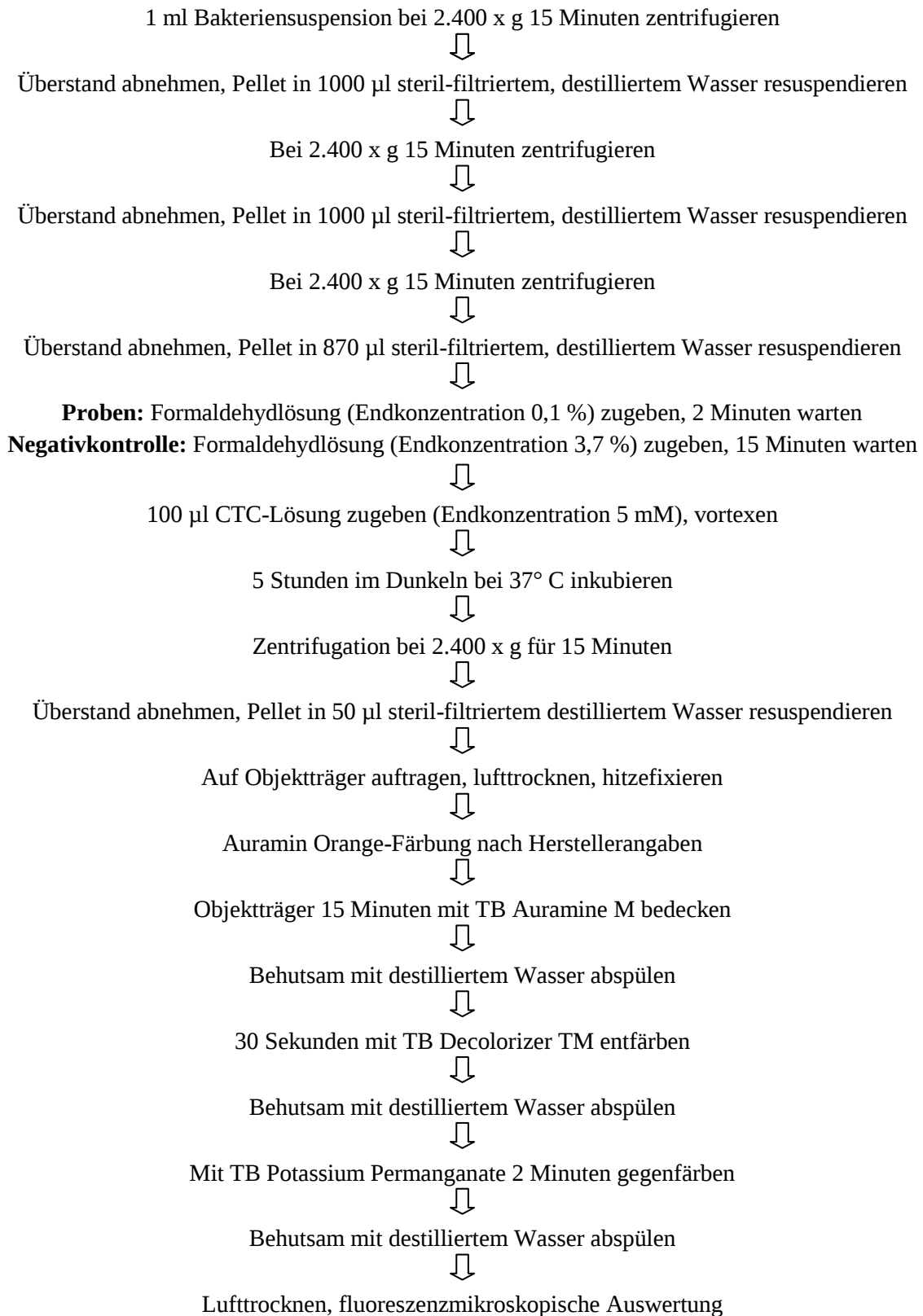
b) CTC- mit anschließender Auramin Orange-Färbung:

Reagenzien und Chemikalien:

- CTC (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
- TB Fluorescent Stain Kit M, Fa. Becton Dickinson (Zusammensetzung pro 1 l)
 - TB Auramine M:
 - 2,0 g Auramin Orange
 - 4,0 g Phenol, USP
 - 100 ml Glycerin, USP
 - 250 ml Isopropanol
 - 650 ml destilliertes Wasser
 - TB Decolorizer TM:
 - 5,0 ml Salzsäure
 - 700 ml Isopropanol
 - 300 ml destilliertes Wasser
 - TB Potassium Permanganate:
 - 5,0 g Kaliumpermanganat
 - 1000 ml destilliertes Wasser
- Formaldehydlösung (Fa. Roth)

Die 50 mM CTC-Stammlösung wurde am Versuchstag frisch angesetzt. Dazu wurde zunächst destilliertes Wasser durch einen 0,2 µm Filter (Whatman FP 30/0,2 CA-S, Fa. VWR International) steril-filtriert. Die benötigte Menge CTC-Farbstoff wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß eingewogen und mit der entsprechenden Menge steril-filtriertem, destilliertem Wasser resuspendiert. Bis zur Verwendung wurde die CTC-Färbelösung dunkel gelagert. Die genauen Arbeitsschritte sind im Fließdiagramm 1 dargestellt.

Fließdiagramm 1: Untersuchungsgang zum Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in artifiziell kontaminiertem FASTPlaqueTB (FPTB)-Medium Plus mittels 5-Cyano-2,3-di-(p-tolyl)-Tetrazolium Chlorid (CTC) und Auramin Orange (AO)-Färbung



Für die kombinierte CTC-/AO-Färbung wurde jeweils 1 ml Bakteriensuspension aus den Verdünnungsstufen 10^{-2} und 10^{-3} im Doppelansatz entnommen und in ein 1,5 ml Eppendorfggefäß pipettiert. Als Negativkontrolle diente 1 ml Bakteriensuspension aus der Verdünnungsstufe 10^{-1} , wie bei Rodriguez *et al.* (1992) beschrieben. Die Arbeitsschritte bei dieser Kontrolle unterschieden sich etwas von denen der restlichen Proben, da bei der Negativkontrolle die Bakterien vor der Zugabe der Färbelösung mit Formaldehydlösung (Endkonzentration 3,7 %) abgetötet wurden, bevor nach 15 Minuten die CTC-Färbelösung zugegeben wurde. Die Proben der Verdünnungsreihe sowie die Negativkontrolle wurden 15 Minuten bei $2.400 \times g$ zentrifugiert, der Überstand mit einer Eppendorfpipette abgenommen und das Pellet in 1 ml steril-filtrierte, destilliertem Wasser resuspendiert. Die Proben wurden erneut 15 Minuten bei $2.400 \times g$ zentrifugiert, der Überstand mit einer Eppendorfpipette abgenommen und das Pellet in $1000 \mu\text{l}$ steril-filtrierte, destilliertem Wasser resuspendiert. Nun wurden die Proben wiederum 15 Minuten bei $2.400 \times g$ zentrifugiert, der Überstand mit einer Eppendorfpipette abgenommen und das Pellet in $870 \mu\text{l}$ steril-filtrierte, destilliertem Wasser resuspendiert. Bei den Proben aus der Verdünnungsreihe wurden jeweils Formaldehydlösung mit einer Endkonzentration von 0,1 % und nach zwei Minuten Wartezeit $100 \mu\text{l}$ CTC-Färbelösung (Endkonzentration 5 mM) zugegeben. Dann wurde alles durch Vortexen gut durchmischt. Die Zugabe von Formaldehyd diente zur Verstärkung der Atmungsaktivität („Stress“), wodurch eine bessere Bildqualität durch intensivere Fluoreszenz beim Mikroskopieren erreicht wurde. Bei der Negativkontrolle wurden die Bakterien zunächst durch die Zugabe von Formaldehydlösung (Endkonzentration 3,7 %) abgetötet, erst nach 15 Minuten wurden $100 \mu\text{l}$ CTC-Färbelösung (Endkonzentration 5 mM) zugegeben und alles durch Vortexen gut durchmischt. Alle Proben wurden im Anschluss fünf Stunden bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Nach dem Ende der Inkubationszeit wurden die Proben 15 Minuten bei $2.400 \times g$ zentrifugiert und der Überstand mit einer Eppendorfpipette abgenommen. Das Pellet wurde in $50 \mu\text{l}$ steril-filtrierte, destilliertem Wasser resuspendiert und mit einer Eppendorfpipette auf eine definierte 1 cm^2 große Fläche auf einen Objektträger ausgebracht. Nach der circa zweistündigen Lufttrocknung im Dunkeln wurden die Objektträger zum Hitzefixieren dreimal durch die Flamme eines Bunsenbrenners gezogen.

Bei der sich anschließenden Auramin Orange-Färbung (TB Fluorescent Stain Kit M) wurden die Objektträger auf einen Färbeständer gelegt und nach Herstellerangabe angefärbt. Alle Objektträger wurden 15 Minuten mit TB Auramine M getränkt, danach behutsam mit destilliertem Wasser abgespült und 30 s mit TB Decolorizer TM entfärbt. Anschließend wurden die Objektträger behutsam mit destilliertem Wasser abgespült und mit TB Potassium Permanganate zwei Minuten gegengefärbt. Zuletzt wurden die Objektträger behutsam mit destilliertem Wasser abgespült und an der Luft getrocknet.

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung erfolgte am Mikroskop Axiostar plus (Carl Zeiss AG), das mit den Filtersätzen 44 für die CTC-Färbung und 15 für die AO-Färbung (s. Tab. 7)

ausgestattet war. Diese Filter sind optimal für die BacLight-Färbung und Filter Nr. 44 ist dem Filter ähnlich, der von Boulos *et al.* (1999) für die CTC-Färbung genutzt wurde. Für die CTC-/AO-Färbung gibt es zwar bessere Filter, aber diese wurden aus Kostengründen nicht eingesetzt, da die Auswertung mit den zur Verfügung stehenden Filtern möglich war.

Tab. 7: Eigenschaften der verwendeten Filtersätze

Filtersatz Nr.	Anregungswellenlänge	Strahlteiler	Emissionswellenlänge
15	546 nm	580 nm	590 nm
44	475 nm	500 nm	530 nm

Die Anzahl der Bakterien wurde durch Auszählung von zehn zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern bei 100-facher Vergrößerung unter Verwendung von wenig fluoreszierendem Immersionsöl (Immersol™ 518 F, Carl Zeiss AG) bestimmt. Die zehn Gesichtsfelder für die CTC-Färbung waren dabei identisch mit denen, die für die AO-Färbung gezählt wurden, nur dass jeweils ein anderer Filter zum Einsatz kam. Die Anzahl der Bakterien pro ml wurde gemäß der bei Boulos *et al.* (1999) beschriebenen Formel berechnet:

$$T = N \times \frac{A}{a} \div V$$

T: Anzahl der Bakterien pro ml

N: Mittelwert der gezählten Bakterien in den 10 Gesichtsfeldern

A: Fläche [mm²], auf die die Bakterien ausgestrichen wurden

a: Gesichtsfeld des Mikroskops [mm²]

V: Volumen der Probe in ml

Die Auswertung erfolgte am nächsten Tag, spätestens aber innerhalb von 3 Tagen. Da das Mikroskopieren immer mehrere Stunden in Anspruch nahm, wurde darauf geachtet, jede halbe Stunde fünf Minuten Pause und nach einer Stunde 15 Minuten Pause einzulegen, um persönliche Fehler durch Ermüdung der Augen möglichst auszuschließen. Alle Objektträger wurden im Dunkeln bei Raumtemperatur in Objektträgerkästen gelagert. Nach erfolgter Auswertung wurden zur Dokumentation mit einer direkt auf dem Fluoreszenzmikroskop installierten Digitalkamera (Canon Power Shot A 640) digitale Aufnahmen der Bakterien bei 1000-facher Vergrößerung angefertigt. Die Datensicherung erfolgte über ein angeschlossenes Laptop.

3.5.6 Artifizelle Kontamination von Milch und Säuglingsanfangsnahrung

Die Säuglingsanfangsnahrung wurde nach Herstellerangaben frisch mit destilliertem Wasser rekonstituiert. 1 ml Bakteriensuspension aus den benötigten Verdünnungsstufen (s. Tab. 8) wurde jeweils mit 9 ml Milch (H-Milch oder Rohmilch) bzw. Säuglingsanfangsnahrung in einem sterilen 15 ml Falcon-Röhrchen gemischt und 30 Minuten unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Proben 15 Minuten bei 2.400 x g zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Das Pellet wurde in FPTB-Medium Plus resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt.

Die Milch und die Säuglingsanfangsnahrung wurden immer molekularbiologisch auf das Nicht-Vorhandensein von MAP-Zellen getestet. Dazu wurden native Milch bzw. Säuglingsanfangsnahrung (Dreifachansatz) mittels Triplex PCR nach Schönenbrücher *et al.* (2008) untersucht. Als Positivkontrolle diente Milch bzw. Säuglingsanfangsnahrung gespikt mit der Verdünnungsstufe 10^{-1} .

Tab. 8: Einbezogene Verdünnungsstufen (VST) bei den verschiedenen Nachweismethoden

	VST 10^{-2}	VST 10^{-3}	VST 10^{-4}	VST 10^{-5}	VST 10^{-6}	VST 10^{-7}
CTC-/AO-Färbung, Doppelansatz	X	X	X	X		
BacLight™-Färbung, Doppelansatz	X	X	X	X		
Kultur (MB 7H10), Dreifachansatz → Kontrolle der Verdünnungsreihe				X	X	X
Kultur (MB 7H10), Doppelansatz → Einmischversuche in FPTB-Medium Plus			X	X	X	X
Kultur (MB 7H10), Doppelansatz → Einmischversuche in H-Milch			X	X	X	X
Kultur (HEYM), Doppelansatz → Einmischversuche in Rohmilch/Säuglingsanfangsnahrung		X	X	X	X	
FPTB-Assay, Doppelansatz		X*	X	X	X	X

* Einfachansatz

3.5.7 CTC- und Auramin Orange-Färbung

Reagenzien und Chemikalien:

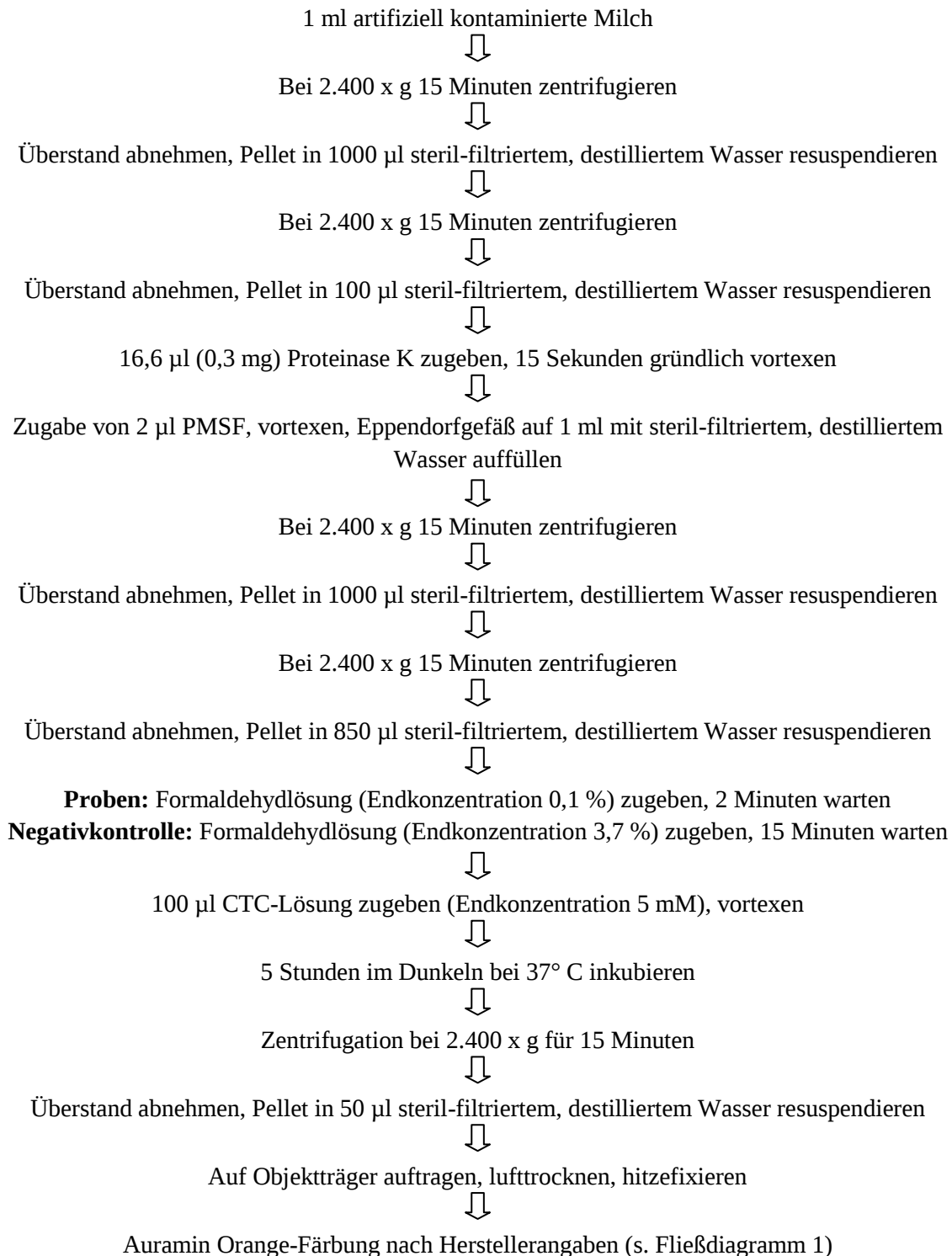
- CTC (Sigma-Aldrich Chemie GmbH und CTC 80 %, Synchem OHG)
- TB Fluorescent Stain Kit M, Fa. Becton Dickinson (Zusammensetzung pro 1 l)
 - TB Auramine M:
 - 2,0 g Auramin Orange
 - 4,0 g Phenol, USP
 - 100 ml Glycerin, USP
 - 250 ml Isopropanol
 - 650 ml destilliertes Wasser
 - TB Decolorizer TM:
 - 5,0 ml Salzsäure
 - 700 ml Isopropanol
 - 300 ml destilliertes Wasser
 - TB Potassium Permanganate:
 - 5,0 g Kaliumpermanganat
 - 1000 ml destilliertes Wasser
- Proteinase K (Fa. Roche)
- Phenylmethylsulfonylfluorid (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
- Formaldehydlösung (Fa. Roth)

Die CTC-Stammlösung wurde, wie unter 3.5.5 b) beschrieben, am Versuchstag frisch angesetzt (Konzentration 50 mM). Die CTC-Färbung unterscheidet sich leicht von der unter 3.5.5 b) für die Verdünnungsreihe beschriebene CTC-Färbung, da die Milch nach mehreren Waschschritten zunächst mit Proteinase K vorbehandelt werden musste, um die durch Milchproteine hervorgerufene unspezifische Hintergrundfluoreszenz zu minimieren. Die genauen Arbeitsschritte sind im Fließdiagramm 2 dargestellt.

Als Negativkontrolle diente Milch, gespikt mit der Verdünnungsstufe 10^{-1} , bei der die Bakterien vor der Zugabe der Färbelösung mit Formaldehydlösung abgetötet wurden. Die Arbeitsschritte bei dieser Kontrolle unterschieden sich etwas von denen der restlichen Proben, da bei der Negativkontrolle die Bakterien vor der Zugabe der Färbelösung mit Formaldehydlösung (Endkonzentration 3,7 %) abgetötet wurden, bevor nach 15 Minuten die CTC-Färbelösung zugegeben wurde. Die artifiziell kontaminierte Milch der Verdünnungsstufen 10^{-2} bis 10^{-5} (jeweils Doppelansatz) sowie die Negativkontrolle wurden 15 Minuten bei $2.400 \times g$ zentrifugiert, der Überstand mit einer Eppendorfpipette abgenommen und das Pellet in 1 ml steril-filtrierte, destilliertem Wasser resuspendiert. Anschließend wurden alle Proben erneut 15 Minuten bei $2.400 \times g$ zentrifugiert, der Überstand mit einer Eppendorfpipette abgenommen und das Pellet in 100 μ l steril-filtrierte, destilliertem Wasser resuspendiert. Nun wurden 16,6 μ l (0,3 mg) Proteinase K zugegeben, 15 Sekunden gründlich gevortext, die Proteinase K durch Zugabe von 2 μ l

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) abgestoppt und die Eppendorfgefäße auf 1 ml mit steril-filtrierte, destilliertem Wasser aufgefüllt. Die Proteinase K-Behandlung wurde nacheinander immer für zwei Proben durchgeführt, um die Zeiten einhalten zu können. Alle Proben wurden 15 Minuten bei 2.400 x g zentrifugiert, der Überstand mit einer Eppendorfpipette abgenommen und das Pellet in 1000 µl steril-filtrierte, destilliertem Wasser resuspendiert. Die Proben wurden erneut 15 Minuten bei 2.400 x g zentrifugiert, der Überstand mit einer Eppendorfpipette abgenommen und das Pellet in 850 µl steril-filtrierte, destilliertem Wasser resuspendiert. Anschließend wurden, außer bei der Negativkontrolle, jeweils 0,1 % Endkonzentration Formaldehydlösung und zwei Minuten später 100 µl CTC-Färbelösung zugegeben (Endkonzentration 5 mM) und alles durch Vortexen gut durchmischt. Bei der Negativkontrolle wurden die Bakterien zunächst durch die Zugabe von Formaldehydlösung (Endkonzentration 3,7 %) abgetötet und erst nach 15 Minuten wurden 100 µl CTC-Färbelösung (Endkonzentration 5 mM) zugegeben. Alle Proben wurden im Anschluss fünf Stunden bei 37° C im Dunkeln inkubiert. Nach dem Ende der Inkubationszeit wurden die Proben 15 Minuten bei 2.400 x g zentrifugiert und der Überstand mit einer Eppendorfpipette abgenommen. Das Pellet wurde in 50 µl steril-filtrierte, destilliertem Wasser resuspendiert und mit einer Eppendorfpipette auf eine definierte 1 cm² große Fläche auf einen Objektträger ausgestrichen. Nach der circa zweistündigen Lufttrocknung im Dunkeln wurden die Objektträger zum Hitzefixieren dreimal durch die Flamme eines Bunsenbrenners gezogen. Bei der sich anschließenden Auramin Orange-Färbung (TB Fluorescent Stain Kit M) wurden die Objektträger auf einen Färbeständer gelegt und nach Herstellerangabe angefärbt [s. 3.5.5 b)].

Fließdiagramm 2: Untersuchungsgang zum Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in artifiziell kontaminierter Milch (H-Milch, Rohmilch) mittels 5-Cyano-2,3-di-(p-tolyl)-Tetrazolium Chlorid (CTC) und Auramin Orange (AO)-Färbung



3.5.8 BacLight™-Färbung

Reagenzien und Chemikalien:

- LIVE/DEAD® BacLight Bacterial Viability Kit, L7012, Fa. Invitrogen GmbH
 - Syto® 9 (3,34 mM), 300 µl Lösung in DMSO
 - Propidiumiodid (20 mM), 300 µl Lösung in DMSO

Die BacLight™-Färbung wurde nur mit artifiziell kontaminiertem FPTB-Medium Plus und mit artifiziell kontaminierter H-Milch durchgeführt. Auf die Anfärbung von Rohmilch musste verzichtet werden, da die BacLight™-Färbung nicht spezifisch für Mykobakterien ist und somit alle in der Milch vorhandenen Bakterien angefärbt werden würden, was eine Auswertung unmöglich machte.

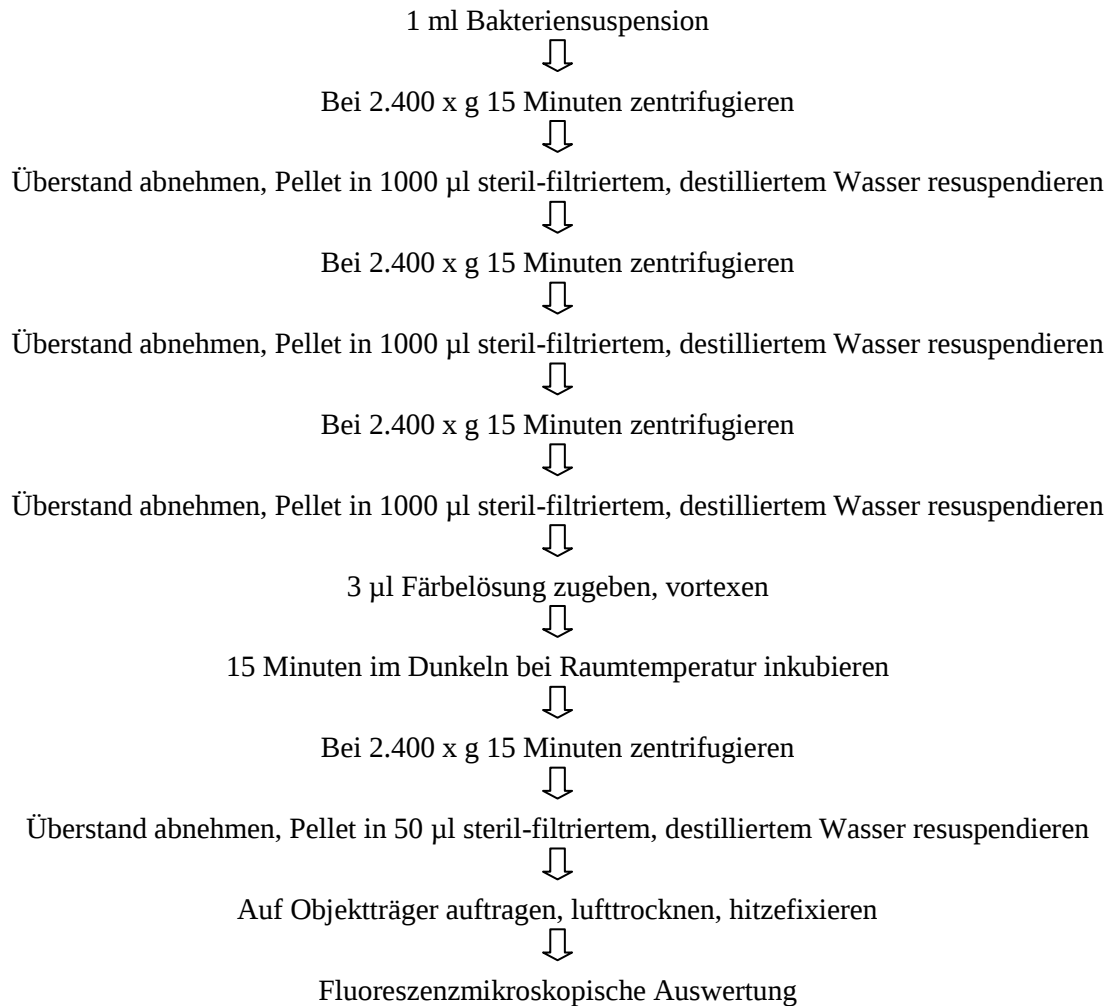
Die BacLight™-Färbelösung wurde nach Herstellerangaben am Versuchstag frisch angesetzt. Die benötigte Menge Syto® 9 und Propidiumiodid wurde im Verhältnis 1:1 gemischt und bis zur Verwendung dunkel gelagert.

a) Artifiziell kontaminiertes FPTB-Medium Plus:

Für die BacLight™-Färbung wurde jeweils 1 ml Bakteriensuspension aus den Verdünnungsstufen 10^{-2} bis 10^{-5} im Doppelansatz entnommen und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert. Die genauen Arbeitsschritte sind im Fließdiagramm 3 dargestellt. Alle Proben wurden 15 Minuten bei 2.400 x g zentrifugiert, der Überstand mit einer Eppendorfpipette abgenommen und das Pellet in 1 ml steril-filtrierte destilliertem Wasser resuspendiert. Die Proben wurden erneut 15 Minuten bei 2.400 x g zentrifugiert, der Überstand mit einer Eppendorfpipette abgenommen und das Pellet in 1000 µl steril-filtrierte destilliertem Wasser resuspendiert. Nun wurden die Proben wiederum 15 Minuten bei 2.400 x g zentrifugiert, der Überstand mit einer Eppendorfpipette abgenommen und das Pellet in 1000 µl steril-filtrierte destilliertem Wasser resuspendiert. Anschließend wurde je 3 µl BacLight™-Färbelösung zugegeben, durch Vortexen gut durchmischt und die Proben 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Ende der Inkubationszeit wurden die Proben 15 Minuten bei 2.400 x g zentrifugiert und der Überstand mit einer Eppendorfpipette abgenommen. Das Pellet wurde in 50 µl steril-filtrierte destilliertem Wasser resuspendiert und mit einer Eppendorfpipette auf eine definierte 1 cm² große Fläche auf einen Objektträger ausgebracht. Nach der circa zweistündigen Lufttrocknung im Dunkeln wurden die Objektträger zum Hitzefixieren dreimal durch die Flamme eines Bunsenbrenners gezogen.

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung erfolgte am Mikroskop AxioStar plus wie unter 3.5.5 b) beschrieben.

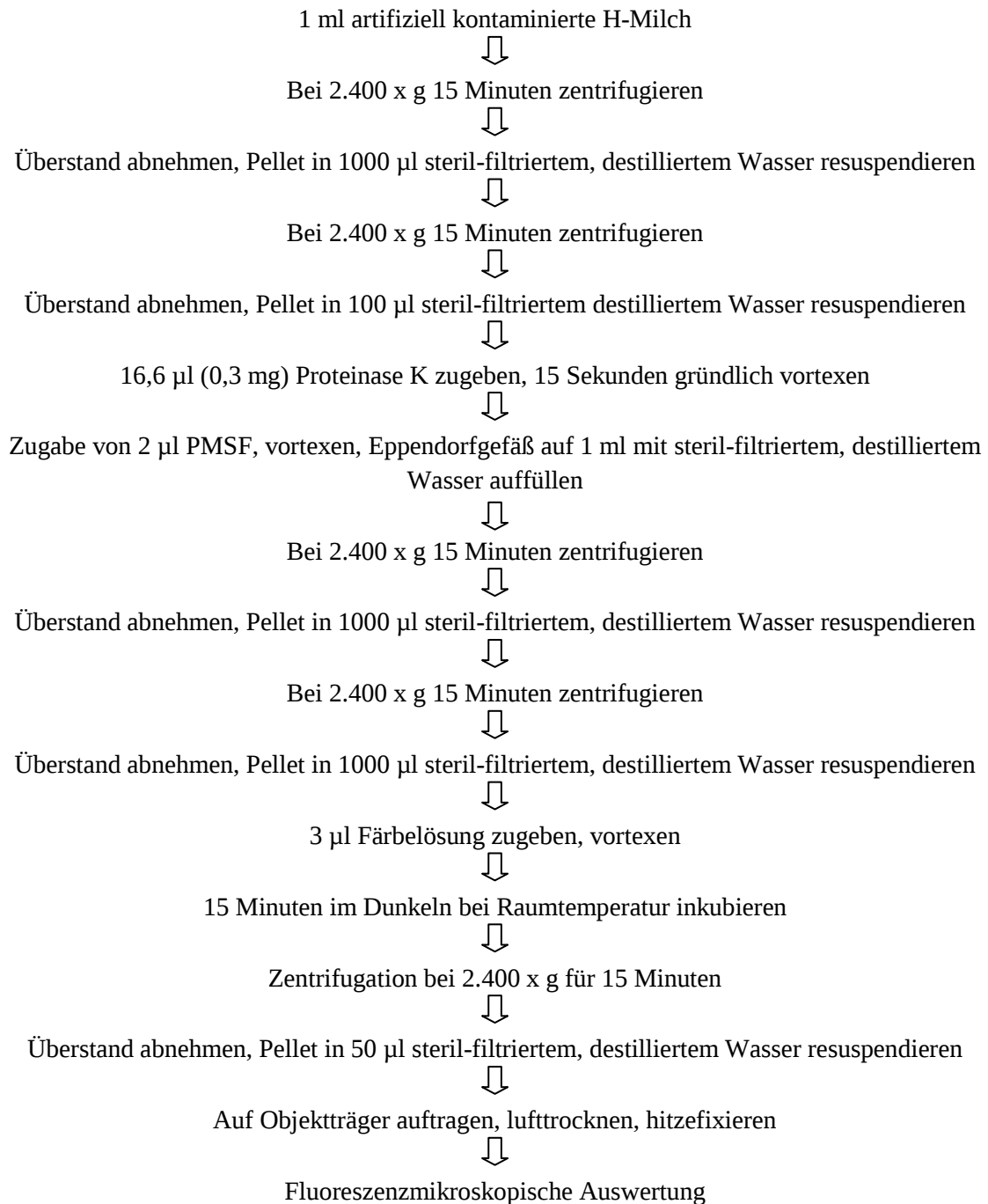
Fließdiagramm 3: Untersuchungsgang zum Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in artifiziell kontaminiertem FASTPlaqueTB (FPTB)-Medium Plus mittels BacLight™-Färbung



b) Artifizuell kontaminierte H-Milch:

Die *BacLight*TM-Färbung für artifizuell kontaminierte H-Milch unterscheidet sich leicht von der unter 3.5.8 a) für artifizuell kontaminiertes FPTB-Medium Plus beschriebenen Färbung, da die Milch nach mehreren Waschschritten zunächst mit Proteinase K vorbehandelt werden musste, um die durch Milchproteine hervorgerufene unspezifische Hintergrundfluoreszenz zu minimieren. Die genauen Arbeitsschritte sind im Fließdiagramm 4 dargestellt. Artifizuell kontaminierte Milch der Verdünnungsstufen 10^{-2} bis 10^{-5} (jeweils Doppelansatz) wurde 15 Minuten bei $2.400 \times g$ zentrifugiert, der Überstand mit einer Eppendorfpipette abgenommen und das Pellet in 1 ml steril-filtrierte, destilliertem Wasser resuspendiert. Anschließend wurden die Proben erneut 15 Minuten bei $2.400 \times g$ zentrifugiert, der Überstand mit einer Eppendorfpipette abgenommen und das Pellet in 100 µl steril-filtrierte, destilliertem Wasser resuspendiert. Nun wurden 16,6 µl (0,3 mg) Proteinase K zugegeben, 15 Sekunden lang gründlich gevortext, die Proteinase K durch Zugabe von 2 µl Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) abgestoppt und die Eppendorfgefäße auf 1 ml mit steril-filtrierte, destilliertem Wasser aufgefüllt. Die Proteinase K-Behandlung wurde nacheinander immer für zwei Proben durchgeführt, um die Zeiten einhalten zu können. Alle Proben wurden 15 Minuten bei $2.400 \times g$ zentrifugiert, der Überstand mit einer Eppendorfpipette abgenommen und das Pellet in 1000 µl steril-filtrierte, destilliertem Wasser resuspendiert. Die Proben wurden erneut 15 Minuten bei $2.400 \times g$ zentrifugiert, der Überstand mit einer Eppendorfpipette abgenommen und das Pellet in 1000 µl steril-filtrierte, destilliertem Wasser resuspendiert. Anschließend wurde je 3 µl *BacLight*TM-Färbelösung zugegeben und alles durch Vortexen gut durchmischt. Die Proben wurden im Anschluss 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach dem Ende der Inkubationszeit wurden die Proben 15 Minuten bei $2.400 \times g$ zentrifugiert und der Überstand mit einer Eppendorfpipette abgenommen. Das Pellet wurde in 50 µl steril-filtrierte, destilliertem Wasser resuspendiert und mit einer Eppendorfpipette auf eine definierte 1 cm^2 große Fläche auf einen Objektträger ausgestrichen. Nach der circa zweistündigen Lufttrocknung im Dunkeln wurden die Objektträger zum Hitzefixieren dreimal durch die Flamme eines Bunsenbrenners gezogen. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung erfolgte am Mikroskop Axiostar plus wie unter 3.5.5 b) beschrieben.

Fließdiagramm 4: Untersuchungsgang zum Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in artifiziell kontaminierter H-Milch mittels BacLight™-Färbung



3.5.9 Kulturelle Anzucht

Reagenzien und Chemikalien:

- BD Difco™ Middlebrook 7H10-Agar, Fa. Becton Dickinson
 - Supplemente: BBL™ MGIT™ OADC-Supplement, Fa. Becton Dickinson
BBL™ MGIT™ PANTA™-Supplement, Fa. Becton Dickinson
Mycobactin J-Supplement, Fa. Allied Monitor
Glycerin 85 % zur Analyse, Fa. Merck
- Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium mit Mykobaktin J (HEYM), Fa. Becton Dickinson, s. Anhang Nr. 9.1.1
- N-Hexadecylpyridiniumchlorid (HPC), Fa. Merck

Bei den Versuchen ohne Milch und mit H-Milch erfolgte die kulturelle Anzucht aufgrund der besseren Auszählbarkeit im Spatelverfahren auf Middlebrook 7H10-Agarplatten. Bei den Versuchen mit Rohmilch und Säuglingsanfangsnahrung erfolgte die kulturelle Anzucht auf Herrold's-Egg-Yolk-Medium (HEYM), da der notwendige Dekontaminationsschritt zur Abtötung der unerwünschten Begleitflora die Anzucht auf einem eigelbhaltigen Nährmedium notwendig machte.

a) Middlebrook 7H10-Agar (FASTPlaqueTB (FPTB)-Medium Plus, H-Milch)

Die Middlebrook 7H10-Agarplatten wurden in der institutseigenen Nährbodenküche (s. Anhang Nr. 9.1.2) hergestellt und innerhalb von sechs Wochen verwendet. Zum Nachweis lebender MAP-Zellen in FPTB-Medium Plus wurden nach vorherigem gründlichen Vortexen je 100 µl der Verdünnungsstufen 10^{-4} bis 10^{-6} (entspricht auf der Platte 10^{-5} bis 10^{-7}) aus den Falcon-Röhrchen der Verdünnungsreihe entnommen und im Spatelverfahren auf die Middlebrook 7H10-Agarplatten aufgebracht (Dreifachansatz). Als Positivkontrolle dienten 100 µl der Verdünnungsstufe 10^{-1} , als Negativkontrolle 100 µl FPTB-Medium Plus.

Bei den Versuchen mit artifiziell kontaminierter H-Milch diente als Positivkontrolle H-Milch gespikt mit der Verdünnungsstufe 10^{-1} und als Negativkontrolle native H-Milch. Die artifiziell kontaminierten H-Milchproben (Verdünnungsstufe 10^{-4} bis 10^{-7}) und die Kontrollen wurden zunächst 15 Minuten bei $2.400 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Eppendorfpipette abgenommen, das Pellet in 200 µl FPTB-Medium Plus resuspendiert und im Spatelverfahren auf die Middlebrook 7H10-Agarplatten aufgebracht (Doppelansatz).

Alle Middlebrook 7H10-Agarplatten wurden mit Parafilm umwickelt und in Plastikbeutel verpackt, um ein Austrocknen der Platten zu verhindern. Die Platten wurden wöchentlich auf Wachstum von MAP-Kolonien und auf Kontamination untersucht, anfangs unter Zuhilfenahme einer Lupe. Bei Bedarf wurde die Parafilm-Umwicklung erneuert. Die endgültige Auswertung erfolgte nach zehn Wochen. Die MAP-Kolonien wurden ausgezählt und die Kolonie-bildenden

Einheiten pro ml berechnet. Zur Dokumentation wurden die Platten mit einer Digitalkamera (Canon Power Shot) fotografiert. Zur Berechnung wurden nur diejenigen Platten herangezogen, die 1-150 klar voneinander trennbare Kolonien aufwiesen. Außerdem musste mindestens eine Verdünnungsstufe vorhanden sein, auf der zwischen 15 und 150 Kolonien vorhanden waren. Die

Berechnung erfolgte nach folgender Formel: $\bar{c} \cdot d$ mit $\bar{c} = \frac{\sum c}{n_1 \cdot 1 + n_2 \cdot 0,1}$

$\bar{c}$: gewogenes (gewichtetes) arithmetisches Mittel

$\sum c$: Summe der Kolonien aller Platten, die zur Berechnung herangezogen wurden (niedrigste und nächst höhere auswertbare Verdünnungsstufe)

n_1 : Anzahl der Platten der niedrigsten Verdünnungsstufe

n_2 : Anzahl der Platten der nächst höheren Verdünnungsstufe

d : Faktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe (d.h. auf n_1 bezogene Verdünnungsstufe)

b) Herrold's-Egg-Yolk-Medium (Rohmilch, Säuglingsanfangsnahrung)

Das eigelbhaltige Herrold's Egg Yolk-Medium (HEYM) wurde gebrauchsfertig bezogen. Die 0,75 % HPC-Lösung wurde am Versuchstag frisch angesetzt. Dazu wurde die entsprechende Menge HPC in ein steriles Becherglas mit sterilem Magnet eingewogen, die benötigte Menge vorgewärmtes (37° C) destilliertes Wasser zugegeben und alles bis zum vollständigen Lösen des Pulvers auf einem Magnetrührer gerührt. Die Proben (je 1 ml) wurden in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und auf 10 ml mit 0,75 % HPC-Lösung aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben fünf Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur dekontaminiert. Als Positivkontrolle diente Rohmilch/Säuglingsanfangsnahrung gespikt mit der Verdünnungsstufe 10^{-1} , als Negativkontrolle native Rohmilch/Säuglingsanfangsnahrung. Nach der fünfstündigen Dekontaminationszeit wurden die Proben 15 Minuten bei 2.400 x g zentrifugiert, der Überstand mit einer gestopften Pasteurpipette abgenommen, das Pellet in 200 µl FPTB-Medium Plus resuspendiert und mit einer gestopften Pasteurpipette auf das HEY-Medium pipettiert. Schließlich wurden die Proben mit einer 1 ml Glaspipette gleichmäßig auf dem Nährmedium verteilt und bei 37° C für 20 Wochen bebrütet. Dabei wurden sie zunächst in Schräglage bei locker aufgesetztem Deckel inkubiert, bis sich keine Flüssigkeit mehr in den Röhrchen befand (circa eine Woche). Für die restlichen Wochen wurden die Röhrchen in senkrechter Position mit fest verschlossenem Deckel bebrütet. Alle HEYM wurden wöchentlich auf das Wachstum von MAP-Kolonien und auf Kontamination kontrolliert, in den ersten Wochen unter Zuhilfenahme einer Lupe. Die Auswertung erfolgte nach zwölf Wochen, dann fand auch die Dokumentation durch Fotografieren mit einer Digitalkamera statt (Canon Power Shot). Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel: $\bar{c} \cdot d$ mit $\bar{c} = \frac{\sum c}{n_1 \cdot 1 + n_2 \cdot 0,1}$

$\bar{c}$: gewogenes (gewichtetes) arithmetisches Mittel

$\sum c$: Summe der Kolonien aller Platten, die zur Berechnung herangezogen wurden (niedrigste und nächst höhere auswertbare Verdünnungsstufe)

n_1 : Anzahl der Platten der niedrigsten Verdünnungsstufe

n_2 : Anzahl der Platten der nächst höheren Verdünnungsstufe

d : Faktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe (d.h. auf n_1 bezogene Verdünnungsstufe)

Alle Röhrchen wurden im Anschluss weiter inkubiert und in Woche 20 nachkontrolliert.

In einigen Fällen gestaltete sich die Auswertung der HEYM-Röhrchen als schwierig (s. auch 4.2.7). In solchen Fällen wurden Abschwemmungen von den entsprechenden Röhrchen durchgeführt und diese mittels Real-Time PCR auf MAP untersucht. Die genauen Arbeitsschritte sind unter 3.5.10 c) beschrieben.

3.5.10 Molekularbiologische Untersuchungen

a) Überprüfung der Verdünnungsreihe

Um die MAP-Konzentration der einzelnen Verdünnungsstufen der dekadischen Verdünnungsreihe zu überprüfen, wurde die Triplex Real-Time PCR nach Schönenbrücher *et al.* (2008) eingesetzt. Die DNS-Isolierung erfolgte mittels DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (Fa. Qiagen) direkt aus der Verdünnungsreihe. Die genauen Arbeitsschritte sind unter 3.5.4 beschrieben.

b) Kontrolle der Milch/Säuglingsanfangsnahrung

Um sicherzustellen, dass die verwendete Milch (H-Milch und Rohmilch) und die verwendete Säuglingsanfangsnahrung frei von MAP-Zellen waren, wurde je 1 ml native Milch/Säuglingsanfangsnahrung am Morgen des Versuchstages im Doppelansatz mittels Real-Time PCR nach Schönenbrücher *et al.* (2008) getestet. Als Positivkontrolle diente jeweils Milch/Säuglingsanfangsnahrung gespikt mit der Verdünnungsstufe 10^{-1} (Doppelansatz). Die DNS-Isolierung erfolgte mittels DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (Fa. Qiagen) wie unter 3.5.4 beschrieben.

c) Extraktion genomischer DNS aus Mykobakterienkulturen (Herrold's Egg Yolk-Medium)

Die DNS-Extraktion von Kolonien, die im Rahmen der Einmischversuche in Rohmilch oder Säuglingsanfangsnahrung auf HEYM gewachsen waren, erfolgte mittels DNeasy[®] Blood & Tissue Mini Kit der Firma Qiagen. Für die Abschwemmung wurde 1 ml FPTB-Medium Plus in das HEYM-Röhrchen pipettiert und dieses 15 Minuten in Schräglage auf einem Schüttler geschüttelt. Die Flüssigkeit wurde mit einer sterilen Pasteurpipette nach mehrmaligem Spülen in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und nach dem modifizierten Protokoll für grampositive Bakterien wie unter 3.5.4 beschrieben weiter bearbeitet. Das Eluat mit der DNS wurde in die

Real-Time PCR nach Schönenbrücher *et al.* (2008) eingesetzt, die Auswertung erfolgte wie unter 3.5.4 beschrieben.

d) Kontrolle der Plaques beim FASTPlaqueTB (FPTB)-Assay

Da die Bakteriophagen beim FPTB-Assay nicht spezifisch MAP-Zellen, sondern auch andere Mykobakterien nachweisen, wurden stichprobenartig Plaques und Agar mittels Real-Time PCR nach Schönenbrücher *et al.* (2008) getestet. Hierfür wurden 10 µl einer ganz oder teilweise lysierten Platte (i. d. R. Verdünnungsstufe 10^{-3} oder 10^{-4}) sowie ein Plaque einer Platte mit wenig Plaques (i. d. R. Verdünnungsstufe 10^{-6} oder 10^{-7}) mit einer ungestopften 1000 µl Pipettenspitze (vorne so abgeschnitten, dass das Volumen des ausgestanzten Stückes circa 10 µl beträgt) ausgestanzt. Zusätzlich wurde im Doppelansatz ein Stück Agar (Negativkontrolle) in dieser Weise ausgestanzt. Die ausgestanzten Stücke wurde mit Hilfe einer gerade gebogenen Platinöse in je ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, dann wurden 10 µl Nuklease-freies Wasser (Fa. Qiagen) dazu pipettiert und die Proben fünf Minuten bei 96° C im Thermomixer unter Schütteln erhitzt. Im Anschluss wurden die Proben bei -86° C eine Stunde lang eingefroren, dann im 37° C Brutschrank aufgetaut und schließlich fünf Minuten bei 13.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und diente als Vorlage für die Triplex Real-Time PCR nach Schönenbrücher *et al.* (2008).

Um auszuschließen, dass die PCR möglicherweise die Bakteriophagen nachweist, wurden außerdem bei den ersten vier Versuchen 50 µl Bakteriophagen aus dem Kit mittels Real-Time PCR getestet. Dazu wurden 50 µl der rekonstituierten Bakteriophagen 15–20 Minuten bei 99° C im Thermomixer gekocht, anschließend in einem Eisblock abgekühlt, gevortext und zwei Minuten bei 15.800 x g zentrifugiert. Der Überstand, der die frei gewordene DNS enthielt, wurde als Vorlage für die Real-Time PCR genommen.

3.5.11 FASTPlaqueTB™ (FPTB)-Assay

Reagenzien und Chemikalien:

- FASTPlaqueTB™ Diagnostik-Kit (Fa. Biotec Laboratories Ltd.)
 - FPTB-Medium
 - FPTB-Growth Supplement
 - Actiphagen
 - Sensorzellen
 - Virusol
 - FPTB-Agar
- NOA-Supplement [Angaben pro Liter; (Biotec Laboratories Ltd.)]
 - 30 mg Aztreonam
 - 2 mg Oxacillin

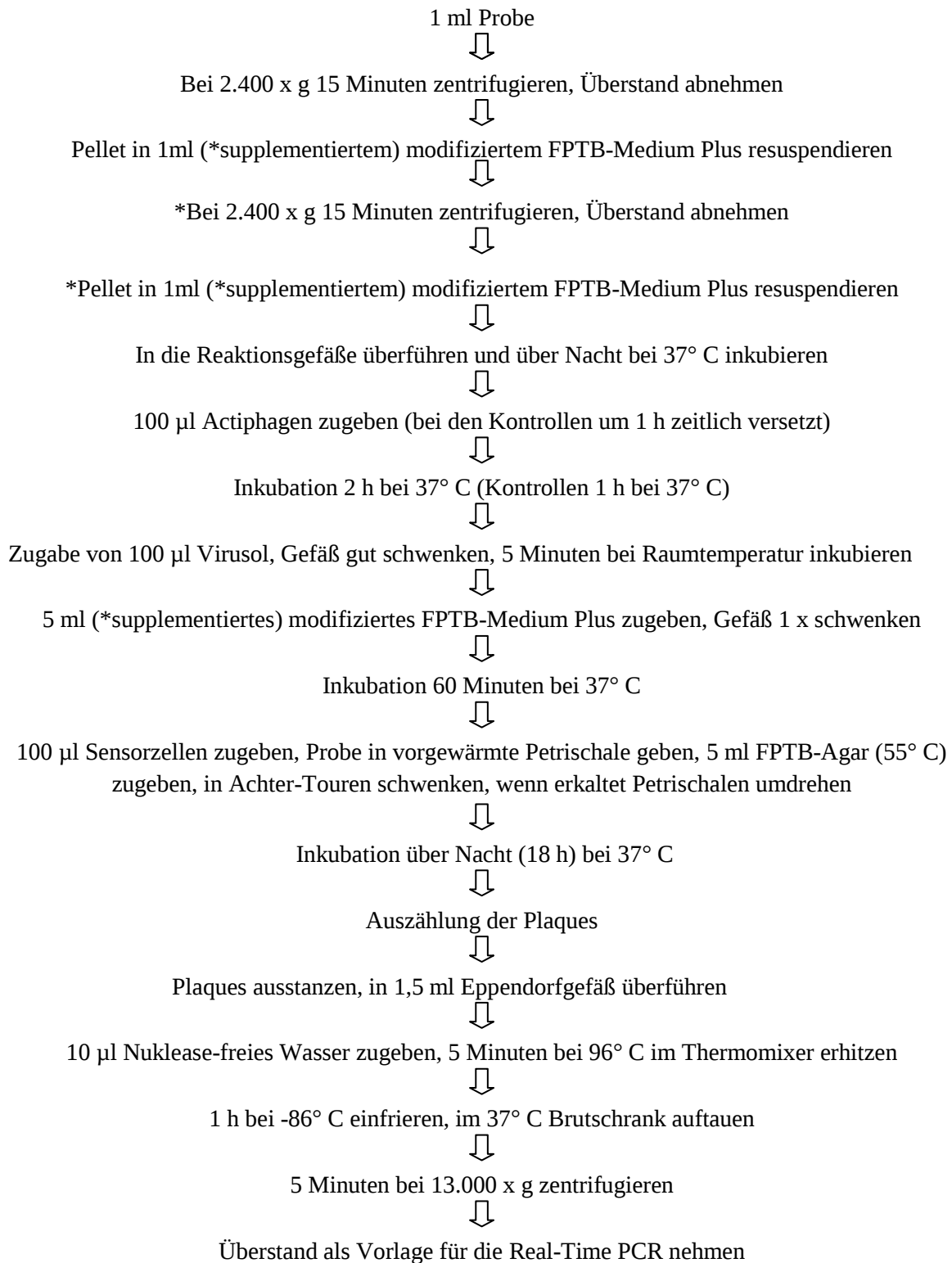
- 50000 IE Nystatin
- Calciumchlorid (CaCl_2), wasserfrei gepulvert (Fa. Merck)

Der *FASTPlaqueTB*TM (FPTB)-Assay wurde gemäß dem modifizierten Protokoll von Foddai *et al.* (2009) durchgeführt. Es gibt bei dem modifizierten Protokoll vier Abweichungen zum Protokoll des Herstellers: (1) Die CaCl_2 -Konzentration des FPTB-Medium Plus wurde erhöht, da Calciumchlorid die Adsorptionsrate der D29 Mykobakteriophagen an vorhandene MAP-Zellen verbessert. Außerdem ist die Lyse der Bakterienzellen besser zu beurteilen, da die entstandenen Plaques größer und einheitlicher sind als bei vergleichbaren Proben mit einer geringeren Calciumchlorid-Konzentration. (2) Die Proben wurden über Nacht in FPTB-Medium Plus inkubiert, bevor der Assay durchgeführt wurde. (3) Die Behandlung mit Virusol erfolgte erst nach zwei Stunden (Herstellerangabe: eine Stunde). (4) Nach der Behandlung mit Virusol wurden die Proben erneut 60 Minuten inkubiert, bevor die Sensorzellen zugegeben wurden.

Gemäß Foddai *et al.* (2009) sollen diese Modifikationen dazu beitragen, dass man eine 100 %ige Korrelation zwischen den gezählten Plaques (PFU/ml) und den kulturell ermittelten MAP-Zellen (KbE/ml) erhält, und der Nachweis von 1–10 KbE/ml MAP-Zellen in artifiziell kontaminierter, pasteurisierter Milch gelingt.

Die genauen Arbeitsschritte sind im Fließdiagramm 5 dargestellt. Die lyophilisierten Actiphagen, Sensorzellen und das NOA-Supplement wurden gemäß Herstellerangabe rekonstituiert. Virusol, FPTB-Agar und FPTB-Medium Plus wurden ebenfalls gemäß Herstellerangabe hergestellt. Das modifizierte FPTB-Medium Plus enthielt zusätzlich 200 µl steril-filtrierte 1 M CaCl_2 -Lösung pro 300 ml Medium Plus. Die Negativkontrolle bestand gemäß Herstellerangaben aus 1 ml FPTB-Medium Plus, die Positivkontrolle aus 1 ml FPTB-Medium Plus mit verdünnten Sensorzellen. Die Rohmilchproben und die Säuglingsanfangsnahrungsproben mussten zunächst mit NOA-Supplement vorbehandelt werden, um die unerwünschte Begleitkeimflora abzutöten.

Fließdiagramm 5: Untersuchungsgang zum Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* mittels FASTPlaqueTB™ (FPTB)-Assay mit anschließender Real-Time PCR



* nur bei Versuchen mit Rohmilch und Säuglingsanfangsnahrung

Supplementiert: Zugabe von NOA-Supplement zu dem modifizierten FPTB-Medium Plus

a) Versuche ohne Milch und mit H-Milch

Die Proben wurden 15 Minuten bei 2.400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Eppendorfpipette abgenommen und das Pellet in 1 ml modifiziertem FPTB-Medium Plus resuspendiert. Die Proben wurden in die im Kit mitgelieferten Reaktionsgefäße umgefüllt und über Nacht bei 37° C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden zunächst die Positiv- und Negativkontrolle gemäß Herstellerangabe angefertigt. Dann wurden 100 µl Actiphagen zu den Proben gegeben und die Gefäße leicht geschwenkt. Im Anschluss wurden die Proben zwei Stunden bei 37° C inkubiert. Die Zugabe der Actiphagen zu den Kontrollen erfolgte eine Stunde zeitlich versetzt, da die Inkubationszeit für die Kontrollen nur eine Stunde betrug. Nach der Inkubationszeit wurden 100 µl Virusol zu allen Proben und den Kontrollen zugegeben, um die Phagen, die keine lebenden Zielzellen infizieren konnten, abzutöten. Die Proben wurden gründlich durch Schwenken der Gefäße (auch über Kopf) durchmischt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 5 ml modifiziertes FPTB-Medium Plus zugegeben und die Proben wiederum durch Schwenken der Reaktionsgefäße durchmischt. Nun wurden die Proben erneut eine Stunde bei 37° C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 100 µl Sensorzellen (*M. smegmatis*) zugegeben, die Proben in vorgewärmte Petrischalen gegeben und sofort 5 ml FPTP Agar, der bei 55° C im Wasserbad warmgehalten wurde, dazu pipettiert. Die Petrischalen wurden in Achter-Touren geschwenkt, um den Inhalt gut zu durchmischen. Anschließend wurden diese bei Raumtemperatur gelagert bis sich der Agar verfestigt hatte. Dann wurden die umgedrehten Petrischalen über Nacht (18 h) bei 37° C inkubiert. Die Auszählung der Plaques erfolgte am nächsten Morgen, zur Dokumentation wurden alle Platten mit einer Digitalkamera (Canon Power Shot) fotografiert. Überdies wurden bei jedem Versuch stichprobenartig Plaques mittels MAP-spezifischer Real-Time PCR nach Schönenbrücher *et al.* (2008) getestet. Die Arbeitsschritte sind unter 3.5.10 d) beschrieben.

b) Versuche mit Rohmilch und Säuglingsanfangsnahrung

Zunächst wurde rekonstituiertes NOA-Supplement gemäß Herstellerangaben dem modifizierten FPTB-Medium Plus zugegeben. Die Proben wurden 15 Minuten bei 2.400 x g zentrifugiert, der Überstand mit einer Eppendorfpipette abgenommen und das Pellet in 1 ml supplementiertem, modifiziertem FPTB-Medium Plus resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (15 Minuten bei 2.400 x g) wurde der Überstand abpipettiert, das Pellet in 1 ml supplementiertem, modifiziertem FPTB-Medium Plus resuspendiert und die Proben im Anschluss in die mitgelieferten Reaktionsgefäße überführt. Es folgte die Inkubation bei 37° C über Nacht. Die restlichen Arbeitsschritte sind identisch mit denen unter 3.5.11 a) für die Versuche ohne Milch/mit H-Milch beschriebenen Arbeitsschritten, außer dass während des gesamten Assays mit NOA supplementiertes, modifiziertes FPTB-Medium Plus zum Einsatz kam.

3.5.12 Untersuchung von Säuglingsanfangsnahrung aus dem deutschen Handel

Im Anschluss an die Einmischversuche fand die Untersuchung eines repräsentativen Spektrums (n=16) von Säuglingsanfangsnahrung („Pre“ und „HA Pre“) aus dem deutschen Handel statt. Alle Produkte wurden im Doppelansatz mittels *FASTPlaque*TB (FPTB)-Assay untersucht und kulturell auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium mit Mykobaktin J (HEYM) angezüchtet. Die Arbeitsschritte für den FPTB-Assay sind unter 3.5.11 b) beschrieben, die der Kontrolle von Plaques unter 3.5.10 d). Die kulturelle Anzucht auf HEYM ist unter 3.5.9 b) beschrieben. Die Untersuchungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Frau Molitor, die die molekularbiologischen Untersuchungen der Säuglingsanfangsnahrung mittels TaqMan®-Real-Time PCR („MAPsureEasy“, Fa. TransMIT) durchführte. Die Extraktion und Aufreinigung der DNS erfolgte dabei parallel mit dem automatisierten „Maxwell 16® System“ (Fa. Promega) und dem „High Pure PCR Template Preparation Kit“ (Fa. Roche). Beiden DNS-Aufbereitungsverfahren wurde eine mechanische Homogenisierung mit dem „Precellys24“ (Fa. Peqlab) vorgeschaltet. Die Amplifikation der DNS wurde mittels der spezifischen und gleichzeitig sensitiven TaqMan®-Real-Time PCR („MAPsureEasy“), die in Anlehnung an Schönenbrücher *et al.* (2008) entwickelt wurde, durchgeführt (Weirich *et al.*, 2011).

3.5.13 Statistische Auswertung

Die Datenhaltung und -auswertung sowie die Erstellung der graphischen Abbildungen im Rahmen der Ergebnispräsentation erfolgte auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die statistischen Auswertungen wurden unter Verwendung des Statistikprogrammpakets BMDP/Dynamic, Release 8.1 durchgeführt (Dixon, 1993).

Die Untersuchung von Zusammenhängen bei den quantitativen Merkmalen erfolgte mit Hilfe von Korrelations- bzw. Regressionsanalysen mit dem Programm BMDP6D unter Angabe des Korrelationskoeffizienten (r) und der Regressionsgeraden ($y = m \cdot x + b$). Bei der Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ zugrunde gelegt, d.h. Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

Die graphischen Abbildungen wurden auf einem Personalcomputer mit dem Programm Microsoft Office Excel 2007 erzeugt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Vorversuche

Im Rahmen der Vorversuche wurden folgende Fragestellungen geklärt:

- a) Welches ist die bestmögliche CTC-Konzentration zum Anfärben lebender MAP-Zellen?
- b) Welches ist die bestmögliche Farbstoff-Konzentration zum Anfärben von MAP-Zellen bei der *BacLight*TM-Färbung?
- c) Wie kann die Milch vorbehandelt werden, um die durch Milchbestandteile hervorgerufene Hintergrundfluoreszenz zu minimieren?

Zu a) Bestmögliche CTC-Konzentration

Um die bestmögliche CTC-Konzentration zu ermitteln, wurden die in der Literatur zum Anfärben anderer Mikroorganismen beschriebenen CTC-Konzentrationen von 1, 2, 3, 5 und 8 mM (Endkonzentration) getestet. Dazu wurden im Doppelansatz die Verdünnungsstufen 10^{-2} und 10^{-3} der Stämme ATCC[®] BAA-968TM (drei zeitlich getrennte Wiederholungen) und DSMZ-Nr. 44133 (zwei zeitlich getrennte Wiederholungen) mit den oben genannten Farbstoffkonzentrationen angefärbt. Es zeigte sich, dass eine Endkonzentration von 5 mM das beste mikroskopische Bild lieferte. Bei niedrigeren Endkonzentrationen war die Fluoreszenz sehr schwach und somit schlecht auswertbar. Bei höheren Konzentrationen hatte CTC einen toxischen Effekt auf die MAP-Zellen, so dass prozentual mehr Bakterien nicht mehr lebensfähig waren.

Zu b) Bestmögliche Farbstoff-Konzentration bei der *BacLight*TM-Färbung

Für die Live/Dead[®] *BacLight*TM Bacterial Viability Kit-Färbung wurde die vom Hersteller empfohlene Menge von 3 µl Färbelösung eingesetzt. Dabei wurde, wie vom Hersteller empfohlen, das Mischungsverhältnis von SYTO[®] 9 und Propidiumiodid variiert und zwar in den Verhältnissen 3µl:3µl, 4µl:3µl, 4µl:1,5µl, 3µl:1,5µl. Getestet wurden die Stämme ATCC[®] BAA-968TM und DSMZ-Nr. 44133 (pro Stamm zwei zeitlich getrennte Wiederholungen), Verdünnungsstufen 10^{-2} und 10^{-3} . Die deutlichste Fluoreszenz zeigte sich bei einem Mischungsverhältnis von 3µl SYTO[®] 9:3µl Propidiumiodid.

Zu c) Minimierung der Hintergrundfluoreszenz beim Anfärben von Milch

Nach Klärung der zuvor angesprochenen methodischen Aspekte, wurden fünf zeitlich voneinander getrennte Vorversuchsreihen mit dem MAP-Stamm DSMZ-Nr. 44133 durchgeführt, um die bei Milchproben auftretende Hintergrundfluoreszenz durch die Milchbestandteile zu minimieren. Im Doppelansatz wurden die Verdünnungsstufen 10^{-2} und 10^{-3} sowohl mit der kombinierten CTC-/AO-Färbung als auch mit der Live/Dead[®] *BacLight*TM Bacterial Viability Kit-Färbung angefärbt. Bei der Proteinase K-Vorbehandlung wurde Proteinase K Solution der Fa. Roche eingesetzt.

Versuchsreihe 1: Zunächst wurden beide Färbemethoden ohne Vorbehandlung der Milch durchgeführt. Dabei zeigte sich eine starke Hintergrundfluoreszenz durch die Milchbestandteile, die eine Auszählung einzelner Bakterien nahezu unmöglich machte (s. Abb. 2).

Versuchsreihe 2: In der Literatur wurde von Gunasekera *et al.* (2000) eine 30–45-minütige Behandlung von Milch mit 0,05 mg Proteinase K beschrieben. Deshalb wurden die Milchpellets einmal nach 30-minütiger Vorbehandlung mit 0,05 mg Proteinase K und einmal ohne Vorbehandlung der Milch mit der CTC-/AO-Färbung und mit der BacLight™-Färbung angefärbt. Die Hintergrundfluoreszenz konnte durch die Vorbehandlung mit Proteinase K minimiert werden. Allerdings war deren Einwirkzeit zu lange, so dass bei beiden Färbemethoden nahezu alle Bakterien nicht mehr lebensfähig waren. Bei der nicht vorbehandelten Milch waren hingegen, soweit eine Auswertung bei der auftretenden Hintergrundfluoreszenz möglich war, überwiegend lebende MAP-Zellen sichtbar.

Versuchsreihe 3: Alle Milchpellets wurden mit 0,05 mg Proteinase K vorbehandelt, bei der einen Hälfte wurde die Einwirkzeit der Proteinase K nach fünf Minuten, bei der anderen Hälfte nach 15 Minuten mit PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) gestoppt. Das mikroskopische Bild war nach der 15-minütigen Einwirkzeit der Proteinase K zwar besser, allerdings waren mehr Bakterien nicht mehr lebensfähig als nach der 5-minütigen Einwirkzeit.

Versuchsreihe 4: Die Milchpellets wurden mit 0,3 mg Proteinase K vorbehandelt deren Einwirkzeit nach 15-sekündigem Vortexen mit 2 µl PMSF gestoppt wurde. Dadurch konnte die Hintergrundfluoreszenz deutlich minimiert werden, so dass eine Auszählung der MAP-Zellen gut möglich war (s. Abb. 3). Der Anteil nicht mehr lebensfähiger MAP-Zellen befand sich mit 15–20 % bei der CTC-/AO-Färbung in dem für einen fünf wochen alten Stamm erwarteten Bereich (Erfahrungswerte aus den Vorversuchen ohne Milch). Bei der BacLight™-Färbung lag der Anteil rot fluoreszierender MAP-Zellen etwas über 30 %. Dies könnte daran liegen, dass die BacLight™-Färbung auf einem Nachweis der Membranintegrität beruht. Möglicherweise schädigt selbst die kurze Behandlung mit Proteinase K die Zellwand dahingehend, dass der Farbstoff Propidiumiodid in die Zelle hineingelangt so dass zu viele Bakterien als nicht mehr lebensfähig angefärbt wurden (rote Fluoreszenz).

Versuchsreihe 5: Um zu sehen, ob die Ergebnisse aus Versuchsreihe vier reproduzierbar sind, wurden die Milchpellets wieder mit 0,3 mg Proteinase K vorbehandelt und deren Wirkung nach 15-sekündigem Vortexen mit PMSF gestoppt. Auch bei dieser Versuchsreihe zeigte sich, dass die Hintergrundfluoreszenz deutlich minimiert werden konnte, und somit eine gute Auswertbarkeit gegeben war. Deshalb wurde bei allen Hauptversuchen mit Milch und Säuglingsanfangsnahrung das Pellet mit 0,3 mg Proteinase K vorbehandelt und deren Wirkung nach 15-sekündigem Vortexen mit 2 µl PMSF gestoppt.

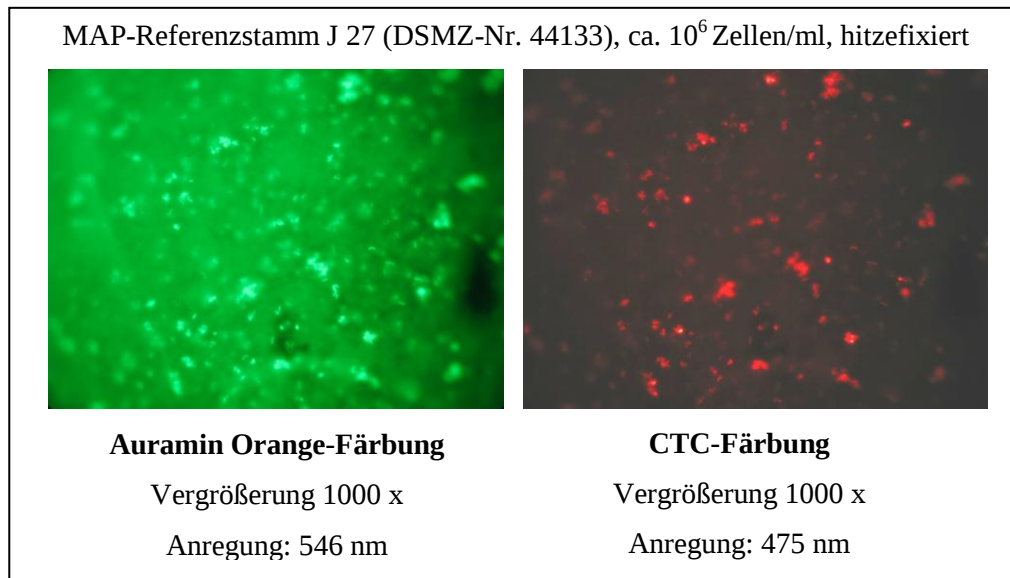


Abb. 2: CTC- und Auramin Orange-Färbung aus artifiziell mit MAP kontaminierter Milch, keine Vorbehandlung der Milch

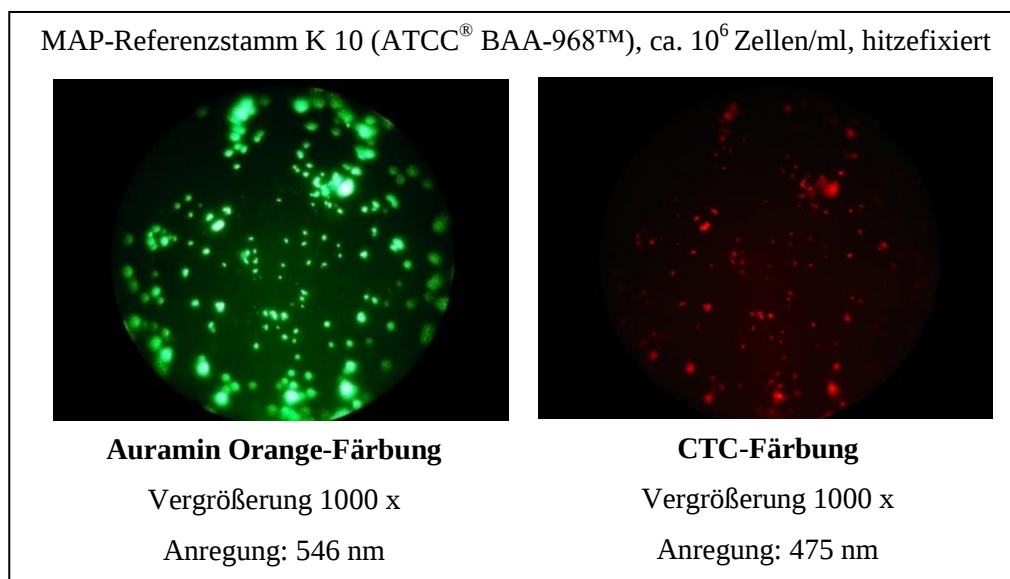


Abb. 3: CTC- und Auramin Orange-Färbung aus artifiziell mit MAP kontaminierter Milch, nach Vorbehandlung der Milch mit Proteinase K und PMSF

4.2 Hauptversuche

4.2.1 Ermittlung der Einmischkonzentration

Die Einmischkonzentration wurde ermittelt, indem zunächst der ungefähre Wert über die optische Dichte mittels Photometer eingestellt wurde. Erfahrungsgemäß entspricht eine optische Dichte von 10,0 % Transmission ungefähr 10^7 KBE/ml. Bevor der eigentliche Versuch durchgeführt wurde, wurde dieser ungefähre Wert mittels „Neubauer improved“-Zählkammer überprüft. Außerdem wurde aus der Verdünnungsreihe die kombinierte CTC-/AO-Färbung sowie die kulturelle Anzucht auf Middlebrook 7H10-Agar durchgeführt. Die oben genannten Verfahren wurden einer statistischen Korrelationsanalyse mit dem Programm BMDP6D unterzogen, um herauszufinden, welche Methode am geeignetsten zur Ermittlung der Einmischkonzentration ist. Bei der Korrelationsanalyse wurde auch berücksichtigt, welcher Stamm bei dem Versuch verwendet wurde, um zu sehen, ob es Stamm-Unterschiede gibt. Die Ergebnisse der statistischen Korrelationsanalysen sind in den Tab. 9 bis 12 dargestellt.

Tab. 9: Korrelationsanalyse (logarithmierte Daten): „optische Dichte“ vs. „Zählkammer“, unter Berücksichtigung der verwendeten Stämme

	Alle vier Stämme (n=102)	ATCC® BAA-968™ (n=30)	DSMZ-Nr. 44133 (n=24)	MAP-Stamm D 8168/02 (n=24)	MAP-Stamm „Niebüll“ (n=24)
r	0,085	- 0,325	- 0,264	0,134	0,672
p	0,55	0,24	0,41	0,68	0,029

r: Korrelationskoeffizient

p: p-Wert

Beim Vergleich der Parameter „optische Dichte“ vs. „Zählkammer“ bestand keine Korrelation ($p \geq 0,05$), wenn alle vier Stämme in die Korrelationsanalyse einbezogen wurden (s. Tab. 9).

Wurden die Ergebnisse für jeden Stamm einzeln in der statistischen Korrelationsanalyse berücksichtigt zeigte sich, dass für die Stämme ATCC® BAA-968™, DSMZ-Nr. 44133 und den MAP-Stamm D 8168/02 keine Korrelation ($p \geq 0,05$) beim Vergleich der Parameter „optische Dichte“ vs. „Zählkammer“ bestand. Einzig der Feldstamm „Niebüll“ zeigte eine signifikant positive Korrelation ($p \leq 0,05$) beim Vergleich dieser beiden Parameter (s. Tab. 9).

Tab. 10: Korrelationsanalyse (logarithmierte Daten): „optische Dichte“ vs. „kulturelle Anzucht aus der Verdünnungsreihe“, unter Berücksichtigung der verwendeten Stämme

	Alle vier Stämme (n=102)	ATCC® BAA-968™ (n=30)	DSMZ-Nr. 44133 (n=24)	MAP-Stamm D 8168/02 (n=24)	MAP-Stamm „Niebüll“ (n=24)
r	0,127	- 0,059	- 0,02	0,007	0,286
P	0,39	0,84	0,96	0,98	0,37

r: Korrelationskoeffizient

p: p-Wert

Der statistische Vergleich zwischen den Parametern „optische Dichte“ vs. „kulturelle Anzucht aus der Verdünnungsreihe“ ergab keine Korrelation ($p \geq 0,05$), weder wenn alle vier Stämme in der statistischen Korrelationsanalyse berücksichtigt wurden, noch wenn die Ergebnisse für jeden Stamm einzeln betrachtet wurden (s. Tab. 10).

Tab. 11: Korrelationsanalyse (logarithmierte Daten): „Zählkammer“ vs. „kulturelle Anzucht aus der Verdünnungsreihe“, unter Berücksichtigung der verwendeten Stämme

	Alle vier Stämme (n=102)	ATCC® BAA-968™ (n=30)	DSMZ-Nr. 44133 (n=24)	MAP-Stamm D 8168/02 (n=24)	MAP-Stamm „Niebüll“ (n=24)
r	0,729	0,555	0,896	0,283	0,684
P	< 0,001	0,039	< 0,001	0,37	0,014

r: Korrelationskoeffizient

p: p-Wert

Beim statistischen Vergleich der Parameter „Zählkammer“ vs. „kulturelle Anzucht aus der Verdünnungsreihe“ bestand eine signifikant positive Korrelation ($p \leq 0,05$), sofern alle Stämme bei der Analyse berücksichtigt wurden. Die Stämme ATCC® BAA-968™, DSMZ-Nr. 44133 und der MAP-Stamm „Niebüll“ zeigten eine signifikant positive Korrelation ($p \leq 0,05$), nur beim Feldstamm D 8168/02 bestand keine Korrelation ($p \geq 0,05$) beim Vergleich der Parameter

„Zählkammer“ vs. „kulturelle Anzucht aus der Verdünnungsreihe“. Insgesamt gab es allerdings beträchtliche Unterschiede, je nach Stamm (s. Tab 11).

Tab. 12: Korrelationsanalyse (logarithmierte Daten): „Kulturelle Anzucht aus der Verdünnungsreihe“ vs. „CTC-Färbung“, unter Berücksichtigung der verwendeten Stämme

	Alle vier Stämme (n=102)	ATCC® BAA-968™ (n=30)	DSMZ-Nr. 44133 (n=24)	MAP-Stamm D 8168/02 (n=24)	MAP-Stamm „Niebüll“ (n=24)
r	0,767	0,825	0,818	0,777	0,739
P	< 0,001	< 0,001	0,002	0,005	0,006

r: Korrelationskoeffizient

p: p-Wert

Die statistische Korrelationsanalyse der Parameter „kulturelle Anzucht aus der Verdünnungsreihe“ vs. „CTC-Färbung“ ergab eine signifikant positive Korrelation ($p \leq 0,05$), sowohl wenn die Ergebnisse für alle Stämme, als auch für jeden Stamm einzeln bei der Analyse berücksichtigt wurden (s. Tab. 12).

4.2.2 Korrelationsanalysen der eingesetzten Methoden

Um die kombinierte CTC-/AO-Färbung zu validieren, wurden zunächst Einmischversuche ohne Milch in FPTB-Medium Plus durchgeführt. Um einen Vergleich zu haben, wurden zusätzlich eine kommerziell erhältliche fluoreszenzmikroskopische Nachweismethode (*BacLight*™-Färbung), die kulturelle Anzucht auf Middlebrook 7H10-Agar und der *FASTPlaqueTB*™-Assay durchgeführt. Insgesamt wurden 20 zeitlich versetzte Versuche (vier Versuche pro Stamm im Doppelansatz, n=40) durchgeführt. Dadurch ergaben sich 766 Einzelwerte, die bei der statistischen Analyse miteinander verglichen wurden. Die vier eingesetzten Methoden wurden einer statistischen Korrelationsanalyse mit dem Programm BMDP6D unterzogen. Die logarithmierten Daten sind in Tab. 13 dargestellt.

Im Anschluss wurden acht zeitlich versetzte Einmischversuche in H-Milch (zwei Versuche pro Stamm im Doppelansatz, n=16), 16 zeitlich versetzte Einmischversuche in Rohmilch (vier Versuche pro Stamm im Doppelansatz, n=32) und acht zeitlich versetzte Einmischversuche in Säuglingsanfangsnahrung (zwei Versuche pro Stamm im Doppelansatz, n=16) durchgeführt. Dadurch ergaben sich 185 Einzelwerte für die Einmischversuche in H-Milch, 98 Einzelwerte für die Einmischversuche in Rohmilch und 56 Einzelwerte für die Einmischversuche in

Säuglingsanfangsnahrung, die für die statistische Analyse herangezogen werden konnten. Bei der Korrelationsanalyse mit dem Programm BMDP6D wurden die unterschiedlichen Nachweismethoden miteinander verglichen, die logarithmierten Daten sind in den Tabellen 14 bis 16 dargestellt.

Tab. 13: Korrelationsanalyse der Einmischversuche (n=40) ohne Milch in FPTB-Medium Plus, logarithmierte Daten

	Kultur vs. CTC	Kultur vs. Phage	Kultur vs. BacL	Phage vs. CTC	Phage vs. BacL	AO vs. BacL (Gesamt)	CTC vs. BacL (Lebend)
r	0,991	0,972	0,991	0,989	0,989	0,999	0,989
P	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

r: Korrelationskoeffizient

p: p-Wert

Kultur: kulturelle Anzucht auf Middlebrook 7H10-Agar

CTC: CTC-Färbung

Phage: *FASTPlaqueTB*TM-Assay

BacL: *BacLight*TM-Färbung

AO: Auramin Orange-Färbung

Die statistische Korrelationsanalyse ergab für die Einmischversuche in artifiziell kontaminiertem FPTB-Medium Plus eine signifikant positive Korrelation ($p \leq 0,05$) für alle miteinander verglichenen Methoden. Der p-Wert lag beim Vergleich der Parameter „kulturelle Anzucht“ vs. „CTC-Färbung“, „kulturelle Anzucht“ vs. „*FASTPlaqueTB*TM-Assay“, „kulturelle Anzucht“ vs. „*BacLight*TM-Färbung“, „*FASTPlaqueTB*TM-Assay“ vs. „CTC-Färbung“, „*FASTPlaqueTB*TM-Assay“ vs. „*BacLight*TM-Färbung“, „Auramin Orange-Färbung“ vs. „*BacLight*TM-Färbung (Gesamtzellzahl)“ und „CTC-Färbung“ vs. „*BacLight*TM-Färbung (Anzahl der lebenden Zellen)“ in allen Fällen < 0,001 (s. Tab. 13).

Tab. 14: Korrelationsanalyse der Einmischversuche in H-Milch (n=16), logarithmierte Daten

	Kultur vs. CTC	Kultur vs. Phage	Kultur vs. BacL	Phage vs. CTC	Phage vs. BacL	AO vs. BacL (Gesamt)	CTC vs. BacL (Lebend)
r	0,996	0,988	0,986	0,985	0,995	0,993	0,993
P	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

r: Korrelationskoeffizient

p: p-Wert

Kultur: kulturelle Anzucht auf Middlebrook 7H10-Agar

CTC: CTC-Färbung

Phage: *FASTPlaqueTB*TM-Assay

BacL: *BacLight*TM-Färbung

AO: Auramin Orange-Färbung

Die statistische Korrelationsanalyse für die Einmischversuche in artifiziell kontaminierter H-Milch ergab eine signifikant positive Korrelation ($p \leq 0,05$) bei allen miteinander verglichenen Methoden. Der p-Wert lag beim Vergleich der Parameter „kulturelle Anzucht“ vs. „CTC-Färbung“, „kulturelle Anzucht“ vs. „*FASTPlaqueTB*TM-Assay“, „kulturelle Anzucht“ vs. „*BacLight*TM-Färbung“, „*FASTPlaqueTB*TM-Assay“ vs. „CTC-Färbung“, „*FASTPlaqueTB*TM-Assay“ vs. „*BacLight*TM-Färbung“, „Auramin Orange-Färbung“ vs. „*BacLight*TM-Färbung (Gesamtzellzahl)“ und „CTC-Färbung vs. *BacLight*TM-Färbung (Anzahl der lebenden Zellen)“ in allen Fällen $< 0,001$ (s. Tab 14).

Tab. 15: Korrelationsanalyse der Einmischversuche in Rohmilch (n=32), logarithmierte Daten

	Kultur vs. CTC	Kultur vs. Phage	Phage vs. CTC
r	0,865	0,991	0,997
p	< 0,001	< 0,001	< 0,001

r: Korrelationskoeffizient

p: p-Wert

Kultur: kulturelle Anzucht auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium

CTC: CTC-Färbung

Phage: *FASTPlaqueTB*TM-Assay

Die statistische Korrelationsanalyse für die Einmischversuche in artifiziell kontaminierter Rohmilch ergab eine signifikant positive Korrelation ($p \leq 0,05$) beim Vergleich der Parameter „kulturelle Anzucht“ vs. „CTC-Färbung“, „kulturelle Anzucht“ vs. „*FASTPlaqueTB*TM-Assay“ und „*FASTPlaqueTB*TM-Assay“ vs. „CTC-Färbung“ (s. Tab. 15).

Tab. 16: Korrelationsanalyse der Einmischversuche in Säuglingsanfangsnahrung (n=16), logarithmierte Daten

	r	p
Kultur vs. Phage	0,989	< 0,001

r: Korrelationskoeffizient

p: p-Wert

Kultur: kulturelle Anzucht auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium

Phage: *FASTPlaqueTB*TM-Assay

Die statistische Korrelationsanalyse für die Einmischversuche in artifiziell kontaminierter Säuglingsanfangsnahrung ergab eine signifikant positive Korrelation ($p \leq 0,05$) beim Vergleich der Parameter „kulturelle Anzucht“ vs. „*FASTPlaqueTB*TM-Assay“ (s. Tab. 16).

Die Einmischversuche zum Nachweis von MAP-Zellen in FPTB-Medium Plus, H-Milch, Rohmilch und Säuglingsanfangsnahrung zeigten, dass bei allen miteinander verglichenen Methoden, unabhängig vom Einmisch-Medium eine signifikant positive Korrelation ($p \leq 0,05$) bestand (s. Tab. 13-16).

4.2.3 Nachweisgrenzen der eingesetzten Methoden

Für alle Einmischversuche wurde die Nachweisgrenze mittels logistischer Regressionsanalyse mit dem Programm BMDP6D bestimmt. Die Ergebnisse der logistischen Regressionsanalyse aller Methoden für die verschiedenen Einmischversuche sind in Tab. 17 dargestellt. Ein Vergleich der Nachweisgrenzen ist in Abb. 4 dargestellt. Alle in Tab. 17 dargestellten Ergebnisse der logistischen Regressionsanalyse wurden bei den einzelnen Nachweismethoden (s. 4.2.4 bis 4.2.7) wiedergegeben.

Tab. 17: Logistische Regressionsanalysen für die kombinierte CTC-/AO-Färbung, BacLight™-Färbung, den FPTB-Assay und die kulturelle Anzucht für die unterschiedlichen Einmischversuche; Schätzwert für eine 95 %ige Nachweiswahrscheinlichkeit

	FPTB-Medium Plus	H-Milch	Rohmilch	Matrix Milch gesamt	Säuglings- nahrung
CTC-/AO-Färbung (KbE/ml¹⁾)	$7,4 \times 10^2$	$7,8 \times 10^2$	$3,8 \times 10^3$	$1,7 \times 10^3$	n. d. ³⁾
BacLight™-Färbung (KbE/ml¹⁾)	$9,5 \times 10^2$	$1,1 \times 10^4$	n. d. ³⁾	n. d. ³⁾	n. d. ³⁾
FPTB-Assay (PFU/ml²⁾)	$6,2 \times 10^0$	$1,7 \times 10^1$	$8,7 \times 10^0$	$1,2 \times 10^1$	$1,5 \times 10^1$
Kultur* (KbE/ml¹⁾)	-	$1,0 \times 10^1$	$8,9 \times 10^1$	-	-

*Kulturelle Anzucht: bei H-Milch auf Middlebrook 7H10-Agar

bei Rohmilch auf Herrold's Egg Yolk-Medium

¹⁾ KbE/ml: Kolonie-bildende Einheiten pro ml

²⁾ PFU/ml: Plaque Forming Units/ml

³⁾ n. d.: nicht durchgeführt

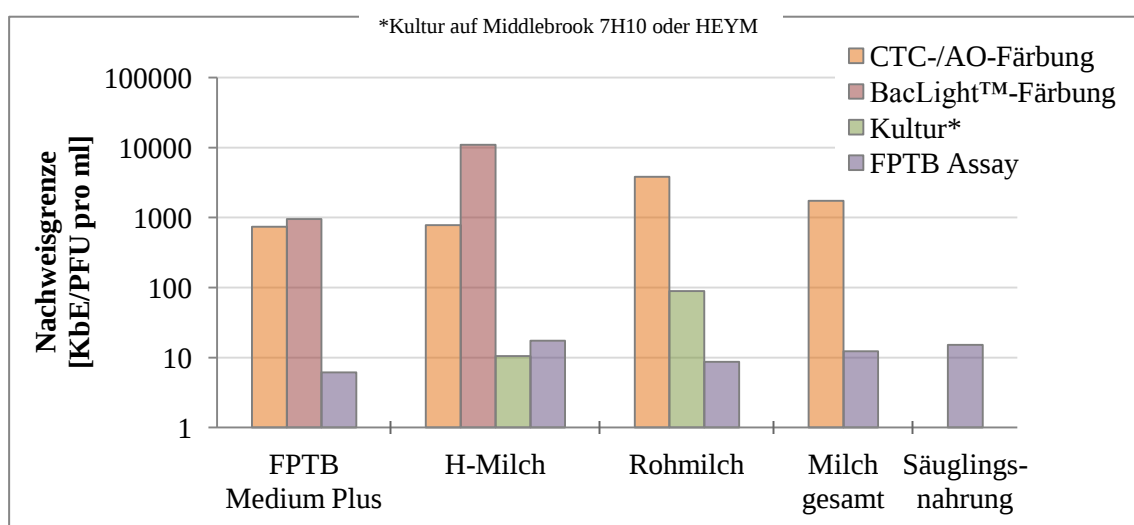


Abb. 4: Nachweisgrenzen für die kombinierte CTC-/AO-Färbung, BacLight™-Färbung, den FPTB-Assay und die kulturelle Anzucht für die unterschiedlichen Matrices

4.2.4 CTC-Färbung

Um die durch Milchbestandteile hervorgerufene unspezifische Hintergrundfluoreszenz zu minimieren, war eine Vorbehandlung der Milch mit Proteinase K unbedingt erforderlich. Die Bildqualität konnte dadurch soweit verbessert werden, dass sowohl einzelne MAP-Zellen als auch MAP-Aggregate deutlich von Farbstoffpartikeln und fluoreszierenden Milchbestandteilen abgegrenzt werden konnten. Durch die Zugabe von Formaldehydlösung (Endkonzentration 0,1 %) vor dem CTC-Färbeschritt konnte die Intensität der roten Fluoreszenz (CTC-Formazan-Kristalle) intensiviert werden. Die zugegebene Formaldehydlösung diente zur Verstärkung der Atmungsaktivität („Stress“) der Bakterien. Die in der Literatur beschriebene Neigung von MAP-Zellen zur Aggregatbildung aufgrund der lipophilen Zellwandeigenschaften (Foddai *et al.*, 2010a) war teilweise auch bei den angefärbten Präparaten zu sehen. Durch gründliches Vortexen mit Keramikkügelchen konnte die Aggregatbildung aber soweit minimiert werden, dass in den meisten Fällen Gesichtsfelder ohne Aggregate gezählt werden konnten. Sofern nur kleine Aggregate vorhanden waren (≤ 10 MAP-Zellen), konnten diese Gesichtsfelder trotzdem ausgezählt werden, da die einzelnen Bakterien unter dem Mikroskop deutlich voneinander abgegrenzt werden konnten. In diesen Fällen gestaltete sich die Foto-Dokumentation allerdings etwas schwierig, da solche Aggregate auf dem Foto als ein großer, fluoreszierender Klumpen zu erkennen waren. Die Nachweisgrenzen für die kombinierte CTC-/AO-Färbung wurden mittels logistischer Regressionsanalyse mit dem Programm BMDP6D bestimmt. Die Nachweisgrenze für artifiziell kontaminiertes FPTB-Medium Plus lag bei $7,4 \times 10^2$ KbE/ml, für artifiziell kontaminierte H-Milch bei $7,8 \times 10^2$ KbE/ml und für artifiziell kontaminierte Rohmilch bei $3,8 \times 10^3$ KbE/ml. Somit lag die Nachweisgrenze der kombinierten CTC-/AO-Färbung für die Gesamtmatrix Milch bei $1,7 \times 10^3$ KbE/ml (s. auch 4.2.3 Tab. 17 und Abb. 4).

4.2.5 BacLight™-Färbung

Auch bei der BacLight™-Färbung war eine Vorbehandlung der Milch mit Proteinase K erforderlich, um die durch Milchbestandteile hervorgerufene unspezifische Hintergrundfluoreszenz zu minimieren. Dadurch konnten sowohl einzelne MAP-Zellen als auch MAP-Aggregate deutlich von Farbstoffpartikeln und fluoreszierenden Milchbestandteilen abgegrenzt werden. Die Nachweisgrenzen für die kombinierte BacLight™-Färbung wurden mittels logistischer Regressionsanalyse mit dem Programm BMDP6D bestimmt. Die Nachweisgrenze für artifiziell kontaminiertes FPTB-Medium Plus lag bei $9,5 \times 10^2$ KbE/ml und für artifiziell kontaminierte H-Milch bei $1,1 \times 10^4$ KbE/ml (s. auch 4.2.3 Tab. 17 und Abb. 4). Da die BacLight™-Färbung nicht spezifisch für MAP-Zellen ist, konnte diese Färbung zur Untersuchung von Rohmilch nicht eingesetzt werden. Aufgrund der in der Rohmilch vorhandenen Begleitkeimflora, die von der BacLight™-Färbung auch angefärbt wurde, war eine Auswertung nicht möglich.

4.2.6 FASTPlaqueTB™-Assay

Sowohl bei Rohmilch als auch bei Säuglingsanfangsnahrung musste eine Vorbehandlung mit dem antibiotischen/antimykotischen NOA-Supplement erfolgen, um die eventuell vorhandene, schnell wachsende Begleitkeimflora zu unterdrücken. Trotzdem waren bei den Rohmilchversuchen 7,6 % der Platten und bei den Versuchen mit Säuglingsanfangsnahrung 12,5 % der Platten mit stecknadelspitzgroßen bis 1 mm großen, runden, weißen, glänzenden Kolonien kontaminiert. Meist konnten alle Platten ausgewertet werden, da die Plaques trotz der gewachsenen Kolonien gut zählbar waren. Als Beispiel ist in Abb. 5 eine auswertbare, kontaminierte Platte von artifiziell kontaminierter Säuglingsanfangsnahrung zu sehen.

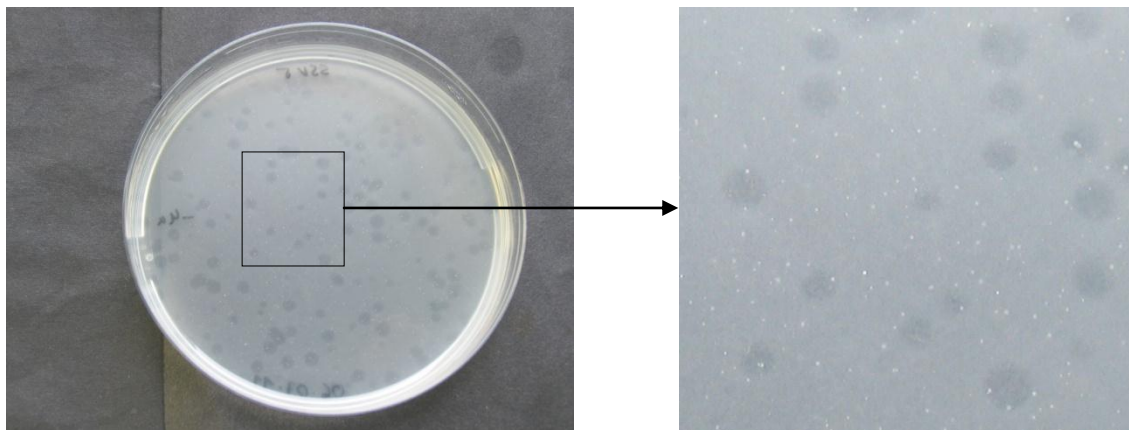


Abb. 5: Auswertbare kontaminierte Platte, mit stecknadelspitzgroßen, runden, weißen, glänzenden Kolonien: artifiziell kontaminierte Säuglingsanfangsnahrung, Dekontamination mit NOA-Supplement, Verdünnungsstufe 10^{-4}

Es gab aber auch Platten, bei denen die Plaques aufgrund der starken Kontamination nicht zu erkennen waren, wie in der Abb. 6 beispielhaft dargestellt ist. Bei den Rohmilchversuchen konnten 2,9 % der Platten wegen der starken Kontamination nicht ausgewertet werden, bei den Versuchen mit Säuglingsanfangsnahrung waren es 3,6 % der Platten.

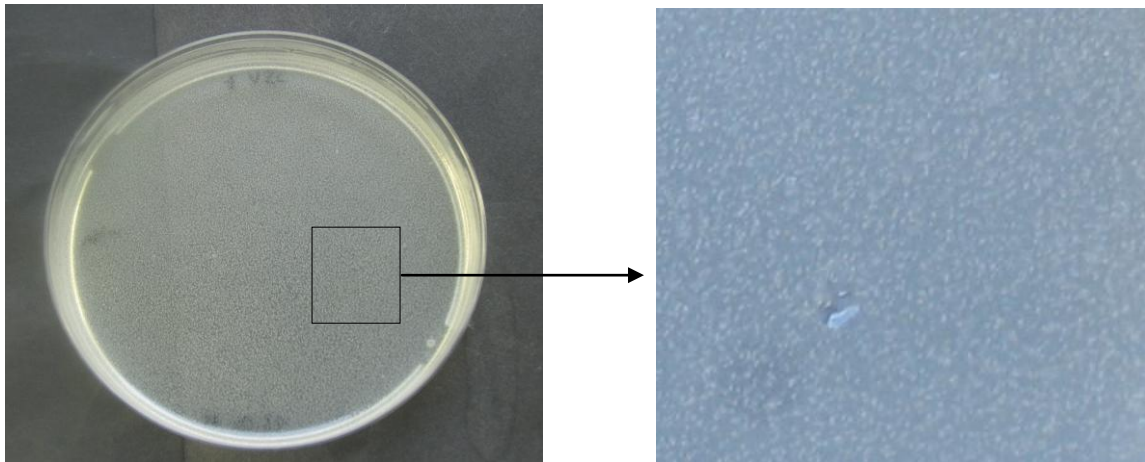


Abb. 6: Nicht auswertbare Platte, kontaminiert mit stecknadelspitzgroßen, weißen, glänzenden Kolonien: artifiziell kontaminierte Rohmilch, Dekontamination mit NOA-Supplement, Verdünnungsstufe 10^{-6}

Für alle Einmischversuche wurde die Nachweisgrenze mittels logistischer Regressionsanalyse mit dem Programm BMDP6D bestimmt. Die Nachweisgrenze für artifiziell kontaminiertes FPTB-Medium Plus lag bei $6,2 \times 10^0$ PFU/ml, für artifiziell kontaminierte H-Milch bei $1,7 \times 10^1$ PFU/ml und für artifiziell kontaminierte Rohmilch bei $8,7 \times 10^0$ PFU/ml. Somit lag die Nachweisgrenze des FPTB-Assay für die Gesamtmatrix Milch bei $1,2 \times 10^1$ PFU/ml. Die Nachweisgrenze für artifiziell kontaminierte Säuglingsanfangsnahrung lag bei $1,5 \times 10^1$ PFU/ml (s. auch 4.2.3 Tab. 17 und Abb. 4).

Die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen der Plaques sind unter 4.2.8 d) dargestellt.

4.2.7 Kulturelle Anzucht

Zur Bestimmung der Einmischkonzentration bei der kulturellen Anzucht aus der Verdünnungsreihe und bei den Einmischversuchen in FPTB-Medium Plus und in H-Milch erfolgte die kulturelle Anzucht aufgrund der besseren Auszählbarkeit im Spatelverfahren auf Middlebrook 7H10-Agar. Dieser Agar ist allerdings nicht geeignet, wenn der kulturellen Anzucht eine Dekontamination zur Abtötung der unerwünschten Begleitkeimflora vorausgeht. In einem solchen Fall muss auf eigelhaltige Nährmedien zurückgegriffen werden. Deshalb erfolgte für die Einmischversuche in Rohmilch und Säuglingsanfangsnahrung die kulturelle Anzucht auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium.

Auf Middlebrook 7H10-Agar wuchsen die MAP-Kolonien als trockene, raue, weiße, z. T. auch beige oder gelbliche Kolonien. Die Kolonien waren erhaben, unregelmäßig, manchmal auch

spiegeleiförmig. Der Durchmesser variierte von 0,5 mm bis 6 mm, auf Platten mit wenigen Kolonien waren diese meist größer.

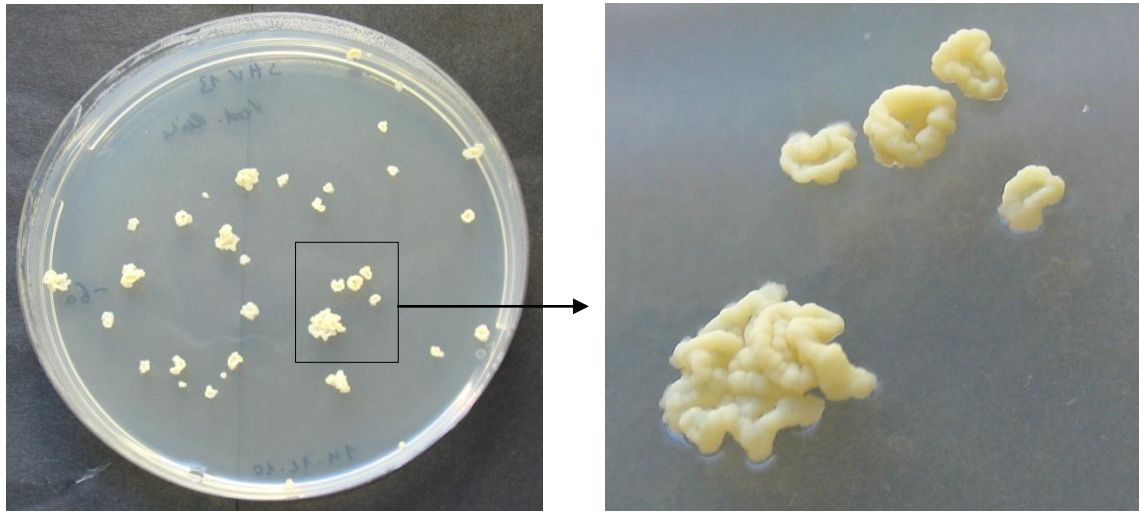


Abb. 7: Koloniemorphologie des MAP-Stammes D 8168/02 auf Middlebrook 7H10-Agar, Anzucht aus der Verdünnungsreihe

Auf HEYM wuchsen die Kolonien als runde, erhabene, glatte, glänzende Kolonien von altweißer Farbe. Der Durchmesser betrug circa 1 mm (s. Abb. 8). Selten waren beige, raue, trockene unregelmäßige, erhabene Kolonien von 1–2 mm Durchmesser zu sehen. Die Auswertung war teilweise problematisch, da insbesondere einzelne kleine, weiße Kolonien nur schwer von Milchbestandteilen unterschieden werden konnten, besonders wenn Reste von Milchbestandteilen Teile der Glaswand des Röhrchens beschmutzten. Bei den Verdünnungsstufen 10^{-3} und 10^{-4} ergab sich außerdem das Problem, dass nach einer gewissen Inkubationszeit teilweise keine Einzelkolonien mehr zu sehen waren, sondern sich im unteren Drittel des HEYM-Röhrchens ein erhabener, dichter, leicht feuchter Bereich bildete. Um sicher zu stellen, dass es sich hierbei um MAP-Kolonien handelt, wurden von solchen HEYM-Röhrchen Abschwemmungen gemacht und mittels Real-Time PCR auf das Vorhandensein von MAP-DNS überprüft [s. Nr. 4.2.8 c)]. Abschwemmungen wurden auch dann vorgenommen, wenn bei der Verdünnungsstufe 10^{-6} nur eine Kolonie/keine sichtbaren Kolonie vorhanden war, um mittels Real-Time PCR zu bestätigen, dass MAP-DNS vorhanden/nicht vorhanden war.

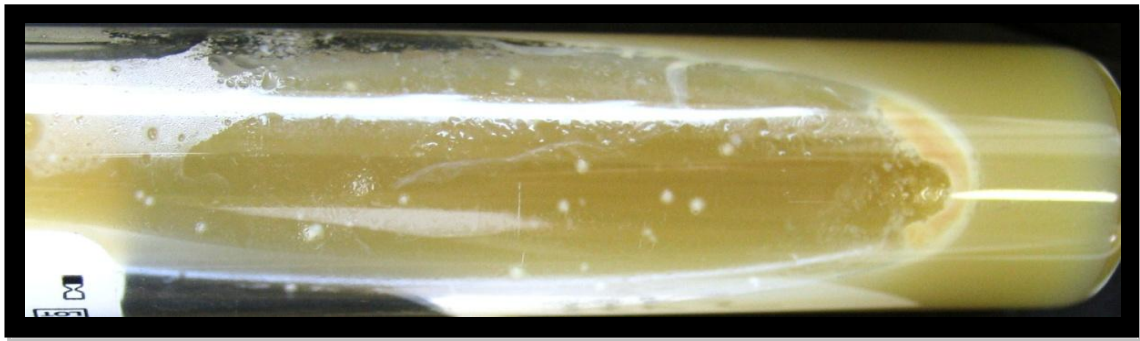


Abb. 8: Koloniemorphologie des MAP-Stammes D 8168/02 auf Herrold's Egg Yolk-Medium, Einmischversuch in Säuglingsanfangsnahrung

Ein großes Problem bei der langen Kultivierungsdauer bestand in der Kontamination der Nährmedien, insbesondere mit Schimmelpilzen. Eine Kontamination der Nährmedien ab der fünften Woche trat sowohl bei den Middlebrook 7H10-Platten als auch bei den HEYM-Röhrchen auf. Die Anzahl der betroffenen Nährmedien, die betroffenen Verdünnungsstufen und der Zeitpunkt der Kontamination sind in den Abb. 9 bis 11 dargestellt. Für die kulturelle Anzucht von MAP-Zellen aus den Verdünnungsreihen wurden insgesamt 551 Middlebrook 7H10-Platten verwendet. Die Kontaminationsrate betrug 17,2 % (n=95). Beide Platten waren bei 3,4 % (n=19) der Proben kontaminiert. Dies behinderte aber nicht die Auswertung, da immer noch genug Platten der anderen Verdünnungsstufen für die Auswertung zur Verfügung standen.

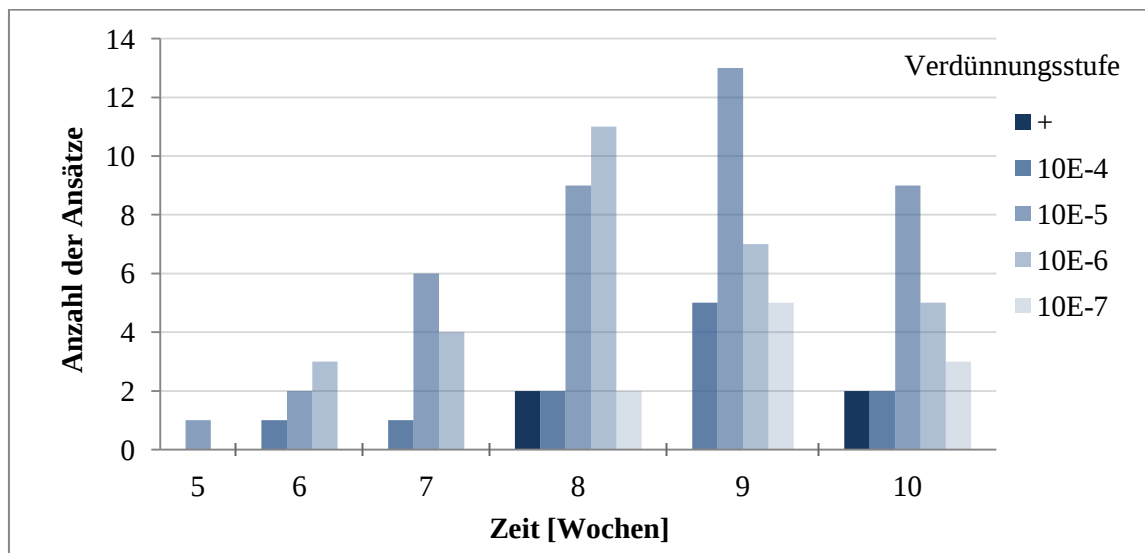


Abb. 9: Anzahl der kontaminierten Middlebrook 7H10-Platten bei der Anzucht aus FPTB-Medium Plus unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufen und des Zeitpunktes der Kontamination

Ergebnisse

Bei den Einmischversuchen in H-Milch wurden insgesamt 80 Middlebrook 7H10-Platten eingesetzt. Die Kontaminationsrate betrug 13,8 % (n=11). In 3,8 % (n=3) der Fälle waren beide Platten betroffen, dies behinderte aber auch hier nicht die Auswertung.

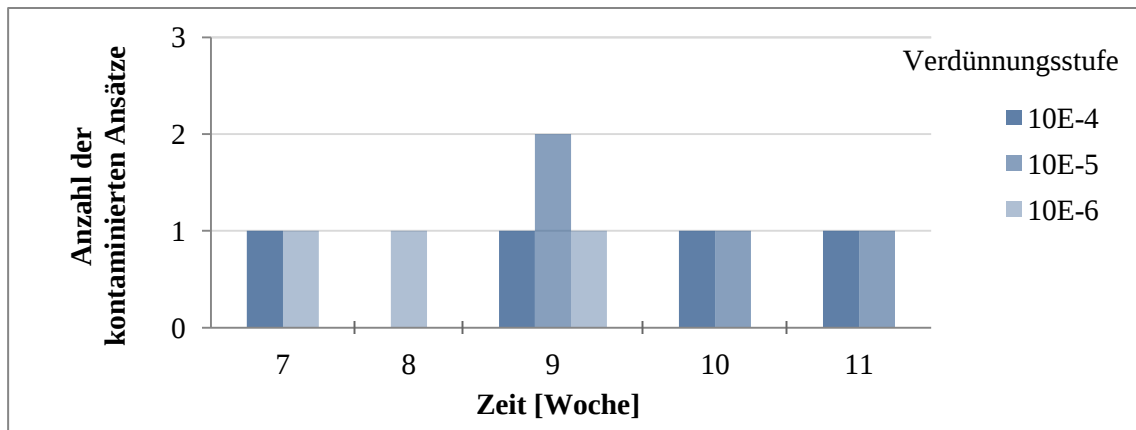


Abb. 10: Anzahl der kontaminierten Middlebrook 7H10-Platten bei der Anzucht aus H-Milch unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufen und des Zeitpunktes der Kontamination

Die Kontaminationsrate der HEYM-Röhrchen fiel mit 2,9 % (n=7) niedriger aus. Insgesamt wurden 240 HEYM-Röhrchen für die kulturelle Anzucht bei den Einmischversuchen mit Rohmilch und Säuglingsanfangsnahrung eingesetzt. 2,5 % (n=6) der Röhrchen trocknete nach einigen Wochen ein. Zusammen mit den kontaminierten Röhrchen konnten somit 5,4 % (n=13) aller HEYM-Röhrchen nicht ausgewertet werden, wobei aber auch hier genug auswertbare Röhrchen der anderen Verdünnungsstufen zur Verfügung standen.

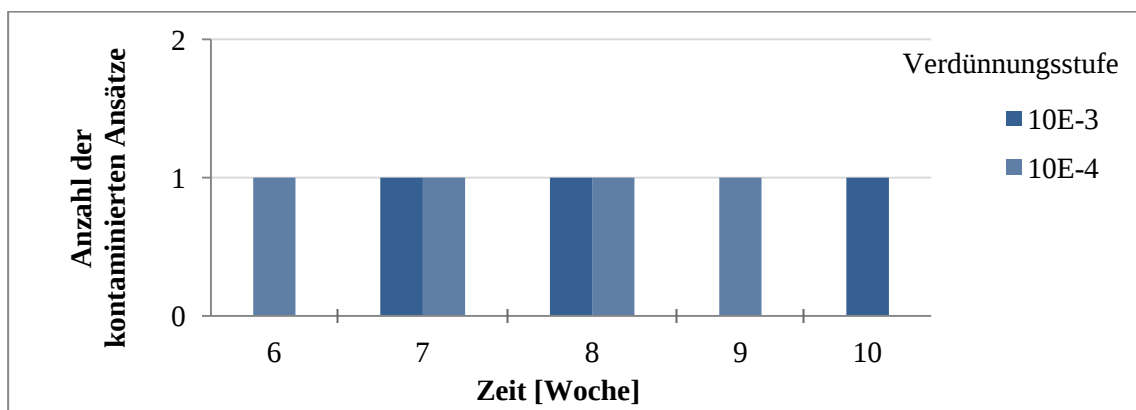


Abb. 11: Anzahl der kontaminierten HEYM-Röhrchen bei der Anzucht aus Rohmilch und Säuglingsanfangsnahrung unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufen und des Zeitpunktes der Kontamination

Für die kulturelle Anzucht auf Middlebrook 7H10-Agar und Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium wurde die Nachweisgrenze mittels logistischer Regressionsanalyse mit dem Programm BMDP6D bestimmt. Die Nachweisgrenze für artifiziell kontaminierte H-Milch auf Middlebrook 7H10-Agar lag bei $1,0 \times 10^1$ KbE/ml. Die Nachweisgrenze für artifiziell kontaminierte Rohmilch auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium lag bei $8,9 \times 10^1$ KbE/ml. Für die Einmischversuche in FPTB-Medium Plus und in Säuglingsanfangsnahrung konnte aufgrund der Datenlage keine logistische Regressionsanalyse durchgeführt werden (s. auch 4.2.3 Tab. 17 und Abb. 4).

4.2.8 Molekularbiologische Ergebnisse

a) Überprüfung der Verdünnungsreihe

Um die MAP-Konzentration der einzelnen Verdünnungsstufen der dekadischen Verdünnungsreihe zu überprüfen, wurde die Triplex Real-Time PCR nach Schönenbrücher *et al.* (2008) eingesetzt. Die DNS-Isolierung erfolgte mittels DNeasy® Blood & Tissue Kit (Fa. Qiagen) direkt aus der Verdünnungsreihe. Abb. 12 zeigt beispielhaft die Amplifikationssignale der Real-Time PCR der einzelnen Verdünnungsstufen (10^{-1} bis 10^{-7}) für den MAP-Stamm „Niebüll“. Die mittels kultureller Anzucht auf Middlebrook 7H10-Platten ermittelte Einmischkonzentration lag bei diesem Versuch bei $1,9 \times 10^7$ KbE/ml. Als positiv wurden nur Signalkurven gewertet, die den Schwellenwert überschritten und deren Ct-Wert (Threshold Cycle) ≤ 38 lag. Zusätzlich mussten die Signale der Positivkontrolle und der Aufbereitungskontrolle positiv sein. Die Negativkontrolle, der Leerwert des Mastermixes und der Aufbereitungsleerwert durften kein Signal erbringen. Außerdem musste die IAK bei negativen Proben ein positives Signal erzielen.

Nur wenn die Abstände zwischen den Ct-Werten der Verdünnungsstufen gleichmäßig waren, war eine Verdünnungsreihe für den jeweiligen Versuch geeignet.

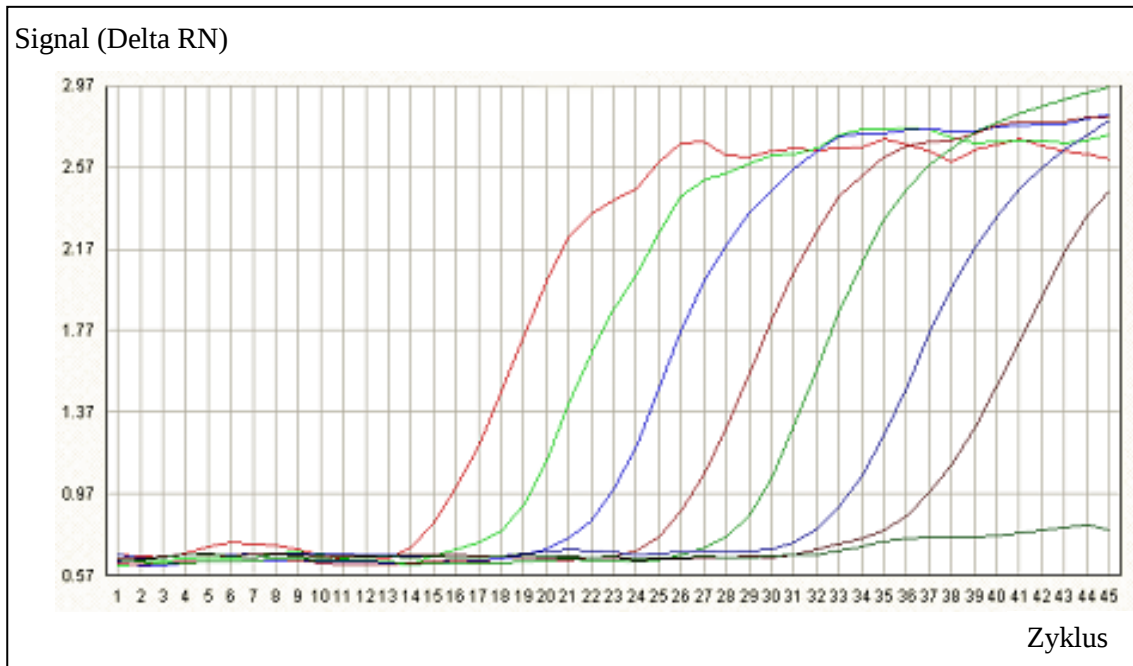


Abb. 12: Amplifikationssignale der Real-Time PCR (Marker F57) der dekadischen Verdünnungsreihe des MAP-Stammes „Niebüll“, Verdünnungsstufen 10⁻¹ bis 10⁻⁷

Zur besseren Anschaulichkeit ist in Abb. 13 die Standardkurve zu dieser Verdünnungsreihe dargestellt. Diese gibt die logarithmische Konzentration der isolierten MAP-DNS der einzelnen Verdünnungsstufen an.

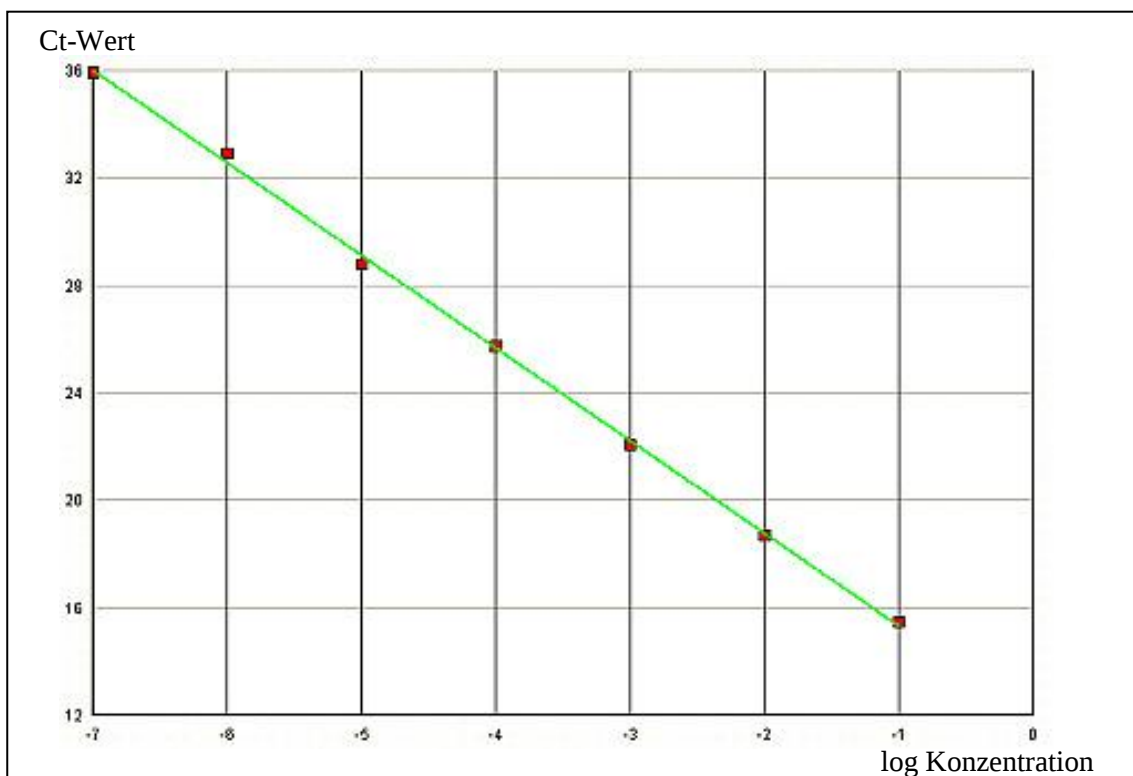


Abb. 13: Standardkurve der dekadischen Verdünnungsreihe des MAP-Stammes „Niebüll“

b) Kontrolle der Milch

Um sicherzustellen, dass die verwendete Milch (H-Milch und Rohmilch) und die verwendete Säuglingsanfangsnahrung frei von MAP-Zellen waren, wurde bei jedem Versuch je 1 ml native Milch/ Säuglingsanfangsnahrung im Doppelansatz mittels Real-Time PCR nach Schönenbrücher *et al.* (2008) getestet. Als Positivkontrolle diente jeweils Milch/Säuglingsanfangsnahrung gespikt mit der Verdünnungsstufe 10^{-1} (Doppelansatz). Bei der nativen Milch/Säuglingsanfangsnahrung konnte in keinem Fall MAP-DNS molekularbiologisch nachgewiesen werden, sie erwies sich somit als geeignet für die Versuche. Die Positivkontrollen waren in allen Fällen positiv.

c) Extraktion genomischer DNS aus Mykobakterienkulturen (HEYM)

Die Auswertung der HEYM-Röhrchen gestaltete sich mitunter als schwierig, da im Übergangsbereich zum Agar das Glas der Röhrchen teilweise mit Milchbestandteilen verschmutzt war. In diesen Bereichen konnten sehr kleine Kolonien nicht absolut sicher von Milchbestandteilen unterschieden werden. Deshalb wurden in unklaren Fällen Abschwemmungen von den HEYM-Röhrchen gemacht und mittels Real-Time PCR nach Schönenbrücher *et al.* (2008) untersucht. Ob die kulturelle Anzucht als positiv oder negativ gewertet wurde, wurde in diesen Fällen vom Ergebnis der PCR abhängig gemacht.

d) Kontrolle der Plaques beim FPTB-Assay

Da die Bakteriophagen beim FPTB-Assay nicht spezifisch MAP-Zellen, sondern auch andere Mykobakterien infizieren, wurden stichprobenartig Plaques und Bereiche von ganz/teilweise lysierten Platten mittels Real-Time PCR nach Schönenbrücher *et al.* (2008) untersucht. Insgesamt wurden bei allen Versuchen 102 Plaques bzw. ganz/teilweise lysierte Bereiche untersucht. Dabei konnte in zwölf Fällen (11,8 %) keine MAP-DNS in den Plaques bzw. ganz/teilweise lysierten Bereichen nachgewiesen werden. Die insgesamt erzielten Ergebnisse sind nach Einmischversuchen unterteilt in Tab. 18 wiedergegeben.

Tab. 18: Ergebnisse der molekularbiologisch mittels Real-Time PCR auf MAP-DNS getesteten Plaques und der getesteten ganz/teilweise lysierten Bereiche beim FPTB-Assay, unterteilt nach Einmischversuchen

	FPTB-Medium Plus (n=38)	H-Milch (n=16)	Rohmilch (n=32)	Säuglingsnahrung (n=16)
MAP-DNS nachgewiesen	28	15	31	16
Keine MAP-DNS nachgewiesen	10	1	1	0

Als Negativkontrolle wurden 10 µl ausgestanzter Agar im Doppelansatz mittels Real-Time PCR getestet. Hiermit sollte auch sichergestellt werden, dass MAP-DNS nicht von den Plaques in den umliegenden Agar diffundiert und dadurch zu falschen Ergebnissen führt. In fünf Fällen war einer der beiden Marker (F57 oder ISMav2) positiv, es wurde also MAP-DNS im Agar nachgewiesen. Die insgesamt erzielten Ergebnisse sind nach Einmischversuchen unterteilt in Tab. 19 wiedergegeben.

Tab. 19: Ergebnisse des molekularbiologisch auf MAP-DNS getesteten Agars beim FPTB-Assay, unterteilt nach Einmischversuchen

	FPTB-Medium Plus (n=38)	H-Milch (n=16)	Rohmilch (n=32)	Säuglingsnahrung (n=16)
MAP-DNS nachgewiesen	4	1	0	0
Keine MAP-DNS nachgewiesen	34	15	32	16

Um auszuschließen, dass die PCR möglicherweise die Bakteriophagen nachweist, wurden außerdem bei den ersten vier Versuchen 50 µl Bakteriophagen aus dem Kit mittels Real-Time PCR getestet. In allen vier Fällen wurde keine MAP-DNS nachgewiesen. Somit konnte sichergestellt werden, dass die PCR diesbezüglich kein falsch-positives Signal erbringt.

4.3 Untersuchung von Säuglingsanfangsnahrung aus dem Handel

Nachdem die einzelnen Methoden für die Matrix Milch und Säuglingsanfangsnahrung validiert worden waren, folgte die Untersuchung eines repräsentativen Spektrums (n=16) von Säuglingsanfangsnahrung („Pre“ und „HA Pre“) aus dem deutschen Handel. Die Wahl der Methode richtete sich nach der niedrigsten Nachweisgrenze bezogen auf die Matrix Milch. Alle Produkte wurden im Doppelansatz mittels FPTB-Assay untersucht und kulturell auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium mit Mykobaktin J (HEYM) angezüchtet (Gold-Standard). Die Untersuchungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Frau Molitor, die im Rahmen ihrer Doktorarbeit die molekularbiologischen Untersuchungen der Produkte mittels TaqMan®-Real Time PCR („MAPsureEasy“) durchführte (Weirich *et al.*, 2011).

In allen 16 untersuchten Produkten konnten kulturell, molekularbiologisch und mittels Phagen-Assay keine MAP-Zellen nachgewiesen werden. Die Positivkontrollen (Doppelansatz) waren jeweils positiv und die Negativkontrollen (Doppelansatz) negativ.

Beim Phagen-Assay waren auf insgesamt fünf Platten Plaques zu sehen, dabei waren die Plaques bei zwei Produkten im Doppelansatz und bei einem Produkt auf einer der Platten zu sehen

(s. Tab. 20). Die Plaques sahen dabei eher nach einer Kontamination aus, da sich in der Mitte eines jeden Plaques eine stecknadelspitzgroße, weiße, glänzende Kolonie befand (s. Abb. 14). Die Plaques eines Ansatzes wurden deshalb gepoolt und anschließend mittels Real-Time PCR untersucht. Bei allen untersuchten Pools konnte molekularbiologisch keine MAP-DNS nachgewiesen werden.

Tab. 20: Anzahl der Plaques pro Platte beim FPTB-Assay der untersuchten Säuglingsanfangsnahrung aus dem Handel

Produkt	Ansatz a)	Ansatz b)
Nr. 9	20	9
Nr. 13	19	17
Nr. 15	Ø	1

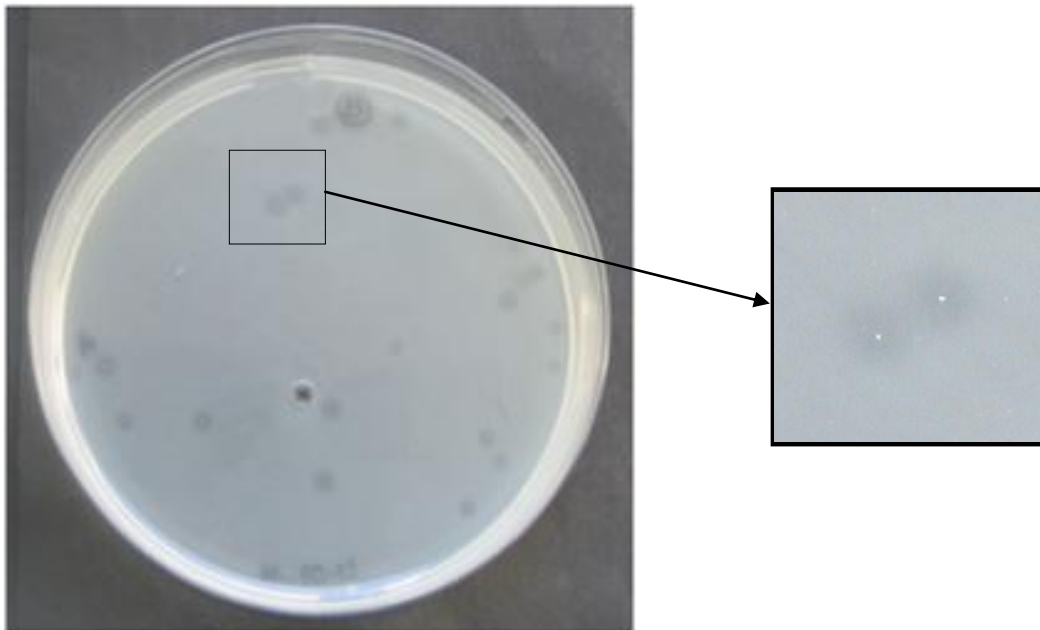


Abb. 14: Untersuchte Säuglingsanfangsnahrung aus dem deutschen Handel: Plaques mit stecknadelspitzgroßen, weißen Kolonien in der Mitte

5 DISKUSSION

5.1 Analyse der Vorversuche und der fluoreszenzmikroskopischen Färbemethoden

5.1.1 CTC-/AO-Färbung

Im Rahmen der Vorversuche wurde zunächst geklärt, welches die beste CTC-Konzentration zum Anfärben von MAP-Zellen ist. Es zeigte sich, dass eine Endkonzentration von 5 mM CTC das beste mikroskopische Bild lieferte. Bei niedrigeren Farbstoffkonzentrationen war die Fluoreszenz sehr schwach und somit schlecht auswertbar. Bei einer höheren Konzentration hatte CTC einen toxischen Effekt auf die MAP-Zellen, so dass prozentual mehr Bakterien nicht mehr lebensfähig waren.

Durch die Zugabe von Formaldehydlösung (Endkonzentration 0,1 %) vor dem CTC-Färbeschritt konnte die Intensität der roten Fluoreszenz der CTC-Formazan-Kristalle intensiviert werden. Die zugegebene Formaldehydlösung hatte dabei den Zweck, die Atmungsaktivität der Bakterien zu verstärken ("Stress").

Die in der Literatur beschriebene Neigung von MAP-Zellen zur Aggregatbildung aufgrund der lipophilen Zellwandeigenschaften (Foddai *et al.*, 2010a) war teilweise bei den angefärbten Präparaten zu sehen. Durch gründliches Vortexen mit Keramikkügelchen konnte die Aggregatbildung weitestgehend minimiert werden, so dass meist Gesichtsfelder ohne Aggregate gezählt werden konnten. Sofern nur kleine Aggregate vorhanden waren (≤ 10 MAP-Zellen), konnten diese Gesichtsfelder ausgezählt werden, da die einzelnen Bakterien deutlich voneinander abgegrenzt werden konnten. Die Auswertbarkeit war allerdings nicht gegeben, wenn größere Aggregate (> 20 MAP-Zellen) vorhanden waren, da sich die Zellen dann überlagerten und nicht mehr sicher einzeln abgegrenzt werden konnten. Deshalb muss bei der Durchführung der CTC-/AO-Färbung unbedingt darauf geachtet werden, dass die Aggregatbildung der MAP-Zellen durch ausreichendes Vortexen mit sterilen Keramik-Kügelchen minimiert wird. Außerdem ist auf eine optimierte Anzucht im Flüssignährmedium bis zur stationären Phase zu achten, was insbesondere die Zugabe von sterilen Keramikkügelchen in die Nährlösung, die Inkubation im Schüttelinkubator und tägliches Vortexen während der 4–6-wöchigen Inkubationszeit beinhaltet.

Ein großes Problem beim Anfärben von MAP-Zellen aus der Matrix Milch war das Auftreten einer starken unspezifischen Hintergrundfluoreszenz, die insbesondere durch Milchproteine hervorgerufen wurde. In der Literatur haben Gunasekera *et al.* (2000) eine 30–45-minütige Behandlung der Milch mit 0,05 mg Proteinase K beschrieben, um diese Hintergrundfluoreszenz zu minimieren. Die Einmischversuche zeigten aber, dass eine 30-minütige Einwirkzeit der Proteinase K zu lange war. Die Bildqualität war zwar gut, allerdings waren nahezu alle Bakterien nicht mehr lebensfähig. Nach einigen Versuchsreihen zeigte sich, dass eine Vorbehandlung des

Milch-Pellets mit 0,3 mg Proteinase K, deren Wirkung nach 15-sekündigem Vortexen mit 2 µl Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) gestoppt wurde, eine gute Bildqualität erbrachte, die eine deutliche Abgrenzung der MAP-Zellen von Farbstoffpartikeln und fluoreszierenden Milchbestandteilen ermöglichte.

Die statistische Korrelationsanalyse zeigte, dass zwischen der CTC-Färbung und den anderen eingesetzten Nachweismethoden (*BacLight*TM-Färbung, kulturelle Anzucht, FPTB-Assay) eine signifikant positive Korrelation bestand ($p \leq 0,05$). Diese signifikant positive Korrelation war sowohl bei den Einmischversuchen in FPTB-Medium Plus als auch in H-Milch und Rohmilch gegeben. Die Nachweisgrenzen für die kombinierte CTC-/AO-Färbung wurden mittels logistischer Regressionsanalyse bestimmt. Die Nachweisgrenze für artifiziell kontaminiertes FPTB-Medium Plus lag bei $7,4 \times 10^2$ KbE/ml, für artifiziell kontaminierte H-Milch bei $7,8 \times 10^2$ KbE/ml und für artifiziell kontaminierte Rohmilch bei $3,8 \times 10^3$ KbE/ml. Somit lag die Nachweisgrenze der kombinierten CTC-/AO-Färbung für die Gesamtmatrix Milch bei $1,7 \times 10^3$ KbE/ml (s. auch 4.2.3 Tab. 17 und Abb. 4). Die Ergebnisse der statistischen Korrelationsanalyse und der logistischen Regressionsanalyse zeigten, dass die kombinierte CTC-/AO-Färbung eine geeignete Methode zum Nachweis von MAP-Zellen in Milch darstellt.

Da mit der kombinierten CTC-/AO-Färbung sowohl der Anteil der lebenden MAP-Zellen als auch die Gesamtzahl der Mykobakterien in einer Probe in nur acht bis neun Stunden bestimmt werden kann, eignet sich diese Färbemethode insbesondere für den Einsatz im Rahmen von wissenschaftlichen Experimenten. Bei Einmischversuchen bietet diese neue Methode die Möglichkeit, die Ausgangskonzentration der MAP-Zellen bereits vor Durchführung des eigentlichen Experimentes zu ermitteln. Dies stellt einen enormen Vorteil gegenüber der sehr langwierigen kulturellen Anzucht dar, bei der man erst einige Wochen nach dem Experiment weiß, ob die Zahl der eingemischten MAP-Zellen der gewünschten Konzentration entsprach. Hervorzuheben ist, dass die CTC-/AO-Färbung einfach durchzuführen ist und die fluoreszenzmikroskopische Auswertung schnell erlernt werden kann. Diese Färbung kann in jedem Routinelabor, das mit einem Fluoreszenzmikroskop ausgestattet ist, durchgeführt werden. Die Untersuchungskosten einer Probe liegen mit circa 3 Euro unter denen für die kulturelle Anzucht auf HEYM (ca. 6,5 Euro). Außerdem besteht nicht wie bei der kulturellen Anzucht das Risiko, dass durch eine Kontamination bei der langwierigen Anzucht Proben eventuell nicht mehr auswertbar sind. Der Untersuchungszeitraum kann mit dieser neuen Färbemethode von mehreren Wochen, die für die kulturelle Anzucht notwendig sind, auf nur acht bis neun Stunden verkürzt werden. Voraussetzung ist allerdings, dass die MAP-Ausgangskonzentration über 10^3 KbE/ml liegt.

Da mit der kombinierten CTC-/AO-Färbung zwischen der Gesamtzellzahl und dem Anteil der lebenden MAP-Zellen unterschieden werden kann und die Bildqualität für Milch optimiert werden konnte, ist auch ein Einsatz dieser Färbemethode im Rahmen von Experimenten zur

Überlebensfähigkeit von MAP-Zellen in Milch denkbar. Einschränkend muss aber erwähnt werden, dass die Einmischkonzentration mindestens bei 10^4 KbE/ml liegen sollte, da die Nachweisgrenze für die Matrix Milch bei $1,7 \times 10^3$ KbE/ml lag ($7,8 \times 10^2$ KbE/ml für H-Milch und $3,8 \times 10^3$ KbE/ml für artifiziell kontaminierte Rohmilch). Zur Untersuchung nativer Milchproben (beispielsweise im Rahmen eines Herdenscreenings) oder zur Untersuchung von pasteurisierter Milch aus dem Handel eignet sich die neue Färbemethode somit nicht. Wenn man die in der Literatur beschriebenen Zahlen zugrunde legt, wonach subklinisch infizierte Tiere 2–8 MAP-Zellen/50 ml Milch ausscheiden können (Sweeney *et al.*, 1992), muss für Herdenscreenings anderen Methoden mit einer höheren Sensitivität der Vorzug gegeben werden. Im Hinblick auf Konsummilch ist zwar insbesondere bei mangelnder Melkhygiene ein zusätzlicher Eintrag von MAP-Zellen über Kot-Partikel in die Milch möglich, da erkrankte Tiere mit dem Kot bis zu 10^{12} MAP-Zellen/g und persistent infizierte Tiere bis zu 10^8 MAP-Zellen/g ausscheiden können (Chiodini *et al.*, 1984). Da es aber im Sammel-tank des Landwirtes und im Stapeltank der Molkerei zu Verdünnungseffekten kommt und durch die Pasteurisation der Milch eine Reduzierung eventuell vorhandener MAP-Zellen um mindestens 4–7 Zehnerpotenz-Stufen erreicht wird (Anonymous, 2010), liegen die zu erwartenden MAP-Zahlen jedoch auch hier deutlich unter der Nachweisgrenze der CTC-/AO-Färbung.

5.1.2 BacLight™-Färbung

Im Rahmen der Versuche wurde die bereits mehrfach in der Literatur zur Anfärbung von MAP-Zellen beschriebene BacLight™-Färbung (Dzieciol *et al.*, 2010; Gunasekera *et al.*, 2000) zusätzlich zur kombinierten CTC-/AO-Färbung eingesetzt, um zu überprüfen, ob die beiden Methoden miteinander korrelieren. Die BacLight™-Färbung ist ein kommerziell erhältliches fluoreszenzmikroskopisches Kit, mit dem zwischen der Gesamtzellzahl und den nicht mehr lebensfähigen Zellen unterschieden werden kann. Ein Vorteil dieser Färbung besteht in dem geringen Zeitbedarf von circa zwei bis drei Stunden zum Nachweis von MAP-Zellen in Milch sowie der einfachen Handhabung. Außerdem ist die BacLight™-Färbung mit ungefähr 2,70 Euro Materialkosten pro Probe im Vergleich zu den anderen im Rahmen dieser Versuche eingesetzten Methoden sehr preiswert. Nachteilig an diesem Kit ist allerdings, dass es nicht spezifisch für Mykobakterien ist, sondern alle Bakterienzellen, unabhängig von der Spezies, in einer Probe nachweist. Problematisch ist überdies, dass das Funktionsprinzip der BacLight™-Färbung nur auf der Membranintegrität vorhandener Zellen beruht. In einer Probe können aber lebende Zellen mit vorgeschädigter Zellwand vorhanden sein. In solchen Fällen kann es zu falschen Ergebnissen kommen, da diese Bakterien von dem Kit fälschlicherweise als nicht mehr lebensfähig angefärbt werden würden (Produkt Information, Live/Dead® BacLight™ Bacterial Viability Kit, Fa. Molecular Probes). Aufgrund der Problematik, dass von der BacLight™-Färbung auch andere Bakterien angefärbt werden, musste auf den Einsatz dieser Färbung bei den Einmischversuchen in

Rohmilch komplett verzichtet werden. Da neben den eingemischten MAP-Zellen auch die in der Milch vorhandene Begleitkeimflora angefärbt wurde, war eine Auswertung der Präparate nicht möglich. Bei den Einmischversuchen in FPTB-Medium Plus konnte gezeigt werden, dass zwischen der *BacLight*TM-Färbung und der kombinierten CTC-/AO-Färbung eine signifikant positive Korrelation bestand (s. Tab. 13). Die Nachweisgrenze lag mit $1,0 \times 10^3$ KbE/ml ungefähr im Bereich der Nachweisgrenze der CTC-/AO-Färbung ($7,4 \times 10^2$ KbE/ml). Die Nachweisgrenze der *BacLight*TM-Färbung für die Einmischversuche in H-Milch lag mit $1,1 \times 10^4$ KbE/ml sehr hoch, somit ist hier der kombinierten CTC-/AO-Färbung der Vorzug zu geben, deren Nachweisgrenze bei $7,8 \times 10^2$ KbE/ml lag. Die *BacLight*TM-Färbung hat im Rahmen dieser Versuche als Vergleichsmethode ihren Zweck erfüllt. Bei Einmischversuchen eignet sie sich aufgrund der guten Handhabbarkeit durchaus zur Bestimmung der Ausgangskonzentration der MAP-Zellen, zur Untersuchung von H-Milchproben ist sie der kombinierten CTC-/AO-Färbung bezüglich der Nachweisgrenze allerdings deutlich unterlegen und somit nicht zu empfehlen. Zur Untersuchung von Rohmilchproben ist die *BacLight*TM-Färbung ungeeignet, da neben den MAP-Zellen alle sonstigen, in der Probe vorhandenen Bakterien-Zellen angefärbt werden, wodurch eine Auswertung unmöglich wird.

5.2 Analyse der Hauptversuche

5.2.1 Ermittlung der Einmischkonzentration

Die Ermittlung der Einmischkonzentration gestaltet sich bei MAP relativ schwierig. Oftmals wird die konzentrierte MAP-Lösung zunächst mittels Photometer auf einen ungefähren Wert voreingestellt. Die Angabe der eigentlichen Einmischkonzentration unterscheidet sich dann je nach Arbeitsgruppe und Ziel des Versuches. Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten: Entweder wird die ermittelte Gesamtzahl der MAP-Zellen angegeben oder nur die Zahl der lebenden MAP-Zellen. Die Gesamtzellzahl wird dabei meist mittels Zählkammer oder molekularbiologischer Methoden ermittelt. Die Ermittlung der Anzahl der lebenden MAP-Zellen erfolgt in der Regel über die kulturelle Anzucht. Insbesondere bei Einmischversuchen, bei denen es um die Überlebensfähigkeit von MAP-Zellen geht, ist es unabdingbar, sowohl die Gesamtzellzahl als auch den Anteil der lebenden Zellen zu kennen. Deshalb wurden im Rahmen der eigenen Versuche mehrere Methoden parallel eingesetzt, um die Einmischkonzentration zu ermitteln und zu überprüfen, ob die kombinierte CTC-/AO-Färbung zu diesem Zweck eingesetzt werden kann. Zunächst wurde der ungefähre Ausgangswert über die optische Dichte mittels Photometer eingestellt. Erfahrungsgemäß entspricht eine optische Dichte von 10,0 % Transmission ungefähr 10^7 KbE/ml. Bevor der eigentliche Versuch durchgeführt wurde, wurde dieser ungefähre Wert mittels „Neubauer improved“-Zählkammer überprüft. Außerdem wurde aus der Verdünnungsreihe die kombinierte CTC-/AO-Färbung sowie die kulturelle Anzucht auf

Middlebrook 7H10-Agar durchgeführt. Die oben genannten Verfahren wurden einer statistischen Korrelationsanalyse unterzogen, um herauszufinden, welche Methode am geeignetsten zur Ermittlung der Einmischkonzentration ist. Bei der Korrelationsanalyse wurde auch berücksichtigt, ob es Stamm-Unterschiede gibt. Die Ergebnisse der statistischen Korrelationsanalysen zeigten, dass beim Vergleich der Parameter „optische Dichte“ vs. „Zählkammer“ insgesamt keine Korrelation bestand ($p \geq 0,05$). Nur wenn der Feldstamm „Niebüll“ allein betrachtet wurde, zeigte sich eine signifikant positive Korrelation ($p \leq 0,05$). Der statistische Vergleich der Parameter „optische Dichte“ vs. „kulturelle Anzucht aus der Verdünnungsreihe“ ergab keine Korrelation. Die statistische Korrelationsanalyse der Parameter „Zählkammer“ vs. „kulturelle Anzucht aus der Verdünnungsreihe“ ergab eine signifikant positive Korrelation ($p \leq 0,05$), sofern alle Stämme bei der Analyse berücksichtigt wurden. Beim Vergleich dieser Parameter gab es allerdings große Unterschiede je nach Stamm und beim Feldstamm D 8168/02 zeigte sich keine Korrelation zwischen den Parametern „Zählkammer“ und „kulturelle Anzucht aus der Verdünnungsreihe“. Beim Vergleich der Parameter „kulturelle Anzucht aus der Verdünnungsreihe“ vs. „CTC-Färbung“ zeigte sich eine signifikant positive Korrelation ($p \leq 0,05$), sowohl über alle Stämme hinweg, als auch für jeden Stamm einzeln betrachtet. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass mit Hilfe der optischen Dichte zwar ein ungefährender Wert voreingestellt werden kann, die exakte Einmischkonzentration aber in jedem Fall durch eine zusätzliche Methode ermittelt werden muss. Die Zählkammer eignet sich zu diesem Zweck nur bedingt. Man kann hiermit nur die Gesamtzellzahl ermitteln. Diese lag bei den Versuchen aber zwischen circa einer halben bis eineinhalb Zehnerpotenzen über dem Wert, der mittels kultureller Anzucht für die Zahl der lebenden MAP-Zellen ermittelt wurde. Diese Unterschiede zwischen den mittels Zählkammer und kultureller Anzucht ermittelten Werten wurden bereits in der Literatur beschrieben und betrugen bis zu zwei Zehnerpotenzstufen (Dzieciol *et al.*, 2010). Außerdem gibt es je nach eingesetztem Stamm starke Unterschiede in der Korrelation beim Vergleich der Parameter „Zählkammer“ vs. „kultureller Anzucht auf Middlebrook 7H10-Agar“ und bei dem aus Kot isolierten Feldstamm D 8168/02 bestand keine signifikante Korrelation für diese Parameter. Somit kann die Zählkammer zur Ermittlung der Einmischkonzentration nicht empfohlen werden.

Bei Einmischversuchen, bei denen die Angabe der Anzahl der lebenden MAP-Zellen eine Rolle spielt, wird momentan meist der mittels kultureller Anzucht ermittelte Wert angegeben (Foddai *et al.*, 2010; Grant *et al.*, 2005; Rademaker *et al.*, 2007). Problematisch ist hierbei, dass die kulturelle Anzucht bei Laborstämmen mindestens sechs bis acht Wochen Zeit in Anspruch nimmt und bei Feldstämmen sogar zehn Wochen und länger andauern kann. Dies bedeutet, dass man zum Zeitpunkt des Versuches nicht sicher weiß, ob die Einmischkonzentration wirklich im gewünschten Bereich liegt. Außerdem besteht bei der langen Inkubationszeit immer die Gefahr der Kontamination der Platten, insbesondere mit Schimmelpilzen. Darüber hinaus können

lebensfähige, aber nicht kultivierbare Zellen (englisch: viable but non-culturable, VBNC-Zellen) mit der kulturellen Anzucht nicht erfasst werden (Gunasekera *et al.*, 2002).

Deshalb wurde bei dieser Versuchsreihe getestet, ob sich die kombinierte CTC-/AO-Färbung zur Ermittlung der Einmischkonzentration eignet. Mit dieser fluoreszenzmikroskopischen Färbemethode kann neben der Gesamtzahl an Mykobakterien gleichzeitig die Zahl der lebenden MAP-Zellen bestimmt werden. Das Ergebnis liegt bereits nach acht bis neun Stunden vor. Die Versuche zeigten, dass beim Vergleich der Parameter „kulturelle Anzucht auf Middlebrook 7H10-Agar“ vs. „CTC-Färbung“ eine signifikant positive Korrelation besteht.

Die kombinierte CTC-/AO-Färbung ist somit eine geeignete Methode, um bei Einmischversuchen die langwierige kulturelle Anzucht zur Ermittlung der Einmischkonzentration zu ersetzen, sofern die Ausgangskonzentration über 10^3 KBE/ml liegt.

5.2.2 FASTPlaqueTB™-Assay

Der nach Foddai *et al.* (2009) modifizierte FASTPlaqueTB™ (FPTB)-Assay ist eine schnelle Methode, um lebensfähige MAP-Zellen in nur 36–48 Stunden in Milch nachzuweisen. Die Handhabung ist einfach, die Nachweisgrenze lag für die Matrix Milch im Bereich von 9–17 PFU/ml. Dies bestätigt die Ergebnisse von Foddai *et al.* (2009), bei denen die Nachweisgrenze bei Einmischversuchen in H-Milch bei 1–10 PFU/ml lag. Ein Nachteil besteht allerdings darin, dass der Assay nicht spezifisch für MAP-Zellen ist, da die eingesetzten Bakteriophagen auch andere Mykobakterien infizieren. Deshalb wurde der Assay mit einer MAP-spezifischen Real-Time PCR kombiniert. Dies erklärt auch die Unterschiede bezüglich der benötigten Zeit zum Nachweis von MAP-Zellen in Milch. Sofern keine MAP-Zellen in einer Probe vorhanden waren, lag das Ergebnis nach 36 Stunden vor. Wenn Plaques auf einer Platte sichtbar waren, schloss sich die Real-Time PCR an, so dass das Ergebnis erst nach 48 Stunden vorlag. Auf die Ergebnisse der Real-Time PCR wird unter der Nr. 5.2.3 eingegangen.

Problematisch beim Nachweis von MAP-Zellen in Rohmilch und Säuglingsanfangsnahrung mittels FPTB-Assay war die Kontamination von Platten, trotz vorheriger Behandlung der Milch/Säuglingsanfangsnahrung mit dem vom Hersteller empfohlenen antibiotischen/antimykotischen NOA-Supplement. Bei den Rohmilchversuchen waren 7,6 % der Platten und bei den Versuchen mit Säuglingsanfangsnahrung 12,5 % der Platten mit stecknadelspitzgroßen bis 1 mm großen, runden, weißen, glänzenden Kolonien kontaminiert. Dies machte in 2,9 % der Platten (Rohmilch) bzw. 3,6 % der Platten (Säuglingsanfangsnahrung) die Auswertung unmöglich. Bereits Foddai *et al.* (2011) wiesen auf dieses Problem hin. Möglicherweise kann die Zugabe von BD BBL™ MGIT™ PANTA™ an Stelle von NOA-Supplement dieses Problem lösen. Dazu wären aber weitere Untersuchungen diesbezüglich notwendig (Foddai *et al.*, 2011).

Die Kosten für den FPTB-Assay belaufen sich auf circa 3,40 Euro, ggf. zuzüglich den Kosten für die PCR und sind damit vergleichbar mit den Kosten, die bei der kulturellen Anzucht auf HEYM

anfallen. Allerdings muss angemerkt werden, dass die Anschaffungskosten für Geräte, Polymerase u. ä. bei der PCR sehr hoch sind. Da die Handhabung des FPTB-Assay einfach ist und alle notwendigen Materialien (außer Materialbedarf für die PCR) im Kit enthalten sind, kann der Assay in jedem Routinelabor, das über geeignete PCR-Nachweismethoden verfügt, durchgeführt werden. Der FPTB-Assay kann als schnelle Methode zum Nachweis lebensfähiger MAP-Zellen aus Milch empfohlen werden. Insbesondere wegen der sehr niedrigen Nachweisgrenze stellt der FPTB-Assay nicht nur bei Einmischversuchen, sondern auch zur Untersuchung nativer Proben eine gute Alternative zur langwierigen kulturellen Anzucht dar (Foddai *et al.*, 2010a).

5.2.3 Molekularbiologische Ergebnisse (Untersuchungen der Plaques des FPTB-Assay)

Da die Bakteriophagen beim FPTB-Assay auch andere Mykobakterien infizieren, wurden stichprobenartig Plaques und Bereiche von ganz/teilweise lysierten Platten mittels Real-Time PCR nach Schönenbrücher *et al.* (2008) untersucht. Insgesamt wurden bei allen Versuchen 102 Plaques bzw. ganz/teilweise lysierte Bereiche untersucht. Dabei konnte in zwölf Fällen (11,8 %) keine MAP-DNS nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle wurde jeweils 10 µl ausgestanzter Agar im Doppelansatz mittels Real-Time PCR getestet. Hiermit sollte darüber hinaus sichergestellt werden, dass MAP-DNS nicht von den Plaques in den umliegenden Agar diffundiert und dadurch zu falsch-positiven Ergebnissen führt. In 5 Fällen war einer der beiden Marker (F57 oder ISMav2) positiv, es konnte also MAP-DNS im Agar nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Untersuchung von Plaques mittels Real-Time PCR zu falsch-negativen Ergebnissen führen kann. Dies ist aber nicht ungewöhnlich, weil keine der gängigen MAP-Nachweismethoden eine 100 % analytische und diagnostische Sensitivität aufweist. Da in fünf Fällen MAP-DNS im Agar nachgewiesen wurde, besteht eventuell die Möglichkeit, dass MAP-DNS von den Plaques in den umliegenden Agar diffundiert. Dies wurde allerdings bislang weder in der Literatur noch vom Hersteller beschrieben, so dass systematische Untersuchungen durchgeführt werden müssten, um diesen Sachverhalt näher zu klären. Falsch-negative Ergebnisse durch eventuell vorhandene Inhibitoren im Agar, die zu einer Hemmung der PCR führen, konnten ausgeschlossen werden, da die interne Amplifikationskontrolle in allen fünf Fällen in Ordnung war. Um auszuschließen, dass die Real-Time PCR nach Schönenbrücher *et al.* (2008) möglicherweise die Bakteriophagen nachweist, wurden bei den ersten vier Versuchen 50 µl Bakteriophagen aus dem Kit mittels Real-Time PCR getestet. In allen vier Fällen wurde keine MAP-DNS nachgewiesen. Somit konnte sichergestellt werden, dass die PCR diesbezüglich kein falsch-positives Signal erbringt.

5.2.4 Kulturelle Anzucht

Die kulturelle Anzucht gilt nach wie vor als Gold-Standard in der Mykobakterien-Diagnostik. Aufgrund mehrerer Faktoren wird sie aber nicht als ideale Nachweismethode angesehen

(Anonymous, 2010). Dazu zählt, dass die kulturelle Anzucht aufgrund des langsamen Wachstums (mehrere Wochen bis Monate) und der hohen Nährmedienansprüche von Mykobakterien zeitaufwendig und kostenintensiv ist. Aufgrund der langen Anzuchtdauer kommt es häufig zu einer Kontamination der Nährmedien, insbesondere durch Schimmelpilze. Durch den notwendigen Dekontaminationsschritt zur Abtötung der in Rohmilch vorhandenen Begleitkeimflora fällt die Zahl der nachgewiesenen MAP-Zellen möglicherweise zu niedrig aus (Grant *et al.*, 2005). Darüber hinaus können nach erfolgter Pasteurisation lebensfähige, aber nicht kultivierbare Zellen (VBNC-Zellen) in der Milch vorhanden sein, die mittels kultureller Anzucht nicht erfasst werden können (Gunasekera *et al.*, 2002).

Im Rahmen der eigenen Versuche hat sich bestätigt, dass die kulturelle Anzucht aus Milch einige Schwachpunkte birgt. Die Auswertung der HEYM-Röhrchen war teilweise problematisch, da insbesondere einzelne kleine, weiße Kolonien nur schwer von Milchbestandteilen unterschieden werden konnten, besonders wenn Reste von Milchbestandteilen Teile der Glaswand des Röhrchens beschmutzten. Bei den Verdünnungsstufen 10^{-3} und 10^{-4} ergab sich außerdem das Problem, dass teilweise nach einigen Wochen Inkubationszeit keine Einzelkolonien mehr zu sehen waren, sondern sich im unteren Drittel des HEYM-Röhrchens ein erhabener, dichter, leicht feuchter Bereich bildete. Um sicher zu stellen, dass es sich hierbei um angrenzende MAP-Kolonien handelt, mussten von solchen Röhrchen Abschwemmungen gemacht werden, die dann mittels Real-Time PCR auf das Vorhandensein von MAP-DNS überprüft wurden. Da bei Rohmilch und Säuglingsanfangsnahrung ein Dekontaminationsschritt vor der kulturellen Anzucht unabdingbar war, um die vorhandene schnell wachsende Begleitkeimflora abzutöten, konnte auf die Verwendung der HEYM-Röhrchen allerdings nicht verzichtet werden. Diese kommerziell erhältlichen, eigelbhaltigen Nährmedien mit Mykobaktinzusatz neutralisieren nämlich die bakteriostatische Wirkung des Dekontaminationsmittels (Akineden *et al.*, 2011; Merkal und Curran, 1974; Stachelscheid, 1989). Whittington *et al.* (2011) empfehlen bei der kulturellen Anzucht von MAP-Zellen den Einsatz modifizierter Middlebrook 7H10-Agarplatten, die Eigelb enthalten. Diese könnten eventuell eine gute Alternative zu den HEYM-Röhrchen darstellen. Bei den eigenen Untersuchungen wurden Middlebrook 7H10-Agarplatten nur zur kulturellen Anzucht von MAP-Zellen aus der Verdünnungsreihe und aus H-Milch benutzt, da die in der institutseigenen Nährbodenküche hergestellten Platten kein Eigelb enthielten. Die Auswertung der Middlebrook 7H10-Agarplatten gestaltete sich aufgrund der guten Auszählbarkeit der Kolonien deutlich einfacher, als die der HEYM-Röhrchen. Eine molekularbiologische Bestätigung erwies sich bei den Middlebrook 7H10-Platten als nicht erforderlich. Um eine Austrocknung der Platten bei der langen Inkubationszeit zu verhindern, erwies es sich als ausreichend, den Agar etwas dicker zu gießen (35 mm), Petrischalen ohne Entlüftungsnocken zu verwenden, die Platten mit Parafilm zu umwickeln und in einem Plastikbeutel verschlossen in den Brutschrank zu stellen.

Allerdings lag die Kontaminationsrate der Middlebrook 7H10-Platten etwas höher als die der HEYM-Röhrchen. Eine Kontamination der Nährmedien, bei den Middlebrook-Platten insbesondere mit Schimmelpilzen, trat ab der fünften Woche auf (Abb. 9 bis 11). Die Kontaminationsrate der Middlebrook 7H10-Platten aus den Verdünnungsreihen betrug 17,2 %, wobei beide Platten in 3,4 % der Fälle kontaminiert waren. Bei den Einmischversuchen in H-Milch betrug die Kontaminationsrate 13,8 %, in 3,8 % der Fälle waren beide Platten betroffen. Da von der Kontamination sowohl die Platten der Verdünnungsreihe als auch der H-Milch betroffen waren, ist davon auszugehen, dass es sich bei dem Schimmelbefall um eine interne Laborkontamination handelt. Bei den meisten Middlebrook Platten trat eine (teilweise recht starke) Kondenswasser-Bildung am Deckel auf. Auch bei sehr vorsichtiger Handhabung ließ es sich bei der Kontrolle der Platten und der Erneuerung des Parafilms nicht vollständig vermeiden, dass Kondenswasser mit dem Agar in Berührung kam.

Die Kontaminationsrate der HEYM-Röhrchen fiel mit 2,9 % deutlich niedriger aus. Hier trat nicht wie bei den Middlebrook-Platten ein Befall mit Schimmelpilzen auf, sondern es kam trotz vorheriger Dekontamination zur Überwucherung des Agars durch die schnell wachsende Begleitkeimflora. Da 2,5 % der Röhrchen nach einigen Wochen eintrockneten, konnten insgesamt 5,4 % aller HEYM-Röhrchen nicht zur Auswertung herangezogen werden. Um die Kontaminationsrate bei den HEYM-Röhrchen möglichst gering zu halten, sollte unbedingt auf eine gute Melkhygiene geachtet werden, damit die Milch nicht noch zusätzlich durch Kot-Partikel verschmutzt wird.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die kulturelle Anzucht bei MAP mindestens im Doppelansatz, insbesondere bei der Verwendung von Agar-Platten besser noch im Dreifachansatz erfolgen sollte. Die Nachweisgrenze der kulturellen Anzucht lag für artifiziell kontaminierte H-Milch (auf Middlebrook 7H10-Agar) bei $1,0 \times 10^1$ KbE/ml. Die Nachweisgrenze für artifiziell kontaminierte Rohmilch (auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium) lag bei $8,9 \times 10^1$ KbE/ml. Die Nachweisgrenze der kulturellen Anzucht zum Nachweis von MAP-Zellen aus H-Milch ist also vergleichbar mit der des Phagen-Assay (s. Nr. 5.2.2). Aufgrund des enormen Zeitaufwands bei der kulturellen Anzucht (z. B. wöchentliche Kontrolle der Nährmedien) und der extrem langen Kultivierungsdauer von mehreren Wochen bis Monaten, ist dem Phagen-Assay zum Nachweis von MAP-Zellen in Milch der Vorzug zu geben. Ein entscheidender Vorteil bleibt bei der kulturellen Anzucht allerdings: Sie ist momentan die einzige Methode bei der die gewachsenen Kolonien für eine weitere Charakterisierung der MAP-Stämme herangezogen werden können.

5.3 Analyse der Untersuchung von Säuglingsanfangsnahrung aus dem deutschen Handel

Säuglingsnahrung wurde im Vergleich zu Milch bislang kaum untersucht. In der Tschechischen Republik wurde MAP-DNS in Säuglingsnahrung nachgewiesen (Hruska *et al.*, 2005 und 2011). Dabei wurden 51 Produkte von zehn Produzenten aus sieben verschiedenen EU-Ländern mittels Real-Time PCR untersucht. In 25 Proben (49 %) wurde der Marker IS900 und in 18 Proben (35,3%) der Marker F57 nachgewiesen. Die Konzentration an MAP-DNS lag im Bereich von $4,8 \times 10^1$ bis $3,3 \times 10^4$ Zellen pro Gramm getrockneter Säuglingsnahrung. Diese Ergebnisse müssen allerdings vorsichtig interpretiert werden, da es sich möglicherweise auch um eine interne Labor-Kontamination handeln könnte. Außerdem wurde in der Literatur mehrfach beschrieben, dass bei der DNS Insertionssequenz IS900 Kreuzreaktionen zu nicht-MAP-Mykobakterien auftreten können, die zu falsch-positiven Ergebnissen führten (Cousins *et al.*, 1999; Englund *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002; Vansnick *et al.*, 2004). Solche Kreuzreaktionen könnten durchaus den doch sehr deutlichen Unterschied der positiven Proben zwischen den beiden Markern erklären.

Im Rahmen der eigenen Untersuchungen wurde im Anschluss an die Einmischversuche ein repräsentatives Spektrum (n=16) von Säuglingsanfangsnahrung („Pre“ und „HA Pre“) aus dem deutschen Handel untersucht. Alle 16 Produkte wurden im Doppelansatz mittels FASTPlaqueTB™-Assay untersucht und kulturell auf Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium angezüchtet. Die Untersuchungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Frau Molitor, die im Rahmen ihrer Doktorarbeit die molekularbiologischen Untersuchungen der Produkte mittels TaqMan®-Real Time-PCR („MAPsureEasy“, Fa. TransMIT) durchführte (Weirich *et al.*, 2011).

In allen 16 untersuchten Produkten konnten kulturell, molekularbiologisch und mittels Phagen-Assay keine MAP-Zellen nachgewiesen werden. Die Positivkontrollen (Doppelansatz) waren jeweils positiv und die Negativkontrollen (Doppelansatz) negativ.

Diese Ergebnisse bestärken die Annahme, dass es sich bei der vergleichsweise hohen Anzahl positiv auf MAP-DNS getesteten Säuglingsnahrungsmittel-Proben aus der Tschechischen Republik um eine interne Laborkontamination oder falsch-positive Proben handelt. Zur Abklärung dieses Sachverhaltes wären Untersuchungen von Säuglingsnahrungsmitteln von anderen Arbeitsgruppen wünschenswert.

6 SCHLUSSFOLGERUNGEN

- Mit der kombinierten CTC-/Auramin Orange-Färbung steht die Entwicklung einer einfachen, schnellen und kostengünstigen Methode zum Nachweis von MAP-Zellen zur Verfügung.
- Mit dieser neuen fluoreszenzmikroskopischen Färbemethode kann sowohl der Anteil der lebenden MAP-Zellen als auch die Gesamtzahl der Mykobakterien in einer Probe in nur acht bis neun Stunden bestimmt werden.
- Die kombinierte CTC-/AO-Färbung ist eine geeignete Methode um bei Einmischversuchen die langwierige kulturelle Anzucht zur Ermittlung der Einmischkonzentration zu ersetzen, sofern die Ausgangskonzentration über 10^3 KbE/ml liegt.
- Wird die CTC-/AO-Färbung zum Nachweis von MAP-Zellen in Milch eingesetzt, muss die Milch zur Minimierung der unspezifischen Hintergrundfluoreszenz, die insbesondere durch die Milchproteine hervorgerufen wird, vorbehandelt werden. Als geeignet erwies sich eine Vorbehandlung des Pellets mit 0,3 mg Proteinase K, deren Wirkung nach 15-sekündigem Vortexen mit 2 µl Phenylmethylsulfonylfluorid abgestoppt wird.
- Bei der Untersuchung eines repräsentativen Spektrums (n=16) von Säuglingsanfangsnahrung aus dem deutschen Handel konnten in keinem der Produkte MAP-Zellen nachgewiesen werden.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* (MAP) ist der kausale Erreger der Paratuberkulose der Wiederkäuer. Seit 1913 wird in der Fachliteratur eine Mitbeteiligung von MAP an der Entstehung von Morbus Crohn, einer chronischen Darmentzündung beim Menschen, kontrovers diskutiert. Neben direktem Kontakt zu mit MAP infizierten Tieren ist eine Exposition des Menschen gegenüber MAP über Lebensmittel tierischer und pflanzlicher Herkunft sowie Wasser möglich. Im Fokus stehen insbesondere Milch und Milchprodukte, bei denen MAP bei einer Vielzahl von Untersuchungen nachgewiesen werden konnte (Anonymous, 2010; Grant, 2010; Slana *et al.*, 2008a). Derzeit gibt es keine ideale Methode zum Nachweis von MAP-Zellen in einer Probe. Um eine exakte Bestimmung der Anzahl lebensfähiger MAP-Zellen gewährleisten zu können, ist die Entwicklung neuer Nachweismethoden notwendig (Anonymous, 2010).

Das Ziel dieser Doktorarbeit bestand deshalb in der Entwicklung einer einfachen, schnellen und kostengünstigen fluoreszenzmikroskopischen Methode zum Nachweis lebensfähiger MAP-Zellen in Milch und Milchprodukten. Durch die Kombination aus CTC- (5-Cyano-2,3-di-(p-tolyl)-Tetrazolium Chlorid) und Auramin Orange (AO)-Färbung kann sowohl die Gesamtzellzahl an Mykobakterien als auch differenziert der Anteil respiratorisch aktiver Zellen in einer Probe in nur acht bis neun Stunden erfasst werden. Die Nachweisgrenze für die kombinierte CTC-/AO-Färbung lag bei $7,4 \times 10^2$ KbE/ml für artifiziell kontaminiertes FPTB-Medium Plus, bei $7,8 \times 10^2$ KbE/ml für artifiziell kontaminierte H-Milch und bei $3,8 \times 10^3$ KbE/ml für artifiziell kontaminierte Rohmilch (Nachweiswahrscheinlichkeit 95 %). Die CTC-/AO-Färbung eignet sich insbesondere für den Einsatz bei wissenschaftlichen Einmischversuchen zur Ermittlung der Einmischkonzentration. Dabei kann diese neue Methode als Ersatzmethode zur langwierigen kulturellen Anzucht dienen, sofern die Ausgangskonzentration der MAP-Zellen über 10^3 KbE/ml liegt.

Um eine Exposition von Säuglingen mit MAP über Nahrungsmittel besser abschätzen zu können, wurde ein repräsentatives Spektrum an Säuglingsanfangsnahrungsmitteln („Pre“ und „HA Pre“) aus dem deutschen Handel mittels kultureller Anzucht auf Herrold's Egg Yolk-Medium, FASTPlaqueTB™-Assay und TaqMan®-Real-Time PCR* untersucht. Bei keinem der 16 untersuchten Produkte konnten MAP-Zellen nachgewiesen werden.

* Die molekularbiologischen Untersuchungen wurden von Frau Molitor (IFTN Gießen) durchgeführt.

8 SUMMARY

Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* (MAP) is the causative agent of paratuberculosis of ruminants. Since 1913 there is a controversial discussion in the scientific literature whether MAP is involved in the pathogenesis of Crohn's disease, which is a chronic enteritis of humans. In addition to direct contact to MAP infected animals, humans may be exposed to MAP by consumption of contaminated food products and water. An increasing number of studies have been focused on milk and dairy products in which MAP has been detected in many cases (Anonymous, 2010; Grant, 2010; Slana *et al.*, 2008a). It has been stated, that current methods for the detection of MAP cells in a sample have significant limitations. In order to accurately determine the number of viable MAP cells, new detection methods have to be developed (Anonymous, 2010).

The aim of the present study was to develop a simple, rapid and economic fluorescence staining method for the detection of viable MAP cells in milk and dairy products. The combination of 5-cyano-2,3-ditoyl tetrazolium chloride (CTC) and auramine orange (AO) staining provides the opportunity to determine the total cell number as well as the number of respiratory active cells in a sample within eight to nine hours. The detection limit of the combined CTC-/AO staining was 7.4×10^2 CFU/ml for spiked FPTB-Medium Plus, 7.8×10^2 CFU/ml for spiked pasteurized milk and 3.8×10^3 CFU/ml for spiked raw milk (probability of detection 95 %). The combined CTC-/AO staining could be used especially in spiking experiments for scientific purposes to determine the initial spiking concentration. This new method could be used instead of time-consuming culture methods, unless the initial MAP-concentration for spiking is above 10^3 CFU/ml.

To provide a better risk assessment whether infants are exposed to MAP by consumption of infant milk, a representative spectrum of powdered infant milk from German retail level ("pre" and "HA pre") have been examined by culture on Herrold's Egg Yolk-Medium, *FASTPlaqueTB*TM-Assay and TaqMan[®]-Real-Time PCR*. In none of the 16 examined products, MAP cells have been detected.

* Molecular based investigations have been accomplished by Mrs Molitor (IFTN Gießen).

9 ANHANG

9.1 Nährmedien und Puffer

9.1.1 Herrold's Egg Yolk-Medium

Herrold's Egg Yolk-Schrägnährmedium mit den Zusätzen Mykobaktin J, Amphotericin B, Nalidixinsäure und Vancomycin wurde von der Firma Becton Dickinson (BD[®]) bezogen. Die Nährmedien wurden bei +6 °C lichtgeschützt gelagert und innerhalb des vorgeschriebenen Verbrauchsdatums verwendet.

Zusammensetzung pro Liter Wasser:

- 15,3 g Agar
- 9,0 g Casein (pankreatisch verdaut)
- 4,5 g NaCl
- 4,1 g Natriumpyruvat
- 2,7 g Fleischextrakt
- 0,1 g Malachitgrün
- 0,05 g Amphotericin B
- 0,05 g Nalidixinsäure
- 0,05 g Vancomycin
- 0,002 g Mykobaktin J
- 100 ml Eigelb
- 27,0 ml Glycerol
- 873 ml destilliertes Wasser

9.1.2 Middlebrook 7H10-Festnährmedium

Zusammensetzung pro Liter Wasser:

BD Difco™ Middlebrook 7H10-Agar, Fa. Becton Dickinson (BD[®])

- Ammoniumsulfat 0,5 g
- Monokaliumphosphat 1,5 g
- Dinatriumphosphat 1,5 g
- Natriumcitrat 0,4 g
- Magnesiumsulfat 0,025 g
- Calciumchlorid 0,0005 g
- Zinksulfat 0,001 g
- Kupfersulfat 0,001 g
- L-Glutaminsäure, Natriumsalz 0,5 g

Anhang

- Eisen (III)-Ammoniumcitrat 0,04 g
- Pyridoxin-HCL 0,001 g
- Biotin 0,0005 g
- Malachitgrün 0,00025 g
- Agar 15 g

Folgende Supplemente wurden zugegeben:

- BBL™ Middlebrook OADC Enrichment, 100 ml, Fa. Becton Dickinson (BD®)

Zusammensetzung pro Liter destilliertem Wasser:

- Natriumchlorid 8,5 g
- Rinderalbumin 50,0 g
- Dextrose 20,0 g
- Katalase 0,03 g
- Ölsäure 0,6 g

- BBL™ MGIT™ PANTA™-Supplement, 21 ml, Fa. Becton Dickinson (BD®)

Zusammensetzung pro Fläschchen lyophilisiertem PANTA:

- Polymyxin B 6.000 Einheiten
- Amphotericin B 600 µg
- Nalidixinsäure 2400 µg
- Trimethoprim 600 µg
- Azlozillin 600 µg

- Mykobaktin J-Supplement, 2 mg, Allied Monitor

- Glycerin 85 % zur Analyse, 5 ml, Fa. Merck

Die Herstellung des Agars erfolgte in der institutseigenen Nährbodenküche. Mykobaktin J (lyophilisiert) wurde in 2 ml absolutem Ethanol gelöst und sorgfältig bis zur völligen Auflösung geschwenkt. Das lyophilisierte Supplement BBL™ MGIT™ PANTA™ wurde in 3 ml destilliertem Wasser rekonstituiert. Die antibiotischen und antimykotischen Zusätze des PANTA™-Supplements gewährleisteten bei der langwierigen Anzucht von MAP aus Rohmilch und Säuglingsanfangsnahrung eine langfristige Stabilität des Nährmediums gegenüber einer unerwünschten Begleitkeimflora. Die Herstellung des Middlebrook 7H10-Agars erfolgte im Agarklav. Zur Herstellung von einem Liter Agar wurden 19 g Middlebrook 7H10-Agar in den Topf des Agarklavs eingewogen, 900 ml destilliertes Wasser sowie 5 ml Glycerin zugegeben und bis zum vollständigen Lösen des Pulvers auf einem Magnetrührer gerührt. Anschließend wurde der Agar im Agarklav unter ständigem Rühren für zehn Minuten auf +121 °C erhitzt. Nach Abkühlung auf eine Temperatur von +50 °C erfolgte unter aseptischen Bedingungen die Zugabe

von 100 ml BBL™ Middlebrook OADC-Supplement, 21 ml BBL™ MGIT™ PANTA™-Supplement und 2 ml Mycobactin J. Der Agar wurde durch dreiminütiges Rühren gut durchmischt. Anschließend wurden je 35 ml Agar mit dem Tachomat 125 Gießautomat in Petrischalen ohne Nocken gegossen. Die Nährmedien wurden bei +6 °C dunkel gelagert und innerhalb von sechs Wochen verwendet.

9.1.3 Middlebrook 7H9-Flüssignährmedium

Zusammensetzung pro Liter Wasser:

BD Difco™ Middlebrook 7H9-Bouillon, Fa. Becton Dickinson (BD®):

- Ammoniumsulfat 0,5 g
- L-Glutaminsäure 0,5 g
- Natriumcitrat 0,1 g
- Pyridoxin 0,001 g
- Biotin 0,0005 g
- Dinatriumphosphat 2,5 g
- Monokaliumphosphat 1,0 g
- Eisen(II)-Ammoniumcitrat 0,04 g
- Magnesiumsulfat 0,05 g
- Calciumchlorid 0,0005 g
- Zinksulfat 0,001 g
- Kupfersulfat 0,001 g

Folgende Supplemente wurden zugegeben:

- BBL™ Middlebrook OADC Enrichment, 100 ml, Fa. Becton Dickinson (BD®)

Zusammensetzung pro Liter destilliertem Wasser:

- Natriumchlorid 8,5 g
- Rinderalbumin 50,0 g
- Dextrose 20,0 g
- Katalase 0,03 g
- Ölsäure 0,6 g
- Mykobaktin J-Supplement, 2 mg, Fa. Allied Monitor
- Glycerin 85 % zur Analyse, 2 ml, Fa. Merck

Die Herstellung des Flüssignährmediums erfolgte in der institutseigenen Nährbodenküche. Das lyophilisierte Supplement Mykobaktin J wurde in 2 ml absolutem Ethanol gelöst und sorgfältig bis zur völligen Auflösung geschwenkt. Zur Herstellung von einem Liter Nährmedium wurden 4,7 g Middlebrook 7H9-Pulver, 2 ml Glycerin und 900 ml destilliertes Wasser in ein 2 l Glasgefäß

eingewogen und bis zur vollständigen Lösung des Pulvers mit dem Magnetrührer durchmischt. Nach Zugabe von 2 ml Mykobaktin J (2 mg) wurden je 9 ml des Flüssignährmediums in Glasgefäße mit Schraubverschluss, die mit 10–15 Keramik-Kügelchen bestückt waren, abgefüllt und für zehn Minuten bei +121 °C autoklaviert. Das 7H9-Flüssignährmedium wurde bei +6 °C dunkel gelagert und innerhalb von 12 Wochen verwendet. Vor Gebrauch wurde pro Fläschchen 7H9-Flüssignährmedium jeweils 1 ml BBL™ MGIT OADC-Supplement zugegeben.

9.1.4 Enzymatischer Lysispuffer

Der enzymatische Lysispuffer für Gram-positive Bakterien wurde nach dem Rezept im Handbuch des DNeasy® Blood & Tissue Mini Kit der Fa. Qiagen hergestellt.

Für 50 ml Lysispuffer wurden abgemessen:

- 10 ml Tris-HCl Stammlösung (100mM, pH 8,0)
- 2 ml EDTA Titriplex III Stammlösung (50 mM)
- 0,6 g Triton X-100 (Fa. Roth)

Die Reagenzien wurden mit destilliertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt, mit einem 0,2 µm Einmalfilter steril filtriert und anschließend autoklaviert. Der fertige Lysispuffer wurde ohne Lysozym bei Raumtemperatur gelagert. Die Zugabe von Lysozym (Fa. Merck, 100000 U/mg) erfolgte erst unmittelbar vor Gebrauch des Puffers. Dazu wurde die benötigte Menge Enzym (20 mg Lysozym/ml Lysispuffer) abgewogen und mit dem Lysispuffer bis zur vollständigen Auflösung sorgfältig gevortext.

9.2 Schaubilder Versuchsaufbau

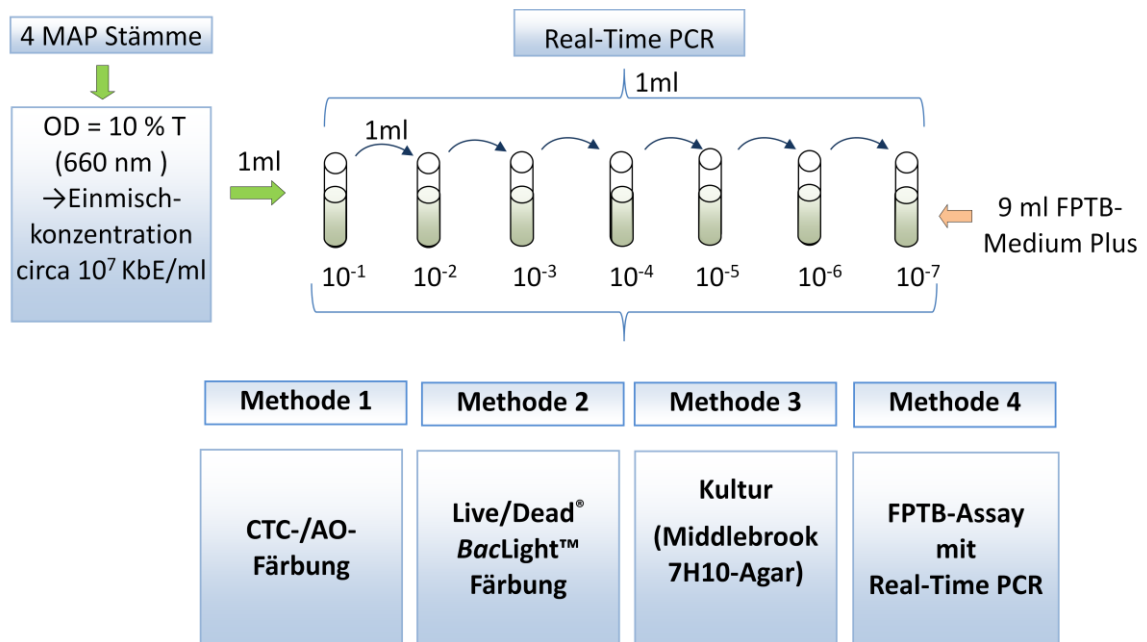


Abb. 15: Versuchsaufbau zum Nachweis von MAP-Zellen in FPTB-Medium Plus

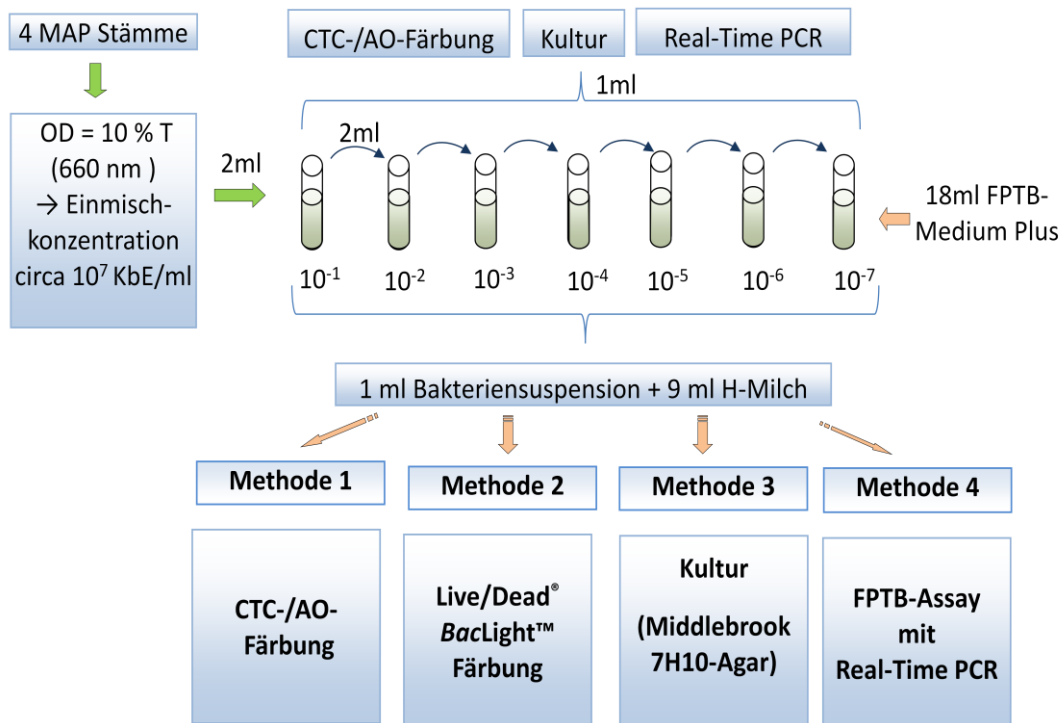


Abb. 16: Versuchsaufbau zum Nachweis von MAP-Zellen in Milch (H-Milch)

Anhang

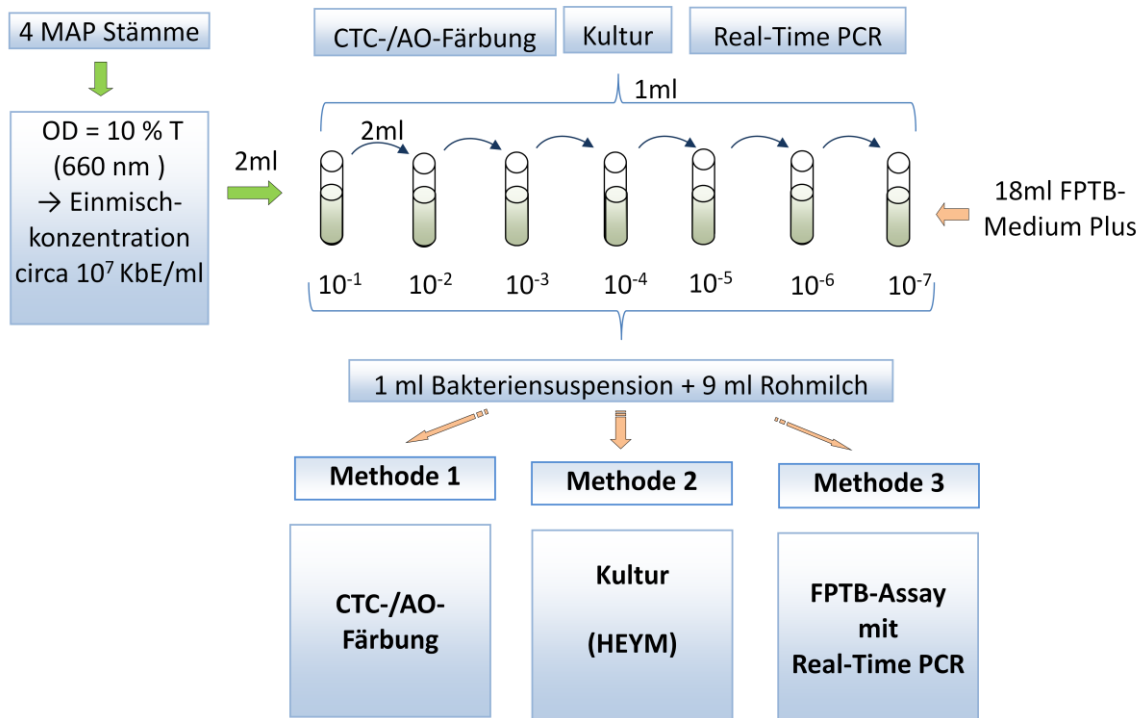
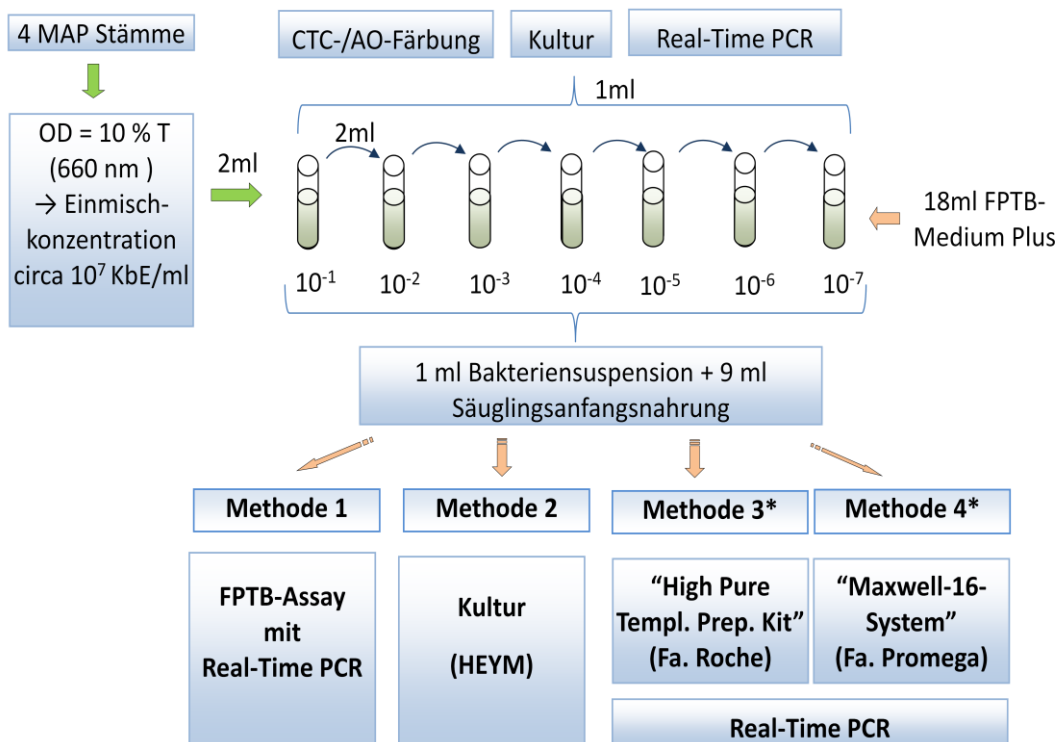


Abb. 17: Versuchsaufbau zum Nachweis von MAP-Zellen in Milch (Rohmilch)



* Die Methoden 3 und 4 wurden von Frau Molitor, IFTN Gießen, im Rahmen ihrer Dissertation bearbeitet

Abb. 18: Versuchsaufbau zum Nachweis von MAP-Zellen in Säuglingsanfangsnahrung

10 LITERATURVERZEICHNIS

- Akineden, Ö., Hassan, A. A., Schneider, E., Usleber, E. (2006):** Kultureller Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Säuglingsnahrung. Abstracts 8. Fachsymposium der Fachgruppe Lebensmittelmikrobiologie und -hygiene, 5. –7. April 2006, Suhl: 56.
- Akineden, Ö., Fernández-Silva, J. A., Weirich, S., Abdulmawjood, A., Bülte, M. (2011):** Comparison of two decontamination procedures, three culture media, and real time-PCR assay for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) from artificially contaminated raw sausage. J. Food Safety and Food Quality/Arch. Lebensmittelhyg. **62**: 150–156.
- Al-Soud, W. A., Jönsson, L. J., Rådström, P. (2000):** Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. J. Clin. Microbiol. **38**: 345–350.
- Alexejeff-Goloff, N. A. (1935):** The pathogenesis and excretion of the bacilli in bovine paratuberculosis (Abstract). Journal of Comparative Pathology **48**, 81–82.
- Altic, L. C., Rowe, M. T., Grant, I. R. (2007):** UV light inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk as assessed by FASTPlaqueTB phage assay and culture. Appl. Environ. Microbiol. **73**: 3728–3733.
- Anonymous (2005):** Leitlinien für den Umgang mit Paratuberkulose in Wiederkäuerbeständen. Bekanntmachungen Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft. Einsehbar unter www.animal-health-online.de/drms/rinder/paraleit.pdf (accessed 11 June 2009).
- Anonymous (2010):** Assessment of food as a source of exposure to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP). J. Food Prot. **73**: 1357–1397.
- Armitage, E., Drummond, H. E., Wilson, D. C., Ghosh, S. (2001):** Increasing incidence of both juvenile-onset Crohn's disease and ulcerative colitis in Scotland. Eur J Gastroenterol Hepatol. **13**: 1439–1447.
- Arrigoni, N., Cammi, G., Galletti, G., Losini, I., Taddei, R., Tamba, M., Belletti, G. L. (2007):** Survey on paratuberculosis prevalence in dairy herds of the Lombardia Region (Italy). Proceedings of 9th International Colloquium on Paratuberculosis, Tsukuba (Japan), 29. Oktober–2. November 2007: 196–197.

- Ayele, W. Y., Svastova, P., Roubal, P., Bartos, M., Pavlik, I. (2005):** *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 1210–1214.
- Barker, R. (2009):** The Canadian Johne's Disease Initiative. Proceedings of the 2nd ParaTb Forum, Minneapolis, USA, 9–14. August 2009.
- Barker, J. und Brown, M. R. (1994):** Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology (Reading, Engl.)* **140**: 1253–1259.
- Beard, P. M., Daniels, M. J., Henderson, D., Pirie, A., Rudge, K., Buxton, D., Rhind, S., Greig, A., Hutchings, M.R., McKendrick, I., Stevenson, K., Sharp, J. M. (2001):** Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 1517–1521.
- Becker-Follmann, J. und Baas, D. (2004):** PCR - eine Methode, drei Schritte. *BIOspektrum* **1**, 10. Jahrgang: 1-4.
- Bickley, J., Short, J. K., McDowell, D. G., Parkes, H. C. (1996):** Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Lett. Appl. Microbiol.* **22**: 153–158.
- Boelaert, F., Walravens, K., Biront, P., Vermeersch, J. P., Berkvens, D., Godfroid, J. (2000):** Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population. *Vet. Microbiol.* **77**: 269–281.
- Borrego, S., Niubó, E., Ancheta, O., Espinosa, M. E. (2000):** Study of the microbial aggregation in *Mycobacterium* using image analysis and electron microscopy. *Tissue Cell.* **32**: 494–500.
- Bosshard, C., Stephan, R., Tasara, T. (2006):** Application of an F57 sequence-based real-time PCR assay for *Mycobacterium paratuberculosis* detection in bulk tank raw milk and slaughtered healthy dairy cows. *J. Food Prot.* **69**: 1662–1667.
- Boulos, L., Prévost, M., Barbeau, B., Coallier, J., Desjardins, R. (1999):** LIVE/DEAD BacLight. Application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J. Microbiol. Methods* **37**: 77–86.
- Buergelt, C. D., Hall, C., Mc Entee, K., Duncan, J. R. (1978):** Pathological evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. *Vet. Pathol.* **15**: 196–207.
- Burton, L. (2006):** Johne's Disease Control in New Zealand. Proceedings of the 1st ParaTb Forum, Shanghai, China, 19. Oktober 2006.

- Castellanos, E., Aranaz, A., Romero, B., de Juan, L., Alvarez, J., Bezos, J., Rodríguez, S., Stevenson, K., Mateos, A., Domínguez, L. (2007):** Polymorphisms in *gyrA* and *gyrB* genes among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I, II, and III isolates. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 3439–3442.
- Charter, M. A. (2006):** An overview of the Voluntary Bovine Johne's Disease Control Program in the United States of America. Proceedings of the 1st ParaTb Forum, Shanghai, China, 19. Oktober 2006.
- Charter, M. A., Wells, S., Collins, M. T. (2009):** Measuring the Impact of the National Johne's Disease Control Program: The U.S. Experience. Proceedings of the 2nd ParaTb Forum, Minneapolis, USA, August 2009.
- Cheng, A. G., Chang, A., Farwell, D. G., Agoff, S. N. (2005):** Auramin Orange stain with fluorescence microscopy is a rapid and sensitive technique for the detection of cervical lymphadenitis due to mycobacterial infection using fine needle aspiration cytology: a case series. *Otolaryngol Head Neck Surg.* **133**: 381–385.
- Chiodini, R. J., van Kruiningen, H. J., Thayer, W. R., Merkal, R. S., Coutu, J. A. (1984):** Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. I. An unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.* **29**: 1073–1079.
- Chiodini, R. J., van Kruiningen, H. J., Thayer, W. R., Coutu, J. A. (1986):** Spheroplastic phase of mycobacteria isolated from patients with Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol.* **24**: 357–363.
- Chiodini, R. J. und Hermon-Taylor, J. (1993):** The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. *J. Vet. Diagn. Invest.* **5**: 629–631
- Cirillo, J. D., Falkow, S., Tompkins, L. S., Bermudez, L. E. (1997):** Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect. Immun.* **65**: 3759–3767.
- Citer, L. und Kennedy, D. (2009):** An integrated risk based approach to the management of Johne's disease in Australia. Proceedings of the 10th International Colloquium on Paratuberculosis, Minneapolis, Minnesota, 9–14. August 2009: 229-231.
- Clark Jr., D. L., Anderson, J. L., Koziczowski, J. J., Ellingson, J. L. E. (2006):** Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* genetic components in retail cheese curds purchased in Wisconsin and Minnesota by PCR. *Mol. Cell. Probes* **20**: 197–202.

- Cocito, C., Gilot, P., Coene, M., de Kesel, M., Poupart, P., Vannuffel, P. (1994):** Paratuberculosis. Clin. Microbiol. Rev. 7: 328–345.
- Coetsier, C., Vannuffel, P., Blondeel, N., Denef, J. F., Cocito, C., Gala, J. L. (2000):** Duplex PCR for differential identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium*, and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues from cattle. J. Clin. Microbiol. 38: 3048–3054.
- Collins, M.T. (1996):** Diagnosis of paratuberculosis. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 12: 357–371.
- Collins, M. T. (2007):** Successful control of Johne’s Disease. Proceedings of the Wisconsin Veterinary Medical Association, Madison WI, Oktober 2007.
- Collins, D. M., Gabric, D. M., de Lisle, G. W. (1990):** Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. J. Clin. Microbiol. 28: 1591–1596.
- Collins, M. T., Wells, S. J., Petrini, K. R., Collins, J. E., Schultz, R. D., Whitlock, R. H. (2005):** Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12: 685–692.
- Corn, J. L., Manning, E. J. B., Sreevatsan, S., Fischer, J. R. (2005):** Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging birds and mammals on livestock premises. Appl. Environ. Microbiol. 71: 6963–6967.
- Corner, L. A. L., Pfeiffer, D. U., Abbott, K. A. (2004):** The respiratory tract as a hypothetical route of infection of cattle with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Aust. Vet. J. 82: 170–173.
- Cousins, D. V., Whittington, R., Marsh, I., Masters, A., Evans, R. J., Kluver, P. (1999):** Mycobacteria distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess IS900-like sequences detectable by IS900 polymerase chain reaction: implications for diagnosis. Mol. Cell. Probes. 13: 431–442.
- Coussens, P. M. (2001):** *Mycobacterium paratuberculosis* and the bovine immune system. Anim. Health Res. Rev. 2: 141–161.
- Daniels, M. J., Hutchings, M. R., Beard, P. M., Henderson, D., Greig, A., Stevenson, K., Sharp, J. M. (2003):** Do non-ruminant wildlife pose a risk of paratuberculosis to domestic livestock and vice versa in Scotland? J. Wildl. Dis. 39: 10–15.

- Dargatz, D. A., Byrum, B. A., Hennager, S. G., Barber, L. K., Kopral, C. A., Wagner, B. A., Wells, S. J. (2001):** Prevalence of antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* among beef cow-calf herds. J. Am. Vet. Med. Assoc. **219**: 497–501.
- Day, A. P. und Oliver, J. D. (2004):** Changes in membrane fatty acid composition during entry of *Vibrio vulnificus* into the viable but nonculturable state. J. Microbiol. **42**: 69–73.
- de Juan, L., Alvarez, J., Aranaz, A., Rodríguez, A., Romero, B., Bezos, J., Mateos, A., Domínguez, L. (2006a):** Molecular epidemiology of Types I/III strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolated from goats and cattle. Vet. Microbiol. **115**: 102–110.
- de Juan, L., Alvarez, J., Romero, B., Bezos, J., Castellanos, E., Aranaz, A., Mateos, A., Dominguez, L. (2006b):** Comparison of Four Different Culture Media for Isolation and Growth of Type II and Type I/III *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Strains Isolated from Cattle and Goats. Appl. Environ. Microbiol. **72**: 5927–5932.
- Deutz, A., Spargser, J., Wagner, P., Rosengarten, R., Köfer, J. (2005):** Nachweise von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* bei Wildtieren und Rindern in der Steiermark/Osterreich. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. **118**: 314–320.
- Diéguez, F. J., Arnaiz, I., Sanjuán, M. L., Vilar, M. J., López, M., Yus, E. (2007):** Prevalence of serum antibodies to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cattle in Galicia (northwest Spain). Prev. Vet. Med. **82**: 321–326.
- Dixon, W. J. (chief editor), (1993):** BMDP Statistical Software Manual, Volume 1 and 2. University of California Press, Berkeley, Los Angeles.
- Domingue, G. J. und Woody, H. B. (1997):** Bacterial persistence and expression of disease. Clin. Microbiol. Rev. **10**: 320–344.
- Donaghy, J. A., Totton, N. L., Rowe, M. T. (2004):** Persistence of *Mycobacterium paratuberculosis* during manufacture and ripening of cheddar cheese. Appl. Environ. Microbiol. **70**: 4899–4905.
- Dundee, L., Grant, I. R., Ball, H. J., Rowe, M. T. (2001):** Comparative evaluation of four decontamination protocols for the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. Lett. Appl. Microbiol. **33**: 173–177.
- Dzieciol, M., Volgger, P., Khol, J., Baumgartner, W., Wagner, M., Hein, I. (2010):** A novel real-time PCR assay for specific detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk with the inherent possibility of differentiation between viable and dead cells. BMC Res. Notes **3**: 251.

- Eisenberg, S. W. F., Nielen, M., Santema, W., Houwers, D. J., Heederik, D., Koets, A. P. (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.
- Ellingson, J. L., Bolin, C. A., Stabel, J. R. (1998):** Identification of a gene unique to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and application to diagnosis of paratuberculosis. *Mol. Cell. Probes.* **12**: 133–142.
- Ellingson, J. L. E., Anderson, J. L., Koziczowski, J. J., Radcliff, R. P., Sloan, S. J., Allen, S. E., Sullivan, N. M. (2005):** Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. *J. Food Prot.* **68**: 966–972.
- Elschner, M. (2005):** Programm zur Bekämpfung der Paratuberkulose in den Rinderbeständen Thüringens. 5. Internationales Symposium zur BHV-1, BVD- und Paratuberkulose-Bekämpfung, Stendal, 09. bis 11. März 2005 (Vortrag).
- Eltholth, M. M., Marsh, V. R., van Winden, S., Guitian, F. J. (2009):** Contamination of food products with *Mycobacterium avium paratuberculosis*: a systematic review. *J. Appl. Microbiol.* **107**: 1061–1071.
- Englund, S., Ballagi-Pordány, A., Bölske, G., Johansson, K. E. (1999):** Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **33**: 163–171.
- Englund, S., Bölske, G., Ballagi-Pordány, A., Johansson, K. E. (2001):** Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue samples by single, fluorescent and nested PCR based on the IS900 gene. *Vet. Microbiol.* **81**: 257–271.
- Englund, S., Bölske, G., Johansson, K. E. (2002):** An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **209**: 267–271.
- Engvall, A., Larsson, B., Bölske, G., Wahlstrom, H. (1994):** Sweden is free from paratuberculosis. *Proceedings of the fourth International Colloquium on Paratuberculosis*, Cambridge, UK: 27–31.
- Fecteau, M. E. und Whitlock, R. H. (2010):** Paratuberculosis in cattle. In: Behr, M. A., Collins, D. M. (Eds.), *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. CAB International, Oxfordshire: 144–153.

- Fecteau, M. E., Whitlock, R. H., Buergelt, C. D., Sweeney, R. W. (2010):** Exposure of young dairy cattle to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) through intensive grazing of contaminated pastures in a herd positive for Johne's disease. *Can. Vet. J.* **51**: 198–200.
- Fischer, O. A., Matlova, L., Dvorska, L., Svastova, P., Bartl, J., Weston, R. T., Pavlik, I. (2004):** Blowflies *Calliphora vicina* and *Lucilia sericata* as passive vectors of *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *M. a. paratuberculosis* and *M. a. hominissuis*. *Med. Vet. Entomol.* **18**: 116–122.
- Foddai, A., Elliott, C. T., Grant, I. R. (2009):** Optimization of a phage amplification assay to permit accurate enumeration of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 3896–3902.
- Foddai, A., Elliott, C. T., Grant, I. R. (2010a):** Maximizing capture efficiency and specificity of magnetic separation for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 7550–7558.
- Foddai, A., Elliott, C. T., Grant, I. R. (2010b):** Rapid assessment of the viability of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cells after heat treatment, using an optimized phage amplification assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 1777–1782.
- Foddai, A., Strain, S., Whitlock, R. H., Elliott, C. T., Grant, I. R. (2011):** Application of a peptide-mediated magnetic separation-phage assay for detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to bovine bulk tank milk and feces samples. *J. Clin. Microbiol.* **49**: 2017–2019.
- Frössling, J., Ågren, E. C. C., Wahlström, H., Lindberg, A., Sternberg-Lewerin, S. (2009):** Evaluation of the surveillance system for MAP infection in Swedish cattle. *Proceedings of the 10th International Colloquium on Paratuberculosis, Minneapolis, Minnesota, 9.–14. August 2009*: 211–214.
- Füllgrabe, R. (2008):** Untersuchungen zum kulturellen und molekularbiologischen Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) aus humanen Darmbiopaten. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen, ISBN: 978-3-8359-5353-6.
- Gao, A., Mutharia, L., Chen, S., Rahn, K., Odumeru, J. (2002):** Effect of pasteurization on survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *J. Dairy Sci.* **85**: 3198–3205.
- Gao, A., Odumeru, J., Raymond, M., Mutharia, L. (2005):** Development of improved method for isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bulk tank milk: effect of age of milk, centrifugation, and decontamination. *Can. J. Vet. Res.* **69**: 81–87.

- Gasteiner, J., Wenzl, H., Fuchs, K., Jark, U., Baumgartner, W. (1999):** Serological cross-sectional study of paratuberculosis in cattle in Austria. *Zentralblatt Veterinarmedizin Reihe B.* **46:** 457–466.
- Geisbauer, E. und Duenser, M. (2009):** Überwachungsprogramm zur Bekämpfung der Paratuberkulose in Österreich: Bisherige Erfahrungen und Ergebnisse. 4. Arbeitstagung des nationalen Referenzlabors für Tuberkulose und des nationalen Referenzlabors für Paratuberkulose, Mykobakterieninfektionen, Friedrich Löffler Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Jena, Deutschland, 13. –14. Mai 2009.
- Geue, L., Köhler, H., Klawonn, W., Dräger, K., Hess, R. G., Conraths, F. J. (2007):** Untersuchungen zur Eignung von ELISAs zum Nachweis von Antikörpern gegen *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Tankmilchproben aus Rheinland-Pfalz. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* **120:** 67–78.
- Giese, S. B. und Ahrens, P. (2000):** Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture. *Vet. Microbiol.* **77:** 291–297.
- Gill, C. O., Saucier, L., Meadus, W. J. (2011):** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy products, meat, and drinking water. *J. Food Prot.* **74:** 480–499.
- Godfroid, J., Boelaert, F., Heier, A., Clavareau, C., Wellemans, V., Desmecht, M., Roels, S., Walravens, K. (2000):** First evidence of Johne's disease in farmed red deer (*Cervus elaphus*) in Belgium. *Vet. Microbiol.* **77:** 283–290.
- Grant, I. R. (2010):** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Animal-derived Foods and the Environment. In: Behr, M. A., Collins, D. M. (Eds.), *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. CAB International, Oxfordshire: 29–35.
- Grant, I. R., Ball, H. J., Neill, S. D., Rowe, M. T. (1996):** Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cows' milk at pasteurization temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **62:** 631–636.
- Grant, I. R., Ball, H. J., Rowe, M. T. (1998a):** Effect of high-temperature, short-time (HTST) pasteurization on milk containing low numbers of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Lett. Appl. Microbiol.* **26:** 166–170.
- Grant, I. R., Ball, H. J., Rowe, M. T. (1998b):** Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from milk by immunomagnetic separation. *Appl. Environ. Microbiol.* **64:** 3153–3158.
- Grant, I. R., Ball, H. J., Rowe, M. T. (2002a):** Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. *Appl. Environ. Microbiol.* **68:** 2428–2435.

- Grant, I. R., Hitchings, E. I., Mc Cartney, A., Ferguson, F., Rowe, M. T. (2002b):** Effect of Commercial-Scale High-Temperature, Short-Time Pasteurization on the Viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in Naturally Infected Cows' Milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 602–607.
- Grant, I. R. und Rowe, M. T. (2004):** Effect of chemical decontamination and refrigerated storage on the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from heat-treated milk. *Lett. Appl. Microbiol.* **38**: 283–288.
- Grant, I. R., Williams, A. G., Rowe, M. T., Muir, D. D. (2005):** Efficacy of various pasteurization time-temperature conditions in combination with homogenization on inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2853–2861.
- Green, E. P., Tizard, M. L., Moss, M. T., Thompson, J., Winterbourne, D. J., Mc Fadden, J. J., Hermon-Taylor, J. (1989):** Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res.* **17**: 9063–9073.
- Greig, A., Stevenson, K., Perez, V., Pirie, A. A., Grant, J. M., Sharp, J. M. (1997):** Paratuberculosis in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet. Rec.* **140**: 141–143.
- Gunasekera, T. S., Attfield, P. V., Veal, D. A. (2000):** A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1228–1232.
- Gunasekera, T. S., Sorensen, A., Attfield, P. V., Sorensen, S. J., Veal, D. A. (2002):** Inducible Gene Expression by Nonculturable Bacteria in Milk after Pasteurization. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1988–1993.
- Hacker, U., Hüttner, K., Konow, M. (2004):** Untersuchung zur serologischen Prävalenz und zu Risikofaktoren der Paratuberkulose in Milchviehbetrieben in Mecklenburg-Vorpommern. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* **117**: 140–144.
- Haghkhah, M., Ansari-Lari, M., Novin-Baheran, A. M., Bahramy, A. (2008):** Herd-level prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by bulk-tank milk PCR in Fars province (southern Iran) dairy herds. *Prev. Vet. Med.* **86**: 8–13.
- Hammer, P. (2011):** *Mycobacterium paratuberculosis*: Exposition über Milch und Milchprodukte-Minimierungsoptionen. 52. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Garmisch-Partenkirchen, vom 27. bis 30. September 2011 (Vortrag).

- Hammer, P., Kiesner, C., Walte, H.G., Knappstein, K., Teufel, P. (2002):** Heat resistance of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in raw milk tested in a pilot plant pasteurizer. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **54**: 275–303.
- Harb, O. S., Gao, L. Y., Abu Kwaik, Y. (2000):** From protozoa to mammalian cells: a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens. Environ. Microbiol. **2**: 251–265.
- Herthnek, D. und Bölske, G. (2006):** New PCR systems to confirm real-time PCR detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. BMC Microbiol. **6**: 87.
- Hines, M. E. und Styer, E. L. (2003):** Preliminary characterization of chemically generated *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cell wall deficient forms (spheroplasts). Vet. Microbiol. **95**: 247–258.
- Holt, G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T. (1994):** Bergey's manual of determinative bacteriology, Group 21: The Mycobacteria, 9th edition. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- Hoorfar, J., Cook, N., Malorny, B., Wagner, M., de Medici, D., Abdulmawjood, A., Fach, P. (2004):** Diagnostic PCR: making internal amplification control mandatory. Lett. Appl. Microbiol. **38**: 79–80.
- Hruska, K., Slana, I., Kralik, P., Pavlik, I. (2005):** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in powdered infant milk: paratuberculosis in cattle – the public health problem to be solved. Vet. Med. Czech. **50**: 327–335.
- Hruska, K., Bartos, M., Kralik, P., Pavlik, I. (2011):** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in powdered infant milk: F57 competitive real time PCR. Veterinarni Medicina **56**: 226–230.
- Hulten, K., Karttunen, T. J., El-Zimaity, H. M., Naser, S. A., Almashhrawi, A., Graham, D. Y., El-Zaatari, F. A. (2000):** *In situ* hybridization method for studies of cell wall deficient *M. paratuberculosis* in tissue samples. Vet. Microbiol. **77**: 513–518.
- Ikonomopoulos, J., Pavlik, I., Bartos, M., Svastova, P., Ayele, W. Y., Roubal, P. (2005):** Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail cheeses from Greece and the Czech Republic. Appl. Environ. Microbiol. **71**: 8934–8936.
- Jayarao, B. M., Pillai, S. R., Wolfgang, D. R., Griswold, D. R., Rossiter, C. A., Tewari, D., Burns, C. M., Hutchinson, L. J. (2004):** Evaluation of IS900-PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cattle using quarter milk and bulk tank milk samples. Foodborne Pathog. Dis. **1**: 17–26.

- Jaravata, C. V., Smith, W. L., Rensen, G. J., Ruzante, J., Cullor, J. S. (2007):** Survey of ground beef for the detection of *Mycobacterium avium paratuberculosis*. Foodborne Pathog. Dis. **4**: 103–106.
- Jones, P. H., Farver, T. B., Beaman, B., Çetinkaya, B., Morgan, K. L. (2006):** Crohn's disease in people exposed to clinical cases of bovine paratuberculosis. Epidemiol. Infect. **134**: 49.
- Juste, R. A., Geijo, M. V., Sevilla, I., Aduriz, G., Garrido, J. M. (2002):** Control of paratuberculosis by vaccination. Proceedings of the 7th International Colloquium on Paratuberculosis, Bilbao, Spain, 11.–14 Juni 2002.
- Kalis, C. H. J., Collins, M. T., Barkema, H. W., Hesselink, J. W. (2004):** Certification of herds as free of *Mycobacterium paratuberculosis* infection: actual pooled faecal results versus certification model predictions. Prev. Vet. Med. **65**: 189–204.
- Kampen, A. H., Dønne, B., Nyberg, O. (2007):** The surveillance and control programmes for paratuberculosis in Norway. In: Brun E, Hellberg H, Sviland S, Jordsmyr HM (editors). Surveillance and control programmes for terrestrial and aquatic animals in Norway. Annual report 2006. Oslo: National Veterinary Institute; 2007: 35–40.
- Kaprelyants, A. S., Gottschal, J. C., Kell, D. B. (1993):** Dormancy in non-sporulating bacteria. FEMS Microbiol. Rev. **10**: 271–285.
- Keatinge, N., Kennedy, D., Citer, L. (2009):** Behavioural change in owners of Johne's disease infected beef herds. Proceedings of the 10th International Colloquium on *Paratuberculosis*, Minneapolis, Minesota, 9. –14. August 2009: 225–227.
- Kell, D. B., Kaprelyants, A. S., Weichart, D. H., Harwood, C. R., Barer, M. R. (1998):** Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. Antonie Van Leeuwenhoek. **73**: 169–187.
- Kelton, D., Sorge, U., Godkin, A. (2009):** Ontario Johne's Education and Management Assistance Program. Proceedings of the 2nd ParaTb Forum, Minneapolis, USA, 9. –14. August 2009.
- Kennedy, D. J. und Benedictus, G. (2001):** Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. Rev. Off. Int. Epizoot. **20**: 151–179.
- Kepner, R. L. und Pratt, J. R. (1994):** Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. Microbiol. Rev. **58**: 603–615.
- Keswani, J. und Frank, J. F. (1998):** Thermal inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. J. Food Prot. **61**: 974–978.

- Khare, S., Ficht, T. A., Santos, R. L., Romano, J., Ficht, A. R., Zhang, S., Grant, I. R., Libal, M., Hunter, D., Adams, L.G. (2004):** Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk and feces by a combination of immunomagnetic bead separation-conventional PCR and real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 1075–1081.
- Khol, J. L. und Baumgartner, W. (2009):** Erfahrungen mit der Paratuberkulosebekämpfung in kleinbäuerlichen Betrieben. 4. Arbeitstagung des nationalen Referenzlabors für Tuberkulose und des nationalen Referenzlabors für Paratuberkulose, Mykobakterieninfektionen; 13. –14. Mai 2009; Friedrich Loeffler Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Jena.
- Kim, S. G., Shin, S. J., Jacobson, R. H., Miller, L. J., Harpending, P. R., Stehman, S. M., Rossiter, C. A., Lein, D. A. (2002):** Development and application of quantitative polymerase chain reaction assay based on the ABI 7700 system (TaqMan) for detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* **14**: 126–131.
- Kirkwood, C. D., Wagner, J., Boniface, K., Vaughan, J., Michalski, W. P., Catto-Smith, A. G., Cameron, D. J. S., Bishop, R. F. (2009):** *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in children with early-onset Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **15**: 1643–1655.
- Kitaguchi, A., Yamaguchi, N., Nasu, M. (2005):** Enumeration of respiring *Pseudomonas* spp. in milk within 6 hours by fluorescence in situ hybridization following formazan reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 2748–2752.
- Klee, W. (2006):** Paratuberkulose (Johne'sche Krankheit). In: Dirksen, G., Gründer, H.-D., Stöber, M.: Innere Medizin und Chirurgie des Rindes. Parey Verlag, 5. Auflage: 586–591.
- Kudahl, A. B., Nielsen, S. S., Østergaard, S. (2008):** Economy, efficacy, and feasibility of a risk-based control program against paratuberculosis. *J. Dairy Sci.* **91**: 4599–4609.
- Lambrecht, R. S., Carriere, J. F., Collins, M. T. (1988):** A model for analyzing growth kinetics of a slowly growing *Mycobacterium* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 910–916.
- Lambrecht, R. S. und Collins, M. T. (1992):** *Mycobacterium paratuberculosis*-Factors that influence mycobactin dependence. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **15**: 239–246.
- Larsen, A. B., Merkal, R. S., Cutlip, R. C. (1975):** Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* **36**: 255–257.
- Larsen, A. B., Merkal, R. S., Vardaman, T. H. (1956):** Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* **17**: 549–551.

- Larsen, A. B., Stalheim, O. H., Hughes, D. E., Appell, L. H., Richards, W. D., Himes, E. M. (1981):** *Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and genital organs of a semen-donor bull. J. Am. Vet. Med. Assoc. **179**: 169–171.
- Li, L., Bannantine, J. P., Zhang, Q., Amonsin, A., May, B. J., Alt, D., Banerji, N., Kanjilal, S., Kapur, V. (2005):** The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A **102**: 12344–12349.
- Lillini, E., Bitonti, G., Gamberale, F., Cersini, A. (2005):** Prevalence of bovine paratuberculosis in the Latium region (Italy). Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis, Copenhagen, Denmark, 14. –17 August 2005 (Poster).
- Lillini, E., De Grossi, L., Bitonti, G., Cersini, A. (2007):** MAP in retail pasteurised cows' milk: first report in Italy. In: Nielsen, S.S. (ed.) *Proceedings of the 9th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wisconsin, pp. 333–335.
- Lloyd, J. B., Whittington, R. J., Fitzgibbon, C., Dobson, R. (2001):** Presence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in suspensions of ovine trichostrongylid larvae produced in faecal cultures artificially contaminated with the bacterium. Vet. Rec. **148**: 261–263.
- Lovell, R., Levi, M., Francis, J. (1944):** Studies on the survival of Johne's bacilli. J. Comp. Pathol. **54**: 120-129.
- Luyven, G., vom Schloss, A., Sasserath, M. (2002):** Paratuberkulosesanierung in Nordrhein-Westfalen. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. **109**: 524–527.
- Mackintosh, C. G., de Lisle, G., Griffin, F. (2009) :** Paratuberculosis vaccine interference with bovine tuberculosis diagnosis in farmed red deer. Proceedings of the 10th International Colloquium on Paratuberculosis, Minneapolis, USA, 9-14. August 2009: 217.
- Manning, E. J., Kucera, T. E., Gates, N. B., Woods, L. M., Fallon-McKnight, M. (2003):** Testing for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in asymptomatic free-ranging tule elk from an infected herd. J. Wildl. Dis. **39**: 323–328.
- Mc Clure, H. M., Chiodini, R. J., Anderson, D. C., Swenson, R. B., Thayer, W. R., Coutu, J. A. (1987):** *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a colony of stump-tail macaques (*Macaca arctoides*). J. Infect. Dis. **155**: 1011–1019.
- Mc Donald, W. L., O'Riley, K. J., Schroen, C. J. and Condron, R. J. (2003):** Heat inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. Proceedings of the 7th International Colloquium on Paratuberculosis, Bilbao, Spain, 11. –14 Juni 2002: 312–316.

- Mc Kenna, S. L. B., Keefe, G. P., Barkema, H. W., Mc Clure, J., Vanleeuwen, J. A., Hanna, P., Sockett, D. C. (2004):** Cow-level prevalence of paratuberculosis in culled dairy cows in Atlantic Canada and Maine. *J. Dairy Sci.* **87**: 3770–3777.
- Mc Neil, M., Daffe, M., Brennan, P. J. (1991):** Location of the mycolyl ester substituents in the cell walls of mycobacteria. *J. Biol. Chem.* **266**: 13217–13223.
- Merkal, R. S. und Curran, B. J. (1974):** Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl Microbiol.* **28**: 276–279.
- Merkal, R. S. und Mc Cullough, W. G. (1982):** A new mycobactin, mycobactin J, from *Mycobacterium paratuberculosis*. *Current Microbiol.* **7**: 333–335.
- Meylan, M., Rings, D. M., Shulaw, W. P., Kowalski, J. J., Bech-Nielsen, S., Hoffsis, G. F. (1996):** Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* and preservation of immunoglobulin G in bovine colostrum under experimental conditions simulating pasteurization. *Am. J. Vet. Res.* **57**: 1580–1585.
- Millar, D., Ford, J., Sanderson, J., Withey, S., Tizard, M., Doran, T., Hermon-Taylor, J. (1996):** IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3446–3452.
- Möbius, P., Hotzel, H., Rassbach, A., Köhler, H. (2008):** Comparison of 13 single-round and nested PCR assays targeting IS900, ISMav2, f57 and locus 255 for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol* **126**, 324–333.
- Moss, M. T., Green, E. P., Tizard, M. L., Malik, Z. P., Hermon-Taylor, J. (1991):** Specific detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by DNA hybridisation with a fragment of the insertion element IS900. *Gut.* **32**: 395–398.
- Mura, M., Bull, T. J., Evans, H., Sidi-Boumedine, K., Mc Minn, L., Rhodes, G., Pickup, R., Hermon-Taylor, J. (2006):** Replication and long-term persistence of bovine and human strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* within *Acanthamoeba polyphaga*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 854–859.
- Muskens, J., Barkema, H. W., Russchen, E., van Maanen, K., Schukken, Y. H., Bakker, D. (2000):** Prevalence and regional distribution of paratuberculosis in dairy herds in The Netherlands. *Vet. Microbiol.* **77**: 253–261.
- Mutharia, L. M., Klassen, M. D., Fairles, J., Barbut, S., Gill, C. O. (2010):** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in muscle, lymphatic and organ tissues from cows with advanced Johne's disease. *Int. J. Food Microbiol.* **136**: 340–344.

- Naser, S. A., Felix, J., Liping, H., Romero, C., Naser, N., Walsh, A., Safranek, W. (1999):** Occurrence of the IS900 gene in *Mycobacterium avium* complex derived from HIV patients. *Mol. Cell. Probes* **13**: 367–372.
- Naser, S. A., Ghobrial, G., Romero, C., Valentine, J. F. (2004):** Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet* **364**: 1039–1044.
- Nielsen, S. S. (2009):** Use of diagnostics for risk-based control of paratuberculosis in dairy herds. *In Practice* **31**: 150–154.
- Nielsen, S. S. (2011):** Dairy farmers' reasons for participation in the Danish control programme on bovine paratuberculosis. *Prev. Vet. Med.* **98**: 279–283.
- Nielsen, S. S. und Toft, N. (2006):** Age-specific characteristics of ELISA and fecal culture for purpose-specific testing for paratuberculosis. *J. Dairy Sci.* **89**: 569–579.
- Nielsen, S. S., Jepsen, O. R., Aagaard, K., (2007):** Control programme for paratuberculosis in Denmark. Proceedings of the 1st ParaTb Forum, Shanghai, China, 19. Oktober 2006.
- Nielsen, S. S. und Toft, N. (2009):** A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Preventive Veterinary Medicine* **88**: 1–14.
- Obasanjo, I. O., Gröhn, Y. T., Mohammed, H. O. (1997):** Farm factors associated with the presence of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in dairy herds on the New York State Paratuberculosis Control Program. *Prev. Vet. Med.* **32**: 243–251.
- Okura, H., Toft, N., Pozzato, N., Tondo, A., Nielsen, S. S. (2011):** Apparent Prevalence of Beef Carcasses Contaminated with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Sampled from Danish Slaughter Cattle. *Vet. Med. Int.* Article ID 152687, 7 Seiten
- Olsen, I., Sigurðardóttir, G., Dønne, B. (2002):** Paratuberculosis with special reference to cattle. A review. *Vet Q.* **24**:12–28.
- O'Doherty, A., O'Grady, D., Smith, T., Egan, J. (2002):** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in pasteurized and unpasteurized milk in the Republic of Ireland. *Irish J. Agr. Food Res.* **4**: 117–121.
- O'Mahony, J. und Hill, C. (2002):** A real time PCR assay for the detection and quantitation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using SYBR Green and the Light Cycler. *J. Microbiol. Methods* **51**: 283–293.
- O'Mahony, J. und Hill, C. (2004):** Rapid real-time PCR assay for detection and quantitation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in artificially contaminated milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4561–4568.

- O'Reilly, C. E., O'Connor, L., Anderson, W., Harvey, P., Grant, I. R., Donaghy, J., Rowe, M., O'Mahony, P. (2004):** Surveillance of bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved Irish liquid-milk pasteurization plants to determine the incidence of *Mycobacterium paratuberculosis*. Appl. Environ. Microbiol. **70**: 5138–5144.
- Orholm, M., Binder, V., Sørensen, T. I., Rasmussen, L. P., Kyvik, K. O. (2000):** Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. Scand. J. Gastroenterol. **35**: 1075–1081.
- Paolicchi, F. A., Cirone, K., Morsella, C., Gioffré, A., Cataldi, A., Romano, M. (2005):** Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* (Map) from commercial pasteurized milk. In: Manning, E.J.B. and Nielsen, S.S. (eds) *Proceedings of the 8th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wisconsin, p. 342.
- Park, D. J., Drobniowski, F. A., Meyer, A., Wilson, S. M. (2003):** Use of a phage-based assay for phenotypic detection of mycobacteria directly from sputum. J. Clin. Microbiol. **41**: 680–688.
- Pavlik, I., Horvathova, A., Dvorska, L., Bartl, J., Svastova, P., du Maine, R., Rychlik, I. (1999):** Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. J. Microbiol. Methods **38**: 155–167.
- Pavlik, I., Ayele, W. Y., Fischer, O., Matlova, L., Svastova, P., Bartos, M., Machackova, M., Alexa, M., Lamka, J. (2002):** Role of the external environment, plants and non-vertebrates for the spread of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. 7th International Colloquium on Paratuberculosis, Bilbao, Spanien, 11. –14. Juni. 2002.
- Pearce, L. E., Truong, H. T., Crawford, R. A., Yates, G. F., Cavaignac, S., de Lisle, G. W. (2001):** Effect of turbulent-flow pasteurization on survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* added to raw milk. Appl. Environ. Microbiol. **67**: 3964–3969.
- Pickup, R. W., Rhodes, G., Arnott, S., Sidi-Boumedine, K., Bull, T. J., Weightman, A., Hurley, M., Hermon-Taylor, J. (2005):** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the catchment area and water of the River Taff in South Wales, United Kingdom, and its potential relationship to clustering of Crohn's disease cases in the city of Cardiff. Appl. Environ. Microbiol. **71**: 2130–2139.
- Pickup, R. W., Rhodes, G., Bull, T. J., Arnott, S., Sidi-Boumedine, K., Hurley, M., Hermon-Taylor, J. (2006):** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in lake catchments, in river water abstracted for domestic use, and in effluent from domestic sewage treatment works:

- diverse opportunities for environmental cycling and human exposure. Appl. Environ. Microbiol. **72**: 4067–4077.
- Pillai, S. R. und Jayarao, B. M. (2002):** Application of IS900 PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* directly from raw milk. J. Dairy Sci. **85**: 1052–1057.
- Poupart, P., Coene, M., van Heuverswyn, H., Cocito, C. (1993):** Preparation of a specific RNA probe for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and diagnosis of Johne's disease. J. Clin. Microbiol. **31**: 1601–1605.
- Rademaker, J. L. W., Vissers, M. M. M., Giffel, M. C. T. (2007):** Effective heat inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk contaminated with naturally infected feces. Appl. Environ. Microbiol. **73**: 4185–4190.
- Richards, O. W., Kline, E. K., Leach, R. E. (1941):** Demonstration of tubercle bacilli by fluorescence microscopy. Am. Rev. Tuberc. **44**: 255–266.
- Robbe-Austerman, S. (2011):** Control of paratuberculosis in small ruminants. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. **27**: 609–20.
- Rodriguez, G. G., Phipps, D., Ishiguro, K., Ridgway, H. F. (1992):** Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 1801–1808.
- Roussel, A. J., Libal, M. C., Whitlock, R. L., Hairgrove, T. B., Barling, K. S., Thompson, J. A. (2005):** Prevalence of and risk factors for paratuberculosis in purebred beef cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. **226**: 773–778.
- Rowe, M. und Grant, I. (2006):** *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* and its potential survival tactics. Lett. Appl. Microbiol. **42**: 305–311.
- Satsangi, J., Jewell, D. P., Bell, J. I. (1997):** The genetics of inflammatory bowel disease. Gut. **40**: 572–574.
- Schaule, G., Flemming, H. C., Ridgway, H. F. (1993):** Use of 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride for quantifying planktonic and sessile respiring bacteria in drinking water. Appl. Environ. Microbiol. **59**: 3850–3857.
- Schönenbrücher, H., Abdulmawjood, A., Failing, K., Bülte, M. (2008):** New triplex real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine feces. Appl. Environ. Microbiol. **74**: 2751–2758.

- Seitz, S. E., Heider, L. E., Heuston, W. D., Bech-Nielsen, S., Rings, D. M., Spangler, L. (1989):** Bovine fetal infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. J. Am. Vet. Med. Assoc. **194**: 1423–1426.
- Selby, W., Pavli, P., Crotty, B., Florin, T., Radford-Smith, G., Gibson, P., Mitchell, B., Connell, W., Read, R., Merrett, M., Ee, H., Hetzel, D. (2007):** Two-year combination antibiotic therapy with clarithromycin, rifabutin, and clofazimine for Crohn's disease. Gastroenterology **132**: 2313–2319.
- Sevilla, I. X., Aduriz, G., Garrido, J. M., Geijo, M. V., Juste, R. A. (2002):** A preliminary survey of the prevalence of paratuberculosis in dairy cattle in Spain by bulk milk PCR. In: Juste, R.A., Geijo, M.V. and Garrido, J.M. (eds). *Proceedings of the 7th International Colloquium on Paratuberculosis*. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wisconsin, pp. 332–336.
- Sivakumar, P., Tripathi, B. N., Singh, N. (2005):** Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in intestinal and lymph node tissues of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) by PCR and bacterial culture. Vet. Microbiol. **108**: 263–270.
- Slana, I., Paolicchi, F., Janstova, B., Navratilova, P., Pavlik, I. (2008a):** Detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and milk products: a review. Veterinarni Medicina **53**: 283–306.
- Slana, I., Kralik, P., Kralova, A., Pavlik, I. (2008b):** On-farm spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk studied by IS900 and F57 competitive real time quantitative PCR and culture examination. Int. J. Food Microbiol. **128**: 250–257.
- Smith, R. L., Schukken, Y. H., Pradhan, A. K., Smith, J. M., Whitlock, R. H., van Kessel, J. S., Wolfgang, D. R., Grohn, Y. T. (2011):** Environmental contamination with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in endemically infected dairy herds. Prev. Vet. Med. **102**: 1–9.
- Spahr, U. und Schafroth, K. (2001):** Fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Swiss hard and semihard cheese manufactured from raw milk. Appl. Environ. Microbiol. **67**: 4199–4205.
- Stabel, J. R., Steadham, E. M., Bolin, C. A. (1997):** Heat inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk: are current pasteurization conditions effective? Appl. Environ. Microbiol. **63**: 4975–4977.
- Stabel, J. R., Wells, S. J., Wagner, B. A. (2002):** Relationships between fecal culture, ELISA, and bulk tank milk test results for Johne's disease in US dairy herds. J. Dairy Sci. **85**: 525–531.

- Stachelscheid, H. L. (1989):** Zum kulturellen Nachweis von *Mycobacterium paratuberculosis* in Rinderkotproben. Vergleich zweier Dekontaminierungs- und Kulturverfahren. Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Stanley, E. C., Mole, R. J., Smith, R. J., Glenn, S. M., Barer, M. R., Mc Gowan, M., Rees, C. E. D. (2007):** Development of a new, combined rapid method using phage and PCR for detection and identification of viable *Mycobacterium paratuberculosis* bacteria within 48 hours. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 1851–1857.
- Stephan, R. (2007):** Diagnostische Systeme zum Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Verbr. Lebensm.* **2**: 222–227.
- Stephan, R., Bühler, K., Corti, S. (2002):** Incidence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in bulk-tank milk samples from different regions in Switzerland. *Vet. Rec.* **150**: 214–215.
- Stephan, R., Schumacher, S., Tasara, T., Grant, I. R. (2007):** Prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss raw milk cheeses collected at the retail level. *J. Dairy Sci.* **90**: 3590–3595.
- Sternberg, S. und Viske, D. (2003):** Control strategies for paratuberculosis in Sweden. *Acta Vet. Scand.* **44**: 247–249.
- Sternberg-Lewerin, S., Agren, E., Frossling, J., Bolske, G., Holmstrom, A., Lindberg, A., Szanto, E., Viske, D. (2007):** Control of paratuberculosis in Sweden. Proceedings of the 9th International Colloquium on Paratuberculosis, Japan, 29. Oktober –2. November 2007: 319–323.
- Stevenson, K., Hughes, V. M., de Juan, L., Inglis, N. F., Wright, F., Sharp, J. M. (2002):** Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 1798–1804.
- Streeter, R. N., Hoffsis, G. F., Bech-Nielsen, S., Shulaw, W. P., Rings, D. M. (1995):** Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am. J. Vet. Res.* **56**: 1322–1324.
- Strommenger, B., Stevenson, K., Gerlach, G. F. (2001):** Isolation and diagnostic potential of ISMav2, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **196**: 31–37.
- Sung, N. und Collins, M. T. (1998):** Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 999–1005.

- Sung, N. und Collins, M. T. (2000):** Effect of three factors in cheese production (pH, salt, and heat) on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1334–1339.
- Sweeney, R. W. (1996):** Transmission of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **12**: 305–312.
- Sweeney, R. W., Whitlock, R. H., Rosenberger, A. E. (1992a):** *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 166–171.
- Sweeney, R. W., Whitlock, R. H., Rosenberger, A. E. (1992b):** *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease. *Am. J. Vet. Res.* **53**: 477–480.
- Tasara, T. und Stephan, R. (2005):** Development of an F57 sequence-based real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 5957–5968.
- Tasara, T., Hoelzle, L. E., Stephan, R. (2005):** Development and evaluation of a *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) specific multiplex PCR assay. *Int. J. Food Microbiol.* **104**: 279–287.
- Taylor, T. K., Wilks, C. R., Mc Queen, D. S. (1981):** Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of a cow with Johne's disease. *Vet. Rec.* **109**: 532–533.
- Tharaldsen, J., Dønne, B., Fredriksen, B., Nyberg, O., Siguroardóttir, O. (2003):** The National Paratuberculosis Program in Norway. *Acta Vet. Scand.* **44**: 243–246.
- Thompson, N. P., Driscoll, R., Pounder, R. E., Wakefield, A. J. (1996):** Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ.* **312**: 95–96.
- Thorel, M. F., Krichevsky, M., Lévy-Frébault, V. V. (1990):** Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**: 254–260.
- Thorne, J. G. und Hardin, L. E. (1997):** Estimated prevalence of paratuberculosis in Missouri, USA cattle. *Prev. Vet. Med.* **31**: 51–57.
- Tiwari, A., van Leeuwen, J. A., Mc Kenna, S. L. B., Keefe, G. P., Barkema, H. W. (2006):** Johne's disease in Canada Part I: clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds. *Can. Vet. J.* **47**: 874–882.

- Torvinen, E., Suomalainen, S., Lehtola, M. J., Miettinen, I. T., Zacheus, O., Paulin, L., Katila, M.-L., Martikainen, P. J. (2004):** Mycobacteria in water and loose deposits of drinking water distribution systems in Finland. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1973–1981.
- Twort, F. W. und Ingram, G. L. Y. (1912):** A method for isolating and cultivating the *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis johne* and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudotuberculous enteritis of bovines. *Proc. Roy. Soc.* **84**: 517–542.
- Tysk, C., Lindberg, E., Järnerot, G., Flodérus-Myrhed, B. (1988):** Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* **29**: 990–996.
- Van Brandt, L., Coudijzer, K., Vlaemynck, G., Hendrickx, M., Michiels, C., Messens, W., Herman, L., de Block, J. (2010):** Localization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in artificially inoculated milk and colostrum by fractionation. *J. Dairy Sci.* **93**: 4722–4729.
- Van Maanen, C., Koster, C., van Veen, B., Kalis, C. H. J., Collins, M. T. (2002):** Validation of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* antibody detecting ELISA's. Proceedings of the 7th International Colloquium on Paratuberculosis, Bilbao, Spain, 11. –14 Juni 2002: 182.
- Vansnick, E., de Rijk, P., Vercammen, F., Geysen, D., Rigouts, L., Portaels, F. (2004):** Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* **100**: 197–204.
- Vary, P. H., Andersen, P. R., Green, E., Hermon-Taylor, J., Mc Fadden, J. J. (1990):** Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 933–937.
- Watt, R., Kennedy, D., Citer, L. (2009):** The National Sheep Health Statement - a tool for assessing Johne's disease risk in the sheep industries. Proceedings of the 10th International Colloquium on Paratuberculosis, Minneapolis, Minnesota, 9. –14. August 2009: 218–221.
- Weber, M. F. (2009):** Surveillance of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in dairy herds. Dissertation, Universität Utrecht, ISBN: 978-90-393-5238-0.
- Weber, A. und Gürke, R. (1992):** Bakteriologische Untersuchungen zum Vorkommen von *Mycobacterium paratuberculosis* in Kotproben von Damwild (*Dama dama* L.). *Zeitschrift für Jagdwissenschaft* **38**: 55–59.
- Weirich, S., Molitor, A., Akineden, Ö., Failing K., Bülte, M. (2011):** Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in Säuglingsanfangsnahrung auf

- Milchpulverbasis. 52. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Garmisch-Partenkirchen, vom 27.–30. September 2011 (Poster).
- Wells, J. E., Bosilevac, J. M., Kalchayanand, N., Arthur, T. M., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L., Koohmaraie, M. (2009):** Prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ileocecal lymph nodes and on hides and carcasses from cull cows and fed cattle at commercial beef processing plants in the United States. *J. Food Prot.* **72**: 1457–1462.
- Whan, L. (2003):** The incidence and persistence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Northern Ireland water supplies. PhD thesis, Queen's University of Belfast, Belfast.
- Whan, L. B., Grant, I. R., Ball, H. J., Scott, R., Rowe, M. T. (2001):** Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium paratuberculosis* in drinking water. *Lett. Appl. Microbiol.* **33**: 227–231.
- Whan, L., Ball, H. J., Grant, I. R., Rowe, M. T. (2005):** Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in untreated water in Northern Ireland. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 7107–7112.
- Whitlock, R. H. und Buergelt, C. (1996):** Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **12**: 345–356.
- Whittington (2010):** Cultivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In: Behr, M. A., Collins, D. M. (Eds.), *Paratuberculosis: Organism, Disease, Control*. CAB International, Oxfordshire: 244–260.
- Whittington, R. J., Hope, A. F., Marshall, D. J., Taragel, C. A., Marsh, I. (2000):** Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS900 restriction fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 3240–3248.
- Whittington, R. J., Marshall, D. J., Nicholls, P. J., Marsh, I. B., Reddacliff, L. A. (2004):** Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 2989–3004.
- Whittington, R. J., Waldron, A., Warne, D. (2010):** Thermal inactivation profiles of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in lamb skeletal muscle homogenate fluid. *Int. J. Food Microbiol.* **137**: 32–39.
- Whittington, R. J., Marsh, I. B., Saunders, V., Grant, I. R., Juste, R., Sevilla, I. A., Manning, E. J. B., Whitlock, R. H. (2011):** Culture phenotypes of genomically and geographically

diverse *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from different hosts. J. Clin. Microbiol. **49**: 1822–1830.

Wittkowski, G., Meier, N., Gangl, A., Böttcher, J. (2011): Paratuberkulose – gezielt, nachhaltig und wirtschaftlich bekämpfen! 52. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Garmisch-Partenkirchen, vom 27–30. September 2011 (Vortrag).

Yamaguchi, N., Sasada, M., Yamanaka, M., Nasu, M. (2003): Rapid detection of respiring *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice, milk, and ground beef by flow cytometry. Cytometry A. **54**: 27–35.

Zwick, L. S., Walsh, T. F., Barbiers, R., Collins, M. T., Kinsel, M. J., Murnane, R. D. (2002): Paratuberculosis in a mandrill (*Papio sphinx*). J. Vet. Diagn. Invest. **14**: 326–328.

DANKSAGUNG

Ich bedanke mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Bülte für seine fortwährende fachliche Unterstützung und seine persönliche Förderung. Insbesondere möchte ich mich dafür bedanken, dass Herr Prof. Dr. Bülte mir absolut freie Hand beim experimentellen Teil meiner Doktorarbeit ließ.

Dr. Ömer Akineden danke ich für seine uneingeschränkte Unterstützung und fachliche Beratung in allen mikrobiologischen und molekularbiologischen Belangen.

Kim Nguyen und Stefan Starke danke ich für ihre permanente Hilfe, insbesondere bei allen Computer-Angelegenheiten, für die viele Zeit, die sie mit dem Korrekturlesen meiner Doktorarbeit verbracht haben und natürlich für ihre tolle Freundschaft!

Jorge Fernández Silva danke ich für seine Unterstützung bei allen molekularbiologischen Fragen, für viele anregende fachliche Diskussionen und für die tolle Arbeitsatmosphäre in unserem Zimmer.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde danke ich für die gute Zusammenarbeit. Insbesondere danke ich Frau Claudia Walter, Frau Karin Simon, Frau Rosemarie Bambey und Herrn Malik M`Bodj für ihre Hilfe bei der Bearbeitung der Proben. Frau Cornelia Dürschmidt und Frau Brigitte Marx danke ich für die hervorragende Einarbeitung in die Laborarbeit, für die vielen guten Tipps und Tricks sowie viel Freude bei der gemeinsamen Arbeit.

Dr. habil. Amir Abdulmawjood danke ich für seine Unterstützung bei den molekularbiologischen Fragestellungen.

Dr. Klaus Failing, Frau Marion Sparenberg und Herrn Andreas Schaubmar danke ich für ihre Beratung und Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Prof. Dr. Klaus Doll und allen Mitarbeitern der Klinik für Wiederkäuer und Schweine danke ich für die Bereitstellung der Rohmilch.

Ich danke der Justus-Liebig-Universität Gießen für die finanzielle Unterstützung durch Gewährung des Graduiertenstipendiums.

Die Untersuchungen wurden durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen des Projektes: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* - von der Johne'schen Krankheit zum Morbus Crohn – ZooMAP gefördert (Förderkennzeichen: 01KI1003E). Projektträger: Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt (DLR).

ERKLÄRUNG

Erklärung gemäß § 10 Abs. 5 der Promotionsordnung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität vom 6. Februar 2002

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“



edition vrentas
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5942-2



9 783835 195942

Cover photos: © Serhiy Shulye (front) + © thieury (back) - Fotolia.com