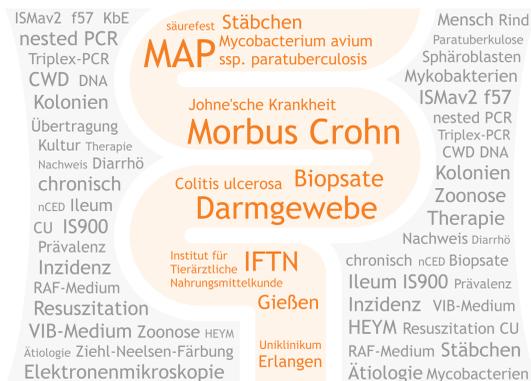


- MAP und Morbus Crohn? -

Untersuchungen zum Nachweis von
Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis (MAP)
in humanen Darmgewebeproben

KIM KATHERINE NGUYEN



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

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 2018

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 2018

© 2018 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
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

– MAP und Morbus Crohn? –

Untersuchungen zum Nachweis von
Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* (MAP)
in humanen Darmgewebeproben

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Kim Katherine Nguyen

Tierärztin aus Erlangen

Gießen 2018

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. Dr. Stefan Arnhold

Tag der Disputation: 20.06.2018

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).

Für Stefan

Für Deine immerwährende Unterstützung,

Deinen Glauben an mich und Deine Liebe

Einige Ergebnisse dieser wissenschaftlichen Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

Nguyen K, Atreya R, Neumann H, Akineden Ö, Neurath MF, Bülte M. (2012): MAP und Morbus Crohn? – Erste Ergebnisse einer Studie zur Isolierung von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) aus humanen Darmbiopsaten. 53. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), 25. bis 28. September 2012, Garmisch-Partenkirchen (Vortrag; Abstract S. 92).

Nguyen K, Atreya R, Neumann H, Akineden Ö, Neurath MF, Bülte M. (2012): MAP and Crohn's disease? – Preliminary results of a study isolation of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) from human intestine tissue. National Symposium on Zoonoses Research 2012, 11. bis 12. Oktober 2012, Berlin (Poster; Abstract S. 178).

Nguyen K, Atreya R, Neumann H, Akineden Ö, Neurath MF, Bülte M. (2013): Detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in human intestinal biopsies. International Workshop ZooMAP – From Johne's disease to Crohn's disease: still more questions than answers, 12. bis 13. März 2013, Hannover (Vortrag und Poster).

Nguyen K, Atreya R, Neumann H, Akineden Ö, Neurath MF, Bülte M. (2013): Detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in Crohn's disease patients? National Symposium on Zoonoses Research 2012, 19. bis 20. September 2013, Berlin (Poster; Abstract S. 204).

Nguyen K, Atreya R, Neumann H, Akineden Ö, Neurath MF, Bülte M. (2013): Mitbeteiligung von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) bei Morbus Crohn des Menschen? 54. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), 24. bis 27. September 2013, Garmisch-Partenkirchen (Poster; Abstract S. 180).

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
Sonderzeichen	X
1 Einleitung.....	1
2 Literaturübersicht	2
2.1 <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	2
2.1.1 Taxonomie und Eigenschaften.....	2
2.1.2 Tenazität und Vorkommen	4
2.1.3 Sphäroblasten.....	6
2.1.3.1 Herstellung von MAP-Sphäroblasten	6
2.1.3.2 Nachweis von MAP-Sphäroblasten.....	7
2.1.3.3 Resus-zitation von MAP-Sphäroblasten	9
2.2 Nachweisverfahren	10
2.2.1 Kulturelle Nachweisverfahren inkl. Dekontamination	13
2.2.2 Mikroskopische Nachweisverfahren.....	14
2.2.3 Molekular-basierte Nachweisverfahren	16
2.3 Paratuberkulose.....	19
2.3.1 Historische, ökonomische und epidemiologische Bedeutung der Paratuberkulose.....	19
2.3.2 Pathogenese, Klinik und Pathologie der Paratuberkulose	21
2.4 Übertragungswege von MAP auf den Menschen	25
2.5 Morbus Crohn.....	30
2.5.1 Historische und epidemiologische Bedeutung.....	31
2.5.2 (Histo-)Pathologie und Klinik von Morbus Crohn	32
2.5.3 Hypothesen zur Ätiologie von Morbus Crohn.....	34
2.5.3.1 Individuelle Einflussfaktoren.....	36
2.5.3.2 Umwelt- und Risikofaktoren	38
2.5.3.3 Infektiöse Ursachen	40
2.6 MAP und Morbus Crohn – Eine zoonotische Bedeutung?.....	43

3	Material und Methoden	52
3.1	Arbeitskonzept.....	52
3.2	Patienten- und Probenkollektiv.....	54
3.3	Aufbereitung der Biopsate und Anlegen der Kultur.....	57
3.4	Untersuchungsmethoden für den Nachweis von MAP.....	59
3.4.1	Färbung nach Ziehl-Neelsen	59
3.4.2	Nested PCR.....	61
3.4.3	Triplex-PCR.....	63
3.5	Anlegen MAP-verdächtiger Proben auf HEYM.....	66
3.6	Charakterisierung MAP-positiver Ergebnisse	67
3.6.1	IS900-PCR	67
3.6.2	DNA-Sequenzanalyse	70
3.8	Statistische Auswertung.....	71
4	Ergebnisse	72
4.1	Molekular-basierte Untersuchungsergebnisse	72
4.1.1	Abhängigkeit der Einflussgrößen aus dem Patienten- und Probenkollektiv	72
4.1.3	Abhängigkeit der Einflussgrößen: Zeit – Medium – Methode	77
4.2	Ergebnisse aus der kulturellen Anzucht auf HEYM.....	82
4.3	Charakterisierung der MAP-positiven Probe.....	83
5	Diskussion	86
5.1	Einfluss der Probenentnahme und des damit verbundenen Patienten- und Probenkollektivs auf den Nachweis von MAP/-DNA)	86
5.1.1	Probenentnahme.....	86
5.1.2	Patientenkollektiv	87
5.1.3	Probenkollektiv	92
5.2	Einfluss der Methodik.....	95
5.2.1	Dekontamination und kulturelle Anzucht.....	96
5.2.2	Färbung nach Ziehl-Neelsen	102
5.2.3	Molekular-basierte Untersuchungsverfahren.....	104
5.2.4	Bestätigung der Ergebnisse mittels kultureller und molekular-basierter Verfahren	108
5.3	Nachweis von MAP in humanen Darmgewebeproben.....	111
6	Schlussfolgerungen	116
7	Zusammenfassung.....	117

8	Summary	119
9	Anhang	121
9.1	Laborbedarf.....	121
9.1.1	Laborgeräte und -materialien	121
9.1.2	Reagenzien und Kits	123
9.2	Medien, Puffer und Lösungen	126
9.2.1	MGIT-Bouillon und Supplemente	126
9.2.2	NALC-NaOH-Lösung.....	127
9.2.3	Phosphatpuffer nach Sørensen	127
9.2.4	VIB-Medium (Modifizierte Kalbfleischbrühe).....	128
9.2.5	RAF-Medium (Reid's A Agar mit fetalem Kälberserum).....	128
9.2.6	Middlebrook 7H9-Flüssigmedium und Supplemente	130
9.2.7	PBS-Lösung	131
9.2.8	TB Stain Kit ZN.....	131
9.2.10	Enzymatischer Lysispuffer	132
9.2.11	DNeasy® Blood & Tissue Kit	132
9.2.12	Ladepuffer.....	133
9.2.13	Agarosegel (1,5 % bzw. 2,0 %)	133
9.2.14	TBE-Puffer.....	134
9.2.15	DNA-Marker XIV.....	134
9.2.16	Ethidiumbromid-Bad	134
9.2.17	HEYM (Herrold's Egg Yolk Medium).....	135
9.2.18	QIAquick PCR Purification Kit	135
9.2.19	QIAquick Gel Extraction Kit	136
9.3	Ergebnis der IS900-Sequenzanalyse.....	137
9.4	Multiple Sequence Alignment für IS900.....	138
10	Literaturverzeichnis.....	141
11	Danksagung.....	161
	Erklärung.....	163

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Elektronenmikroskopische Aufnahmen nach Ultradünnschnittverfahren von <i>M. smegmatis</i> -Stamm mc ² 155 vor (A,B) und nach (C,D) der Herstellung von Sphäroblasten.....	8
Abb. 2:	Mögliche Übertragungswege von <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> (MAP) auf den Menschen.....	26
Abb. 3:	Mögliche Einflussfaktoren auf die Ätiologie von Morbus Crohn, gegliedert nach Kategorien.....	35
Abb. 4:	Arbeitskonzept zum Nachweis von <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> (MAP) in humanem Darmgewebe.....	52
Abb. 5:	Anzahl der Biopsate aus dem entzündlichen und nicht-entzündlichen Bereich des Darmgewebes in Abhängigkeit von der Beurteilungsart, bezogen auf die Patientengruppen	56
Abb. 6:	Fließschema zur Aufbereitung der Biopsate und Anlegen der Kultur.....	58
Abb. 7:	Ladeschema des präparativen Agarosegels zur Isolierung des IS900-PCR-Produkts	69
Abb. 8:	Nachweis von MAP-DNA (in %) in Abhängigkeit vom Nährmedium, PCR-Methode und Zeitpunkt der Untersuchung	77
Abb. 9:	Koloniemorphologie MAP-verdächtiger Kolonien auf RAF-Medium a) nach 24-wöchiger Inkubationsdauer und b) nach 48-wöchiger Inkubationsdauer.....	80
Abb. 10:	Ergebnis der im IFTN etablierten IS900-PCR zum Nachweis der Insertionssequenz IS900 zur Sequenzierung	83
Abb. 11:	DNA-Sequenz des 853 bp-langen IS900-Amplifikates, isoliert aus der Probe eines Colitis ulcerosa-Patienten (siehe Kap. 4.3).....	137
Abb. 12:	Darstellung Multipler Sequence Alignements aus humanen und tierischen MAP-Stämmen.	140

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1:	Vorkommen von <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> bei Wildwiederkäuern.....	5
Tab. 2:	Vorkommen von <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> bei weiteren Tierarten.....	5
Tab. 3:	Übersicht unterschiedlicher Verfahren für den Nachweis von MAP	11
Tab. 4:	Übersicht der in Deutschland nach §11 Abs. 2 TierGesG durch das Friedrich-Löffler-Institut zugelassenen ELISA-Testsysteme zum Nachweis von MAP-Antikörpern bei Wiederkäuern in unterschiedlichen Matrices (Anonymous, 2012; Anonymous, 2016b, modifiziert).....	12
Tab. 5:	Historie der Paratuberkulose.....	19
Tab. 6:	Übersicht der geschätzten Herden- und Einzeltierprävalenzen bei Rindern	20
Tab. 7:	Inzidenzen für Morbus Crohn pro 100.000 Einwohner pro Jahr in Deutschland....	32
Tab. 8:	Mögliche Beteiligung bakterieller Mikroorganismen am Morbus Crohn	41
Tab. 9:	Nachweis von MAP bzw. MAP-DNA in humanen Gewebeproben des Magen-Darm-Traktes mittels kultureller und/oder molekular-basierter Methoden in Abhängigkeit der Patientengruppen	44
Tab. 10:	Nachweis von MAP bzw. MAP-DNA in verschiedenen humanen Probenarten mittels kultureller und/oder molekular-basierter Methoden in Abhängigkeit der Patientengruppen	48
Tab. 11:	Nachweis von MAP-Sphäroblasten in verschiedenen Darmgewebeproben bzw. im Blut mittels kultureller und/oder molekular-basierter und/oder mikroskopischer Methoden in Abhängigkeit der Patientengruppen	49
Tab. 12:	Verteilung der aus unterschiedlichen Darmabschnitten entnommenen Biopsate innerhalb verschiedener Patientengruppen	55
Tab. 13:	Zusammensetzung des Transportmediums für die Biopsate zur Versendung in Kryoröhrchen.....	56
Tab. 14:	Vergleich der Zusammensetzung der Medien für das Anlegen der Biopsate.....	57
Tab. 15:	Nested PCR-Ansatz zum Nachweis der Insertionssequenz IS900	63
Tab. 16:	Triplex-PCR-Ansatz zum Nachweis der Marker <i>f57</i> und <i>ISMav2</i>	64
Tab. 17:	Interpretation der C _t -Werte (Schwellenwertzyklus) bei der Triplex-PCR	65
Tab. 18:	IS900-PCR-Ansatz zum Nachweis der Insertionssequenz IS900.....	68
Tab. 19:	Nachweis von MAP-DNA bei verschiedenen Patientengruppen	73
Tab. 20:	Verteilung der Biopsate mit unterschiedlichem Entzündungscharakter.....	74

Tab. 21: Darstellung des Einflusses durch Merkmale des Patienten- (A) bzw. Probenkollektivs (B) ohne Darmabschnitt II (Caecum, Appendix) und VI (Colon descendens).....	76
Tab. 22: Vergleich aller Einzelergebnisse bezüglich Zeit, Medium und Methode auf den Nachweis von MAP-DNA	78
Tab. 23: Vergleich der Einzelergebnisse bezüglich Zeit und Medium auf den Nachweis von MAP-DNA.....	78
Tab. 24: Vergleich der Einzelergebnisse bezüglich Zeit und Methode auf den Nachweis von MAP-DNA.....	79
Tab. 25: Vergleich der Einzelergebnisse bezüglich Medium und Methode auf den Nachweis von MAP-DNA	79
Tab. 26: Vergleich der nested und Triplex-PCR bezüglich des Nachweises von MAP-DNA.....	81
Tab. 27: Übersicht der angelegten Herrold's Egg Yolk Medium (HEYM)-Röhrchen mit den Auswahlkriterien „Medium“ und „Inkubationsdauer“	82
Tab. 28: Darstellung der mittels Sequenzanalyse identifizierten und zur positiven, aus dem CU-Patienten isolierten, Probe ähnlichen Sequenzen.....	85

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AcrO	Acridin-Orange
AG	Arbeitsgruppe
AGID	Agargel-Immunodiffusionstest (<i>engl.: agar gel immunodiffusion</i>)
AIDS	<i>engl.: aquired immune deficiency syndrome</i>
AIEC	Adhärent-invasive <i>Escherichia coli</i>
Aqua dest.	destilliertes Wasser (<i>lat.: Aqua destillata</i>)
ATCC	American Type Culture Collection
<i>ATG16L1</i>	Gen (<i>engl.: autophagy-related 16-like 1</i>)
BACTEC 12B	radiometrisches Flüssigmedium zur Detektion von Mykobakterien
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare (<i>engl.: base pairs</i>)
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
<i>CARD15</i>	Gen (<i>engl.: caspase recruitment domain 15</i>)
CDEAS	<i>engl.: Crohn's Disease endomicroscopic activity score</i>
CI	Konfidenzintervall (<i>engl.: confidence interval</i>)
CLE	Konfokale Laserendomikroskopie (<i>engl.: confocal laser endomicroscopy</i>)
cm ²	Quadratzentimeter
CMV	Zytomegalievirus/Cytomegalievirus
C _t	Schwellenwertzyklus (<i>engl.: cycle threshold</i>)
CU	Colitis ulcerosa
CWD	Sphäroblasten (<i>engl.: cell wall deficient forms</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.: desoxyribonucleic acid</i>)
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EBV	Eppstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>engl.: enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Emakros	Entzündungscharakter der Probe makroskopisch festgestellt
Emikros	Entzündungscharakter der Probe mikroskopisch festgestellt
<i>et al.</i>	und andere (<i>lat.: et alii</i>)
g	Gramm
HEYM	Herrold's Egg Yolk Medium
HTE	High Throughput Experimentation
HPC	Hexadecylpyridiniumchlorid-Monohydrat
HTST	<i>engl.: high temperature-short time pasteurisation</i>
IAK	Interne Amplifikationskontrolle
<i>IBD5</i>	Gen (<i>engl.: inflammatory bowel disease 5</i>)
IFTN	Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde

IL23R	Gen (engl.: <i>interleukin 23 receptor</i>)
IRGM	Gen (engl.: <i>immunity-related GTPase family M protein</i>)
IS900	Insertionssequenz 900
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
KBR	Komplementbindungsreaktion
l bzw. L	Liter
LAM	Lipoarabinomannan
Lsg.	Lösung
M	Molar
M.	<i>Mycobacterium</i>
MAC	<i>Mycobacterium avium</i> -Komplex (engl.: <i>Mycobacteria avium complex</i>)
MALT	engl.: <i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>
mAU	milliAnsonU (Proteinaktivität nach Mortimer L. Anson)
max.	<i>Maximum</i> (math.)
MB	Middlebrook
Mbp	Mega-Basenpaare (entspricht 1.000 bp)
MC	Morbus Crohn
mg	Milligramm
MGIT	Mycobacterial Growth Indicator Tube
min	Minuten
min.	<i>Minimum</i> (math.)
MIRU	engl.: <i>mycobacterial interspersed repetitive unit</i>
ml	Milliliter
MLSSR	engl.: <i>multilocus short sequence repeats</i>
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MOTT	<i>Mycobacteria other than tubercle bacilli</i>
MPIL	engl.: <i>multiplex PCR of IS900 loci</i>
MS	Multiple Sklerose
MSDP-TLC	engl.: <i>matrix solid-phase dispersion and thin layer chromatography</i>
MTC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> -Komplex (engl.: <i>Mycobacterium tuberculosis complex</i>)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
NALC	N-Acetyl-L-Cystein
NaOH	Natriumhydroxid
nCED	nicht chronisch-entzündliche Darmerkrankung
NF-κB	engl.: <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
nm	Nanometer
NOD2	Gen, veraltetes Synonym zu <i>CARD15</i> (engl.: <i>nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2</i>)

Nr.	Nummer
<i>NRAMP1</i>	Gen, veraltetes Synonym zu <i>SLC11A1</i> (engl.: <i>natural resistance-associated macrophage protein 1</i>)
NRL	Nationales Referenzlabor
OADC	Ölsäure-Albumin-Dextrose-Komplex (engl.: <i>oleic acid albumin dextrose complex</i>)
OIE	Office International des Epizooties
OR	Chancenverhältnis (engl.: <i>odds ratio</i>)
PANTA	Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixinsäure, Trimethoprim, Azlocillin
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese (engl.: <i>pulse field gel electrophoresis</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität (lat.: <i>pondus hydrogenii</i>)
p(-Wert)	Signifikanzwert (engl.: <i>probability</i>)
RAF	Reid's A Agar mit fetalem Kälberserum (engl.: <i>Reid's A agar with fetal calf serum</i>)
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (engl.: <i>restriction fragment length polymorphism</i>)
SDS-PAGE	engl.: <i>sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
<i>SLC11A1</i>	Gen (engl.: <i>solute carrier family 11 member 1</i>)
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl.: <i>single nucleotide polymorphism</i>)
sp.	Spezies (lat.: <i>species</i>)
T1DM	Diabetes mellitus Typ 1
Tab.	Tabelle
T _m	Hybridisierungstemperatur (engl.: <i>temperature of melting</i>)
TSB	engl.: <i>tryptic soy broth</i>
U	Unit (Enzymeinheit)
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VIB	Modifizierte Kalbfleischbrühe (engl.: <i>veal infusion broth</i>)
VNTR	engl.: <i>variable number tandem repeats</i>
x g	Vielfaches der mittleren Erdbeschleunigung (Zentrifugationsbeschleunigung)
YOPIS	Empfindliche Personengruppen: Säuglinge/Kleinkinder bis 5 Jahre, Senioren, Schwangere, immungeschwächte Personen (engl.: <i>young, old, pregnant, immunosuppressed segments of the public</i>)
ZN	Ziehl-Neelsen

SONDERZEICHEN

%	Prozent
°C	Grad Celsius
±	plus minus
<	kleiner als
>	größer als
≥	größer als oder gleich
≤	kleiner als oder gleich
α	Signifikanzniveau
®	registrierte Warenmarke (<i>engl.: registered trademark</i>)
™	unregistrierte Warenmarke (<i>engl.: unregistered trademark</i>)

In zahlreichen Diskussionen steht *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) im Verdacht bei der Entstehung von Morbus Crohn (MC) – einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung des Menschen – mitbeteiligt zu sein.

Als Erreger der Johne'schen Krankheit – besser bekannt unter dem Namen Paratuberkulose – löst MAP bei Wiederkäuern eine chronische Darmentzündung aus, die nicht therapierbar ist (Whitlock und Buergelt, 1996). MAP konnte jedoch auch bei zahlreichen anderen Tierarten, unter anderem Primaten, nachgewiesen werden (McClure *et al.*, 1987; Münster *et al.*, 2013). Ähnlichkeiten in Bezug auf die Symptomatik und pathomorphologischen Veränderungen des Darmgewebes bei Morbus Crohn des Menschen und der Paratuberkulose der Wiederkäuer lassen die Frage nach einem zoonotischen Potential von MAP aufkommen. MAP konnte bereits aus Darmgewebe bzw. Blut von MC-Patienten isoliert werden (Chiodini *et al.*, 1984b; Naser *et al.*, 2004). Jedoch werden zahlreiche weitere Einflussfaktoren wie die individuelle Immunitätslage, eine genetische Prädisposition, Lebensstil des Patienten, umweltbedingte Gegebenheiten sowie das Vorhandensein anderer bzw. weiterer infektiöser Auslöser diskutiert (Ekbohm, 2007; Akbariqomi und Heidari, 2014).

Umstritten ist auch die Frage, ob Zellwand-geschädigte MAP-Zellen (Sphäroblasten) an der Ätiologie von Morbus Crohn mitbeteiligt sind. Bisher konnten solche Sphäroblasten aus reseziertem Darmgewebe, Biopsaten und Blut von MC-Patienten isoliert werden (Chiodini *et al.*, 1986; Markesich *et al.*, 1988; Hulten *et al.*, 2000b; Naser *et al.*, 2004). Aufgrund der veränderten Zellwandeigenschaften werden diese möglicherweise nicht vom Immunsystem des Menschen erfasst und können auch nicht mit den gängigen Nachweismethoden detektiert werden. Dadurch gestaltet sich der Nachweis von Sphäroblasten als schwierig und langwierig und erscheint in manchen Fällen sogar unmöglich.

Um eine nicht auszuschließende Mitbeteiligung von MAP am MC beim Menschen zu eruieren, wurden im Rahmen eigener Untersuchungen humane Gewebeproben von Morbus Crohn-, Colitis ulcerosa- sowie Kontrollpatienten (ohne chronisch entzündliche Darmerkrankungen) auf das Vorhandensein von MAP-Zellen untersucht. Hierfür kamen kulturelle, mikroskopische und molekular-basierte Nachweismethoden zum Einsatz. Aufgrund einer möglichen Mitbeteiligung von MAP-Sphäroblasten an der Ätiologie von MC wurden gleichzeitig Nährmedien zur Wiederherstellung Zellwand-intakter Zellen – sogenannte Resuszitationsmedien – verwendet.

2.1 *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*

2.1.1 Taxonomie und Eigenschaften

Taxonomisch lässt sich *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in die **Ordnung** der Actinomycetales der **Familie** *Mycobacteriaceae* einordnen. *Mycobacterium* – als einziger Vertreter der **Gattung** *Mycobacteria* – umfasst zurzeit weit über 120 Arten (Holt *et al.*, 1994; Tortoli, 2006). Die Einteilung der Arten kann aufgrund des Geno- bzw. Phänotyps erfolgen; des Weiteren werden Faktoren wie die individuelle Wachstumsgeschwindigkeit, die Fähigkeit der Pigmentierung, die Pathogenität hinsichtlich Mensch und Tier und der Anspruch hinsichtlich bestimmter Nährstoffe zur Klassifizierung genutzt.

Allgemein kann zwischen tuberkulösen und nicht-tuberkulösen, auch atypische Mykobakterien genannt, unterschieden werden. Dem *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex (**MTC**) zugehörig sind die Spezies *Mycobacterium* (*M.*) *tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis* ssp. *caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii* und *M. canetti*, die allesamt klinisch tuberkulöse Erscheinungsformen bei dem jeweiligen Wirt hervorrufen können (Songer und Post, 2005; Anonymous, 2015).

In Abgrenzung zum MTC gehören eine Vielzahl verschiedener Spezies der Gruppe der atypischen Mykobakterien – auch **MOTT** (mycobacteria other than tubercle bacilli) genannt – an. Eine besondere Untergruppe der MOTT stellt dabei der *Mycobacterium avium*-Komplex (**MAC**) dar: *M. avium* ssp. *avium*, *M. avium* ssp. *hominisuis*, *M. avium* ssp. *paratuberculosis* sowie *M. avium* ssp. *silvaticum* sind Vertreter dieser Gruppe (Anonymous, 2015). Eine weitere Möglichkeit der Einteilung der MOTT-Gruppe – vornehmlich auf Wachstumsgeschwindigkeit und Koloniemorphologie beruhend – erfolgte erstmals 1954 (Timpe und Runyon, 1954). Insgesamt können vier unterschiedliche Gruppen von atypischen Mykobakterien unterschieden werden (Runyon, 1959):

- I. langsam wachsend und photochromogen (Bsp.: *M. kansasii*)
- II. langsam wachsend und skotochromogen (Bsp.: *M. scrofulaceum*)
- III. langsam wachsend und keine Pigmentbildung (Bsp.: *M. avium*)
- IV. schnell wachsend (Bsp.: *M. smegmatis*)

Zur letzteren Gruppe gehören zumeist nicht-pathogene, aus der Umwelt isolierte Mykobakterien, im Gegensatz zu den ersten drei Gruppen, hinter denen sich auch pathogene Mykobakterien verbergen können. So lässt sich der zuvor erwähnte MAC-Komplex der Gruppe III zuordnen. Als einer der wichtigsten Vertreter dieser Gruppe ist **MAP** zu nennen, ein aerobes, nicht bewegliches, gram-positives Stäbchen von schlanker, gerader oder leicht gekrümmter Gestalt mit einer Länge von 0,3–2 µm, einer Breite von 0,3–0,5 µm und einer Neigung zur Bildung von Aggregaten (Bisping und Amtsberg, 1988). Die Generationszeit beträgt bei optimalen Bedingungen 22 bis 26 Stunden, so dass nach acht bis zwölf Wochen, in vielen Fällen auch später, kleine (1–5 mm), weißliche Kolonien mit rauher oder glatter Oberfläche auf festen Nährmedien sichtbar sind (Chiodini *et al.*, 2012). MAP ist Katalase-positiv, Acrylsulfatase-positiv, Lysozym-resistent und gilt – im Gegensatz zu *M. tuberculosis* – als anspruchsvolle Spezies, die eine exogene Mykobaktin-Quelle für das Wachstum *in vitro* benötigt (Holt *et al.*, 1994; Greenstein, 2003; Chiodini *et al.*, 2012). Aufgrund dieser Mykobaktin-Abhängigkeit lässt sich MAP von anderen Vertretern der MAC-Gruppe unterscheiden (Songer und Post, 2005). Das komplette Genom des MAP-Stammes K10 beinhaltet 4,83 Mbp mit einem hohen G+C-Gehalt von 66–67 % und ist somit kleiner als das Genom von *M. avium* ssp. *hominisuis* (Harris und Barletta, 2001; Li *et al.*, 2005; Wynne *et al.*, 2010). Es wird vermutet, dass MAP sich aus *M. avium* ssp. *hominisuis* entwickelt hat und sich in der einzigartigen biologischen Nische der intestinalen Mukosa der Wiederkäuer als obligat intrazellulärer pathogener Mikroorganismus etablieren konnte (El-Zaatari *et al.*, 2001; Turenne *et al.*, 2007).

Die Entdeckung von IS900 als Spezies-spezifische Insertionssequenz mit 14 bis 18 Kopien im Genom lässt eine Unterscheidung zu anderen Mykobakterien-Spezies innerhalb der MAC-Gruppe zu (McFadden *et al.*, 1987; Collins *et al.*, 1989).

Mittels molekularer Charakterisierung anhand IS900-Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE), Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) sowie der Betrachtung der spezifischen Eigenschaften bei der Kultivierung lassen sich MAP-Stämme in drei Hauptgruppen einteilen (Collins *et al.*, 1990; Pavlík *et al.*, 1995; Juan *et al.*, 2005):

- **Typ I** oder **S-Typ** (sheep) → infiziert Schafe und Ziegen
- **Typ II** oder **C-Typ** (cattle) → infiziert Rinder, Wildtiere und Ziegen
- **Typ III** oder **intermediärer Typ** → infiziert Ziegen, selten Rinder

Typ I und III werden aufgrund der engen genetischen Homologie auch als **Typ I/III** gruppiert (Collins *et al.*, 1990; Juan *et al.*, 2005). Bestimmte Typen infizieren bevorzugt bestimmte Tiere, jedoch besteht auch die Möglichkeit einer Kreuzinfektion (Collins *et al.*, 1990).

Ein weiteres Charakteristikum für MAP ist seine Säurefestigkeit (Holt *et al.*, 1994; Stephan, 2007), die auf der komplexen Zellwandstruktur beruht. Die Zellwand besteht zu einem großen Anteil aus Lipiden; darunter befinden sich auch stark verzweigte Mykolsäuren, die den Mykobakterien allgemein eine hohe Stabilität verleihen und den Grund für die ungewöhnlich hohe Tenazität in der Umwelt darstellen (Brennan und Nikaido, 1995).

2.1.2 Tenazität und Vorkommen

Die hohe Tenazität von MAP liegt in dem Aufbau der Zellwand begründet, der dadurch bedingt hydrophoben Natur des Mikroorganismus und seiner Tendenz zur Aggregatbildung (Brennan und Nikaido, 1995; Lund *et al.*, 2002).

Beispielsweise kann MAP in Rinderkot zwischen 154 bis 270 Tagen (Lovell *et al.*, 1944; Larsen *et al.*, 1956), in Rindergülle unter optimalen Bedingungen bis zu 252 Tagen (Jørgensen, 1977), in fließendem Gewässer bis zu 163 Tage (Lovell *et al.*, 1944) sowie in stehendem Gewässer 270 Tage (Larsen *et al.*, 1956) und im Boden kontaminierter Weidenflächen bis zu elf Monate (Gay und Sherman, 1992) überleben. Es wird beschrieben, dass die Überlebensfähigkeit von MAP außerhalb seines Wirtes durch Sonnenlicht, Austrocknung, einem hohen Kalzium-Gehalt und einem hohen pH-Wert im Boden beeinflusst werden kann und dass ein andauernder Kontakt zu Urin und Kot dessen Lebensdauer verkürzen kann (Jørgensen, 1977; Chiodini *et al.*, 1984a; Ayele *et al.*, 2001). Des Weiteren ist MAP äußerst resistent gegenüber chlorhaltigen Desinfektionsmitteln sowie Ozon (Klanicova *et al.*, 2012); möglicherweise tragen Eliminierungsmaßnahmen wie Chlorierung und Filtration eher zum Überleben von MAP durch das Ausmerzen konkurrierender Keime bei (Falkinham III., 2003). Die Überlebensfähigkeit von MAP konnte nach einer Austrocknungsphase von 47 Monaten belegt werden (Gay und Sherman, 1992). Außerdem wird MAP eine hohe Thermotoleranz zugeschrieben: Nach einer zwölfmonatigen Lagerung bei einer Temperatur von -14 °C (Büttner *et al.*, 2005), aber auch nach Pasteurisierung bei 72 °C für 15 Sekunden (Büttner *et al.*, 2005; Grant, 2005) konnte MAP angezüchtet werden. Der Grund für die Hitzeresistenz wird insbesondere der Aggregatbildung von MAP-Zellen zugeschrieben (Klijn *et al.*, 2001b).

Vor allem Rinder sind für eine MAP-Infektion empfänglich, aber mit Schafen und Ziegen sind auch kleine Wiederkäuer betroffen. MAP ist ebenfalls bei Wildwiederkäuern sowie Nicht-

Wiederkäuern nachweisbar (Pavlik *et al.*, 2000a; Ayele *et al.*, 2001; Beard *et al.*, 2001a). Eine Übersicht für MAP empfängliche Wildwiederkäuer ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tab. 1: Vorkommen von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* bei Wildwiederkäuern

Tierart	Literatur
Mufflon (<i>Ovis musimon</i>)	Pavlik <i>et al.</i> , 2000a
Dickhornschaf (<i>Ovis canadensis</i>)	Williams <i>et al.</i> , 1983
Bergziege (<i>Oreamnos americanus</i>)	Williams <i>et al.</i> , 1983
Bison (<i>Bison bison</i>)	Buergelt <i>et al.</i> , 2000
Weißwedelhirsch (<i>Odocoileus virginianus</i>)	Chiodini und Van Kruiningen, 1983
Rotwild (<i>Cervus elaphus</i>)	Nebbia <i>et al.</i> , 2000; Pavlik <i>et al.</i> , 2000a
Rehwild (<i>Capreolus capreolus</i>)	Pavlik <i>et al.</i> , 2000a
Damhirsch (<i>Dama dama</i>)	Pavlik <i>et al.</i> , 2000a; Balseiro <i>et al.</i> , 2008

Wildwiederkäuer können somit ein Reservoir für MAP bilden. Eine Transmission von MAP von wildlebenden auf domestizierte Wiederkäuer kann beispielsweise durch die Nutzung infizierter Weideflächen erfolgen (Çetinkaya *et al.*, 1997; Carta *et al.*, 2013).

Darüber hinaus ist MAP bei einer Vielzahl anderer Tierarten nachgewiesen worden (siehe Tab. 2).

Tab. 2: Vorkommen von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* bei weiteren Tierarten

Tierart	Literatur
Wildkaninchen (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	Greig <i>et al.</i> , 1997; Beard <i>et al.</i> , 2001b
Fuchs (<i>Vulpes vulpes</i>)	Beard <i>et al.</i> , 2001a
Hermelin (<i>Mustela erminea</i>)	Beard <i>et al.</i> , 2001a
Dachs, Waschbär, Wiesel, Gürteltier, Opossum	Corn <i>et al.</i> , 2005; Beard <i>et al.</i> , 2001a
Wildkatze (<i>Felis silvestris</i>)	Corn <i>et al.</i> , 2005
<i>Primates</i> : Stummelschwanzmakak (<i>Macaca arctoides</i>), Mandrill (<i>Papio sphinx</i>), Schwarz-Weiß Vari (<i>Varecia variegata</i>), Lisztaffe (<i>Saguinus oedipus</i>)	McClure <i>et al.</i> , 1987; Zwick <i>et al.</i> , 2002; Münster <i>et al.</i> , 2013
<i>Rodentia/ Muroidea</i> : Ratte, Waldmaus	Beard <i>et al.</i> , 2001a
<i>Aves</i> : Saatkrähe, Rabe, Dohle	Beard <i>et al.</i> , 2001a; Corn <i>et al.</i> , 2005
<i>Diptera</i> : <i>Scatophaga</i> spp., <i>Lucilia caesar</i> , <i>Calliphora vicina</i> , <i>Eristalis tenax</i>	Fischer <i>et al.</i> , 2001; Fischer <i>et al.</i> , 2005
Regenwurm (<i>Oligochaeta, Lumbricidae</i>), Schabe (<i>Blatta orientalis</i>), Käfer	Fischer <i>et al.</i> , 2003a; Fischer <i>et al.</i> , 2003b; Fischer <i>et al.</i> , 2004
<i>Nematoda</i> : Larven von <i>Haemonchus contortus</i> , <i>Ostertagia circumcincta</i> , <i>Trichonstrongylus colubriformis</i>	Lloyd <i>et al.</i> , 2001
<i>Protozoa</i>	Hermon-Taylor <i>et al.</i> , 2000

2.1.3 Sphäroblasten

Als Sphäroblasten werden Zellwand-geschädigte Formen von Bakterien bezeichnet. Abhängig von der Reduktion des Anteils an Zellwandbestandteilen können Zellwand-geschädigte Formen – auch CWD-Formen (cell wall deficient forms) genannt – in **Protoplasten** ohne jegliche Zellwand und ohne die Möglichkeit sich zu teilen und in **Sphäroblasten** mit Zellwandresten und der Fähigkeit sich zu regenerieren, unterschieden werden (Rastogi und Venkitasubramanian, 1979; Murty und Venkitasubramanian, 1983; Beran *et al.*, 2006). Im Weiteren werden die Begriffe Sphäroblasten und CWD-Formen gleichbedeutend angewendet.

Die Bildung von Sphäroblasten *in vitro* kann durch zwei verschiedene Mechanismen erfolgen: (1) Durch die Zugabe von chemischen Substanzen kann der Aufbau der Zellwand unterbrochen oder (2) die Zellwand selbst geschädigt werden (Rastogi und David, 1981). Zumeist erfolgt eine Kombination beider Mechanismen, beispielsweise durch den Zusatz von Glycin und Lysozym zum Kultivierungsmedium (Hulten *et al.*, 2000a). Es wird vermutet, dass durch die Schädigung der Zellwand Lipoarabinomannane (LAM), welche mit der Lipiddoppelschicht der Zellmembran verbunden sind, reduziert werden, und Sphäroblasten dadurch einem immunologischen Nachweis entgehen können. LAM sind immunologisch aktive Verbindungen, bestehend aus Glycerol, Inositol, Phosphaten in Kombination mit Zucker und weiteren Fettsäuren (Brennan und Nikaido, 1995; Valentin-Weigand, 2002; Keown, 2010).

2.1.3.1 Herstellung von MAP-Sphäroblasten

Die Entwicklung von Sphäroblasten kann sowohl *in vitro* als auch *in vivo* erfolgen, wobei die genauen Prozesse der Umwandlung Zellwand-intakter in Zellwand-geschädigte Formen im Tier bzw. Menschen letztendlich nicht geklärt sind. Drei mögliche Hypothesen zur ***in vivo*-Sphäroblastenbildung** werden im Review von Beran *et al.* (2006) diskutiert: **(1)** Durch die Aufnahme von Bakterien, unter anderem MAP, in Makrophagen formieren sich Phagolysosome (siehe auch Kapitel 2.3.2). Das dabei entstehende **Lysozym** kann die Zellwand der Mykobakterien schädigen; die Sphäroblasten sind damit in der Lage, in den Makrophagen zu persistieren und der Immunantwort des Wirtes zu entgehen. **(2)** Durch die Gabe von nicht ausreichend therapeutisch wirksamen Dosen an **Antibiotika** zur Behandlung des Wirtes können diese Substanzen die Biosynthese der Mykobakterienzellwand stören und zur Sphäroblasten-Umwandlung führen. **(3)** Durch **Mutationen im Genom** könnten Sphäroblasten *in vivo* entstehen, jedoch liegen bisher keine Studien vor, die diese Hypothese belegen.

Dagegen wurde die **Umwandlung von Mykobakterien-Sphäroblasten *in vitro*** bisher sehr gut untersucht. Bei den primär verwendeten chemischen Substanzen zur Herstellung von Sphäroblasten handelt es sich um Glycin und Lysozym, die die Zellwand(-biosynthese) schädigen können (Udou *et al.*, 1983; Naser *et al.*, 1993; Rosu *et al.*, 2013). Die gewonnene Sphäroblasten-Suspension ist osmotisch instabil und kann beispielsweise mit einem Protoplasten-Puffer mit einem pH von 7,2 (Hopwood *et al.*, 1986) oder einer anderen vergleichbar salzreichen Lösung (Udou *et al.*, 1982) stabilisiert werden.

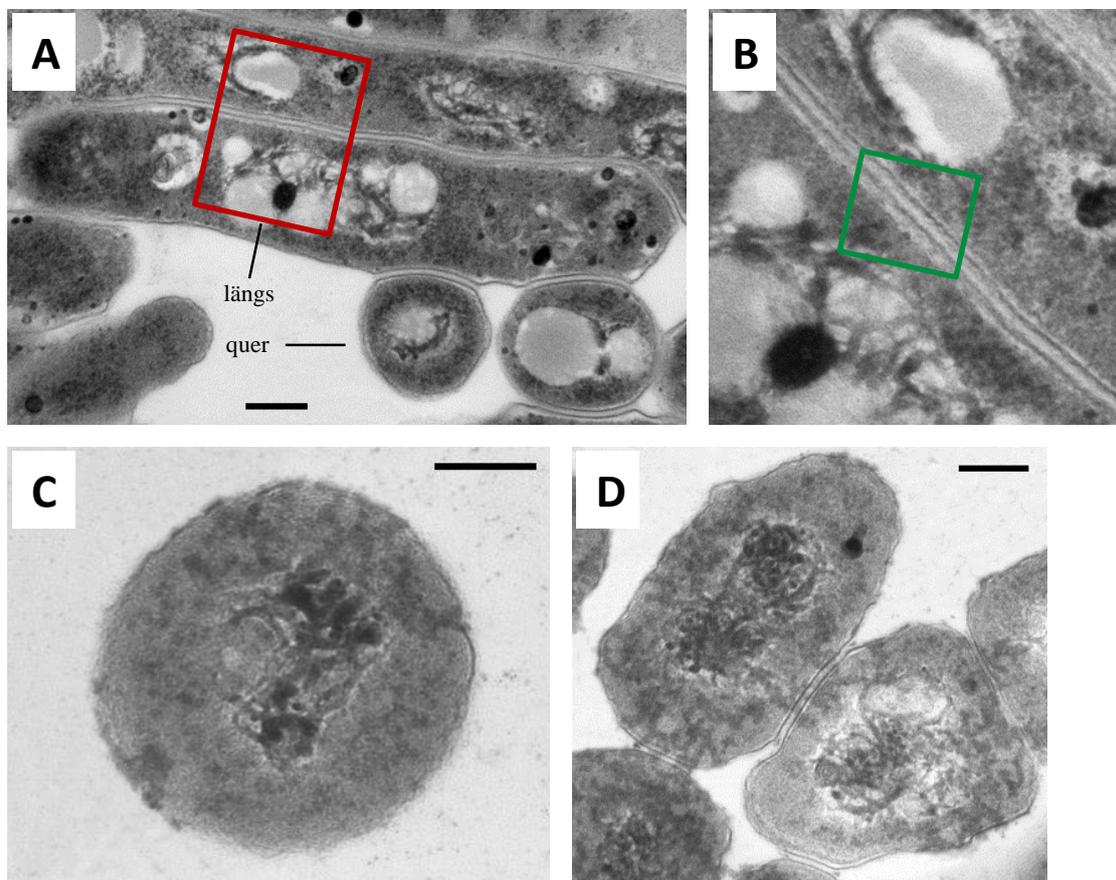
2.1.3.2 Nachweis von MAP-Sphäroblasten

MAP-Sphäroblasten werden als lebensfähige, aber schlecht nachweisbare Zellen angesehen, unter anderem aufgrund ihrer nur sehr langsamen Replikation in kulturellen Nährmedien (Mattman *et al.*, 1960; Naser *et al.*, 2014) und deren Eigenheit, nicht auf hypertonischem Medium zu wachsen (Chiodini *et al.*, 1986).

Der partielle Verlust der Zellwand wurde von Hines II und Styer (2003) durch die Erstellung eines chemisch-typischen Profils mittels MSPD-TLC (Matrix-Festphasendispersion mit anschließender Dünnschichtchromatographie) und mit Hilfe von SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) nachgewiesen. Zellwand-geschädigte Formen von Mykobakterien verlieren ihre Säurefestigkeit und können weder mit der Ziehl-Neelsen- noch mit der Kinyoun-Färbung lichtmikroskopisch dargestellt werden (Hulten *et al.*, 2001; Beran *et al.*, 2006). Fluoreszenzmikroskopisch-basierte Färbemethoden wie Acridin Orange sind nicht in der Lage, zwischen Zellwand-intakten und -geschädigten Formen zu unterscheiden (Hulten *et al.*, 2000a). Dagegen bietet die Elektronenmikroskopie die Möglichkeit, sowohl Form als auch Struktur der Zelle und der damit verbundenen Zellwand zu betrachten: Sphäroblasten besitzen eine pleomorphe Gestalt, liegen jedoch häufig in kugelförmiger Form vor und sind mit durchschnittlich 500 nm größer als die stäbchenförmigen Zellwand-intakten MAP-Zellen (siehe Abb. 1). An manchen Stellen sind MAP-Sphäroblasten nur von der Zytoplasmamembran umgeben, an anderen Stellen ist wiederum lediglich die Stärke der Zellwand reduziert (Udou *et al.*, 1982; Hines II und Styer, 2003).

Molekularbiologisch lassen sich mit dem PCR-Verfahren Zellwand-kompetente und Zellwand-geschädigte Mykobakterien nicht unterscheiden (Wall *et al.*, 1993). Jedoch konnten mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung (ISH) mit IS900-Sonden nach Hulten *et al.* (2000a; 2000b; 2001) spezifisch MAP-Sphäroblasten in Gewebeabschnitten von Paratuberkulose-positiven Rindern sowie Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten nachgewiesen werden. Eine Studie von Hines II und Styer (2003) zum Vergleich der Seren von Paratuberkulose-positiven und

-negativen Rindern mittels Western Blot deckte unterschiedliche Antigenexpressionen bei Zellwand-kompetenten MAP-Formen und Sphäroblasten auf. Bei Sphäroblasten sind keine Banden bzw. nur abgeschwächte Signale an einer Region zu sehen, die normalerweise Banden für LAM – immunologisch aktive Verbindungen in der Mykobakterienzellwand – aufweisen.



(A) Zellwand-intakte Stäbchen von *M. smegmatis* (längs- und querschnitt). Der rote Rahmen zeigt den in Bild B vergrößert aufgenommenen Ausschnitt. (B) Vergrößerte Ansicht der intakten Zellwand (grüner Rahmen) von *M. smegmatis* (elektronendichte innere Schicht: Zytoplasmamembran; elektronentransparente Schicht; elektronendichte äußere Schicht: äußere Schicht der Zellwand). (C, D) Zellwand-geschädigte Formen (Sphäroblasten) von *M. smegmatis* mit runder (C) bzw. pleomorpher (D) Form mit partiell abgelöster Zellwand oder alleiniger Begrenzung durch Zytoplasmamembran. Maßstab 0,2 μm (Nguyen *et al.*, 2011a).

Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen nach Ultradünnschnittverfahren von *M. smegmatis*-Stamm mc² 155 vor (A, B) und nach (C, D) der Herstellung von Sphäroblasten

Insgesamt sind nur wenige Informationen über den Nachweis von MAP-Sphäroblasten in Tieren vorhanden. Ein Nachweis von MAP-Sphäroblasten in Menschen ist zwar selten und nur mit erhöhtem Aufwand verbunden, jedoch durchaus möglich (Beran *et al.*, 2006). Burnham *et al.* detektierten bereits 1978 bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten) Zellwand-geschädigte Formen von Mykobakterien, jedoch gelang erst Chiodini *et al.* (1984b; 1986) der Nachweis von MAP-Sphäroblasten im Darmgewebe von Morbus Crohn-Patienten. Im Laufe der Zeit konnte eine

Reihe von Forschern Zellwand-geschädigte Formen von MAP aus Biopsien und Resektaten des Darmgewebes oder aus dem Blut von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen isolieren (Graham *et al.*, 1987; Markesich *et al.*, 1988; Hermon-Taylor *et al.*, 1990; Mendoza *et al.*, 2010; Wall *et al.*, 1993). Eine detaillierte Übersicht über das Vorkommen von MAP-Sphäroblasten im Menschen ist in Tabelle 11 dargestellt (siehe Kapitel 2.6).

Hines II und Styer resümierten in ihrer Studie von 2003, dass zellwandbedingte Veränderungen morphologischer und chemischer Genese bei MAP-Sphäroblasten einen signifikanten Einfluss auf die Diagnose, Virulenz, Pathogenität, Immunantwort und Ausmaß der Erkrankung, welche sowohl bei Menschen als auch Tieren mit dem Vorhandensein von Sphäroblasten in Verbindung gebracht werden, haben können.

2.1.3.3 Resusztation von MAP-Sphäroblasten

Bereits in den Jahren 1982 und 1983 berichteten Udou *et al.* über eine mögliche Reversion Zellwand-geschädigter Mykobakterien in Zellwand-intakte Formen. Diese sogenannte Resusztation konnte bei *in vitro* hergestellten *M. smegmatis*-Sphäroblasten elektronenmikroskopisch nachvollzogen werden. Zwei Mechanismen der morphologischen Umwandlung in Zellwand-intakte Stäbchen können dabei erfolgen (Udou *et al.*, 1983): **(1)** Das sogenannte „**Budding**“ (Knospung) kann in den ersten 20–48 Stunden nach Inkubation in Regenerationsmedien zu unregelmäßig auftretenden Auswüchsen mit Verästelung, jedoch ohne Septierung, an den Sphäroblasten führen. Eine länger andauernde Inkubation bewirkt ein mycelartiges Wachstum und eine anschließende Teilung zu Stäbchen an den vorgesehenen Septierungspunkten. **(2)** Bei der Bildung kleiner, intrazellulärer „**Tochterzellen**“ können **(a)** elektronendichte Zellen im Zytoplasma der Sphäroblasten („**elementary bodies**“ oder „**inclusion bodies**“) oder **(b)** initiale Körper, umgeben von einer Membran und mit einem individuellen Nucleoid („**initial bodies**“), entstehen, die sich durch anschließende Knospung vom Sphäroblasten lösen und eigenständig zu Stäbchen wachsen können.

Chiodini *et al.* (1986) konnten aus zuvor aus dem Darmgewebe von Morbus Crohn-Patienten isolierten Sphäroblasten, nach drei aufeinander folgenden Subkultivierungsschritten auf HEYM (Herold's Egg Yolk Schrägmedium) und einer weiteren Passage in Middlebrook 7H9-Flüssigmedium säurefeste Stäbchen nachweisen. Hines II und Styer (2003) gelang ebenfalls die stufenweise Umwandlung in Zellwand-intakte Formen von MAP durch die Anzucht künstlich hergestellter Sphäroblasten in Middlebrook 7H9-Flüssigmedium. Markesich *et al.* (1988) entwickelten ein Medium, welches dem Wachstum anspruchsvoller Mikroorganismen genügen

und die Umwandlung von Sphäroblasten in säurefesten Stäbchen anregen soll. Die so genannte **modifizierte Kalbfleischbrühe** ist ein Flüssigmedium, basierend auf Kalbfleischbrühe und Hefeextrakt, dem weitere Zusätze wie Pferdeserum, Saccharose, Magnesiumsulfat und Mycobactin J nach Inokulation mit einer Sphäroblasten-Suspension beigefügt werden. Ein weiteres Resuszitationsmedium ist das **RAF-Festmedium** (Reid's A Agar mit fetalem Kälberserum) nach Bull (2008; 2009; 2010), welches neben dem fetalen Kälberserum, Amphotericin B, Nalidixinsäure und Vancomycin enthält.

Über die Höhe der Resuszitationsrate wurde vielfach diskutiert: Bei *in vitro* hergestellten mykobakteriellen Sphäroblasten soll die Resuszitationsrate bei weniger als 0,1 % liegen (Rastogi und David, 1981; Udou *et al.*, 1982; Udou *et al.*, 1983); Hines II und Styer (2003) gelang jedoch eine mehr als 90 %ige Reversion in die ursprüngliche Zellwand-intakte Stäbchenform von MAP innerhalb von acht Tagen. Während Chiodini *et al.* (1986) vermuteten, dass die Resuszitationsrate von *in vivo* vorkommenden Sphäroblasten noch unbekannt ist, aber möglicherweise niedriger als die *in vitro*-Reversion sein würde, berichteten Graham *et al.* (1987) und Markesich *et al.* (1988) von einer erfolgreichen Umwandlung von aus Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen isolierten mykobakteriellen Sphäroblasten bei 33,3 % bzw. 53,8 % der Fälle. Bis zur Resuszitation in Zellwand-kompetente MAP-Stäbchen in Nährmedien können gleichwohl Monate bis Jahre vergehen (Chiodini *et al.*, 1986; Markesich *et al.*, 1988).

2.2 Nachweisverfahren

Allgemein können zum Nachweis von MAP direkte und indirekte Methoden unterschieden werden (siehe Tab. 3). Dabei beeinflussen verschiedene Faktoren entscheidend die Auswahl des Nachweisverfahrens:

- a) Probenmatrix (Kot, Gewebe, Blut etc.),
- b) Ziel der Untersuchung (Screening, Epidemiologie),
- c) Sensitivität und Spezifität des jeweiligen Nachweisverfahrens.

Bei klinischen Proben kann zusätzlich das Stadium der Erkrankung eine Rolle bei der Auswahl des Testsystems spielen (Homuth, 2002). Gegebenenfalls kann eine Kombination der Methoden zur Erhöhung der Aussagekraft angestrebt werden; beispielsweise erfolgt nach erfolgreicher kultureller Anzucht eine anschließend molekular-basierte Identifizierung des Mikroorganismus (Carta *et al.*, 2013).

Tab. 3: Übersicht unterschiedlicher Verfahren für den Nachweis von MAP

Direkte Nachweisverfahren	
Kultur	Feste oder flüssige Nährmedien mit/ohne vorhergehender Dekontamination
Mikroskopie	Lichtmikroskopie Fluoreszenzmikroskopie Elektronenmikroskopie
Molekularbasierte Verfahren	Polymerase-Kettenreaktion (PCR): konventionell oder Real Time Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit – Variable Number Tandem Repeats (MIRU-VNTR) Multilocus Short Sequence Repeats (MLSSR)
Indirekte Nachweisverfahren	
Basierend auf zellulärer Immunantwort	Intrakutan- / Johnin-Test Interferon γ -Test
Basierend auf humoraler Immunantwort	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Komplementbindungsreaktion (KBR) Agargel-Immunodiffusionstest (AGID)

Indirekte Nachweisverfahren beruhen in der Regel auf einer T-Zell-vermittelten Immunantwort (in frühen Phasen der Infektion) oder Antikörper-vermittelten Immunantwort (in späteren Phasen der Infektion, meist verbunden mit klinischer Ausprägung) des Wirtes (Ayele *et al.*, 2001; Harris und Barletta, 2001; Büttner *et al.*, 2005). Die Spezifität dieser immunologischen Methoden liegt bei ca. 50 % (Stephan, 2007). Besonders hervorzuheben ist der Nachweis von Antikörpern mittels der fünf in Deutschland zugelassenen und kommerziell erhältlichen ELISA-Systeme (siehe Tab. 4).

Tab. 4: Übersicht der in Deutschland nach §11 Abs. 2 TierGesG¹⁾ durch das Friedrich-Löffler-Institut zugelassenen ELISA-Testsysteme zum Nachweis von MAP-Antikörpern bei Wiederkäuern in unterschiedlichen Matrices (Anonymous, 2012; Anonymous, 2016b, modifiziert)

Bezeichnung des Testsystems (Hersteller)	Verwendungszweck ²⁾			Sensitivität (%)		Spezifität (%)		Zulassungs-Nr.
	Rind	Schaf	Ziege	Serum ³⁾	Milch ⁴⁾	Serum ⁵⁾	Milch ⁶⁾	
Test zum Nachweis von Antikörpern gegen die Paratuberkulose (Screening bzw. Bestätigung) (Institut Pourquier, IDEXX Laboratories Inc., Montpellier, F)	S/P/M	S/P	S/P	58,2	54,5	99,0	98,3	BGVV-B 263
PARAS bzw. PARAB – ID Screen® Paratuberculosis indirect (Screening bzw. Bestätigung) (ID VET Sarl, Grabels, F)	S/P/M	S/P	S/P	58,2	62,2	99,3	97,4	FLI-B 443 FLI-B 533
<i>cattletype</i> ® MAP Ab – ELISA-Testkit zum Nachweis von Antikörpern gegen <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> (QIAGEN Leipzig GmbH, Leipzig, D)	S/P/M	S/P	S/P	59,1	51,1	98,6	98,3	FLI-B 471
PARACHEK® 2 – ELISA für den <i>in vitro</i> Nachweis von Antikörpern gegen <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> (Thermo Fisher Scientific, LSI, Lissieu, F)	S/M	S	S	59,1	55,6	99,3	99,1	FLI-B 477
LSIVet VETPTRS – LSIVet™ Ruminant Paratuberculosis Advanced-Serum (LSI, Life Technologies, Lissieu, F)	S	S	S	100 ⁷⁾	–	100 ⁸⁾	–	FLI-B 605

- 1) Gesetz zur Vorbeugung vor und Bekämpfung von Tierseuchen (Tiergesundheitsgesetz – TierGesG) vom 22.05.2013 (BGBl. I S. 1324)
- 2) S = Serum, P = Plasma, M = Milch
- 3) Seren von 110 Rindern, bei denen Paratuberkulose kulturell oder pathomorphologisch nachgewiesen wurden (Anonymous, 2012)
- 4) Milch von 45 Rindern aus der gleichen Population (Anonymous, 2012)
- 5) Seren von 286 Rindern aus Paratuberkulose-unverdächtigen Beständen (Anonymous, 2012)
- 6) Milch von 115 Rindern aus der gleichen Population (Anonymous, 2012)
- 7) Kurz- bzw. Langzeit-Inkubation von 56 bzw. 54 Seren von Rindern, Schafe, Ziegen (Angaben des Herstellers)
- 8) Kurz- bzw. Langzeit-Inkubation von 81 bzw. 290 Seren von Rindern, Schafe, Ziegen (Angaben des Herstellers)

ELISA-Systeme werden bevorzugt als Herdenscreening für verschiedene Tierarten aus der Probenmatrix Milch oder Serum angewendet (Chiodini *et al.*, 2012). Eine Anwendung des Testsystems bei subklinischen Paratuberkulose-Fällen wird jedoch nicht empfohlen, da die Sensitivität mit 15–37 % deutlich herabgestuft wird (Chiodini *et al.*, 2012).

Auf die direkten Nachweisverfahren soll im Folgenden etwas näher eingegangen werden.

2.2.1 Kulturelle Nachweisverfahren inkl. Dekontamination

Um eine möglichst hohe Effizienz bei den kulturellen Nachweisverfahren zu erreichen, ist eine vorherige Dekontamination der Proben anzuraten. Es können verschiedene Dekontaminationsmittel abhängig von der Probenmatrix angewendet werden. N-Acetyl-L-Cystein-Natriumhydroxid (**NALC-NaOH**) – vormals entdeckt zur Dekontamination und Verflüssigung von Sputumproben zum Nachweis von *M. tuberculosis* in Kultur (Kubica *et al.*, 1963) – wird eingesetzt um die Begleitflora, vor allem die Kontamination mit Pilzen, bei der Kultivierung von MAP einzudämmen (Bradner *et al.*, 2013a). Die Dekontamination mit NALC-NaOH wurde bei Milchproben von Rindern (Bradner *et al.*, 2013a) und humanen Gewebeproben (Schwartz *et al.*, 2000; Füllgrabe, 2008) angewendet. Ein anderes häufig eingesetztes Dekontaminationsmittel ist **HPC** (Hexadecylpridiumchlorid-Monohydrat) zur Unterdrückung von *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. sowie weiteren nicht-pathogenen Mykobakterien (Bradner *et al.*, 2013a). Ein Gebrauch von HPC zur Dekontamination erfolgte bei Rinderkotproben (Whipple *et al.*, 1991; Pavlik *et al.*, 2000b), Milchproben (Bradner *et al.*, 2013b) sowie humanen Gewebeproben (Graham *et al.*, 1987). Des Weiteren können **antibiotische Zusätze** zum Kultivierungsmedium wie Amphotericin B, Nalidixinsäure, Vancomycin oder eine Mischung all derer zur Unterdrückung der Begleitflora von MAP beitragen (Anonymous, 2007; Bradner *et al.*, 2013a).

Nach wie vor gelten kulturelle Verfahren mit Nachweis der Mykobaktin-Abhängigkeit und Säurefestigkeit von MAP als Goldstandard (Spezifität 100 %), auch wenn diese mit großem Aufwand und einer langwierigen Anzucht verbunden sind (Twort und Ingram, 1912; Stephan, 2007; Bradner *et al.*, 2013a). Zur eindeutigen Identifizierung von MAP wird in der Regel ein molekular-basiertes Verfahren im Anschluss angewendet (Anonymous, 2007). **Flüssigmedien** wie das modifizierte Dubois-Medium, Middlebrook 7H9 mit OADC-Zusatz (Ölsäure-Albumin-Dextrose-Komplex), das BACTEC-System oder die MGIT-Bouillon sind teilweise sensitiver als Festmedien und können auch als Anreicherungsmedien vor einer Kultivierung auf Festmedien eingesetzt werden (Ayele *et al.*, 2001; Stephan, 2007; Anonymous, 2007; Gilardoni *et al.*, 2012). Das automatisierte, radiometrische BACTEC-System wurde ursprünglich zum Nachweis von *M. tuberculosis* bei Menschen entwickelt und misst das Bakterienwachstum über das radioaktive Metabolisierungsprodukt ^{14}C -CO₂ (Ayele *et al.*, 2001; Homuth, 2002) mit einer Nachweisgrenze von 10² KBE/ml (Bradner *et al.*, 2013b). Dagegen benötigt die auf Basis des BACTEC-Systems entwickelte MGIT-Bouillon keinen Einsatz von Radioaktivität. Das Flüssigmedium enthält Fluoreszenzmarker, die bei Abnahme der O₂-Konzentration ein MAP-Wachstum mittels Fluoreszenzsignal unter UV-Licht anzeigen (Homuth, 2002).

Als Nachteile bei der Anzucht von MAP in Flüssigmedien sind zum einen die fehlende Koloniemorphologie, zum anderen das schlechte Wachstum einiger Stämme – vornehmlich Schaf-Isolate – zu nennen (Whittington, 2009; Bradner *et al.*, 2013a). Dagegen lassen sich MAP-Isolate kleiner Wiederkäuer zwar schwer, jedoch erfolgreich – teilweise unter Ausbildung gelb-orangefarbener Kolonien – auf Festmedien anzüchten (Lambrecht *et al.*, 1988; Songer und Post, 2005). Bekannte **feste Nährmedien** mit Mykobaktin-Zusatz für den Nachweis von MAP sind das Eigelb-basierte Herrold's Egg Yolk Medium (HEYM) mit einer Nachweisgrenze von 10^4 KBE/ml (Whipple *et al.*, 1991; Bradner *et al.*, 2013b) sowie das Löwenstein-Jensen-Medium (Löwenstein, 1931; Jensen, 1932). Ebenfalls stehen verschiedene feste Middlebrook-Medien 7H10 oder 7H11 zur Wahl (Anonymous, 2007; Stephan, 2007). Die Anzucht auf Festmedien gestattet eine koloniemorphologische Charakterisierung und ermöglicht damit eine Quantifizierung. Die lange Inkubationszeit, der damit möglicherweise einhergehende Eintrocknungsvorgang der Nährmedien sowie eine gelegentliche Kontamination mit Schimmelpilzen stellen Nachteile dar. Die Isolierung von MAP aus Rinderkot benötigt beispielsweise zwölf Wochen, für eine entsprechende Anzüchtung aus Milch beträgt die Inkubationszeit 18 bis 52 Wochen (Slana *et al.*, 2008a). Außerdem ist ein kultureller Nachweis von Sphäroblasten auf Festmedien schwierig, wenn nicht gar unmöglich (Beran *et al.*, 2006). Trotz all dieser Aspekte wird die Isolierung auf festen Wachstumsmedien empfohlen und gilt als Goldstandard (Whitlock und Rosenberger, 1990).

2.2.2 Mikroskopische Nachweisverfahren

Mit mikroskopischen Nachweisverfahren in Verbindung mit vorhergehenden spezifischen Färbemethoden gelingt es, die für MAP relevante Säurefestigkeit (licht- oder fluoreszenzmikroskopisch), deren Struktur (elektronenmikroskopisch) sowie die Lebensfähigkeit (fluoreszenzmikroskopisch) darzustellen.

Die **Ziehl-Neelsen-Färbung** mit anschließender **lichtmikroskopischer Beurteilung** ist ein weit verbreitetes Verfahren zum Nachweis von säurefesten Mykobakterien (Zimmer *et al.*, 1999; Naser *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2008; Gill *et al.*, 2011). Die aufbereitete Probe wird mit einer Karbolfuchsin-Lösung überschichtet, erhitzt und anschließend einem Entfärbeprozess unterzogen. Durch die besondere wachsartige Struktur der Mykobakterienzellwand wird die Zelle nach der Säure-Alkohol-Färbung nicht komplett entfärbt (Doetsch, 1981; Brennan und Nikaido, 1995). Die Mikroorganismen sind als leuchtend rote Stäbchen in der für MAP typischen nesterartigen Zusammenlagerung vor blauem Hintergrund unter dem Lichtmikroskop zu erkennen (Merkal, 1973); eine speziesspezifische Unterscheidung ist mit dieser

Färbemethode jedoch nicht möglich (Suerbaum *et al.*, 2012). Nachteile der Färbemethode nach Ziehl-Neelsen sind die geringe Spezifität (25–60 %) und Sensitivität (19–49 %), die stark von der vorliegenden MAP-Konzentration in den Proben abhängt und wiederum zu falsch-negativen Ergebnissen führen kann (Hielta, 1992; Zimmer *et al.*, 1999; Gilardoni *et al.*, 2012; Suerbaum *et al.*, 2012). Zellwand-geschädigte Formen von Mykobakterien, insbesondere MAP-Sphäroblasten, können mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden (El-Zaatari *et al.*, 2001; Hulten *et al.*, 2001; Beran *et al.*, 2006). Vorteile der Ziehl-Neelsen-Färbung sind die einfache Handhabung, der schnelle Nachweis und die kostengünstige Anwendung (Gilardoni *et al.*, 2012). In Kombination mit kulturellen Nachweisverfahren kann die Sensitivität und Spezifität der Ziehl-Neelsen-Methode mit anschließender lichtmikroskopischer Beurteilung gesteigert werden.

Nach dem gleichen Prinzip wie die Ziehl-Neelsen-Färbung, jedoch um einiges sensitiver, funktioniert die **Färbung mit Auramin-Orange** mit anschließender **fluoreszenzmikroskopischer Untersuchung**. Die Auramin-Orange-Färbemethode wurde bereits 1938 zum Nachweis von *M. tuberculosis* eingeführt; die Verbreitung der Anwendung erfolgte 1941 (Hagemann, 1938; Richards *et al.*, 1941). Der fluoreszierende Farbstoff Auramin-Orange bindet an die Mykolsäuren der Mykobakterienzellwand und weist nach Stimulation mit kurzwelligem Ultraviolettlicht bei positivem Nachweis ein rot-oranges Signal vor einem schwarzen Hintergrund auf (Suerbaum *et al.*, 2012). Eine Spezies-spezifische Unterscheidung der Mykobakterien ist bei dieser Methode nicht möglich (Suerbaum *et al.*, 2012). Zellwand-geschädigte Formen sind auch mittels Auramin-Orange-Färbung nicht darstellbar, da dieses Nachweisverfahren vergleichbar mit der Ziehl-Neelsen-Färbung auf dem Nachweis einer intakten Zellwand beruht (Nguyen *et al.*, 2011b). Des Weiteren können fluoreszierende Trümmer mit säurefesten Bakterien verwechselt werden. Aufgrund dessen entwickelten Smithwick *et al.*, 1995 die sogenannte **Acridin-Orange-Färbung**, die im Vergleich zur Auramin-Färbung weniger unspezifische Fluoreszenzsignale und eine geringere Hintergrundfluoreszenz bei ähnlichen Ergebnissen im Nachweis zeigte. Der Farbstoff Acridin-Orange kann, nach Durchdringung der Mykobakterienzellwand mit Hilfe von Phenol, mit der DNA von MAP interkalieren und weist anschließend bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung rötliche Signale bei Aktivierung mit kurzwelligem UV-Licht auf (Smithwick *et al.*, 1995; Beran *et al.*, 2006). Mit Hilfe dieser Färbemethode lassen sich auch Zellwand-geschädigte Formen von MAP nachweisen (Hulten *et al.*, 2000b).

Allgemein besitzen mikroskopische Nachweisverfahren eine niedrige Sensitivität; so liegt die Nachweisgrenze für bakterielle Erreger bei circa 10^4 KBE/ml (Suerbaum *et al.*, 2012).

Aufgrund dessen wird eine wiederholte Untersuchung der mikroskopischen Präparate bzw. eine Kombination mit anderen Methoden höherer Sensitivität wie beispielsweise molekular-basierter Verfahren empfohlen (Anonymous, 2007; Suerbaum *et al.*, 2012).

2.2.3 Molekular-basierte Nachweisverfahren

Zu den molekular-basierten Nachweisverfahren zählen neben der PCR auch RFLP, MIRU-VNTR und MLSSR um nur einige Beispiele zu nennen (siehe Tab. 3). Die PCR ist das mit Abstand am häufigsten eingesetzte Nachweisverfahren für MAP und wird aufgrund seiner hohen Spezifität von 99,7 % bevorzugt angewendet (Harris und Barletta, 2001; Waddell *et al.*, 2008; Eltholth *et al.*, 2009; Over *et al.*, 2011; Atreya *et al.*, 2014).

1989 entdeckten Collins *et al.* und Green *et al.* das für MAP spezifische Insertionselement **IS900** – eine kleine, mobile, genetische Einheit von 1,4 kB, die repetitiv in 14–18 Kopien im Genom vorliegt (Bull *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2005). Die zunächst angenommene hohe Spezifität für MAP wurde später eingeschränkt, als ähnliche Insertionselemente, sogenannte **IS900-like Sequenzen**, in eng verwandten Mykobakterien-Spezies nachgewiesen wurden (Cousins *et al.*, 1999; Englund *et al.*, 2002). Beispielsweise konnte das Vorhandensein von IS901 bei *M. avium* ssp. *avium*, IS902 bei *M. avium* ssp. *silvaticum* sowie IS1110, IS124, IS1311 und IS1626 bei diversen *M. avium*-Stämmen aufgezeigt werden (El-Zaatari *et al.*, 2001; Gerlach, 2002; Castellanos *et al.*, 2012). Auch innerhalb der IS900-Sequenz wurden Polymorphismen beschrieben (Möbius *et al.*, 2008b; Sohal *et al.*, 2010; Chiodini *et al.*, 2012). Kreuzreaktionen können folglich zu falsch-positiven Ergebnissen bei der IS900-PCR führen (Harris und Barletta, 2001; Motiwala *et al.*, 2003). Eine eindeutige Identifizierung der ermittelten IS900-Sequenzen kann mit Hilfe der Sequenzierung von Amplifikationsprodukten oder genotypischer Analysen wie MIRU-VNTR erfolgen (Bull *et al.*, 2003b; Möbius *et al.*, 2008b).

Des Weiteren kann das DNA-Fragment **f57** mit nur einer Kopie im Genom als diagnostische Sonde für den Nachweis von MAP eingesetzt werden (Poupart *et al.*, 1993; Tasara und Stephan, 2005). Die Genabschnitte **ISMav2** mit drei Kopien im MAP-Genom (Strommenger *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2005) und **ISMap02** mit sechs Kopien (Stabel und Bannantine, 2005), das **hspX-Gen**, welches für ein putatives Hitzeschock-ähnliches Protein kodiert, mit einer Kopie (Ellingson *et al.*, 1998) sowie die **Loci 251** und **255** (Möbius *et al.*, 2008a; Castellanos *et al.*, 2012) können gezielt für den MAP-Nachweis mittels PCR dienen. Schönenbrücher *et al.* (2008) entwickelten am Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde ein auf den Markern f57 und ISMav2 beruhendes PCR-Verfahren mit einer internen Amplifikationskontrolle (IAK) nach

Abdulmawjood *et al.* (2002) für den Nachweis von MAP-DNA in Rinderkot. Diese Triplex Real Time-PCR weist sich durch eine hohe Sensitivität (94,4 %) und Spezifität (98,9 %) aus.

Die Sensitivität der PCR ist teilweise sehr niedrig, wenn eine lediglich geringe Bakterienkonzentration vorliegt (Whipple *et al.*, 1991; Harris und Barletta, 2001; Homuth, 2002). Um die Sensitivität zu erhöhen, kann eine Anreicherung von MAP-Zellen der PCR vorgeschaltet werden: Die immunomagnetische Separation (Grant *et al.*, 2000; Gilardoni *et al.*, 2012), die Verwendung Peptid-vermittelter magnetischer Separation mittels Phagen (Stratmann *et al.*, 2002) und aMptD-Peptid-vermittelter magnetischer Separation (Stratmann *et al.*, 2006) zum Nachweis von MAP in Milchproben sind Beispiele hierfür.

Beim Nachweis mittels PCR können verschiedene Methoden zur Anwendung kommen: die nested, Multiplex- oder Real Time-PCR. Die **nested PCR** verwendet im Vergleich zur konventionellen Methode zwei unterschiedliche Primerpaare innerhalb derselben Zielsequenz. Nach dem ersten Durchlauf der PCR mit dem ersten Primerpaar wird das amplifizierte Produkt erneut verwendet und dient als Template für einen weiteren PCR-Lauf mit dem zweiten Primerpaar, wodurch es zu einer erheblichen Sensitivitätssteigerung kommt (Gilardoni *et al.*, 2012). Die Nachweisgrenze für die Zielsequenz in der nested PCR liegt bei einem Genom/PCR im Vergleich zu der konventionellen PCR-Methode mit 10–100 Genomen/PCR (Vansnick *et al.*, 2004). Die hohe Sensitivität kann jedoch auch zu falsch-positiven Ergebnisse führen. Eine Kreuzkontamination bei der nested-PCR ist vor allem bei der Handhabung der Materialien zu vermeiden (Gill *et al.*, 2011).

Eine weitere Form der PCR ist die **Multiplex-PCR** zum Nachweis mehrerer Zielsequenzen innerhalb desselben Genoms. Durch die gleichzeitige Verwendung mehrerer spezifischer Primerpaare in nur einer Reaktion kann der Anwender in kürzester Zeit Hinweise auf die im Genom beteiligten Loci erhalten (Gill *et al.*, 2011; Gilardoni *et al.*, 2012) Dieses Prinzip nutzten beispielsweise Bull *et al.* (2000) in der Multiplex-PCR, um Informationen über 14 IS900-flankierende DNA-Abschnitte zu gewinnen.

Die **Real Time-PCR** erlaubt im Vergleich zu den anderen PCR-Methoden die direkte Erfassung des Amplifikationsvorgangs (Slana *et al.*, 2008b; Gill *et al.*, 2011). Es werden Fluorochrom-markierte Sonden eingesetzt, die bereits nach jeder Amplifikationsrunde visuell die Vervielfältigung der Zielsequenz anzeigen. Somit kann aufgrund des direkt proportionalen Anstiegs der Amplifikationsprodukte ein Rückschluss auf die ursprünglich vorliegende Menge der Zielsequenz gezogen werden (Slana *et al.*, 2008b; Gill *et al.*, 2011; Gilardoni *et al.*, 2012). Um verlässliche quantitative Informationen mit hoher Genauigkeit zu erhalten, sollten als

Zielsequenzen Genabschnitte eingesetzt werden, die mit nur wenigen Kopien im Genom vertreten sind, beispielsweise *f57*, *ISMap2* oder *hspX* (Slana *et al.*, 2008b). Im direkten Vergleich zur nested PCR und zur Kultur weist die Real Time-PCR eine Sensitivität von 93–96 % und eine Spezifität von 92 % auf (Fang *et al.*, 2002). Das PCR-Verfahren bietet zudem den Vorteil, dass eine große Anzahl an Proben gleichzeitig verarbeitet und die Daten der Ergebnisse schnell und unkompliziert abgelesen werden können (Slana *et al.*, 2008b). Bereits eine Vielzahl an Real Time-PCR-Verfahren mit unterschiedlichen Zielsequenzen wurden für die Detektion von MAP etabliert: Rodríguez-Lázaro *et al.* (2005) verwendeten das IS900-Element zum MAP-Nachweis in Wasser und Milch, Irengé *et al.* (2009) die Marker IS900, *f57* und ISMap02 zum Nachweis in Rinderkot und Schönenbrücher *et al.* (2008) die Marker *f57* und *ISMap2* in einer sogenannten Triplex-PCR ebenfalls für den Nachweis in Rinderkot. Bei der Real Time-PCR ist im Besonderen auf das Mitführen einer **internen Amplifikationskontrolle** (IAK) zu achten, um falsch-negative Ergebnisse, die durch die Ausbildung von Primer-Dimeren und/oder nicht-spezifischen Banden entstehen können, auszuschließen (Slana *et al.*, 2008b).

Generell können sich falsch-negative Ergebnisse, unabhängig vom angewandten PCR-Verfahren, ergeben, wenn PCR-Inhibitoren beteiligt sind. Eine Verwendung geeigneter interner Negativ- und Positivkontrollen zur Probe wird bei jedem PCR-Lauf benötigt (Ayele *et al.*, 2001).

2.3 Paratuberkulose

2.3.1 Historische, ökonomische und epidemiologische Bedeutung der Paratuberkulose

Die Paratuberkulose ist eine chronische, granulomatöse Enteritis, die hauptsächlich beim Rind aber ebenfalls bei anderen Wiederkäuern durch MAP hervorgerufen wird. Erstmals wurde von Johne und Frothingham (1895) die Anwesenheit säurefester Mikroorganismen bei einem „*eigenthümlichen Fall von Tuberculose*“ beim Rind nachgewiesen. Aufgrund dessen wurde die Erkrankung auch als „*Johne's disease*“ bekannt. Eine Übersicht zur Historie der Paratuberkulose ist in der nachfolgenden Tabelle 5 dargestellt.

Tab. 5: Historie der Paratuberkulose

Jahr	Ereignis	Publikation
1895	MAP wird entdeckt – Beschreibung eines „ <i>eigenthümlichen Fall[s] von Tuberculose</i> “ beim Rind (später auch als „ <i>Johne's disease</i> “ bekannt)	Johne und Frothingham, 1895
1906	Abgrenzung zur Tuberkulose – Vorschlag die Erkrankung „ <i>Enteritis chronica bovis pseudotuberculosis bzw. paratubercula</i> “ zu benennen (später in „ <i>Paratuberkulose</i> “ umgewandelt)	Bang, 1906
1910	Erfolgreiche Isolierung und Anzüchtung des Erregers – Vorschlag den Erreger „ <i>Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis johne</i> “ zu nennen	Twort und Ingram, 1912
1990	Umbenennung des Erregers in „ <i>Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis</i> “	Thorel <i>et al.</i> , 1990

Die Paratuberkulose gilt als weltweit verbreitet und ist eine meldepflichtige Erkrankung in Deutschland (**Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft**, 2015). Sie ist auf der Liste der OIE, welche Krankheiten von sozioökonomischer Wichtigkeit und/oder Bedeutung für die öffentliche Gesundheit beinhaltet, unter der Kategorie „Erkrankungen, Infektionen und Infestationen, die mehrere Tierarten betreffen“ gelistet (Anonymous, 2017b). Das nationale Referenzlabor (NRL) für Paratuberkulose ist das Friedrich-Loeffler-Institut in Jena.

Die Paratuberkulose besitzt aufgrund der enormen Milch- und Mastleistungsrückgänge, der damit verbundenen reduzierten Schlachterlöse, den auftretenden Fruchtbarkeitsstörungen und der erhöhten Infektionsanfälligkeit in den Tierbeständen eine große wirtschaftliche Bedeutung (Benedictus *et al.*, 1987; Bülte *et al.*, 2005; Garcia und Shalloo, 2015). Die geschätzte Abgangsrate beträgt zwischen 3 und 10 % der erwachsenen Tiere pro Herde und Jahr (Stephan, 2007). Insgesamt entsteht durch die Infektion mit MAP ein direkter wirtschaftlicher Produktionsverlust von 12–15 % (Wilson *et al.*, 1993). Weiterhin muss mit direkten und

indirekten Kosten für die Diagnose, Behandlung und Kontrolle der Paratuberkulose gerechnet werden (Ott *et al.*, 1999; Hasonova und Pavlik, 2006). Eine Kostenanalyse von Milchviehherden mit Paratuberkulose aus sechs verschiedenen Studien ergab, dass abhängig von der klinischen Ausprägung die Kosten im amerikanischen Raum zwischen 145 bis 1.094 US-Dollar pro Jahr pro Tier liegen (Ott *et al.*, 1999). Vergleichsweise hohe Kosten ermittelten Dufour *et al.* (2004) in Frankreich: Dort betrug der durchschnittlicher Verlust 461 EUR pro Jahr und Milchrind bei subklinischer Ausprägung und 1.940 EUR pro Jahr und Milchrind mit klinischer Symptomatik. Bei Mastrindern mit klinischer Ausprägung der Paratuberkulose lagen die durchschnittlichen Kosten bei 1.905 EUR pro Jahr pro Tier. Generell scheint die Paratuberkulose häufiger Milch- als Fleischrinder zu betreffen, wobei bestimmte Rassen wie Jersey, Guernsy und Holstein empfänglicher sind als andere (Çetinkaya *et al.*, 1997; Clarke, 1997; Grant, 2005). Merkal *et al.* (1987) beschrieben in ihrer Studie eine Prävalenz von 0,8 % bei Fleischrindern und eine im Gegensatz dazu deutlich erhöhte Prävalenz von 2,9 % bei den untersuchten Milchrindern. Ebenfalls ist der Nachweis von MAP in Rinderkot bei Milchrindern (46,1 %) höher als bei Fleischrindern (17,8 %) und weist einen hochsignifikanten Unterschied in Abhängigkeit des Produktionstyps auf (Pavlik *et al.*, 2000b).

Die Paratuberkulose ist flächendeckend in Deutschland verbreitet, wobei die Herdenprävalenz zwischen 10–85 % und die Einzeltierprävalenz bei Rindern zwischen 1–17 % schwankt (Bülte *et al.*, 2005; Büttner *et al.*, 2005; Anonymous, 2016a). Eine Übersicht der geschätzten Herden- und Einzeltierprävalenzen in Deutschland, Europa und der USA ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tab. 6: Übersicht der geschätzten Herden- und Einzeltierprävalenzen bei Rindern

Region (Bundesland/Stadt)	Herdenprävalenz	Einzeltierprävalenz	Publikation
Deutschland gesamt	10–15 %	k. A.*	Moser, 2004
	80 %	1–17 %	Bülte <i>et al.</i> , 2005
	20 % (Milchrinder)	k. A.	Grant, 2005
Deutschland (Mecklenburg-Vorpommern 2004)	84,7 % (Serologie/ ELISA)	k. A.	Büttner <i>et al.</i> , 2005
Deutschland (Bayern 1992–1999)	28,8 % (kultureller Nachweis in Kot)	11,2 %	Büttner <i>et al.</i> , 2005
Europa gesamt	> 50 %	k. A.	Nielsen und Toft, 2009
Europa (Frankreich)	10–15 %	2,8 %	Büttner <i>et al.</i> , 2005
Nordamerika gesamt	> 50 %	k. A.	Carta <i>et al.</i> , 2013
Nordamerika (Michigan)	54 %	6,9 %	Büttner <i>et al.</i> , 2005

* keine Angabe

Eltholth *et al.* (2009) fassten Prävalenzdaten von 18 Reviews – vornehmlich Studien aus Amerika und Europa – zusammen: Die Herdenprävalenz betrug zwischen 1,47–53,5 % bei Mastrindern und 2,6–70,2 % bei Milchrindern. Die Einzeltierprävalenz variierte zwischen 0,4–19 % bei den Mastrindern und 0,87–17,5 % bei den Milchrindern. Die Herdenprävalenz der kleinen Wiederkäuer (Schafe und Ziegen) basierend auf Daten aus der Schweiz und aus Spanien wird auf > 20 % geschätzt (Nielsen und Toft, 2009). Die unterschiedlich hohen Prävalenzdaten ergeben sich aus den eingesetzten Nachweisverfahren und deren unterschiedlicher Sensitivität bzw. Spezifität; es wird vermutet, dass die wirkliche Prävalenz bedeutend höher liegt (Bülte *et al.*, 2005; Büttner *et al.*, 2005).

In Deutschland existieren, abhängig vom Bundesland, freiwillige Sanierungsprogramme um die Paratuberkulose einzudämmen, wie beispielsweise in Nordrhein-Westfalen, Thüringen, Sachsen und Niedersachsen (Büttner *et al.*, 2005; Schneider *et al.*, 2007). In Hessen können mit Hilfe des HEMAP-Untersuchungsprogramms Staturhebungen in Milchviehbetrieben durch die Beprobung der Stallumgebung mit Sockentupfer erzielt werden (Anonymous, 2017a). Die vom Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft in 2005 veröffentlichten Leitlinien für den Umgang mit Paratuberkulose in Wiederkäuerbeständen dienen dem deckungsgleichen Vorgehen zur Bekämpfung der Paratuberkulose in Deutschland, die mit engmaschigen Kontrollen zur Ermittlung des Bestandstatus, einem strengen Herdenmanagement und restriktiven Maßnahmen verbunden ist (**Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft**, 2005; Schneider *et al.*, 2007). Im August 2014 veröffentlichte das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft Empfehlungen für hygienische Anforderungen an das Halten von Wiederkäuern (WdkHH). Dieser vom Berufsstand vielfach diskutierte, aufgrund seiner kaum praxistauglichen Umsetzung, nicht rechtsverbindliche Maßnahmenkatalog schließt neben Empfehlungen für die Basishygiene auch spezielle Hygienemaßnahmen im Falle von Paratuberkulose und Q-Fieber mit ein und löst somit die Paratuberkulose-Leitlinie von 2005 ab (**Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft**, 2014). Kontrollprogramme zur Erfassung der Paratuberkulose sind ebenfalls in anderen EU- und Nicht-EU-Ländern vorhanden (Nielsen, 2009; Sohal *et al.*, 2015).

2.3.2 Pathogenese, Klinik und Pathologie der Paratuberkulose

Die Übertragung von MAP auf Wiederkäuer und im Speziellen auf Rinder kann direkt oder indirekt erfolgen. Eine **direkte Übertragung** kann sich **horizontal** über die Aufnahme von kontaminiertem Kot, mit bis zu 10^8 KbE/g, Milch oder Kolostrum ereignen (Ayele *et al.*, 2001;

Songer und Post, 2005). Bei der **vertikalen** Infektion steht die intrauterine Übertragung im Vordergrund (Kopecky *et al.*, 1967; Whittington und Windsor, 2009); in fetalem Gewebe war MAP mit Hilfe kultureller Anzucht detektierbar (Sweeney *et al.*, 1992). Untersuchungen von Larsen und Kopecky (1970) zeigten, dass MAP auch in Sperma von Bullen nachgewiesen werden konnte und dass der Erreger die für die Bereitstellung von Sperma für die künstliche Befruchtung vorgesehenen Konservierungsmethoden, wie Antibiotika-Zugabe und Einfrieren, überlebt. Eine **indirekte Übertragung** kann beispielsweise über kontaminierte Weideflächen, Futter und/oder Wasser erfolgen (Ayele *et al.*, 2001). Die in Kapitel 2.1.2 beschriebene Tenazität von MAP in der Umwelt und die Verbreitung durch Wildtiere, deren mittlere Prävalenz auf 2,41 % geschätzt wird (Carta *et al.*, 2013), spielen dabei eine bedeutende Rolle.

Eine Infektion mit MAP findet vorwiegend in den ersten 30 Tagen nach Geburt des Kalbes statt. Dieser Zeitraum wird auch „Empfänglichkeitsfenster“ genannt; die Empfänglichkeit nimmt indirekt proportional mit fortschreitendem Alter ab (Gerlach, 2002; Büttner *et al.*, 2005). Die minimale Infektionsdosis für ein Kalb liegt zwischen 10^3 bis 10^4 MAP-Kolonie-bildenden Einheiten (Whittington und Sergeant, 2001; Gerlach, 2002). Nach einer mehrjährigen Inkubationszeit von zwei bis zehn Jahren tritt das klinische Bild der Paratuberkulose häufig aufgrund Stress auslösender Umstände – beispielsweise durch den Geburtsvorgang – zutage (Ayele *et al.*, 2001; Büttner *et al.*, 2005). Spezifische Faktoren wie die Empfänglichkeit eines Tieres aufgrund seiner individuellen immunologischen Resistenz oder Rasse können den Krankheitsverlauf steuern (Pavlik *et al.*, 2000b; Liverani *et al.*, 2014).

Nach zumeist fäkal-oralen Aufnahme des Erregers gelangt dieser zunächst in den Magen-Darm-Trakt des Wirtstieres. Aufgrund seiner Affinität zu M-Zellen tritt MAP mit den Peyer'schen Plaques, vor allem im Bereich des Ileums, in Interaktion (Chiodini *et al.*, 1984a; Songer und Post, 2005). Die Peyer'schen Plaques sind Bestandteil des sogenannten MALT-Systems (mucosa-associated lymphoid tissue) – einer Agglomeration von Lymphozyten im Schleimhautgewebe, die unter anderem im Magen-Darm-, Atmungs- oder Urogenitaltrakt zu finden ist. Nach Phagozytose von MAP durch Makrophagen verhindern erregerspezifische Mechanismen und Resistenzen die Fusion zum Phagolysosom (Periasamy *et al.*, 2013). So ist MAP gegenüber Katalase, Peroxidase sowie geringen Konzentrationen an Stickstoffmonoxid stabil und verhindert die Azidifizierung und Reifung der Phagosomen (Harris und Barletta, 2001; Weiss und Souza, 2008). Stattdessen kommt es zur intrazellulären Vermehrung des Erregers und Infiltration der Submukosa (Harris und Barletta, 2001). Nach der Freisetzung von MAP aus den Makrophagen, wobei die Mechanismen der Freisetzung mittels induziertem Zelltod bislang noch nicht geklärt sind (Periasamy *et al.*, 2013), gibt es drei

Verbreitungsmöglichkeiten: (1) MAP wird erneut von weiteren Makrophagen aufgenommen, (2) MAP wird ausgeschieden und ist im Kot teilweise in hohen Konzentration bis zu 10^8 KbE/g nachweisbar oder (3) MAP gelangt durch lymphogene und/oder hämatogene Disseminierung in extra-intestinale Organe und Lymphknoten (Whitlock und Buergelt, 1996; Ayele *et al.*, 2001; Antognoli *et al.*, 2008).

Klinisch kann die Paratuberkulose nach Whitlock und Buergelt (1996) in vier Stadien eingeteilt werden. Im ersten mehrjährigen Stadium, auch als **stilles Infektionsstadium** bekannt, zeigen die betroffenen Tiere – vornehmlich Jungtiere wie z. B. Kälber und Färsen – keine klinischen Symptome. MAP persistiert zu diesem Zeitpunkt in den Makrophagen und ist weniger im Kot, sondern eher im Darm oder den assoziierten Lymphknoten nachweisbar (Büttner *et al.*, 2005). In dem **subklinischen Stadium** weisen erwachsene Tiere über Monate bis Jahre hinweg keine klinischen Anzeichen auf. Der Erreger wird nach intrazellulärer Vermehrung freigesetzt und mobilisiert zunächst die zelluläre anschließend die humorale Immunantwort des Wirtstieres (Schneider *et al.*, 2007). Die Erregerausscheidung erfolgt diskontinuierlich, so dass der Nachweis im Kot nicht immer zuverlässige Ergebnisse liefert. Gilardoni *et al.* (2012) unterscheiden Tiere, die in der subklinischen Phase als Ausscheider niedriger Konzentration (< 10 KbE), mittlerer (10–50 KbE) und hoher Konzentration an MAP (> 50 KbE) pro Gramm Kot fungieren. Laut Whitlock und Buergelt (1996) kommen auf einen bestätigten Fall von Paratuberkulose 25 weitere Tiere, die mit dem Erreger infiziert sind. In dem nur einige Wochen bis Monate andauernden **klinischen Stadium** zeigen die Tiere Gewichtsverlust trotz anhaltendem Appetit, intermittierenden Durchfall und reduzierte Milch- bzw. Mastleistung sowie eine niedrige Abkalberate. Der Erreger ist zu diesem Zeitpunkt zum einen im Kot, zum anderen mittels Serologie detektierbar (Whitlock und Buergelt, 1996). Im nachfolgenden **Endstadium** weisen die erkrankten Tiere Ödeme im Halsbereich, fortschreitenden bis dauerhaften Durchfall ohne Besserung bei Therapie sowie Kachexie aufgrund Malabsorption und Proteindefizit auf. Die Milchleistung kommt zum Erliegen; die Tiere sind lethargisch ohne Fieberanzeichen (Gilardoni *et al.*, 2012). Das Stadium endet meist tödlich, wenn nicht zuvor diese erkrankten Tiere im Rahmen von Sanierungsmaßnahmen gekeult werden. MAP wird in hohen Konzentrationen mit dem Kot ausgeschieden und kann in den disseminierten Organen und assoziierten Lymphknoten nachgewiesen werden (Whitlock und Buergelt, 1996). Der Erregernachweis mittels Serologie kann zu diesem Zeitpunkt negativ ausfallen; das Immunsystem befindet sich in einem Zustand der Anergie (Büttner *et al.*, 2005; Gilardoni *et al.*, 2012).

Das pathologische Bild der Paratuberkulose ist geprägt von einer hochgradigen Schleimhauthypertrophie, bei der die Mukosaschicht das drei- bis vierfache ihrer normalen Größe annimmt, und dem Vorhandensein vergrößerter mesenterialer Lymphknoten. Des Weiteren bilden sich hirnwindungsähnliche, nicht verstreichbare Falten im Darm, besonders im Bereich des Ileums (Ayele *et al.*, 2001). Die sich dort befindlichen Granulome entstehen durch die Einwanderung von MAP aufgenommenen Epitheloid- und (Langhans-) Riesenzellen sowie Makrophagen (Gilardoni *et al.*, 2012). Nach Balseiro *et al.* (2008) beeinflusst die Art der Immunantwort des jeweiligen Wirtstieres – ob vorwiegend zellulär oder humoral – die Erregerkonzentration in den granulomatösen Veränderungen. Es wird zwischen dem **tuberkuloiden bzw. paucibazillären Typ**, bei welchem nur wenige bis keine Erreger im Gewebe vorhanden sind, und dem **lepromatösen bzw. pluribazillären Typ** der Paratuberkulose unterschieden. Beim pluribazillären Erscheinungsbild lassen sich massenhaft säurefeste Stäbchen im Gewebe nachweisen. Eine dritte Form der Paratuberkulose – der sogenannte **intermediäre Typ** – kann ebenso vorliegen (González *et al.*, 2005).

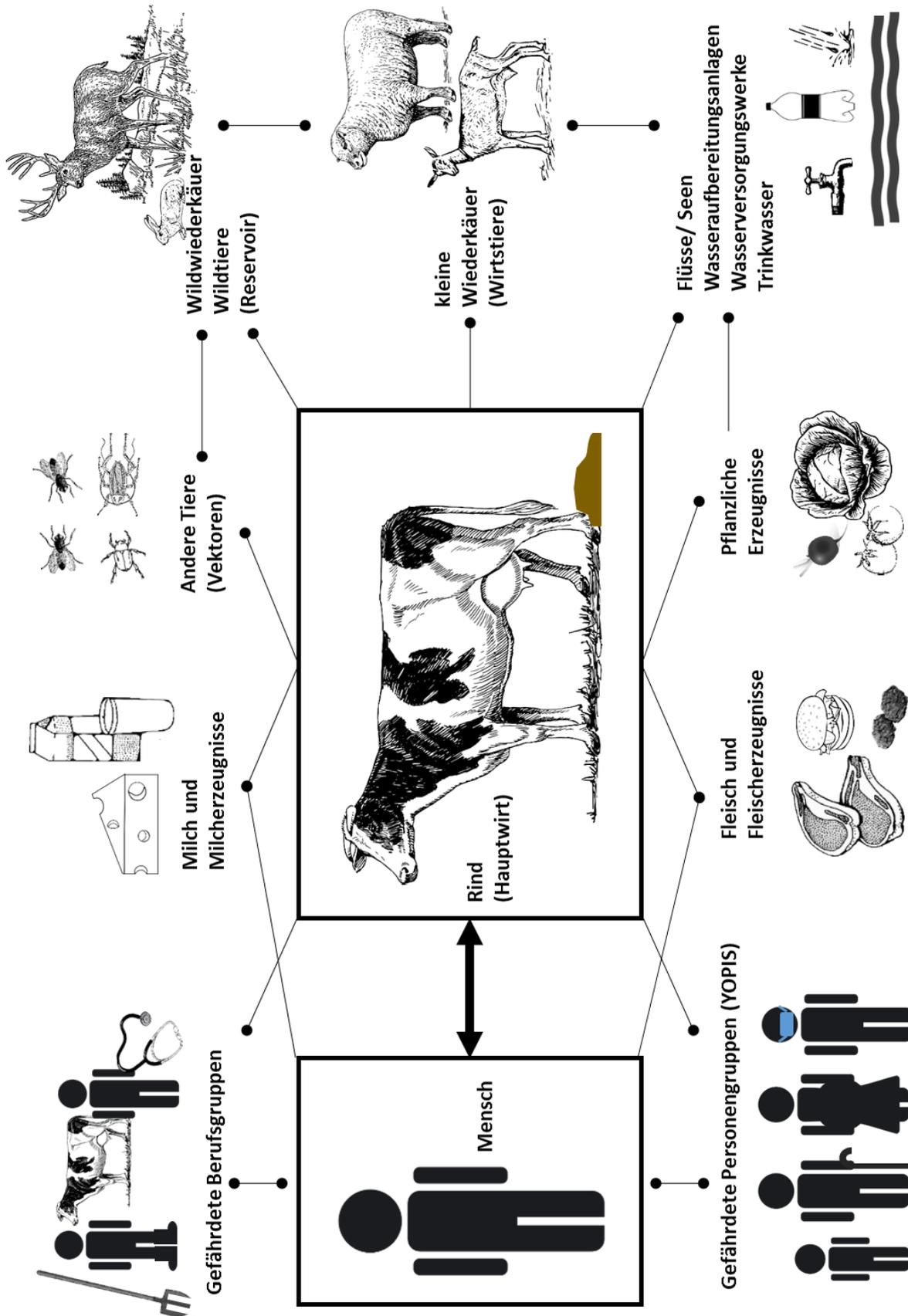
2.4 Übertragungswege von MAP auf den Menschen

Die Übertragungswege des Erregers MAP auf den Menschen sind mannigfaltig, wie in Abbildung 2 dargestellt. Wiederkäuer, im besonderen Rinder, gelten als Hauptwirte von MAP. Aber auch Wildtiere wie Wildwiederkäuer und Kaninchen können als Wirtstiere und Reservoir, Dipteren als Vektoren dienen (siehe Kapitel 2.1.2). Eine wichtige Rolle spielt die ebenfalls in Kapitel 2.1.2 beschriebene Tenazität von MAP in der Umwelt.

MAP kann durch die Ausscheidung von Wiederkäuern und/oder durch die Verbreitung in die Umgebung in folgende Produkte der Lebensmittelkette, die wiederum von Menschen aufgenommen werden können, gelangen (National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, 2010):

- Milch und Milcherzeugnisse,
- Fleisch und Fleischerzeugnisse,
- Trinkwasser,
- Pflanzliche Lebensmittel.

In Bezug auf Lebensmittel wird MAP am häufigsten mit **Milch und Milcherzeugnissen** in Verbindung gebracht. Durch eine Ausscheidung des Erregers über die Milch können Rohmilch und daraus hergestellte Produkte primär kontaminiert werden; sekundär kann eine fäkale Kontamination der Milch mit MAP oder ein Vermengen bereits kontaminierter Milch in die Tankmilch erfolgen (Eltholth *et al.*, 2009). Bereits 1981 erfolgte der positive Nachweis auf MAP in neun Milchproben (35 %) von 26 an Paratuberkulose erkrankten Rindern (Taylor *et al.*, 1981). Weitere im Review von Grant (2005), Eltholth *et al.* (2009) und dem National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (2010) benannte Studien belegen, dass MAP sowohl in **Rohmilch** als auch in **Tankmilchproben** mit einer Prävalenz von 0,3 % bis 33 %, abhängig vom eingesetzten Detektionsverfahren, nachgewiesen werden kann. Auch die Rohmilch von Ziegen und Schafen kann betroffen sein: In Norwegen wiesen Djønne *et al.* (2003) MAP in 7,1 % der Milchproben von 34 Ziegenherden mit insgesamt 340 Einzeltieren mittels PCR mit vorgeschalteter immunomagnetischer Separation nach.



YOPIS: Säuglinge / Kleinkinder bis 5 Jahre, Senioren, Schwangere, immungeschwächte Personen

Abb. 2: Mögliche Übertragungswege von *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* (MAP) auf den Menschen

Die zumeist als ***pasteurisierte im Einzelhandel erhältliche Milch*** kann verschiedenen Studien zufolge ebenfalls mit MAP mit einer Prävalenz von 1,6 % bis 11,8 % belastet sein (Millar *et al.*, 1996; Grant *et al.*, 2002; Ayele *et al.*, 2005; Ellingson *et al.*, 2005), wobei die höchste MAP-Belastung bei den Proben nach Millar *et al.* (1996) zwischen Januar und März sowie September und November und nach Ellingson *et al.* (2005) zwischen Juli und September nachgewiesen wurde. Die Pasteurisierung der Milch unterliegt verschiedenen Temperatur-Zeitprofilen: So kann die Rohmilch 30 Minuten lang bei 63 °C erhitzt oder dem sogenannten HTST (high temperature-short time)-Verfahren, bei dem eine Temperatur von 72 °C 15 Sekunden lang gehalten wird, unterzogen werden. Um die Effizienz des Pasteurisationsprozesses auf MAP zu testen, wurde von Chiodini und Hermon-Taylor (1993) das HTST-Verfahren bei künstlich kontaminierten Milchproben angewendet. Die Studie zeigte, dass zwischen 3–5 % der MAP-Zellen die Hitzeinaktivierung überlebten. Jedoch muss bei dieser Studie und weiteren bedacht werden, dass die Pasteurisierung unter Laborbedingungen nicht bzw. nur bedingt dem tatsächlichen, kommerziell gesteuerten, Prozess der Hitzeinwirkung gleicht (Grant *et al.*, 1996). Es existieren verschiedene Hypothesen, warum MAP in der Lage ist, die Hitzeinaktivierung zu überleben: (1) MAP ist im Vergleich zu anderen Mykobakterien wie beispielsweise *M. bovis* hitzetoleranter (Grant, 2005), (2) durch das Vorliegen von MAP in Aggregaten wird eventuell nur ein Teil der Zellen durch den Hitzeprozess zerstört (Sung und Collins, 1998; Klijn *et al.*, 2001a), (3) MAP wird nicht vollständig durch die Pasteurisierung reduziert, da der Erreger bereits vor der Erhitzung in sehr hohen Konzentrationen in der Rohmilch vorliegt (Grant, 2005). Das Vorhandensein von MAP in ***Käse, hergestellt aus Rohmilch, thermisierter oder pasteurisierter Milch***, wird durch Untersuchungen von Proben aus dem Einzelhandel belegt: In der Schweiz untersuchten Stephan *et al.* (2007) verschiedene Weich-, Schnitt- und Hartkäseprodukte und konnten in 4,2 % der Rohmilchkäseproben MAP mittels *f57*-PCR nachweisen; in Zypern wiesen Botsaris *et al.* (2010) 25 % positive MAP-Proben mittels Real Time-PCR in traditionell hergestelltem Käse aus Schaf- und/oder Ziegenmilch oder Kuhmilch nach; die Prävalenz für MAP in Feta, einem aus Schaf- und Ziegenmilch hergestellten Salzlakenkäse aus Griechenland, betrug 31,7 % und für Hart-, Schnitt- sowie Weichkäseprodukte aus Kuhmilch aus der Tschechischen Republik 3,6 % (Ikonomopoulos *et al.*, 2005). Der Pasteurisationsprozess und/oder die durchschnittliche Reifezeit des Käses von 60 Tagen bei 2 °C, welcher zudem durch einen niedrigen pH-Wert und einer hohen Salzkonzentration unterstützt wird, kann das Vorhandensein von MAP eindämmen (Spahr und Schafroth, 2001; Slana *et al.*, 2008b). Studien aus der Schweiz mit aus Rohmilch hergestelltem Hartkäse (*Emmentaler*) und Schnittkäse (*Tilsiter*) sowie Hartkäse (*Cheddar*) aus dem Vereinigten Königreich wurden artifiziell mit MAP kontaminiert und dessen Reduktion

durch die verschiedenen Einflussfaktoren der Reifung untersucht (Spahr und Schafroth, 2001; Donaghy *et al.*, 2004). In der 27 Wochen andauernden Reifung von Cheddar konnte eine langsame, stufenweise Abnahme der MAP-Konzentration im Käse (Anfangskonzentration bis zu 10^4 KbE/g), nachvollzogen werden; die D-Werte lagen zwischen 90–107 Tagen (Donaghy *et al.*, 2004). Eine weitere Übersicht über den Zusammenhang vom D-Wert des Erregers mit der Reifedauer, der Temperatur und des pH-Wertes während der Reifung in Abhängigkeit von der Käseart bzw. der Einfluss von pH-Wert, Salzkonzentration und Hitze einwirkung bei einer spanischen Weichkäseart (*Queso Fresco*) wird in den Publikationen von Gill *et al.* (2011) und Sung und Collins (2000) wiedergegeben. Neben Käse wurde auch **Säuglingsanfangsnahrung** auf das Vorkommen von MAP untersucht. Hruska *et al.* (2005) konnten MAP-DNA in 49 % der Produkte mittels IS900-PCR und in 35 % von insgesamt 51 Produkten mittels *f57*-PCR nachweisen. Diese in der Tschechischen Republik durchgeführte Studie mit kommerziell erhältlicher Säuglingsanfangsnahrung von zehn Herstellern aus sieben verschiedenen EU-Ländern ermittelten Konzentrationen mit bis zu $3,3 \times 10^4$ MAP-Zellen pro Gramm Säuglingsanfangsnahrung. Derart hohe Konzentrationen konnten bisher in keiner weiteren Studie nachgewiesen werden (Hruska *et al.*, 2011). In Zypern detektierten Botsaris *et al.* (2010) in 35 Säuglingsanfangsnahrungsprodukten von elf verschiedenen Hersteller 21,9 % MAP-DNA-positive (IS900-PCR) und 9,4 % kulturell positiv bestätigte Proben. In Deutschland konnten in keiner der 16 aus dem Einzelhandel erworbenen Säuglingsanfangsnahrung MAP kulturell, molekularbiologisch (Real Time-PCR) oder mittels Phagen-Assay nachgewiesen werden (Weirich, 2012; Molitor, 2014).

Neben Milch/-erzeugnissen können auch **Fleisch und Fleischerzeugnisse** MAP aufweisen: Zum einen kann der Erreger sich über dem hämatogenen und vor allem lymphogenen Weg im Wirtstier verbreiten, so dass vorweg die Leber, die Lymphknoten und gegebenenfalls das umliegende Gewebe infiziert sind (Pavlik *et al.*, 2000b; Ayele *et al.*, 2004; Antognoli *et al.*, 2008; Brady *et al.*, 2008). Es wird vermutet, dass MAP durch die Verwendung infiltrierter Lymphknoten bei der Herstellung von Rinderhackfleisch in das Produkt gelangen kann (Rossiter und Henning, 2001). Dagegen kann eine Studie von Jaravata *et al.* (2007), die 200 aus dem Einzelhandel erhältliche Proben von Rinderhackfleisch mittels Real Time-PCR auf das Vorhandensein von MAP untersuchte, diese Hypothese nicht untermauern: In keiner der Produkte ließ sich MAP-DNA detektieren.

Zum anderen kann das Fleisch von Rinderschlachttierkörpern mit MAP-haltigem Darminhalt sekundär kontaminiert werden. Sowohl Meadus *et al.* (2008) als auch Wells *et al.* (2009) konnten MAP-DNA aus Oberflächentupfer von enthäuteten und hergerichteten Schlachttierkörpern von Rindern isolieren. Die Prävalenz von MAP bei Rinderkarkassen vor

bzw. nach dem Enthäuten und Zurichten bewegt sich zwischen 1–80 % für molekularbiologische und 0–50 % für kulturelle Nachweisverfahren (Gill *et al.*, 2011). Mutharia *et al.* (2010) untersuchten in einer Studie, ob sich MAP in rohen, erhitzten oder gefrorenen Lymphknoten und Muskelgewebe von Paratuberkulose-positiven Rindern nachweisen ließ: Ein direktes Einfrieren hat keine Auswirkung auf die Lebensfähigkeit von MAP und ein Erhitzungsprozess von 61 °C bzw. von ≥ 70 °C kann den Erreger in Fleischbratlingen für Hamburger, hergestellt mit MAP-positiven Lymphknoten, teilweise aber nicht vollständig inaktivieren.

Durch den Eintrag von MAP-haltigem Rinderdung in das Oberflächenwasser und dem anschließenden Zuleiten zu den Wasserversorgungswerken bis hin zum Verbraucher kann der Erreger beispielsweise ins *Leitungswasser*, welches für den menschlichen Gebrauch vorgesehen ist, gelangen (Falkinham, III. *et al.*, 2001; Whan *et al.*, 2005; Pickup *et al.*, 2005). So konnten Pickup *et al.* (2006) bei 68,8 % der aus Flüssen, Seen und dem Abwasser stammenden Proben (n = 70) MAP-DNA nachweisen. Weiterführend konnten 2011 Aboagye und Rowe in Proben von Wasseraufbereitungsanlagen – sandfiltriertes Wasser und finalem Trinkwasser – in bis zu 48 % der Fälle molekularbiologisch und in einem Fall kulturell MAP (-DNA) detektieren. Den Publikationen zufolge sind die Wasseraufbereitungsanlagen und -versorgungswerke wichtige Schnittstellen und eine MAP-reduzierende Behandlung an diesen Orten unumgänglich. Jedoch wird die Effizienz der Chlorierung und Ozonierung zur Inaktivierung von MAP in Wasser aufgrund seiner Persistenz gegenüber diesen Methoden angezweifelt (Greenstein, 2003; Klanicova *et al.*, 2013); darüber hinaus stellt Falkinham, III. (2003) die Hypothese auf, dass eine Filtration bzw. Chlorierung MAP Selektionsvorteile gegenüber den im Wasser befindlichen Mikroorganismen verschafft.

Pflanzliche Lebensmittel können durch die Düngung und/oder Bewässerung mit MAP-kontaminiertem Mist und/oder Wasser ebenfalls den Erreger aufweisen (Whan *et al.*, 2005; Pribylova *et al.*, 2011). In einer Studie von Pavlik *et al.* (2002) wurde MAP in den Wurzeln, Stielen und Salatblättern, Tomaten und Radieschen, welche vier Wochen lang in künstlich kontaminiertem Boden anwachsen, detektiert.

Ein Zusammenhang zwischen Paratuberkulose und Morbus Crohn ist bisher nicht abschließend geklärt, so dass Übertragungswege von MAP-haltigen Lebensmitteln auf den Menschen nicht ignoriert werden sollten (Waddell *et al.*, 2008; National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, 2010).

Neben Lebensmittel, die als Überträger von MAP dienen können, kann der Mensch durch den direkten Kontakt mit erkrankten Tieren und/oder kontaminierter Umgebung dem Erreger ausgesetzt sein. Bestimmte Berufsgruppen wie Landwirte und Veterinäre sowie empfindliche Personengruppen – Säuglinge / Kleinkinder bis fünf Jahre, Schwangere, Senioren und immungeschwächte Menschen (YOPIS) – sind prädestiniert dafür. Ebenso ist eine horizontale Übertragung von MAP von Mensch zu Mensch möglich (National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, 2010).

2.5 Morbus Crohn

Die beiden Krankheitsbilder Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) gehören zur Gruppe der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) – im Englischen auch bekannt unter „idiopathic inflammatory bowel disease“ (IBD; Pierce, 2010). Ist eine eindeutige Differenzierung in MC oder CU nicht möglich, wie es bei ca. 5–20 % der CED-Patienten der Fall ist, erfolgt die Zuordnung zur „Colitis indeterminata“ (Price, 1978; Silverberg *et al.*, 2005). Rund drei Millionen Menschen in Europa sind von CED betroffen; Europa sowie Nordamerika weisen die höchsten Prävalenzen weltweit auf (Molodecky und Kaplan, 2010; Burisch *et al.*, 2013). Generell wird CED als „Zivilisationskrankheit“ angesehen: In industrialisierten Ländern erkranken mehr Menschen an chronischen Darmentzündungen als in Entwicklungsländern, bedingt durch veränderte Umweltfaktoren, jedoch steigt weltweit die Prävalenz durch die Industrialisierung (Molodecky und Kaplan, 2010; Stallmach *et al.*, 2012). Laut einer in der Oberpfalz durchgeführten Studie von Ott *et al.* (2008) liegt die Inzidenz von CED in Deutschland bei 11,0 pro 100.000 Einwohner pro Jahr.

2.5.1 Historische und epidemiologische Bedeutung

Morbus Crohn wurde 1913 erstmalig durch den schottischen Chirurg Dalziel beschrieben: Neun humane Fälle „chronischer intestinaler Enteritis“ von Tuberkulose-ähnlicher Form, jedoch ohne Nachweis säurefester Stäbchen, wiesen mit der Paratuberkulose von Wiederkäuern vergleichbare histologische sowie klinische Erscheinungen auf (Dalziel, 1913). Die Benennung eines eigenständigen Krankheitsbildes aus der Beschreibung acht humaner Fälle „regionaler Ileitis“ erfolgte 1932 durch die amerikanischen Mediziner Crohn, Ginzburg und Oppenheimer (Crohn *et al.*, 1932).

Eine prospektive Studie von Shivananda *et al.* (1996) wies für den Zeitraum 1991 bis 1993 eine **Inzidenz** von 5,6 pro 100.000 Einwohner für **Morbus Crohn in Europa** auf. Nach Molodecky *et al.* (2012) lag Europa mit der höchsten, zwischen 1930 und 2008 ermittelten, Inzidenz von 12,7/100.000 Einwohner im Mittelfeld, während die höchste Inzidenz in Nordamerika 20,2/100.000 Einwohner im Zeitraum von 1920–2004 und in Asien sowie im mittleren Osten gerade mal 5,0/100.000 Einwohner im Zeitraum von 1950–2008 betrug. Die MC-Inzidenz lag bei 6,3/100.000 Einwohner/Jahr in Nordeuropa, dagegen in Südeuropa bei 3,6/100.000 Einwohner/Jahr (Burisch *et al.*, 2013). Bei 43 von 57 MC-Studien (75 %) aus den letzten zehn Jahren war ein signifikanter Anstieg der Inzidenz zu verzeichnen (Molodecky *et al.*, 2012). Der Trend zur steigenden **Inzidenz von MC** ist auch **in Deutschland** ersichtlich. Wie in Tabelle 7 dargestellt, lag die im Zeitraum von 1962 bis 1975 ermittelte durchschnittliche Inzidenz bei 3,0/100.000 Einwohner, stieg bis 1995 nahezu kontinuierlich an und wies mit 6,6/100.000 Einwohner eine mehr als doppelt so hohe durchschnittliche Inzidenz im Zeitraum 2004 bis 2006 auf.

Die höchsten **Prävalenzen für Morbus Crohn in Europa** lagen bei 322/100.000 Einwohner (1930–2008); die Prävalenzdaten aus Nordamerika mit 318,5/100.000 (1920–2004) erwiesen sich als vergleichbar hoch (Molodecky *et al.*, 2012; Ng *et al.*, 2017). Für **Deutschland** wurden unterschiedliche **Prävalenzen** ermittelt: Studien von Brandes und Lorenz-Meyer (1983) sowie Daiss *et al.* (1989) ermittelten Werte von 30,5 bzw. 54,6/100.000 Einwohner, während Preiß *et al.* (2014) auf Prävalenzen zwischen 100 und 200/100.000 Einwohner hinwies. Eine auf Versicherungsdaten basierende Studie wies eine MC-Prävalenz in Deutschland von 322/100.000 Einwohner für das Jahr 2010 auf (Hein *et al.*, 2014).

Tab. 7: Inzidenzen für Morbus Crohn pro 100.000 Einwohner pro Jahr in Deutschland

Zeitraum	Region	Inzidenz (Mittelwert)	Geschlechtsspezifische Inzidenz		Publikation
			männlich	weiblich	
1962–1975	Marburg/Lahn	3,0	k. A.*	k. A.	Brandes und Lorenz-Meyer, 1983
1970–1980	Tübingen	4,0	k. A.	k. A.	Daiss <i>et al.</i> , 1989
1980–1984	Ruhrgebiet (Essen, Oberhausen, Mülheim, Duisburg)	4,0	3,6	4,3	Goebell <i>et al.</i> , 1994
1980–1984	Ruhrgebiet (Essen, Mülheim)	4,9	4,2	5,5	Timmer <i>et al.</i> , 1999
1985–1986	Köln	5,1	4,3	5,8	Löffler und Glados, 1993
1991–1993	Essen	4,4	3,2	5,6	Shivananda <i>et al.</i> , 1996
1991–1995	Ruhrgebiet (Essen, Mülheim)	5,2	4,3	5,9	Timmer <i>et al.</i> , 1999
2004–2006	Oberpfalz	6,6	k. A.	k. A.	Ott <i>et al.</i> , 2008

* keine Angabe

2.5.2 (Histo-)Pathologie und Klinik von Morbus Crohn

Bei Morbus Crohn handelt es sich um eine transmurale chronische Entzündung des Gastrointestinaltraktes, die diskontinuierlich mit abwechselnd veränderten und normalen Bereichen des Darmes, unter Mitbeteiligung mesenterialer sowie regionaler Lymphknoten, verläuft (Chacon *et al.*, 2004). Grundsätzlich können alle Segmente des Verdauungstraktes von der Entzündung betroffen sein; am häufigsten sind die Veränderungen jedoch im Übergangsbereich vom Ileum zum Caecum (40 % der Fälle), gefolgt vom Dünndarm (30 %) und Kolon (25 %) und äußerst selten im Rektum anzutreffen (Sands und Siegel, 2010; Akbariqomi und Heidari, 2014). Histopathologisch ist die Entzündung in allen Schichten des Darmes zu erkennen, begleitet von nicht-verkäsenden Granulomen, vergrößerten Lymphknoten – bedingt durch erweiterte Lymphkanäle und Hyperplasie – sowie Aggregaten von Lymphozyten, Granulozyten und Histiozyten (Chacon *et al.*, 2004).

Die Koloskopie in Verbindung mit einer segmentalen Biopsatentnahme – besonders die Darstellung der Verbindung zwischen Ileum und Kolon – entspricht dem Golden Standard zur Diagnose von Morbus Crohn. Aufgrund der vor allem in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts verbesserten Beurteilungsmöglichkeiten nahm die Diagnose von CED-Fällen zu, wobei gleichzeitig ein Anstieg an MC verzeichnet werden konnte (Molodecky *et al.*, 2012).

Drei charakteristische Erscheinungen prägen das makroskopische Bild des Darmes bei Patienten mit MC:

- 1) **Gartenschlauchphänomen:** Die Darmwand ist verdickt, gleichzeitig ist das Lumen durch Stenosen, welche durch Fibrosierungen entstanden sind, verengt (Chacon *et al.*, 2004);
- 2) **Pflastersteinphänomen** („cobblestoning“): Tiefe Geschwüre wechseln sich mit entzündeter und damit verdickter Darmschleimhaut ab (Atreya, 2011; Akbariqomi und Heidari, 2014);
- 3) **„Creeping fat“:** Durch die Proliferation der Adipozyten kommt es zur Hyperplasie und Versteifung des mesenterialen Fettgewebes, welches sich um die Darmwand schlingt (Chacon *et al.*, 2004; Pierce, 2010).

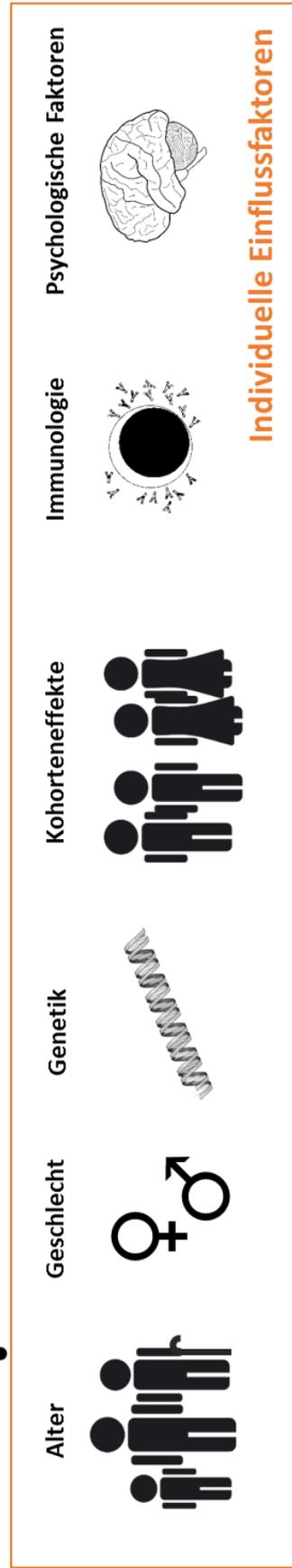
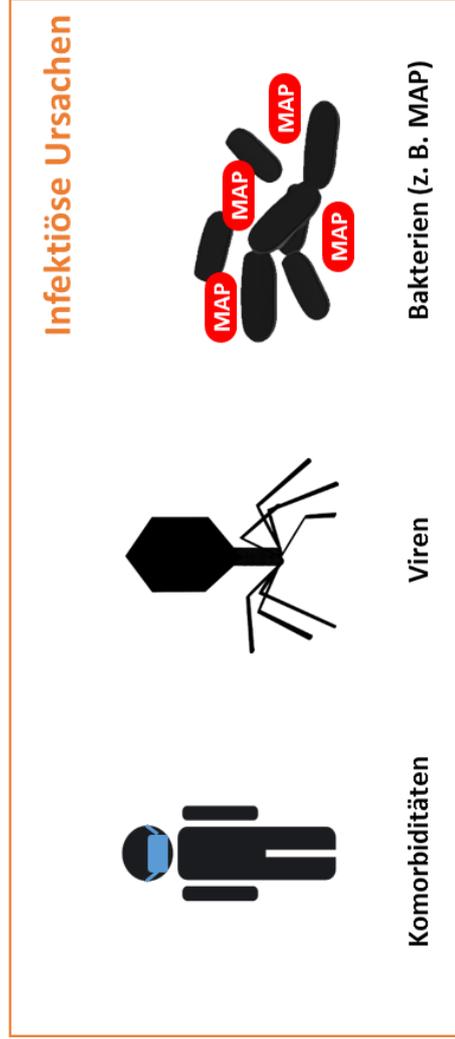
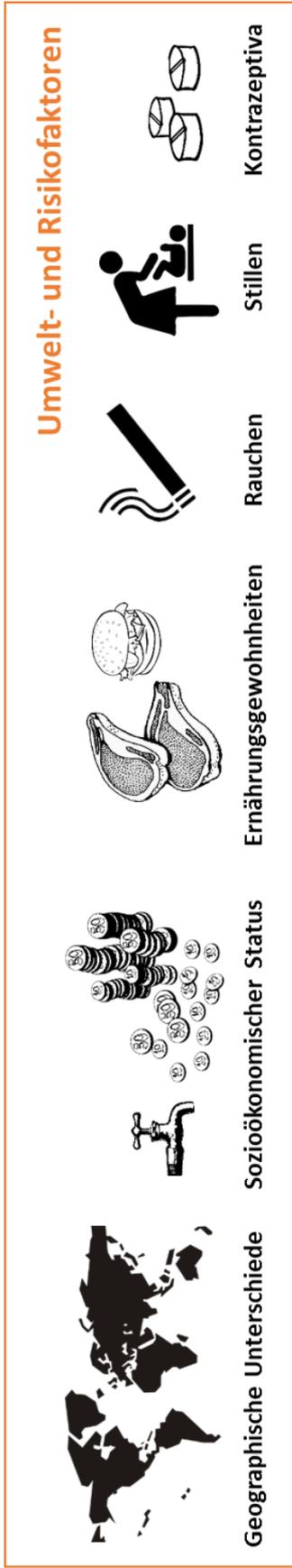
Des Weiteren erscheint das Ileum hyperämisch und die beteiligten Lymphknoten des Mesenteriums verdickt (Chacon *et al.*, 2004).

Klinisch gesehen stehen bei 77–81 % der Morbus Crohn-Patienten Bauchschmerzen, abhängig von der Lokalisation der Erkrankung, im Vordergrund. Bei 60–73 % geht die Erkrankung teilweise mit Schleim, Eiter und/oder Blut abgehendem Durchfall einher. Bei 54 % der Patienten war ein Gewichtsverlust von 10–20 % aufgrund von Malabsorption oder der verminderten Aufnahme von Nahrungsmitteln feststellbar (Timmer *et al.*, 1999; Hermon-Taylor und Bull, 2002; Atreya, 2011). Diese Erscheinungen sind auch als Symptomentrias bekannt und prägen das klinische Bild von Morbus Crohn. Spezifische Komplikationen wie Obstruktionen aufgrund der zuvor beschriebenen Stenosen, Darmperforationen sowie Fistel- oder abdominale Abszessbildung sind beschrieben worden (Hermon-Taylor und Bull, 2002). Unspezifische Symptome wie Fieber und Müdigkeit treten bei 35 bzw. 67 % der Patienten auf (Timmer *et al.*, 1999; Atreya, 2011). Zudem spielen extraintestinale Manifestationen bei 20–40 % der MC-Patienten eine gravierende Rolle. Dazu zählen periphere Arthritiden und ankylosierende Spondylitiden, Entzündungen des Auges (Uveitis, Skleritis, Episkleritis u.a.), Manifestationen der Haut wie Erythema nodosum und Pyoderma gangraenosum, Entzündungen und Geschwüre im Mundbereich bei bis zu 20 % der Patienten, und die Beteiligung weiterer Organe wie beispielsweise Leber inklusive Gallengänge und Niere sind möglich (Burisch *et al.*, 2013; Molicotti *et al.*, 2013).

Differentialdiagnostisch muss Morbus Crohn von Colitis ulcerosa abgegrenzt werden, ein Erkrankungsgeschehen, das hauptsächlich auf die Darmmukosa, insbesondere des Kolons und Rektums beschränkt ist (Hodgson und Bhatti, 1995; Kornbluth und Sachar, 2010). Kardinalsymptome der diffusen Entzündung von Colitis ulcerosa sind Anämie in 80 % der Fälle, Durchfälle, zumeist mit Blutabgang (90 %), Bauchschmerzen (47 %) sowie Tenesmen und in 5 % der Fälle Gewichtsverlust (Atreya, 2011; Dignass *et al.*, 2011). Auch extraintestinale Symptome, die denen des MC ähneln oder übereinstimmen wie die Gelenkbeteiligung, Haut- und Augenmanifestationen, können bei 15–20 % der CU-Patienten eine Rolle spielen (Dignass *et al.*, 2011; Burisch *et al.*, 2013).

2.5.3 Hypothesen zur Ätiologie von Morbus Crohn

Zahlreiche Hypothesen und Einflussfaktoren zur Entstehung von Morbus Crohn sind in der Literatur beschrieben worden, eine Einschränkung auf lediglich einen Faktor ist bisher nicht möglich gewesen. Individuelle Einflussfaktoren wie beispielsweise Alter, Geschlecht, Genetik und Immunologie eines Patienten, umweltbedingte Einflüsse wie Lebensraum und sozioökonomischer Status des Einzelnen, Risikofaktoren wie Rauchen oder das Einnehmen oraler Kontrazeptiva, Komorbiditäten und mikrobiologische Trigger, insbesondere MAP, sind an diesem multifaktoriellen Geschehen beteiligt (Chiodini, 1989; Ekbom, 2007; Akbariqomi und Heidari, 2014). Eine Übersicht der wichtigsten Einflussfaktoren ist in Abbildung 3 dargestellt.



MAP: *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*

Abb. 3: Mögliche Einflussfaktoren auf die Ätiologie von Morbus Crohn, gegliedert nach Kategorien

2.5.3.1 Individuelle Einflussfaktoren

Das **Alter** des Patienten ist ein wichtiges Indiz für die Zuordnung des Krankheitsbildes: 74 % der Patienten sind bei der Feststellung von Morbus Crohn 35 Jahre oder jünger, durchschnittlich liegt das Alter für die Erstdiagnose bei 30 Jahren (Goebell *et al.*, 1994; Timmer *et al.*, 1999). Das Einsetzen der Symptome kann bereits Jahre zuvor erfolgen (Timmer *et al.*, 1999). Laut einem Review von Molodecky *et al.* (2012) ergibt sich bei der Auswertung von 50 MC-Studien eine zweigipflige Kurve der altersspezifischen Inzidenzen. Der erste Peak befindet sich bei der Gruppe der 20- bis 40-Jährigen, ein weiterer – wenngleich niedrigerer – bei Patienten über 60 Jahre. Nach Timmer *et al.* (1999) liegt in Deutschland die höchste Inzidenz für MC in der Altersgruppe der 15–24-Jährigen mit 10,5 (1980–1984) bzw. 10,2/100.000 Einwohner (1991–1995).

Studien in Deutschland zufolge tritt MC vergleichsweise häufiger bei **Frauen** als bei **Männern** auf (Löffler und Glados, 1993; Goebell *et al.*, 1994; Shivananda *et al.*, 1996). Diese Hypothese ist jedoch umstritten, da andere Veröffentlichungen keinen Einfluss des Geschlechtes ermittelten oder inkonsistente Ergebnisse aufwiesen (Molodecky *et al.*, 2012).

Die Möglichkeit, dass eine Subpopulation **genetisch empfänglicher Individuen** Morbus Crohn entwickeln kann, ist vielfach diskutiert worden (Grant, 2005; Akbariqomi und Heidari, 2014). Genom-weite Assoziationsstudien ermitteln über 160 unabhängige Suszeptibilitätsloci, die eine Rolle im angeborenen Immunsystem spielen, darunter zahlreiche Gene bzw. Gendefekte, die bei MC-Patienten vermehrt auftreten (Akbariqomi und Heidari, 2014; Ellinghaus *et al.*, 2015). Die Mutation des *NOD2/CARD15*-Gens auf dem Chromosom 16 wurde 2001 von drei Forschergruppen unabhängig beschrieben (Hampe *et al.*, 2001; Hugot *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001) und besitzt eine starke – statistisch signifikante – Assoziation zu MC (Tremelling und Parkes, 2007). Diese bei 15–30 % der MC-Patienten entdeckte Mutation führt zu einer Störung der Bakterienerkennung und -eliminierung: *NOD2/CARD15* kodiert gewöhnlich einen zytoplasmatischen Rezeptor zur Erkennung von Makrophagen präsentierten Muropeptiden bakterieller Zellwände und aktiviert die Expression von NF- κ B (Grant, 2005; Akbariqomi und Heidari, 2014; Sechi und Dow, 2015). Eine nachgewiesene Beteiligung von *NOD2/CARD15* an der Paratuberkulose der Wiederkäuer ist zudem in einem Review von Chiodini *et al.* (2012) dargestellt worden. Eine Studie von Sechi *et al.* im Jahr 2005 konnte bei 14 von 19 MC-Patienten aus Sardinien (73,7 %), die mindestens ein suszeptibilitäts-assoziiertes *NOD2/CARD15*-Allel trugen, MAP-DNA mittels IS900-PCR feststellen (Sechi *et al.*, 2005a). Weitere Suszeptibilitätsloci für Morbus Crohn, die einen entscheidenden Einfluss auf das angeborene Immunsystem haben, konnten für die Gene *ATG16L1* (autophagy-related 16-like 1;

Akbariqomi und Heidari, 2014), *IBD5* (inflammatory bowel disease 5; Tremelling und Parkes, 2007) und *IL23R* (interleukin 23 receptor; Duerr *et al.*, 2006), *IRGM* (immunity-related GTPase family M protein; Parkes *et al.*, 2007) und *SLC11A1* (solute carrier family 11 member 1; Paccagnini *et al.*, 2009) ermittelt werden.

Defekte im **erworbenen Immunsystem** werden ebenfalls diskutiert, an der Entstehung und Aufrechterhaltung des Morbus Crohns beteiligt zu sein (Akbariqomi und Heidari, 2014). MC-Patienten besitzen im Vergleich zu CU- oder Kontrollpatienten (ohne CED) einen mit 71 % höher liegenden Anteil reaktiver T-Zellen, wobei das Gleichgewicht Richtung Th1- und Th17-Effektorzellen verschoben ist (Chiodini *et al.*, 2012). Im Vordergrund steht die Sezernierung proinflammatorischer Mediatoren wie IL17, TNF α und IFN γ ; die regulatorischen T-Zellen – Th1 sowie Th3 – sowie deren Effekte spielen nur eine geringe Rolle (Atreya, 2011; Akbariqomi und Heidari, 2014).

Beim Auftreten von Morbus Crohn bei nicht verwandten Personen, aber auch bei Familienmitgliedern, kann ein sogenannter **Kohorteneffekt** eintreten. So berichteten Aisenberg und Janowitz (1993) von drei während der College-Zeit befreundeten, nicht miteinander verwandten Männern, die innerhalb eines Jahrzehnts ihres Kontaktes an CED erkrankten, davon zwei an MC, einer an CU. Im südlichen Wales (Vereinigtes Königreich) wiesen Pickup *et al.* (2005) MAP-DNA in 32,3 % der innerhalb eines Jahres täglich entnommenen Wasserproben (n = 96) des Flusses Taff nach, der durch ein endemisches Paratuberkulose-Gebiet verläuft. Gleichzeitig wurde eine steigende Inzidenz für MC bei elf Bezirken, die entlang des Flusses liegen, ermittelt (Pickup *et al.*, 2005). Familiäre Cluster zeigten auf, dass Verwandte ersten Grades ein zehnfach höheres Risiko aufwiesen, selbst an MC zu erkranken (Van Kruiningen *et al.*, 1993; Akbariqomi und Heidari, 2014). Eine in Deutschland durchgeführte Zwillingstudie wies nach, dass 35,5 % der monozygoten Zwillingspaare (11 aus 31) häufiger an Morbus Crohn erkranken als dizygoten (2 aus 58; 3,4 %), wobei der erstgeborene Zwilling dominierend als Erster erkrankte (Spehlmann *et al.*, 2008).

Ein Einfluss **psychologischer Faktoren** auf die Ätiologie von CED – insbesondere MC – ist äußerst umstritten. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass psychologischer Stress die Symptomatik auslösen oder sogar verstärken kann (Ekbom, 2007; Molodecky und Kaplan, 2010). Das Konzept der Psychoneuroimmunologie besagt, dass eine negative Interaktion von Gehirn und Gastrointestinaltrakt möglich sei und dass ein psychosozialer Faktor wie chronischer Stress Schäden an der Darmmukosa auslösen und zu Entzündungen im Bereich des Magen-Darm-Traktes führen kann (Mawdsley und Rampton, 2005; Molodecky und Kaplan,

2010). Laut Hoffmann *et al.* (2008) empfindet die überwiegende Anzahl der MC-Patienten Stress als Einflussfaktor.

2.5.3.2 Umwelt- und Risikofaktoren

Umweltfaktoren, wie geographische und sozioökonomische Gegebenheiten, können die Epidemiologie und Ätiologie des Morbus Crohns beeinflussen. Shivananda *et al.* (1996) untersuchten in der zweijährigen Studie von 1991 bis 1993 den bereits mehrfach in der Literatur beschriebenen **geographischen Unterschied** der Inzidenzen für MC. So ergab sich bei den in den Untersuchungszentren ermittelten MC-Inzidenzen ein Nord-Süd-Gefälle, wobei die Inzidenzen im Norden um 80 % höher lagen als im Süden. Weltweit betrachtet wiesen vor allem industrialisierte – an die westliche Kultur angepasste – Regionen hohe Inzidenzen und Prävalenzen auf: Nordamerika, vor allem Kanada (höchste Inzidenz 20,2/100.000 Einwohner, höchste Prävalenz 318,5/100.000) und Europa (höchste Inzidenz 12,7/100.000 Einwohner, höchste Prävalenz 322/100.000) stehen an erster Stelle (Molodecky *et al.*, 2012).

Mit einhergehender Industrialisierung und Urbanisierung der Gesellschaft verändern sich auch die **sozioökonomischen Faktoren**, denen die Patienten ausgesetzt sind. Nach Economou *et al.* (2009) und Molodecky *et al.* (2012) ist MC eine „Zivilisationskrankheit“, die hauptsächlich mit dem wirtschaftlichen Wohlstand, dem höheren Hygienestatus und den geänderten Lebensgewohnheiten wie beispielsweise Ernährung, einhergeht. Soon *et al.* (2012) wiesen eine positive Assoziation von MC mit der städtischen im Vergleich zur ländlichen Umgebung (Inzidenzratenverhältnis 1,42) nach. In dem Review von Chiodini *et al.* (2012) wurden auch Studien mit einer höheren Inzidenz an MC bei der ländlichen Bevölkerung, aufgeführt; darunter vor allem Landwirte und Veterinäre, die MAP ausgesetzt sind. Eine amerikanische Studie aus dem Jahr 2010 wies bei über 702 Fleischrinderzüchtern und 774 Tierärzten drei bzw. vier Fälle von MC nach; trotz dieser hohen Prävalenz von 474/100.000 Einwohner konnte keine statistisch signifikante positive Assoziation bei diesen Berufsgruppen festgestellt werden (Qual *et al.*, 2010). Der durch verbesserte Sanitäreinrichtungen und unbegrenztem Zugang zu heißem Leitungswasser entstandene hohe Hygienestatus führt dazu, dass Kinder vergleichsweise seltener Darmerkrankungen ausgesetzt sind, jedoch aufgrund der fehlenden Immunkonditionierung (in der Kindheit) später empfänglicher für CED-Erkrankungen sind (Molodecky und Kaplan, 2010; Pugazhendhi *et al.*, 2011). Eine weitere, jedoch umstrittene Hypothese zur Entstehung von MC ist die „Kühlkettenhypothese“: Durch den einfachen Zugang zu gekühlten Lebensmitteln können darin enthaltene psychrophile Bakterien wie *Listeria monocytogenes* oder *Yersinia enterocolitica* mit aufgenommen werden (Hugot *et al.*, 2003;

Economou *et al.*, 2009). Eine positive Assoziation zwischen dem Auftreten von MC und dem frühzeitigen Besitz eines Kühlschranks im Haushalt von durchschnittlich 4,7 Jahren im Vergleich zu nicht an CED erkrankten Patienten konnte durch Forbes und Kalantzis (2006) nachgewiesen werden. Trotz dieser Studie kann die „Kühlkettenhypothese“ nicht eindeutig belegt werden; die orale Aufnahme psychrophiler Mikroorganismen von geringer Anzahl führt seit Jahrtausenden, noch vor der Einführung von Kühlschränken, zu keiner dem MC vergleichbaren Krankheitsausprägung (Adam und Golly, 2005; Forbes und Kalantzis, 2006).

Der Einfluss von **Ernährungsgewohnheiten** auf die Entstehung von MC ist umstritten und noch nicht ausreichend geklärt (Ekbom, 2007; Baumgart und Sandborn, 2012). Diskutiert wird über eine positive Assoziation von MC durch erhöhte Aufnahme von (raffiniertem) Zucker/Süßstoffen, Süßwaren, Fetten und Ölen insbesondere mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Molodecky und Kaplan, 2010; Baumgart und Sandborn, 2012), wohingegen eine überwiegend ballaststoffreiche Diät, darunter Obst und Gemüse, einen schützenden Effekt haben soll (Ekbom, 2007; Molodecky und Kaplan, 2010). Eine in Japan im Zeitraum 1966 bis 1985 durchgeführte epidemiologische Studie untersuchte den Zusammenhang zwischen der Inzidenz des MC und den Essgewohnheiten und fand unter anderem eine positive Korrelation bei vermehrter Aufnahme tierischer Proteine (Milchprotein) und Fett (Gesamtfett, tierisches Fett, n-6-polyungesättigte Fettsäuren, erhöhtes Verhältnis n-6 zu n-3-mehrfach ungesättigter Fettsäuren); eine Adaption an die „westlichen“ Ernährungsgepflogenheiten mit einer sechsfach gestiegenen Fettaufnahme zwischen 1945 und 1985 könnte die zunehmende Inzidenz in Japan erklären (Shoda *et al.*, 1996).

Eine Aufnahme von MAP-kontaminierten Fleisch/-erzeugnissen, Milch/-produkten, Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs oder Trinkwasser steht ebenfalls in Verdacht, Morbus Crohn mit auszulösen (siehe auch Kapitel 2.4).

Rauchen ist zahlreichen Studien zufolge ein Risikofaktor bei der Entstehung von MC. (1) Generell wird ein indirektes Verhältnis von Rauchen und Entwicklung einer CED beobachtet: Während Rauchen das Risiko für MC erhöht, sinkt das Risiko für CU (Calkins, 1989; Pierce, 2010). In der im Jahr 2006 durchgeführten Meta-Analyse von Mahid *et al.* wurde ein positiver Zusammenhang von Rauchen und MC mit einer Odds Ratio von 1,76 ermittelt. (2) Ein früh einsetzender Konsum an Tabak führt zu einem statistisch signifikanten Risiko, an MC zu erkranken (Akbariqomi und Heidari, 2014). (3) Dabei handelt es sich vorwiegend um einen dosisabhängigen und weniger um einen mechanischen Effekt: Multifokale gastrointestinale Infarkte werden durch Nikotin, aber womöglich auch durch andere, bisher nicht ausreichend erforschte Inhaltsstoffe, ausgelöst (Ekbom, 2007; Molodecky und Kaplan,

2010; Akbariqomi und Heidari, 2014). In der Meta-Analyse von Inamdar *et al.* (2015) werden neben Auswirkungen auf die Barrierefunktion und das Gefäßsystem des Magen-Darm-Traktes, auch mögliche Auswirkungen auf das Nervensystem, Immunsystem sowie auf die Funktion mononukleärer Blutzellen diskutiert. (4) Rauchen steigert das Risiko, einen schweren Krankheitsverlauf von MC zu entwickeln (Pugazhendhi *et al.*, 2011; Akbariqomi und Heidari, 2014), wie ebenfalls eine Studie von Cosnes *et al.* (1996) durch Befragung von 400 MC-Patienten im Zusammenhang mit deren Rauchgewohnheiten herausfand. (5) Dagegen nimmt das Risiko eines schweren Krankheitsverlaufes ein Jahr nach Beenden des Rauchens um die Hälfte ab (Begon *et al.*, 2015).

Orale Kontrazeptiva stehen wie das Rauchen in Verdacht, das Krankheitsbild des Morbus Crohns durch Bildung östrogen-bedingter gastrointestinaler Infarkte zu verstärken, ohne jedoch die Schwere der Erkrankung oder das Wiederauftreten zu beeinflussen (Ekbom, 2007). Zwei unabhängige Meta-Analysen wiesen eine positive Assoziation von MC und der oralen Dosis-unabhängigen Aufnahme von Kontrazeptiva mit einem relativen Risiko für MC von 1,44 bzw. 1,46 auf; ein Absetzen der Aufnahme würde diesen Effekt reversibel machen (Godet *et al.*, 1995; Cornish *et al.*, 2008).

Die Frage, ob das **Stillen mit Brust oder Flasche** einen Einfluss auf die Ätiologie oder vielmehr auf die Entwicklung von MC hat, ist in zahlreichen Studien aufgegriffen worden. In den meisten Fällen wird eine Fütterung mit Flasche sowie frühes Absetzen des Stillens mit Muttermilch mit einem erhöhten Risiko für CED-Erkrankungen assoziiert (Ekbom, 2007). Eine negative Assoziation des Stillens mit Brust und MC ist aus dem systematischen Review mit Meta-Analyse von Klement *et al.* (2004) mit 17 involvierten Studien (Odds Ratio = 0,69) sowie aus der Studie von Rigas *et al.* (1993) mit 68 pädiatrischen bzw. jugendlichen Patienten, die im Zeitraum 1986–1990 mit MC diagnostiziert wurden (Relatives Risiko = 0,5; $p = 0,04$), ersichtlich. Der Hintergrund dieses protektiven Effektes könnte in der Zusammensetzung der Brustmilch, die Inhaltsstoffe mit antibakteriellen und antiviralen Eigenschaften enthält und die die immunologische Kompetenz der Mukosa des Magen-Darm-Traktes bei Kindern fördern, liegen (Pittard, III., 1979; Molodecky und Kaplan, 2010).

2.5.3.3 Infektiöse Ursachen

Die Beteiligung infektiöser Ursachen wie Bakterien, Viren oder andere übertragbare Agentien am Morbus Crohn konnte bisher weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Im Darm des Menschen dominieren nach einer Studie von Yau *et al.* (2013) hauptsächlich die vier Bakterienstämme Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria und Proteobacteria. Firmicutes und

Bacteroidetes repräsentieren nahezu 90 % des intestinalen Mikrobioms; bei MC-Patienten wurde dagegen ein geringeres Verhältnis dieser Gruppen gegenüber anderen **Bakterien** nachgewiesen (Akbariqomi und Heidari, 2014; Ghouri *et al.*, 2014). Im Vergleich zu CU-Patienten verringerte sich die Anzahl der Bakterien in Biopsaten aus entzündeten und nicht-entzündeten Regionen des Darmes bei MC-Patienten um die Hälfte (Bibiloni *et al.*, 2006). Neben obligat pathogenen Bakterien können auch nicht-pathogene Darmbakterien zu einer CED führen, sofern die mukosale Schrankenfunktion, die Immun- oder Bakterienabwehr geschädigt ist, wie es bei genetisch empfänglichen Menschen der Fall sein kann (Rahimi *et al.*, 2006; Naser *et al.*, 2014). Eine Übersicht der an der Entwicklung von MC möglicherweise beteiligten Bakterien ist in Tabelle 8 dargestellt. Hervorzuheben ist die Beteiligung von *Escherichia coli*: In 80 % der Granulome im MDT (12 aus 15) und in 57 % der intestinalen Gewebeproben (12 aus 21) von MC-Patienten konnte *E. coli* molekularbiologisch bzw. immunhistochemisch nachgewiesen werden (Liu *et al.*, 1995; Ryan *et al.*, 2004). Im Vordergrund stehen die adhärent-invasiven *E. coli*-Stämme (AIEC), welche in sieben von 23 der chronischen (30 %) und acht von 22 der akut entstandenen Veränderungen (36 %) sowie in vier von 18 der unveränderten Mukosa (22 %) des Ileums von MC-Patienten ermittelt wurden (Darfeuille-Michaud *et al.*, 2004).

Tab. 8: Mögliche Beteiligung bakterieller Mikroorganismen am Morbus Crohn

Mikroorganismen-Nachweis bei MC-Patienten	Publikation
<i>Bacteroides fragilis</i>	European Commission, 2000; Naser <i>et al.</i> , 2014
<i>Brucella abortus</i>	European Commission, 2000
<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Campylobacter faecalis</i>	European Commission, 2000
<i>Chlamydia</i> spp., <i>Chlamydia pneumoniae</i>	European Commission, 2000; Naser <i>et al.</i> , 2014
<i>Eubacterium</i> spp.	European Commission, 2000
<i>Enterococcus faecalis</i>	European Commission, 2000
Adhärenz-invasive <i>Escherichia coli</i> (AIEC)	Liu <i>et al.</i> , 1995; Glasser <i>et al.</i> , 2001; Darfeuille-Michaud <i>et al.</i> , 2004
<i>Helicobacter pylori</i>	Chacon <i>et al.</i> , 2004
<i>Klebsiella</i> spp.	European Commission, 2000
<i>Listeria monocytogenes</i>	Liu <i>et al.</i> , 1995; Hugot <i>et al.</i> , 2003
<i>Mycobacterium</i> spp., <i>M. kansasii</i> , MAP	European Commission, 2000; Liverani <i>et al.</i> , 2014; Naser <i>et al.</i> , 2014
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	European Commission, 2000
<i>Pseudomonas</i> spp.	Chacon <i>et al.</i> , 2004; Naser <i>et al.</i> , 2014
<i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Hugot <i>et al.</i> , 2003; Chacon <i>et al.</i> , 2004

Im Rahmen der „Kühlkettenhypothese“ von Hugot *et al.* (2003) könnten psychrophile Bakterien wie *Listeria monocytogenes* und *Yersinia enterocolitica* ebenfalls eine Rolle beim MC spielen (siehe auch Kapitel 2.5.3.2). *Listeria monocytogenes* konnte immunhistochemisch bei zwölf von insgesamt 16 MC-Patienten nachgewiesen werden (Liu *et al.*, 1995), wohingegen zwar ein Nachweis der DNA mittels PCR bei MC-Patienten möglich war, jedoch ohne statistische Signifikanz blieb (Chiba *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2000). Der Studie von Lamps *et al.* (2003) zufolge gelang der DNA-Nachweis von *Yersinia* spp. bei Patienten mit MC; die Stämme *Yersinia enterocolitica* und/oder *Yersinia pseudotuberculosis* konnten ebenfalls in Darmgewebeproben anderer Studien detektiert werden (Hugot *et al.*, 2003). Ein vorherrschend bei der Entstehung von Morbus Crohn diskutierter Mikroorganismus ist MAP (Chiodini, 1989; Hermon-Taylor *et al.*, 2000; Over *et al.*, 2011; Liverani *et al.*, 2014; Naser *et al.*, 2014; Sechi und Dow, 2015); in Kapitel 2.6 wird näher auf einen möglichen Zusammenhang eingegangen.

Viren spielen als mögliche Auslöser von Morbus Crohn eine eher untergeordnete Rolle. Ekbom (2007) diskutiert über eine Beeinträchtigung der Immunantwort durch virale Infektionen, besonders wenn diese gehäuft in den ersten Lebensjahren auftreten. In dem systematischen Review von Wagner *et al.* (2013) werden dominierend das Zytomegalievirus (CMV; Risikoverhältnis 1,602) und das Epstein-Barr-Virus (EBV; Risikoverhältnis 1,366) mit MC in Verbindung gebracht. Eine geringe Assoziation wird unter anderem den Masernviren, humanen Herpesviren Typ 6 und 8, Herpes-simplex-Viren, Varizella-Zoster-Viren sowie Noro- und Adenoviren zugeschrieben.

Studien zufolge geht Morbus Crohn auch mit **anderen Erkrankungen** einher; diese wurden jedoch hauptsächlich in Verbindung mit dem Vorhandensein von MAP untersucht. Eine positive Assoziation von MAP wurde in der Meta-Analyse von Waddell *et al.* (2015) aus 128 Veröffentlichungen für MC (OR = 4,26–8,44), Diabetes mellitus Typ 1 (T1DM; OR = 2,91–9,95) und Multiple Sklerose (MS; OR = 6,5–7,99) ermittelt. Bei T1DM können die gleichen Suszeptibilitätsgene *SLC11A1* (*NRAMP1*) wie bei MC angesprochen werden (Paccagnini *et al.*, 2009; Rani *et al.*, 2010). Eine weitere Assoziation zu *SLC11A1* und zu MAP wurde bei der Multiplen Sklerose sowie der Sarkoidose nachgewiesen (Dubaniewicz *et al.*, 2005; Cossu *et al.*, 2013; Waddell *et al.*, 2015).

2.6 MAP und Morbus Crohn – Eine zoonotische Bedeutung?

Die Ätiologie von Morbus Crohn ist bis heute unzureichend geklärt; zahlreiche Einflussfaktoren werden diskutiert (siehe auch Kapitel 2.5.3). Seit Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts wird vermutet, dass MAP am Krankheitsgeschehen einer Subpopulation von Patienten mitbeteiligt ist, da Morbus Crohn vergleichbare pathomorphologische Veränderungen und klinische Erscheinungen wie bei der Paratuberkulose der Wiederkäuer aufweist (siehe auch Kapitel 2.3.2 und 2.5.2; Chiodini, 1989). 1984 gelang in der Studie von Chiodini *et al.* zum ersten Mal die Isolation von MAP aus dem Darmgewebe von drei MC-Erkrankten (Chiodini *et al.*, 1984b). 1998 wiesen Hermon-Taylor *et al.* in den aufgrund einer Lymphadenitis entnommenen Lymphknoten eines siebenjährigen Jungen MAP-DNA nach, der fünf Jahre später an terminaler Ileitis erkrankte (Hermon-Taylor *et al.*, 1998). Zahlreichen Forschergruppen aus verschiedenen Ländern gelang der positive Nachweis von MAP mittels kultureller Methoden bzw. von MAP-DNA mittels molekular-basierter Methoden aus intestinalen Gewebeproben von MC-Patienten (siehe Tab. 9).

Tab. 9: Nachweis von MAP bzw. MAP-DNA in humanen Gewebeproben des Magen-Darm-Traktes mittels kultureller und/oder molekularbasierter Methoden in Abhängigkeit der Patientengruppen

Land	Probenart	Methode [ggf. Primer]	MAP/-DNA-Nachweis (%)			Statistik/Bemerkungen	Publikation
			MC	CU	nCED		
Vereinigtes Königreich	Biopsate (Dünn- und Dickdarm)	IS900-PCR [Primer 90/Primer 91]	26/40 (65,0 %)	1/23 (4,3 %)	5/40 (12,5 %)	-	Sanderson et al., 1992
Vereinigtes Königreich	Biopsate (aus entzündeten Regionen bei MC: terminales Ileum, Kolon)	nested IS900-PCR (L/AV) [L1/L2] und [AV1/AV2] Kultur: MGIT + OADAC, PANTA, Mycobactin J (Dekontamination: NALC-NaOH), anschließend nested IS900-PCR (L/AV)	34/37 (91,9 %)	-	9/34 (26,5 %)	p = 0,0002, OR = 3,47 (positive Assoziation für MC) p = 0,0019, OR = 4,66 (positive Assoziation für MC); 38. Inkubationswoche optimal für PCR-Nachweis	Bull et al., 2003a
China	Resektate (in Paraffin eingebettet: Ileum und/oder Kolon)	nested IS900-PCR (L/AV) [L1/L2] und [AV1/AV2]	9/13 (69,2 %)	-	2/14 (14,3 %)	p = 0,0063, OR = 13,5	Cheng et al., 2005
Italien	Biopsate (aus entzündeten Regionen bei MC)	IS900-PCR [p89/p92]	25/37 (67,6 %)	-	7/34 (20,6 %)	p = 0,001, OR = 4,94 (positive Assoziation für MC)	Sechi et al., 2005a
Italien	Biopsate (aus entzündeten Regionen bei MC)	IS900-PCR [p89/p92] Kultur: MGIT + Eigelb, Mycobactin J (Dekontamination: NaOH), anschließend IS900-PCR	25/30 (83,8 %)	0/2 (0 %)	3/29 (10,3 %)	p = 0,000001, OR = 43,3 (positive Assoziation für MC) p = 0,00001, OR = 14,9 (positive Assoziation für MC)	Sechi et al., 2005b

Tab 9: Nachweis von MAP bzw. MAP-DNA in humanen Gewebeproben des Magen-Darm-Traktes mittels kultureller und/oder molekular-basierter Methoden in Abhängigkeit der Patientengruppen (Fortsetzung)

Land	Probenart	Methode [ggf. Primer]	MAP/-DNA-Nachweis (%)			Statistik/Bemerkungen	Publikation
			MC	CU	nCED		
Australien	Biopsate (aus entzündeten/nicht entzündeten Regionen: terminales Ileum, Caecum, Kolon, Colon sigmoideum, Rektum)	nested IS900-PCR [TJ1/TJ2] und [TJ3/TJ4] Kultur: BACTEC 12B + Eigelb, PANTA, Mycobactin J (Dekontamination: HPC), anschließend Kultur auf HEYM	22/56 (39,3 %)	7/22 (31,8 %)	6/39 (15,4 %)	p < 0,05 MC vs. nCED	Kirkwood et al., 2009
Deutschland	Biopsate (terminales Ileum, Caecum, Colon transversum, Colon sigmoideum)	Kultur: MGIT + OADC, PANTA, Mycobactin J (Dekontamination: NALC-NaOH), anschließend nested IS900- und Real Time-PCR (f57 und ISMav2)	4/12 (33,3 %)	2/8 (25 %)	9/12 (75 %)	p = 0,0586; nur bei einem Probanden (nCED) MAP mittels Sequenzanalyse bestätigt	Füllgrabe, 2008
Brasilien	Biopsate (terminales Ileum, Colon ascendens)	Kultur: HEYM mit/ohne Mycobactin J; MB7H9 + OADC, Mycobactin J (Dekontamination: NALC-NaOH)	1/5 (20,0 %)	1/8 (12,5 %)	1/12 (8,3 %)	p = 0,8161; Probe von CU-Patient als einzige positiv in ZN-Färbung	Carvalho et al., 2015
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	MGIT	Mycobacterial Growth Indicator Tube	BACTEC 12B	radiometrisches Flüssigmedium		
MC	Morbus Crohn	HEYM	Herrold's Egg Yolk Medium	ZN	Ziehl-Neelsen		
CU	Colitis ulcerosa	MB	Middlebrook	p	Signifikanzwert		
nCED	nicht chronisch-entzündliche Darmerkrankung	NALC-NaOH	N-Acetyl-L-Cystein-Natriumhydroxid	OR	Chancenverhältnis		
DNA	Desoxyribonukleinsäure	HPC	Hexadecylpyridiniumchlorid-Monohydrat				
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	OADC	Ölsäure-Albumin-Dextrose-Komplex				
IS900	Insertionssequenz 900	PANTA	Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixinsäure, Trimethoprim, Azlocillin				

Um die Aussagekraft der Studien zu stützen, muss immer eine Kontrollgruppe im Vergleich mitgeführt werden, die in der Regel aus Patienten ohne chronische Darmentzündungen besteht; in den meisten Fällen wurde zudem das MAP/-DNA-Vorkommen bei CU-Patienten untersucht. Die Arbeitsgruppe um Bull *et al.* (2003a) konnte sowohl mittels kulturellem Nachweis in MGIT mit anschließender molekular-basierter Bestätigung als auch direkt mittels nested PCR (IS900-PCR) die dominierende Präsenz von MAP/-DNA in Biopsaten von MC-Patienten, welche aus entzündeten Regionen des Magen-Darm-Traktes stammten, aufzeigen (OR = 4,66 bzw. 3,47). Zusätzlich fand die Arbeitsgruppe heraus, dass in neun der 15 MGIT-Proben von MC-Patienten (60 %) erst nach einer Inkubation von mehr als 38 Wochen MAP-DNA nachgewiesen werden konnte, so dass der optimalste Zeitpunkt zur Entnahme einer Teilprobe aus der Kultur für die molekular-basierte Untersuchung die 38. Inkubationswoche sei. Die im Jahre 2008 in Deutschland durchgeführte Studie von Füllgrabe wies bei vier von zwölf (33,3 %) der MC- und zwei von acht (25,0 %) der CU-Patienten MAP-DNA nach (Füllgrabe, 2008). Die zuvor entnommenen Darmgewebeproben wurden nach Aufbereitung zwölf Wochen lang in dem Flüssigmedium MGIT inkubiert und einem anschließenden Nachweis für MAP-DNA mittels nested und Real Time-PCR unterzogen. Der Anteil MAP-DNA-positiver nCED-Patienten lag mit 75 % erstaunlicherweise hoch (9 aus 12). Eine, im Anschluss der Untersuchungen durchgeführte Sequenzanalyse aller ermittelten positiven Befunde, bestätigte nur in einem Fall – und zwar bei einem Kontrollpatienten – MAP. Ebenfalls konnte in einer Studie von Bernstein *et al.* (2003) kein Zusammenhang von MAP und Morbus Crohn nachgewiesen werden: Nur einer von 28 CU- und keiner der 24 MC-Patienten wiesen MAP-DNA auf, dagegen gelang der molekular-basierte Nachweis bei sechs der 19 zufällig ausgewählten Kontrollpatienten (31,6 %).

MAP bzw. MAP-DNA konnte im Laufe der Zeit aus verschiedenen Matrices von MC-Patienten isoliert werden (siehe Tab. 10), beispielsweise aus Muttermilch durch Naser *et al.* (2000b), aus oralen Läsionen vom aphthösen Typ durch Molicotti *et al.* (2013) und aus Stuhlproben durch Tuci *et al.* (2011). Letztere Forschergruppe stellte zudem fest, dass die hohe Nachweisrate von MAP-DNA in Fäzes sowohl in MC-, CU- als auch Kontrollpatienten in ihrer Studie mit der hohen Prävalenz an asymptomatischen MAP-Infektionen in der Allgemeinbevölkerung übereinstimmt. Im Jahr 2004 entdeckten Naser *et al.* MAP erstmalig in Blut von Patienten mit Morbus Crohn (Naser *et al.*, 2004). Dagegen stellten Studien von Parrish *et al.* (2009) und Mendoza *et al.* (2010), die ebenfalls Blutproben untersuchten, keine Assoziation zwischen MAP und MC fest. Bei serologischen Untersuchungen von Suenaga *et al.* (1999) stellte der Antikörper-Titer der Immunglobuline G bei fünf von 13 MC-Patienten einen statistisch signifikant höheren Unterschied zu den von CU- und Tuberkulose-Patienten dar; auch

Antikörper gegen die MAP-spezifischen Antigene p35 und p36 bei MC-Patienten wurden im Vergleich zu Kontrollpatienten durch Naser *et al.* (2000a) häufiger nachgewiesen. Jedoch wurden letztere Antigene ebenfalls bei *M. avium* ssp. *avium* detektiert. Zusätzlich existieren Studien wie die von Bernstein *et al.* (2004), die keinen signifikanten Unterschied beim Nachweis von MAP-spezifischen Antikörpern mittels ELISA bei MC-, CU- oder Kontrollpatienten (ca. 35 % seropositive Rate bei allen Gruppen) und somit keine Assoziation von MAP mit erhöhten Antikörper-Titern bei MC-Patienten aufzeigten.

Über eine mögliche Rolle von Zellwand-geschädigten Formen – sogenannten Sphäroblasten – von MAP bei Morbus Crohn wurde bereits in den frühen 80er Jahren von Chiodini *et al.* (1984b; 1986) diskutiert (siehe auch Kapitel 2.1.3.2). Man vermutete, dass Zellwand-defekte Formen im befallenen Darmgewebe persistieren und eine Immunantwort bei den erkrankten Patienten auslösen können, die zur Symptomatik von Morbus Crohn führt (Hulten *et al.*, 2000a). Ein Nachweis von MAP-Sphäroblasten ist, wie in Kapitel 2.1.3.2 und 2.1.3.3 dargestellt, schwierig und mitunter sehr langwierig. Molekular-basierte Verfahren wie die PCR können lediglich DNA nachweisen, jedoch nicht zwischen Zellwand-geschädigten und Zellwand-intakten sowie lebensfähigen und toten Bakterien unterscheiden (Hermon-Taylor *et al.*, 1990; Wall *et al.*, 1993). 1986 isolierten Chiodini *et al.* Mykobakterien-Sphäroblasten aus Darmresektaten zweier MC-Patienten nach 18- bzw. 30-monatiger Inkubation auf HEYM-Medium. Die Bestätigung, dass es sich um Sphäroblasten handelte, erfolgte über licht-, fluoreszenz- und elektronenmikroskopischen Betrachtungen (Chiodini *et al.*, 1986). Des Weiteren konnte die Forschergruppe bei 16 von 26 MC-Patienten (61,5 %), jedoch in keinem der jeweils 13 CU- und Kontrollpatienten mykobakterielle Sphäroblasten nachweisen. MAP-Sphäroblasten konnten aus zuvor auf/in Fest- oder Flüssigmedium inkubierten Proben vorwiegend aus dem Darmgewebe von MC-Patienten, und in geringem Ausmaß von CU- oder Kontrollpatienten isoliert werden (Graham *et al.*, 1987; Markesich *et al.*, 1988; Wall *et al.*, 1993). Aufgrund der äußerst langwierigen kulturellen Anzucht mussten effiziente diagnostische Verfahren für den Nachweis von MAP-Sphäroblasten in humanen Gewebeproben gefunden werden wie beispielsweise die *in situ*-Hybridisierung von Hulten *et al.* (2000a; 2000b). Auch die Wiederherstellung Zellwand-intakter MAP-Formen aus Sphäroblasten durch den Einsatz sogenannter Resuszitationsmedien kann diesen Nachweis erleichtern (Markesich *et al.*, 1988). Eine Auswahl an Studien mit positivem Nachweis von MAP-Sphäroblasten aus verschiedenen humanen Proben mittels unterschiedlicher Methoden ist in Tabelle 11 dargestellt.

Tab. 10: Nachweis von MAP bzw. MAP-DNA in verschiedenen humanen Probenarten mittels kultureller und/oder molekular-basierter Methoden in Abhängigkeit der Patientengruppen

Probenart	Methode [ggf. Primer]	MAP-/DNA-Nachweis (%)			Statistik/Bemerkungen	Publikation
		MC	CU	nCED		
Brustmilch	Kultur: MGIT und BACTEC 12B, jeweils mit OADC, PANTA, Mycobactin J (Dekontamination: nicht bekannt), anschließend IS900-PCR [P90/P91]	2/2 (100%)	-	0/5 (0%)	Positiver Nachweis nur in MGIT, Inkubationszeit 12 Wochen	Naser <i>et al.</i> , 2000b
Blut	nested IS900-PCR [P90/P91] und [AV1/AV2]	13/28 (46,4%)	4/9 (44,4%)	3/15 (20,0%)	-	Naser <i>et al.</i> , 2004
	Kultur: MGIT und BACTEC 12B, jeweils mit OADC, PANTA, Mycobactin J (Dekontamination: NALC-NaOH), anschließend nested IS900-PCR	14/28 (50,0%)	2/9 (22,2%)	0/15 (0%)	p = 0,0005 MC vs. nCED; Inkubationszeit 12 Wochen (davor Prä-Sphäroblasten)	
Blut	IS900-PCR [P90/P91], nested IS900-PCR [TJ1/TJ2] und [TJ3/TJ4]	0/130 (0%)	-	1/130 (0,8%)	MAP-Isolat nicht kultivierbar	Parrish <i>et al.</i> , 2009
	Kultur: a) MGIT + OADC, Mycobactin J, b) HEYM, c) BACTEC 12B + OADC + Mycobactin J, d) Hungate Anaerobic Culture + Mycobactin J	0/130 (0%)	-	0/130 (0%)	Inkubationszeit bis 18 Wochen; Isolat des <i>M. tuberculosis</i> -Komplexes bei einer MC-Probe	
Blut	nested IS900-PCR [P90/P91] und [AV1/AV2]	30/30 (100%)	29/29 (100%)	10/10 (100%)	MAP-Prävalenz vergleichbar bei MC, CU, nCED	Mendoza <i>et al.</i> , 2010
Fäzes	IS900-PCR [MapF/MapR]	21/31 (67,7%)	13/20 (65,0%)	11/23 (47,8%)	MC und CU > nCED, aber nicht signifikant	Tuci <i>et al.</i> , 2011
Orale Biopsate	nested IS900-PCR [IS9R/IS9L] und [SP6/T7]	8/12 (66,7%)	-	1/11 (0,1%)	p = 0,0094 MC vs. nCED	Molicotti <i>et al.</i> , 2013
	Kultur: MGIT + Mycobactin J; HEYM	0/12 (0%)	-	0/11 (0%)	-	
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	IS900	Insertionssequenz 900	BACTEC 12B	radiometrisches Flüssigmedium	
MC	Morbus Crohn	MGIT	Mycobacterial Growth Indicator Tube	ZN	Ziehl-Neelsen	
CU	Colitis ulcerosa	HEYM	Herrold's Egg Yolk Medium	Acro	Acridin-Orange	
nCED	nicht chronisch-entzündliche Darmerkrankung	NALC-NaOH	N-Acetyl-L-Cystein-Natriumhydroxid	p	Signifikanzwert	
DNA	Desoxyribonukleinsäure	OADC	Ölsäure-Albumin-Dextrose-Komplex			
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	PANTA	Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixinsäure, Trimethoprim, Azlocillin			

Tab. 11: Nachweis von MAP-Sphäroblasten in verschiedenen Darmgewebeproben bzw. im Blut mittels kultureller und/oder molekular-basierter und/oder mikroskopischer Methoden in Abhängigkeit der Patientengruppen

Probenart	Methode [ggf. Primer]	MAP/-DNA-Nachweis (%)			Statistik/Bemerkungen	Publikation
		MC	CU	nCED		
Resektate	Kultur: HEYM (Dekontamination: HPC)	10/37 (27,0)	1/2 (50,0 %)	0/8 (0 %)	Inkubationszeitraum 2–12 Monate	Graham et al., 1987
Biopsate		2/22 (9,1 %)	2/17 (11,8 %)	0/19 (0 %)		
Resektate	Kultur: HEYM + Mycobactin J; MB7H10, MB7H11, MB7H9 + OADC, Tween 80, Mycobactin	13/55 (23,6 %)	1/3 (33,3 %)	3/16 (18,8 %)	anschließende Re-susztation der Sphäroblasten zu 53,8 % in MG3-Flüssigmedium	Markesich et al., 1988
Biopsate		5/32 (15,6 %)	2/22 (9,1 %)	2/25 (8,0 %)		
Resektate	Kultur: HEYM + Mycobactin J, anschließend IS900-PCR [IS900-1/IS900-2]	6/25 (24,0 %)	0/2 (0 %)	0/3 (0 %)	Ergebnisse aus der IS900-PCR	Wall et al., 1993
Biopsate/Resektate (in Paraffin eingebettet)	in situ-Hybridisierung	6/15 (40,0 %; granulomatös) 1/22 (4,5 %; nicht granulomatös)	2/21 (9,5 %)	0/22 (0 %)	-	Huitten et al., 2001
Blut	a) Kultur: BACTEC 12B + OADC, PANTA, Mycobactin J (Dekontamination: NALC-NaOH) b) anschließend ZN-Färbung c) und AcrO-Färbung	0/30 (0 %)	0/29 (0 %)	0/10 (0 %)	Inkubationszeit 8 Wochen bzw. 18 Monate; Färbung nach 18 Monaten	Mendoza et al., 2010
		0/30 (0 %)	0/29 (0 %)	0/10 (0 %)		
		30/30 (100 %)	1/29 (3,4 %)	0/10 (0 %)		
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	IS900	Insertionssequenz 900	PANTA	Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixinsäure, Trimethoprim, Azlocillin	
MC	Morbus Crohn	HEYM	Herrold's Egg Yolk Medium			
CU	Colitis ulcerosa	MB	Middlebrook	BACTEC 12B	radiometrisches Flüssigmedium	
nCED	nicht chronisch-entzündliche Darmerkrankung	NALC-NaOH	N-Acetyl-L-Cystein-Natriumhydroxid	ZN	Ziehl-Neelsen	
DNA	Desoxyribonukleinsäure	HPC	Hexadecylpyridiniumchlorid-Monohydrat	Acro	Acridin-Orange	
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	OADC	Ölsäure-Albumin-Dextrose-Komplex			

Um die zahlreichen, teilweise inhomogenen Studien miteinander zu vergleichen und zu bewerten, ob ein Zusammenhang zwischen MAP und Morbus Crohn vorliegt, werden systematische Reviews und Meta-Analysen eingesetzt. Bereits im Jahr 1989 stellte Chiodini ein Review von über 300 Publikationen vor und folgerte einen positiven Zusammenhang zwischen MAP und MC (Chiodini, 1989). Diese Assoziation ergab sich ebenfalls aus dem systematischen Review und der Meta-Analyse von Feller *et al.* (2007): Eine Odds Ratio von 7,01 aus 18 Fall-Kontroll-Studien mit molekular-basiertem Nachweis von MAP aus intestinalem Gewebe und Blutproben von MC-Patienten im Vergleich zu Kontrollpatienten wurde ermittelt. Eine Gegenüberstellung von 13 Fall-Kontroll-Studien wies eine mittels ELISA detektierte höhere Prävalenz von MAP-Antikörper im Blutserum von MC-Patienten als von Kontrollpatienten (OR = 1,72) bzw. Colitis ulcerosa-Patienten (OR = 1,88) auf. Das 2008 von Abubakar *et al.* veröffentlichte systematische Review von 58 Publikationen und die Meta-Analyse von 49 Studien fokussierte sich auf den Nachweis von MAP mittels Nukleinsäure-basierter Methoden (Abubakar *et al.*, 2008). Die Risikodifferenz für den Nachweis von MAP-DNA mittels PCR betrug 0,20 bzw. 0,23, wenn nur die Studien mit einer Probenahme aus humanem Gewebe betrachtet wurden. Das bedeutet, dass MAP-DNA häufiger in MC- als Kontrollpatienten detektiert wurde. Die ermittelte Risikodifferenz aus Studien, die *in situ*-Hybridisierungsverfahren zum Nachweis von MAP anwendeten, lag bei 0,43; jedoch unterlagen diese Studien einer starken Heterogenität. Beim Vergleich von 38 Studien zum Nachweis von MAP wurde eine Risikodifferenz von 0,19 bei Patienten mit Morbus Crohn versus Colitis ulcerosa ermittelt. Waddell *et al.* stellten 2015 in dem systematischen Review (128 Publikationen) und der mit 108 Studien inkludierten Meta-Analyse ebenfalls eine positive Assoziation zwischen MAP und Morbus Crohn fest: 15 Studien wiesen MAP mittels Kultur (OR = 8,44) und 40 Studien wiesen MAP-DNA/-RNA mittels PCR bzw. Hybridisierungstechnik (OR = 5,24) in unterschiedlichen humanen Proben nach. Die Odds Ratio betrug 4,26 für den Nachweis von MAP-Antikörpern mittels ELISA. Bei allen erwähnten Reviews/Meta-Analysen wird auf die Heterogenität der Studien bezüglich Kontrollgruppe, Nachweismethode inklusive Sensitivität und Spezifität, Probenart und -zustand sowie bei der PCR eingesetzte Primer hingewiesen. Aufgrund dessen kann keine eindeutig positive Aussage – bestenfalls eine fragliche – zum Zusammenhang von MAP und Morbus Crohn getroffen werden, wie auch das Review von Gill *et al.* (2011) oder die gemeinsame Literaturstudie des Robert Koch-Institutes und des BfRs (Schrauder *et al.*, 2003) zeigten. Ein von Waddell *et al.* (2008) zuvor veröffentlichtes Review über ein mögliches zoonotisches Potential von MAP und dem Vorhandensein dieses Erregers in Milch/-produkten kam zu inkonsistenten Ergebnissen.

Eine weitere Möglichkeit zur Ermittlung eines potentiellen Zusammenhanges zwischen MAP und MC, ist die Betrachtung randomisierter, Placebo-kontrollierter Studien mit antimykobakterieller Therapie bei MC-Patienten. In der Meta-Analyse von Rahimi *et al.* (2006) ergab sich bei der Untersuchung sechs klinischer Studien, dass eine Therapie mit Breitspektrumantibiotika bei MC-Patienten, verglichen mit der Gabe von Placebo, eine Odds Ratio von 2,26 ergab ($p < 0,001$). Eine klinische Verbesserung der Patienten mit Morbus Crohn konnte auch bei dem systematischen Review und der Meta-Analyse von Borgaonkar *et al.* (2000) ermittelt werden, jedoch nur im Zusammenhang mit einer Kombination aus antimykobakterieller Therapie und der Gabe von Kortikosteroiden ($p = 0,013$, OR = 3,37). Eine Therapie ohne Kortikosteroide leitete keine statistisch signifikante Remission im Vergleich zu den Kontrollen ein (OR = 0,69). Eine zweijährige randomisierte, doppelblinde und Placebo-kontrollierte Studie von Selby *et al.* (2007) mit über 200 Teilnehmern konnte die Effizienz einer kombinierten antimykobakteriellen Therapie – bestehend aus Clarithromycin, Rifabutin und Clofazimin – nicht nachweisen. Jedoch steht außer Frage, dass die Heterogenität der klinischen Studien wie beispielsweise bezüglich der Art und Dosis der Wirkstoffe, Darreichungsform, Therapiedauer und der Detektion von MAP vor einer antimykobakteriellen Behandlung möglichst gering gehalten werden muss, um aussagekräftige Vergleiche zu erhalten (Rahimi *et al.*, 2006; Chiodini *et al.*, 2012). Laut Chiodini *et al.* (2012) ist möglicherweise nur eine Teilmenge an MC-Patienten für eine antimykobakterielle Therapie gut empfänglich.

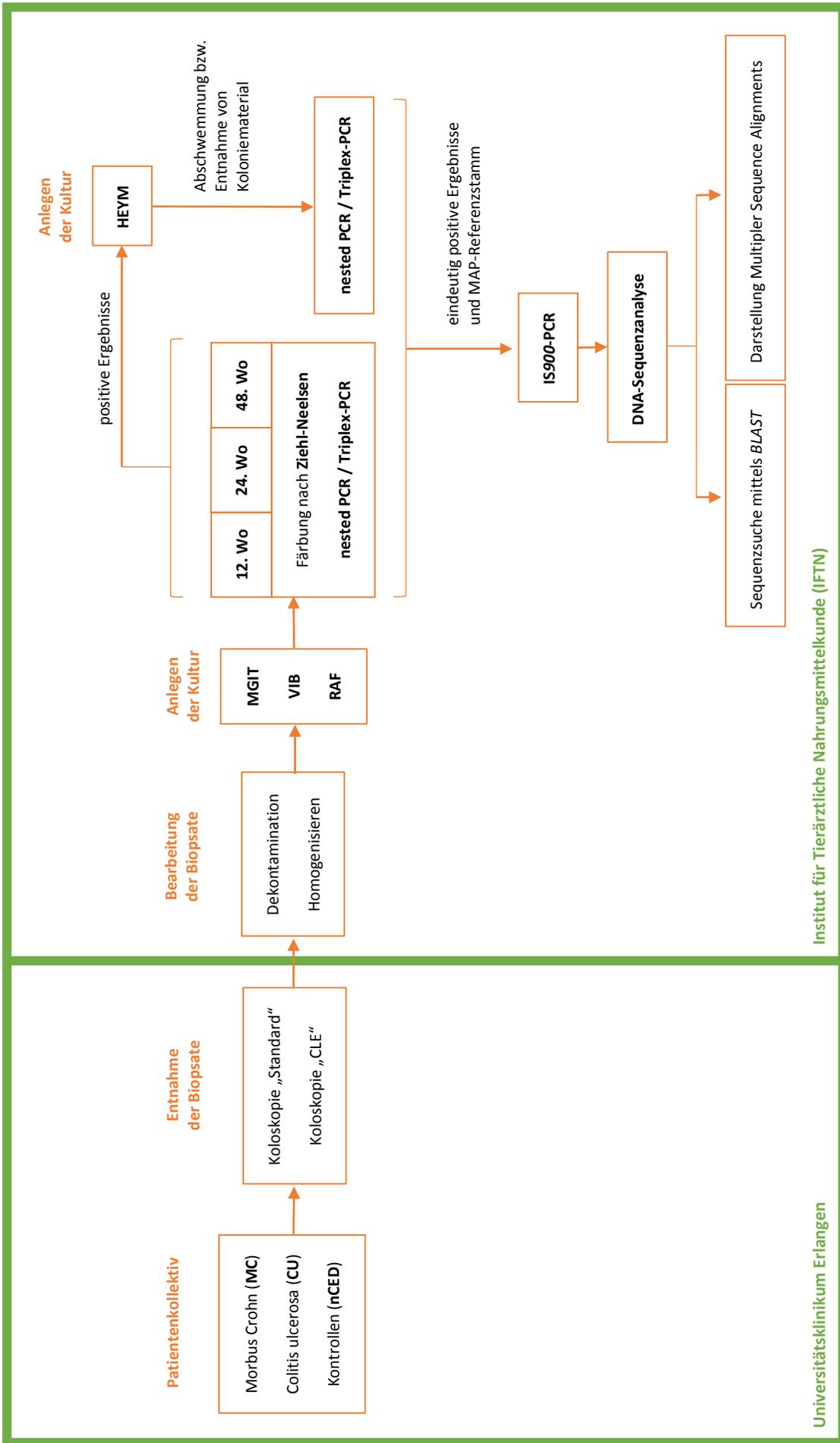
3.1 Arbeitskonzept

Aufgrund des möglichen zoonotischen Potentials von MAP und der damit verbundenen Frage, ob dieser an der Ätiologie von Morbus Crohn beim Menschen mitbeteiligt ist, wurden in Kooperation mit dem Universitätsklinikum Erlangen (Prof. Dr. med. Atreya/ Prof. Dr. med. Neurath) Darmgewebeproben von Patienten auf das Vorhandensein von MAP bzw. MAP-DNA untersucht (siehe Abb. 4).

Dazu sollten kulturelle, mikroskopische und molekular-basierte Nachweisverfahren eingesetzt werden. Gleichzeitig sollte auch der Fragestellung des Nachweises von MAP-Sphäroblasten nachgegangen werden. Zu diesem Zweck wurden zwei verschiedene Resusziationsmedien eingesetzt. Angesichts der langwierigen Anzüchtung von MAP von in der Regel acht bis zwölf Wochen – teilweise gelang der kulturelle Nachweis von MAP aus humanen Gewebeproben erst nach 18-monatiger Inkubation – und der erforderlichen Resusziationszeit von Sphäroblasten wurden drei verschiedene Zeitpunkte zur Untersuchung herangezogen. Somit war ein Vergleich der Methoden sowie der Medien zum Nachweis von MAP bzw. MAP-DNA unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkte möglich.

Parallel wurden am Universitätsklinikum Erlangen Daten von Morbus Crohn-, Colitis ulcerosa- sowie Kontrollpatienten, aus deren Darmgewebe Biopsate entnommen wurden, erhoben, um mögliche Einflussgrößen auf das Vorhandensein des Erregers zu berücksichtigen: Geschlecht und Alter der Patienten, beprobter Darmabschnitt, Biopsatmasse und Entzündungscharakter der Probe.

Um die Lebensfähigkeit von MAP-Zellen bei einem positiven Untersuchungsergebnis in den molekular-basierten bzw. im mikroskopischen Verfahren zu prüfen, wurden solche Proben zusätzlich subkultiviert. Positive Proben – aus kultureller, molekularbiologischer und mikroskopischer Sicht – wurden weiterhin einem im IFTN (Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde) etablierten IS900-PCR-Verfahren und einer darauf folgenden DNA-Sequenzanalyse unterzogen.



nCED	nicht chronisch-entzündliche Darmerkrankung	VIB	Modifizierte Kalbfleischbrühe	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
CLE	konfokale Laserendomikroskopie	RAF	Reid's A Agar mit fetalem Kälberserum	DNA	Desoxyribonukleinsäure
MGIT	Mycobacterial Growth Indicator Tube	HEYM	Herrold's Egg Yolk Medium	BLAST	Basic Local Alignment Search Tool

Abb. 4: Arbeitskonzept zum Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in humanem Darmgewebe.

3.2 Patienten- und Probenkollektiv

Vor Beginn der Untersuchungen wurde der Antrag zum „Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*-Zellen in humanen Gewebeproben“ bei der Ethikkommission des Universitätsklinikums Erlangen eingereicht und positiv beschieden (Re.-No 4559). Die Patienten wurden im Vorfeld mündlich und schriftlich über die Probenentnahme zu Studienzwecken aufgeklärt und unterschrieben die Einwilligungserklärung zur wissenschaftlichen Verwendung von Blut- bzw. Gewebeproben und der personenbezogenen Daten nach entsprechender Verblindung bzw. Pseudoanonymisierung.

In Abbildung 4 sind die Arbeitsschritte, die am Universitätsklinikum Erlangen stattfanden, ersichtlich. Insgesamt wurden im Zeitraum zwischen November 2011 und Dezember 2012 Proben von 203 Patienten entnommen, davon 103 männliche und 100 weibliche Probanden. Die durchschnittliche Biopsatmasse betrug 0,13 g (min. 0,03 g; max. 1,05 g). In der Regel wurden mindestens zwei Biopsieschläge getätigt, um ausreichend Material für die spätere kulturelle Anzucht zu gewinnen. Der Patientenpool teilte sich folgendermaßen auf: 80 Morbus Crohn-Patienten (39,4 %), 54 Colitis ulcerosa-Patienten (26,6 %) und 69 nCED-Patienten (34,0 %). Bei Letzteren handelte es sich um Kontrollpatienten, die nicht an einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung (nCED) litten. Die Einteilung der Patientengruppen nach Krankheitsbild wurde durch den im Universitätsklinikum Erlangen zuständigen Gastroenterologen durchgeführt. Das durchschnittliche Alter der Patienten lag bei 45 Jahren (min. 19 Jahre; max. 92 Jahre).

Die Entnahme der Darmbiopsate erfolgte in der Regel in Verbindung mit einer Koloskopie (Koloskopie „Standard“). Bei sieben der 203 Patienten wurde das Verfahren der konfokalen Laserendomikroskopie mit der Probenentnahme gekoppelt (Koloskopie „CLE“). Mit Hilfe dieser Methode ließ sich das Darmgewebe histologisch *in vivo* und intramukosale Bakterien durch die vorherige intravenöse Gabe von Fluorescein darstellen.

Bei 36 der insgesamt 203 Patienten handelte es sich um sogenannte Mehrfachpatienten. Diesen Patienten wurden im dargestellten Zeitraum zwei oder mehr Biopsate an zumeist unterschiedlichen Untersuchungstagen entnommen. 31 Mehrfachpatienten wurden zweimal, die restlichen fünf wurden dreimal beprobt. Betrachtet man gezielt die sieben Patienten, deren Biopsate mittels konfokaler Laserendomikroskopie gewonnen wurden, so ergaben sich neben einem Einzelpatienten sechs Mehrfachpatienten (4/6 zweimal beprobt, 2/6 dreimal beprobt). Ein Patient wurde von der Studie ausgeschlossen, da dieser einer antimykobakteriellen Therapie unterzogen worden war.

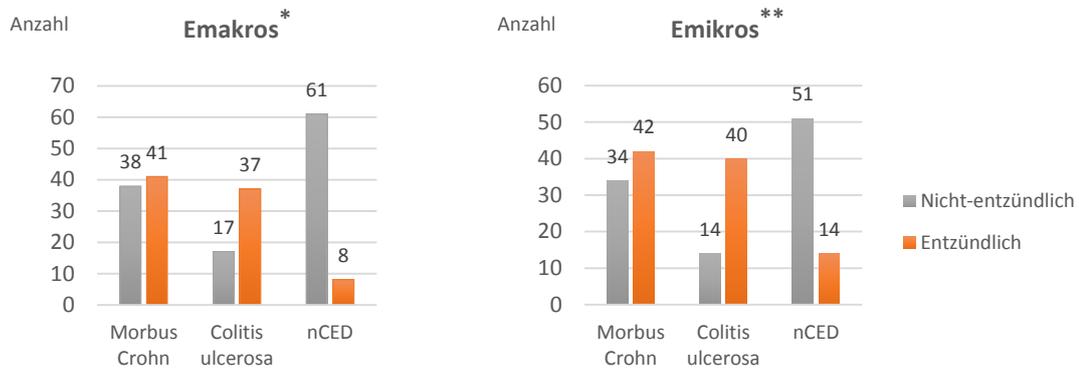
Insgesamt wurden 203 Biopsate aus unterschiedlichen Darmabschnitten entnommen, wobei das Colon sigmoideum als Entnahmestelle dominierte (siehe Tab. 12). Acht Proben waren keinem Darmabschnitt eindeutig zuzuordnen.

Tab. 12: Verteilung der aus unterschiedlichen Darmabschnitten entnommenen Biopsate innerhalb verschiedener Patientengruppen

Gruppe	Darmabschnitt							Gesamt
	Terminales Ileum (I)	Appendix, Caecum (II)	Colon transversum (III)	Colon sigmoideum (IV)	Colon ascendens (V)	Colon descendens (VI)	Rectum (VII)	
MC	22	4	9	29	4	2	3	73
(%)	(30,1)	(5,5)	(12,3)	(39,7)	(5,5)	(2,7)	(4,1)	(100)
CU	3	2	3	29	6	2	8	53
(%)	(5,7)	(3,8)	(5,7)	(54,7)	(11,3)	(3,8)	(15,1)	(100)
nCED	4	1	6	44	6	2	6	69
(%)	(5,8)	(1,4)	(8,7)	(63,8)	(8,7)	(2,9)	(8,7)	(100)
Gesamt	29	7	18	102	16	6	17	Σ 195*
(%)	(14,9)	(3,6)	(9,2)	(52,3)	(8,2)	(3,1)	(8,7)	(100)

MC = Morbus Crohn, CU = Colitis ulcerosa, nCED = nicht chronisch-entzündliche Darmerkrankung (Kontrollpatienten); n = 203, * acht Proben nicht eindeutig zuzuordnen.

Die Biopsate wurden aus entzündlichen und nicht-entzündlichen Bereichen des Darmgewebes entnommen. Die Entzündungsart wurde während der Koloskopie makroskopisch durch den Gastroenterologen charakterisiert („Emakros“). Die Entnahme der Biopsate mit Hilfe der konfokalen Laserendomikroskopie, bei deren Durchführung direkt histologische Bilder des Darmgewebes aufgenommen werden konnten, bildete eine Ausnahme. Die Beurteilungen von Koloskopie „Standard“ und Koloskopie „CLE“ bezüglich der Entzündungsart flossen jedoch im Folgenden in „Emakros“ zusammen. Nach der Entnahme der Biopsate wurde das Gewebe in der Histologie des Universitätsklinikums Erlangen mikroskopisch untersucht und der Entzündungscharakter ebenfalls beschrieben („Emikros“). In Abbildung 5 wird das Verhältnis der Biopsate aus dem entzündlichen und nicht-entzündlichen Bereich bei „Emakros“ bzw. „Emikros“ innerhalb der verschiedenen Patientengruppen dargestellt. Insgesamt lagen 203 Biopsate vor, wobei eine Probe („Emakros“) bzw. acht Proben („Emikros“) keiner Entzündungsart eindeutig zuzuordnen waren, beispielsweise aufgrund fehlender Daten.



Emakros = Beurteilung der Entzündungsart durch den Gastroenterologen während Koloskopie „Standard“ bzw. „CLE“. Emikros = Beurteilung der Entzündungsart mittels histologischer Untersuchung. nCED = nicht chronisch-entzündliche Darmerkrankung (Kontrollpatienten); n = 203, * eine Probe bzw. ** acht Proben nicht eindeutig zuzuordnen.

Abb. 5: Anzahl der Biopsate aus dem entzündlichen und nicht-entzündlichen Bereich des Darmgewebes in Abhängigkeit von der Beurteilungsart, bezogen auf die Patientengruppen

Die Versendung der Biopsate erfolgte vom Universitätsklinikum Erlangen an das IFTN in Gießen – getrennt nach Patienten, entnommenen Darmabschnitt und Entzündungscharakter des Biopsates – in Kryoröhrchen mit MGIT-Bouillon (Mycobacterial Growth Indicator Tube; siehe Anhang, 9.2.1) und den erforderlichen Supplementen (siehe Tab. 13).

Tab. 13: Zusammensetzung des Transportmediums für die Biopsate zur Versendung in Kryoröhrchen

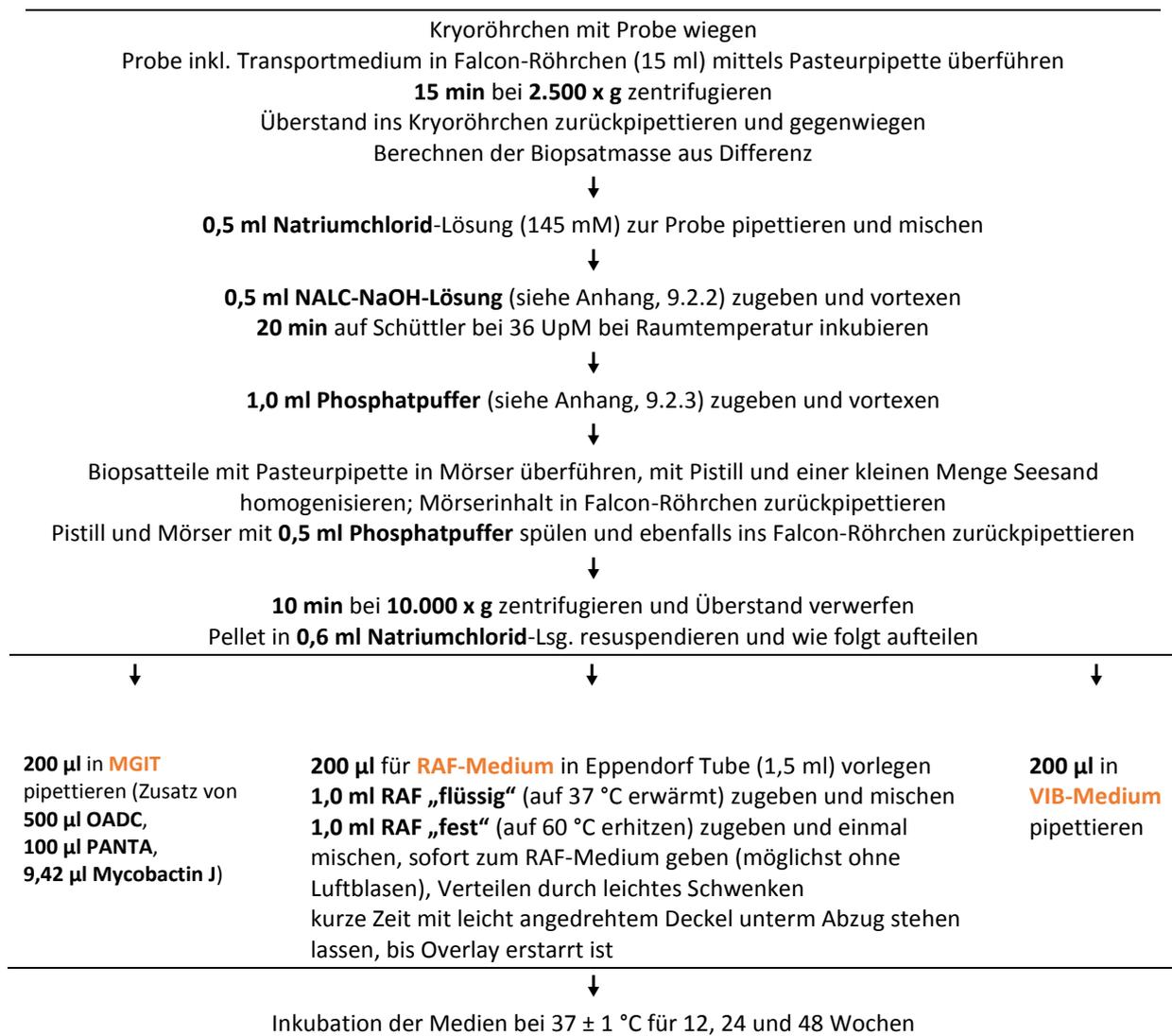
Menge	Produkt	Name bzw. Zusammensetzung
1,0 ml	MGIT-Bouillon	Mycobacterial Growth Indicator Tube
125 µl	OADC	Oleic Acid Albumin Dextrose Complex
25 µl	PANTA	Polymyxin B, Amphotericin B, Nalidixinsäure, Trimethoprim, Azlocillin
2,36 µl	Mycobactin J	

3.3 Aufbereitung der Biopsate und Anlegen der Kultur

Nach Ankunft im IFTN erfolgte die unverzügliche Bearbeitung der Biopsate. Eine detaillierte Beschreibung zur Aufbereitung der Proben findet sich in Abbildung 6. Für die Kultur wurde zum einen die kommerziell erhältliche MGIT-Bouillon mit Supplementen verwendet. Zum anderen wurden zur Erfassung von MAP-Sphäroblasten zwei Resusziationsmedien berücksichtigt: das VIB-Medium – modifizierte Kalbfleischbrühe nach Markesich *et al.* (1988) – und das RAF-Medium – Reid’s A Agar mit fetalem Kälberserum nach Bull (2009; 2010). Letzteres wurde entwickelt, um primär ein beschleunigtes kulturelles Wachstum von MAP zu erzielen, wohingegen das VIB-Medium als Wiederbelebungsmedium der Konversion von Sphäroblasten in Zellwand-intakte Formen dient. Die Herstellung der Resusziationsmedien erfolgte nach den im Anhang dargestellten Schemata (9.2.4 VIB-Medium, 9.2.5 RAF-Medium). Eine Übersicht zur Zusammensetzung der Medien findet sich in Tabelle 14. Die MGIT-Röhrchen wurden nach Beimpfung einmal wöchentlich geschüttelt.

Tab. 14: Vergleich der Zusammensetzung der Medien für das Anlegen der Biopsate

MGIT Mycobacterial Growth Indicator Tube	VIB-Medium Modifizierte Kalbfleischbrühe	RAF-Medium Reid’s A Agar mit fetalem Kälberserum
Mycobactin J	Mycobactin J	Mycobactin J
OADC = Ölsäure, Rinderalbumin, Dextrose, Katalase		
Modifizierte Middlebrook 7H9 Bouillonbasis Casein-Pepton	Kalbfleischbrühe Hefeextrakt	Agar Noble D/L-Asparagin Glycerol (C3H8O3)
	Magnesiumsulfat (MgSO ₄) Natriumcitrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇) Eisenammoniumsulfat (Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂)	Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) Magnesiumsulfat (MgSO ₄ x 7 H ₂ O) Triammoniumcitrat (NH ₄) ₃ C ₅ H ₅ O ₇ Natriumchlorid (NaCl) Ammonium Iron (III) Citrate Brown
	Pferdeserum	Fetales Kälberserum
	Saccharose	D(+)-Glucose
PANTA = Polymyxin B, Amphoteri- cin B, Nalidixinsäure, Trimethoprim, Azlocillin		Amphotericin B, Nalidixinsäure, Vancomycin



UpM = Umdrehungen pro Minute, MGIT = Mycobacterial Growth Indicator Tube, RAF-Medium = Reid's A Agar mit fetalem Kälberserum, VIB-Medium = Modifizierte Kalbfleischbrühe.

Abb. 6: Fließschema zur Aufbereitung der Biopsate und Anlegen der Kultur

Die Aufbereitung der Biopsate beinhaltet die Dekontamination mit NALC-NaOH-Lösung (N-Acetyl-L-Cystein-Natriumhydroxid) und Homogenisierung der Proben. Als Positivkontrolle wurde für jede kommerziell erworbene MGIT-Charge sowie jede im IFTN hergestellte VIB- und RAF-Charge der MAP-Referenzstamm 44135 (DSMZ Nr. 44135) eingesetzt. Dazu wurden nach sorgfältigem Vortexen 50–100 µl MAP-Suspension aus Middlebrook 7H9-Flüssigmedium (siehe Anhang, 9.2.6) dem jeweiligen Medium zugesetzt und über die entsprechenden Zeiträume inkubiert. Für die Negativkontrolle wurde stattdessen 100 µl sterile Natriumchlorid-Lösung verwendet.

3.4 Untersuchungsmethoden für den Nachweis von MAP

Nach Inkubation der beimpften Medien wurde nach 12, 24 und 48 Wochen jeweils ein Teil der Probe aus der MGIT-Bouillon und dem VIB-Medium entnommen bzw. eine Abschwemmung des RAF-Mediums durchgeführt und molekularbiologisch mittels nested und Triplex-PCR sowie lichtmikroskopisch mittels Färbung nach Ziehl-Neelsen auf das Vorhandensein von MAP bzw. MAP-DNA untersucht. Nach Entnahme der Teilprobe wurden die Medien bis zum nächsten Untersuchungszeitpunkt weiter inkubiert.

3.4.1 Färbung nach Ziehl-Neelsen

Zunächst wurden für die mikroskopische Untersuchung nach gründlichem Vortexen der **MGIT-Bouillon** bzw. nach leichtem Aufschütteln des **VIB-Mediums** 250 µl aus dem jeweiligen Medium entnommen und in ein 1,5 ml-Eppendorf Tube pipettiert. Anschließend wurden die Proben bei 2.500 x g für 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand mittels Pasteurpipette abgenommen. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Pellet wurde mit 500 µl PBS-Lösung (siehe Anhang, 9.2.7) resuspendiert und die Probe erneut bei 2.500 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 20–30 µl abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde resuspendiert und auf eine definierte Fläche eines Objektträgers (1 cm²) pipettiert. Anschließend erfolgte eine Hitze-fixierung der luftgetrockneten Objektträger, indem diese etwa dreimal durch die Bunsenbrennerflamme gezogen wurden.

Die Entnahme von Proben vom **RAF-Medium** für die mikroskopische Untersuchung war nur in den Fällen vorgesehen, in denen Koloniewachstum auf dem Agar erkennbar war. Dazu wurden zwei bis drei Kolonien mit Hilfe einer sterilen Plastiköse vom RAF-Medium abgenommen. Danach wurde das Koloniematerial auf eine definierte Fläche des Objektträgers (1 cm²) gerieben und mit 20 µl einer vorgelegten PBS-Lösung gemischt. Die Lufttrocknung und Hitze-fixierung des Objektträgers erfolgte, wie für die Proben der MGIT-Bouillon und des VIB-Mediums beschrieben.

Im Anschluss wurden die Präparate nach Ziehl-Neelsen unter Verwendung des *TB Stain Kit ZN* (siehe Anhang, 9.2.8) nach Herstellerangaben gefärbt. Diese Färbemethode dient dem Nachweis säurefester Bakterien, wobei allerdings eine Unterscheidung einzelner Mykobakterien-Spezies nicht möglich ist. Zunächst wurden die Objektträger auf eine Färbepan-ke gelegt und der gesamte Ausstrich mit *TB Carbol-fuchsin ZN* bedeckt. Mit Hilfe des Bunsenbrenners wurde das Karbol-fuchsin so erhitzt, dass es über fünf Minuten lediglich zur

Dampfentwicklung kam. Anschließend wurde der Farbstoff abgegossen und die Objektträger vorsichtig mit destilliertem Wasser gespült. Danach wurden diese mit dem *TB Decolorizer* bedeckt, und nach einer kurzen Einwirkzeit wurde die Entfärbelösung wieder abgegossen. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis keine roten Farbwolken mehr sichtbar waren, jedoch insgesamt maximal zwei Minuten lang. Nach einem weiteren vorsichtigen Spülen mit destilliertem Wasser wurde der Ausstrich mit *TB Methylene Blue* bedeckt und 30 Sekunden gegengefärbt. Nach einem letzten Spülschritt wurden die Objektträger luftgetrocknet.

Die darauf folgende lichtmikroskopische Untersuchung wurde mit Hilfe des *Axiostar plus*-Mikroskops bei 1.000-facher Vergrößerung unter Verwendung von Immersionsöl durchgeführt. Zur Dokumentation wurden Bilder mittels der am Mikroskop angeschlossenen Kamera aufgenommen und archiviert.

Als Positivkontrolle für die Färbung nach Ziehl-Neelsen wurden 20 µl einer MAP 44135-Suspension nach sorgfältigem Vortexen aus dem Middlebrook 7H9-Flüssigmedium entnommen und auf einen Objektträger pipettiert. Als Negativkontrolle diente ein Nicht-MAP-Stamm, in diesem Fall ein *Staphylococcus aureus*-Stamm (DSMZ Nr. 1104 bzw. ATCC Nr. 25923). Dazu wurden ein bis zwei Kolonien mit einer Platinöse vom Plate Count-Agar abgenommen und mit 20 µl PBS-Lösung auf einer definierten Objektträgerfläche verteilt. Die Objektträger der Kontrollen wurden nach Lufttrocknung entsprechend hitzefixiert. Als „bakterienfreie“ Kontrolle wurde zusätzlich ein leerer Objektträger mitgeführt, um Kontaminationen durch die Farbstofflösungen bzw. durch das Entfärbereagenz auszuschließen. Alle Kontrollen wurden entsprechend den Herstellerangaben gefärbt.

3.4.2 Nested PCR

Bei der nested PCR handelt es sich um eine konventionelle PCR mit zwei Primerpaaren (TJ 1/2 und TJ 3/4) nach Bull *et al.* (2003a) zum Nachweis der MAP-spezifischen Insertionssequenz IS900. Vor der Durchführung der nested PCR erfolgte zunächst die Entnahme der Proben aus den entsprechenden Medien sowie deren Vorbereitung zur anschließenden DNA-Isolierung mit Hilfe des *DNeasy[®] Blood & Tissue Kits* der Firma Qiagen.

Aus der beimpften **MGIT-Bouillon** wurde nach vorherigem Vortexen 0,5 ml entnommen und in ein 1,5 ml-Eppendorf Tube pipettiert. Nach vorsichtigem Aufschütteln wurde 1,0 ml **VIB-Medium** ebenfalls in ein 1,5 ml-Eppendorf Tube überführt. Dem **RAF-Medium** wurden 1,5 ml PBS-Lösung zugegeben, durch leichtes Schwenken auf dem Agar verteilt und anschließend fünf Minuten liegend auf einem Schüttelapparat bei 36 UpM bei Raumtemperatur inkubiert. Zusätzlich wurde der Agar mit Hilfe einer Pipette mehrmals mit der bereits aufgetragenen PBS-Lösung gespült. Die nach dem Abschwemmen verbliebene Flüssigkeit mit einem Volumen zwischen 0,5 und 0,7 ml wurde entnommen und in ein 1,5 ml-Eppendorf Tube überführt.

Eine positive Aufbereitungskontrolle, bestehend aus dem mit MAP 44135 inokulierten Medium, und eine negative Aufbereitungskontrolle (Leerwert), bestehend aus dem mit 145 mM NaCl-Lösung beimpften Medium, wurden zusammen mit den entnommenen Proben mitgeführt. Die Kontrollen aus den verschiedenen Medien (MGIT, VIB-, RAF-Medium) wurden jeweils am Tag der Aufbereitung gewählt.

Die aus den Medien entnommenen Proben sowie die Kontrollen wurden jeweils bei 5.000 x g für zehn Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand mittels Pasteurpipette abgenommen und verworfen, und das entstandene Pellet mit 1,0 ml PBS-Lösung resuspendiert. Die Proben wurden erneut bei 5.000 x g für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen sowie das Pellet in 1,0 ml Nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 5.000 x g für fünf Minuten wurde der Überstand bis auf ein Volumen von 20–30 µl verworfen und das Pellet resuspendiert. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zusätzlich wurde zur Prüfung einer möglichen Kontamination der PBS-Lösung 1,0 ml als *Leerwert PBS* bei der Aufbereitung mitgeführt. Das Volumen ergab sich aus der für die Abschwemmung des RAF-Agars sowie der zum Waschen verwendeten Lösung. Die Vorbereitung des PBS-Leerwertes erfolgte nach dem oben beschriebenen Schema, angefangen mit dem Zentrifugationsschritt nach dem Resuspendieren in PBS-Lösung.

Als Weiteres wurden alle Proben, Kontrollen und Leerwerte mit einem modifizierten Protokoll zur Vorbehandlung gram-positiver Bakterien (*DNeasy Blood & Tissue Handbook*, Qiagen) behandelt. Es wurde der in Anhang, 9.2.9 beschriebene enzymatische Lysispuffer eingesetzt. Abweichend vom Protokoll wurde das resuspendierte und mit Lysispuffer versetzte Pellet bei 37 °C für mindestens 1,5 Stunden bzw. über Nacht, nach Zugabe von Proteinase K und AL-Puffer bei 56 °C zwischen 1,5 und 3 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben 15 Minuten lang bei 95 °C im Thermomixer und wie bei den vorhergehenden Inkubationsschritten leicht schüttelnd bei 750 UpM erhitzt. Die weitergehende DNA-Extraktion mit dem *DNeasy[®] Blood & Tissue Kit* (Qiagen; siehe Anhang, 9.2.11) wurde gemäß dem Protokoll zur Aufreinigung der Gesamt-DNA aus Tiergewebe (QIAGEN, 2006) durchgeführt. Die extrahierte DNA wurde mit 100 µl AE-Puffer eluiert und als Template für die nested PCR eingesetzt.

Zur Durchführung der nested PCR (siehe Tab. 15) wurde zunächst ein Mastermix mit den entsprechenden Reagenzien und dem sogenannten äußeren Primerpaar TJ 1/2 in einem PCR-Kabinett hergestellt und anschließend als Submixe in 0,2 ml-Reagiergefäße verteilt. Pro Gefäß wurden für einen 50 µl-Ansatz 5 µl extrahierte DNA zum Submix gegeben und im Thermocycler nachfolgendem Temperatur-/Zeitprofil amplifiziert: initiale Denaturierung bei 95 °C für zehn Minuten, 35 Zyklen bestehend aus Denaturierung bei 94 °C für 30 Sekunden, Annealing bei 60 °C für 30 Sekunden und Extension bei 72 °C für 30 Sekunden, und eine finale Extensionsphase bei 72 °C für fünf Minuten. Anschließend erfolgte die Abkühlung auf 4 °C. Schließlich wurden 5 µl einer 1:10-Verdünnung dieses Reaktionsansatzes zum Submix mit dem inneren Primerpaar TJ 3/4 gegeben und erneut im Thermocycler nach dem gleichen Profil amplifiziert. Das äußere Primerpaar TJ 1/2 bzw. innere Primerpaar TJ 3/4 dient dem Nachweis der Insertionssequenz IS900.

Zusätzlich wurden eine positive Kontrolle mit dem MAP-Stamm K10 (ATCC[®] BAA-968[™]) und Leerwerte, bestehend aus dem Mastermix mit TJ 1/2 und 5 µl Nuklease-freies Wasser bzw. mit TJ 3/4 und 5 µl Nuklease-freies Wasser, mitgeführt.

Tab. 15: Nested PCR-Ansatz zum Nachweis der Insertionssequenz IS900

Reagenzien	Menge	Bemerkung
Nuklease-freies Wasser	36,6 µl	
10 x Polymerase-Puffer mit 15 mM MgCl ₂	5,0 µl	
dNTP-Mix	1,0 µl	bestehend aus dATP, dGTP, dCTP, dTTP (je 10 mM)
Primer (Endkonzentration 10 µM)	Je 1,0 µl	
oder Äußeres Primerpaar: TJ 1 und TJ 2 (je 100 µM) Inneres Primerpaar: TJ 3 und TJ (je 100 µM)	TJ 1	5'-GCT GAT CGC CTT GCT CAT-3'
	TJ 2	5'-CGG GAG TTT GGT AGC CAG TA-3'
	TJ 3	5'-CAG CGG CTG CTT TAT ATT CC-3'
	TJ 4	5'-GGC ACG GCT CTT GTT GTA GT-3'
Polymerase AmpliTaq Gold™ (5 U/µl)	0,4 µl	
DNA bzw. 1:10-verdünntes Amplifikat	5,0 µl	
	50,0 µl	Gesamtvolumen

MgCl₂ = Magnesiumchlorid

Jeweils 8 µl des zweiten PCR-Ansatzes, versetzt mit 2 µl Ladebuffer (siehe Anhang, 9.2.12), wurden in einem 1,5 %igen Agarosegel (siehe Anhang, 9.2.13) in 1x TBE-Puffer (siehe Anhang, 9.2.14) bei 120 V für eine Stunde gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Marker wurden 10 µl einer Marker XIV-Verdünnung (siehe Anhang, 9.2.15) verwendet. Zur Visualisierung der PCR-Produkte wurde das Gel für eine Stunde in einer 1 %igen Ethidiumbromid-Färbelösung (siehe Anhang, 9.2.16) auf einem Horizontalschüttler inkubiert, zehn Minuten im Wasserbad mit Aqua dest. entfärbt und schließlich auf einem UV-Tisch (Wellenlänge 302 nm) mit Hilfe des *Polaroid Instant Camera Systems* (Polaroid) mit angeschlossener Kamera dokumentiert. Die Probe galt als IS900-positiv und enthielt somit MAP-DNA, wenn ein bei 294 bp migrierendes PCR-Produkt als spezifische Bande zu sehen war.

3.4.3 Triplex-PCR

Bei der Triplex-PCR handelt es sich um eine Real Time-PCR mit einer internen Amplifikationskontrolle (IAK) nach Schönenbrücher *et al.* (2008) zum Nachweis der MAP-spezifischen Marker *f57* und *ISMav2* (siehe Tab. 16). Als DNA-Template standen die für die nested PCR gewonnenen Eluate (siehe Kapitel 3.4.2) auch für die Triplex-PCR zur Verfügung.

Zur Durchführung der Triplex-PCR wurde zunächst ein Mastermix hergestellt und als Submixe in 0,2 ml-Reagiergefäße verteilt. Neben den beiden Primerpaaren zum Nachweis des *f57*-Gens (F57-F/-R) und der Insertionssequenz *ISMav2* (ISMav2-F/-R) wurden entsprechende fluoreszenzmarkierte Sonden konfiguriert und eingesetzt (Schönenbrücher *et al.*, 2008). Die

Herstellung der internen Amplifikationskontrolle zum Ausschluss falsch-negativer Ergebnisse in der PCR erfolgte nach Abdulmawjood *et al.* (2002) und Schönenbrücher *et al.* (2008). Pro 50 µl-Ansatz wurden 5 µl extrahierte DNA zugegeben und anschließend in eine 96 well-Mikrotiterplatte pipettiert. Als Positivkontrolle wurde der MAP-Stamm K10 (ATCC® BAA-968™) und als Leerwert der Mastermix mit 5 µl Nuklease-freiem Wasser mitgeführt.

Tab. 16: Triplex-PCR-Ansatz zum Nachweis der Marker *f57* und *ISMav2*

Reagenzien	Menge	Bemerkung	
Nuklease-freies Wasser	8,5 µl		
2 x qPCR MasterMix Plus (ohne UNG)	25,0 µl	Bestehend aus dNTP/dUTP (ohne UNG), HotGoldStar DNA-Polymerase, MgCl ₂ (5 mM Endkonzentration), Stabilisatoren, passiver Referenzfarbstoff (ROX)	
Primer (Endkonzentration 10 µM)	Je 1,0 µl		
Primerpaar F57-F und F57-R (je 100 µM)		F57-F	5'-TAC GAG CAC GCA GGC ATT C-3'
		F57-R	5'-CGG TCC AGT TCG CTG TCA T-3'
Primerpaar <i>ISMav2</i> -F und <i>ISMav2</i> -R (je 100 µM)		<i>ISMav2</i> -F	5'-CGG CAA AAT CGA GCA GTT TC-3'
		<i>ISMav2</i> -R	5'-TGA GCC GGT GTG ATC ATC TTT-3'
Sonden (Endkonzentration 2 µM)	Je 2,0 µl		
F57 TaqMan _{mgb} Sonde (100 µM)		VIC-CCT GAC CAC CCT TC-MGB	
<i>ISMav2</i> TaqMan _{mgb} Sonde (100 µM)		FAM-CGC TGA GTT CCT TAG-MGB	
F57 TaqMan _{mgb} IAK Sonde (100 µM)		NED-CGA GTT ACA TGA TCC C-MGB	
DNA IAK Verdünnung (175 Kopien)	1,5 µl		
DNA	5,0 µl		
	50,0 µl	Gesamtvolumen	

UNG = Uracil-N-glycosylase, MgCl₂ = Magnesiumchlorid, ROX = 6-Carboxy-X-rhodamin, VIC®/ FAM™/ NED™ = Reporter-Fluoreszenzfarbstoffe von TaqMan®-Sonden, MGB = Minor growth binder, IAK = Interne Amplifikationskontrolle.

Die Proben sowie die Kontrollen wurden nach folgendem Protokoll im Thermocycler amplifiziert: Aktivierung der DNA-Polymerase bei 95 °C für zehn Minuten und 45 Zyklen bestehend aus der DNA-Denaturierung bei 95 °C für 15 Sekunden und einem kombinierten Annealing/Extensionsschritt bei 60 °C für eine Minute.

Die Auswertung der Proben wurde mittels *ABI PRISM Detection System 7000* (Applied Biosystems) durchgeführt. Proben galten als positiv für den Marker *f57* bzw. *ISMav2*, wenn der Schwellenwertzyklus (C_t-Wert) unter 37 lag (siehe Tab. 17). Wurde kein Signal von der internen Amplifikationskontrolle bei einem der Leerwerte detektiert, so galt der PCR-Lauf als nicht auswertbar. Erschien dagegen kein IAK-Signal bei einer Probe, wurde – um einer möglichen Hemmung in der PCR entgegenzusteuern – der Lauf mit einer eingesetzten 1:2-

und/oder 1:5-Verdünnung der DNA wiederholt. Im Falle eines positiven Leerwertes (für die C_t -Werte galten dann die gleichen Regeln wie für MAP-positive Proben bzw. fragliche Ergebnisse) wurde dieser erneut in der Triplex-PCR überprüft bzw. die in dem PCR-Lauf MAP-positiven Ergebnisse wurden erst nach Vergleich mit den Ergebnissen der parallel durchgeführten nested PCR gewertet.

Tab. 17: Interpretation der C_t -Werte (Schwellenwertzyklus) bei der Triplex-PCR

Art der Probe	C_t -Werte		Interpretation
	<i>f57</i> und <i>ISMav2</i>	IAK	
Probe	< 37	Beliebig	MAP-positiv
	≥ 40	30–36	MAP-negativ
	≥ 37 bis < 40	30–36	Ergebnis fraglich
Positivkontrolle (K10)	< 28	Beliebig	PCR erfolgreich
Negativkontrolle (Leerwert)	Kein Signal	30–36	Ergebnis auswertbar

K10 = MAP-Stamm (ATTC® BAA-968™), Leerwert = Mastermix plus 5 µl Nuklease-freies Wasser bzw. plus 5 µl aus Medium mit 145 mM NaCl-Lösung inokuliert.

Die C_t -Werte der MAP-spezifischen Marker *f57* und *ISMav2* sowie der internen Amplifikationskontrolle (IAK) werden in Bezug auf den Nachweis von MAP-DNA bzw. dem Erfolg der PCR in Zusammenhang mit der Art der Probe interpretiert.

3.5 Anlegen MAP-verdächtiger Proben auf HEYM

Fiel das **Ergebnis aus den molekular-basierten Untersuchungen** (nested und/oder Triplex-PCR) **positiv** aus oder wurden **säurefeste Stäbchen** mit Hilfe der **Färbung nach Ziehl-Neelsen** nachgewiesen, so wurde ein Teil der Probe aus dem entsprechenden Medium auf Herrold's Egg Yolk Medium (HEYM; siehe Anhang, 9.2.17) subkultiviert. Es wurden die Untersuchungsergebnisse aus der 24. und 48. Inkubationswoche, sowie ab dem letzten Drittel des Beprobungszeitraums auch die Ergebnisse aus der zwölften Inkubationswoche, bei der Auswahl der Proben herangezogen.

Im Falle eines positiven MAP-Nachweises auf dem **RAF-Medium** wurden 500 µl PBS-Lösung zum Medium gegeben, fünf Minuten lang bei 36 UpM auf dem Schüttelapparat bei Raumtemperatur geschwenkt und der Agar mit Hilfe einer Pipette abgeschwemmt. Die verbliebene Flüssigkeit wurde auf die schräge Agarfläche des HEYM-Röhrchens gegeben und durch leichtes Schwenken verteilt. Sowohl aus der **MGIT-Bouillon** als auch aus dem **VIB-Medium** wurden bei einem positiven Nachweis von MAP-DNA bzw. säurefesten Stäbchen 100 µl nach sorgfältigem Vortexen bzw. leichtem Aufschütteln des Mediums entnommen und auf HEYM pipettiert. Hier erfolgte ebenfalls durch leichtes Schwenken die Verteilung der Flüssigkeit auf der Agarfläche. Das HEYM-Röhrchen wurde auf einem entsprechenden Ständer in Schräglage bei 37 °C mit nicht vollständig verschlossenem Deckel inkubiert. Eine Woche nach Beimpfung wurde kontrolliert, ob die Flüssigkeit in den Agar einzogen war, und das HEYM-Röhrchen wurde nach Verschließen aufrecht gestellt. Das Schrägmedium wurde mindestens zwölf Wochen lang bei 37 °C inkubiert und wöchentlich auf Koloniewachstum überprüft. Nach diesem Zeitraum wurden die HEYM-Röhrchen bis zu einem Jahr weiter bebrütet, jedoch entfiel die regelmäßige wöchentliche Kontrolle.

Bei Vorliegen von **MAP-verdächtigen Kolonien** auf HEYM wurde etwas Koloniematerial mit Hilfe einer 1 µl-Einmal-Impföse abgenommen und am Rande eines 1,5 ml-Eppendorf Tubes verrieben um anschließend mit der im Tube vorgelegten 500 µl PBS-Lösung vermischt zu werden. Bei **Vorliegen fraglicher Strukturen** auf HEYM, die im Zusammenhang mit dem Vorkommen von MAP-Zellen standen – beispielsweise für MAP atypisches Koloniewachstum –, wurden 1,0 ml PBS-Lösung auf die Agaroberfläche des HEYM-Röhrchens pipettiert und unter leichtem Schwenken verteilt. Anschließend wurde dieses 5–10 Minuten lang liegend bei Raumtemperatur auf dem Schüttelapparat (36 UpM) inkubiert. Die verbliebene Flüssigkeit wurde mittels Pasteurpipette in ein 1,5 ml-Eppendorf Tube überführt und das mit PBS-Lösung abgeschwemmte HEYM-Medium schräg mit leicht geöffnetem Deckel bis zu

einer Woche bei 37 °C inkubiert, bis keine Flüssigkeit mehr auf dem Agar sichtbar war. Danach wurde das Schrägmedium verschlossen und in aufrechter Position bei 37 °C weiter bebrütet. Die in die Eppendorf Tubes überführte Flüssigkeit aus der MGIT-Bouillon oder aus dem VIB- oder RAF-Medium wurde bei 5.000 x g für zehn Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand mittels Pasteurpipette abgenommen. Das Pellet wurde mit 500 µl Nuklease-freiem Wasser resuspendiert und anschließend erneut bei 5.000 x g für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 20–30 µl verworfen, das Pellet mit der verbliebenen Flüssigkeit resuspendiert und mit dem im Kapitel 3.4.2 beschriebenen Protokoll zur Aufbereitung für gram-positive Bakterien und Extraktion mittels *DNeasy® Blood & Tissue Kit* behandelt. Das entstandene Eluat wurde in die nested PCR zum Nachweis der Insertionssequenz *IS900* (siehe Kapitel 3.4.23.4.2) und in die Triplex-PCR zum Nachweis der Marker *f57* und *ISMav2* (siehe Kapitel 3.4.3) eingesetzt.

3.6 Charakterisierung MAP-positiver Ergebnisse

Der MAP-Referenzstamm 44135 sowie diejenigen Proben, bei denen MAP-DNA mit Hilfe der nested und Triplex-PCR sowie säurefeste Stäbchen nach der Färbung mit Ziehl-Neelsen nachgewiesen werden konnten, wurden nach Feststellen der DNA-Konzentration ausgewählt um diese einem im IFTN etablierten *IS900*-PCR-Verfahren und einer darauffolgenden DNA-Sequenzanalyse zu unterziehen.

3.6.1 *IS900*-PCR

Die im IFTN für die Charakterisierung MAP-positiver Ergebnisse etablierte *IS900*-PCR ist eine konventionelle PCR mit Verwendung des Primerpaares *seq1* und *seq2* und der DNA-Polymerase *AmpliTaq* (Applied Biosystems). Die in Kapitel 3.4.2 beschriebene nested PCR wurde für diesen Zweck entsprechend modifiziert. Der Vorwärtsprimer **seq1** (5'-GGG TAT GGC TTT CAT GTG GT-3') wurde von der Primer-Sequenz *IS9L* (Bull *et al.*, 2000), welche an einer flankierenden Region der Insertionssequenz *IS900* bindet, abgeleitet. Der Rückwärtsprimer **seq2** (5'-GAT GCT GTG TTG GGC GTT AG-3') dagegen bindet innerhalb der *IS900*-Sequenz. Die Hybridisierungstemperatur der Primer wurde mit Hilfe des *Tm Calculator*-Programms (Applied Biosystem) errechnet und durch Verändern der Sequenzlänge des *seq2*-Primers angeglichen ($T_{m_{seq1}} = 63,5$ °C und $T_{m_{seq2}} = 65,5$ °C). Die Primer-Sequenzen und das entstandene Produkt mit einer Länge von 853 Basenpaaren wurden unter Zuhilfenahme dreier beschriebener MAP-Sequenzen (GenBank accession no. AF416985, AJ250023, AJ250015) mit Sequenzen aus den bestehenden Datenbanken unter Verwendung

des *Basic Local Alignment Search Tools (BLAST)* verglichen. Alle verglichenen Sequenzen waren spezifisch für MAP; die Primer-Sequenzen waren zudem spezifisch für die in Bull *et al.* (2000) beschriebenen Loci 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 und 11 für MAP.

Zur Etablierung des IS900-PCR-Verfahrens wurden Vorversuche durchgeführt (hier nicht beschrieben) um die geeignete DNA-Polymerase und deren Konzentration, das ideale Reaktionsvolumen sowie die geeigneten Konzentrationen der Reagenzien des Mastermixes auszuwählen. In den Vorversuchen wurde zudem die Frage geklärt, ob zusätzliches Magnesiumchlorid zum Mastermix zugesetzt werden sollte. Pro Ansatz wurde ein Reaktionsvolumen von 25,0 µl gewählt (siehe Tab. 18). 5 µl DNA der ausgewählten Probe (DNA-Extraktion siehe Kapitel 3.4.2) wurden nach vorhergehender Konzentrationsbestimmung mittels UV-Spektralphotometer zum Ansatz zugegeben. Als Positivkontrolle wurde die DNA des MAP-Stammes K10 (ATCC® BAA-968™), als Leerwert wurde der Mastermix plus 5 µl Nuklease-freiem Wasser mitgeführt.

Tab. 18: IS900-PCR-Ansatz zum Nachweis der Insertionssequenz IS900

Reagenzien	Menge	Bemerkung
Nuklease-freies Wasser	14,9 µl	
10 x Polymerase-Puffer mit 15 mM MgCl ₂	2,5 µl	
MgCl ₂ (50 mM)	0,25 µl	
dNTP-Mix	0,75 µl	Bestehend aus dATP, dGTP, dCTP, dTTP (je 10 mM)
Primer (Endkonzentration 10 µM)	Je 0,75 µl	
Primerpaar seq1 und seq2 (je 100 µM)		seq1 5'-GGG TAT GGC TTT CAT GTG GT-3' seq2 5'-GAT GCT GTG TTG GGC GTT AG -3'
Polymerase AmpliTaq® (5 U/µl)	0,1 µl	
DNA	5,0 µl	
	25,0 µl	Gesamtvolumen

MgCl₂ = Magnesiumchlorid

Im Gegensatz zu der nested PCR, die ebenfalls die Insertionssequenz IS900 nachweist, wird bei der im IFTN neu etablierten PCR nur ein Primerpaar (seq1/seq2) eingesetzt. Gleichzeitig erfolgt die zusätzliche Verwendung von 50 mM Magnesiumchlorid.

Die Proben und Kontrollen wurden im Thermocycler nach folgendem Temperatur-/ Zeitprofil amplifiziert: Initiale Denaturierung bei 94 °C für fünf Minuten, 35 Zyklen bestehend aus Denaturierung bei 94 °C für 30 Sekunden, Annealing bei 60 °C für 30 Sekunden, Extension bei 72 °C für eine Minute, und anschließend eine finale Extension bei 72 °C über fünf Minuten. Die entstandenen Amplifikate wurden auf 4 °C heruntergekühlt, mit dem Ladepuffer im

Verhältnis 1:5 vermischt und in die Taschen eines 1,5 %igen Agarosegels pipettiert. 10 µl einer DNA-Marker XIV-Verdünnung dienten als Längenstandard. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 125 Volt für circa eine Stunde. Das Ergebnis wurde nach Färbung des Gels im Ethidiumbromid-Bad und anschließendem Entfärben im Wasserbad unter UV-Licht (302 nm) betrachtet und fotografiert.

Waren spezifische Banden (853 Basenpaaren) sichtbar, wurde das Amplifikat aus der ersten IS900-PCR mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) nach dem Protokoll im *QIAquick® Spin Handbook* unter Verwendung einer Zentrifuge aufgereinigt (siehe Anhang, 9.2.18). Um eine höhere Ausbeute der gewünschten DNA für die anschließende Sequenzanalyse zu erhalten, wurde das aufgereinigte PCR-Produkt erneut in die IS900-PCR eingesetzt. In Anlehnung an das Protokoll für den IS900-PCR-Ansatz wurde ein 25 µl-Ansatz hergestellt (siehe Tab. 18). Als DNA-Template dienten 1,0 µl bzw. 0,5 µl des aufgereinigten PCR-Produktes aus der ersten IS900-PCR. Für die Positivkontrolle wurden 5 µl DNA des MAP K10-Stammes (ATCC® BAA-968™) im Original (nicht als Amplifikat) und für den Leerwert 5 µl Nuklease-freies Wasser mitgeführt.

Für die zweite IS900-PCR wurde die Zyklenzahl von 35 auf 20 herabgesetzt; die weiteren Einstellungen des Thermocyclers waren identisch mit denen der ersten IS900-PCR. Parallel dazu wurde ein 2 %iges Agarosegel hergestellt (siehe Anhang, 9.2.13), wobei jeweils zwei Taschen miteinander verbunden und eine Tasche zwischen den zu pipettierenden Produkten freigelassen wurde. Die Amplifikate aus der ersten und zweiten IS900-PCR, sowie die Kontrollen (Positivkontrolle und Leerwert) und der Marker XIV, wurden nach dem in Abbildung 7 dargestellten Schema aufgetragen. Dabei wurden zu 25 µl des zweiten IS900-PCR-Produkts 6,25 µl Ladebuffer zugegeben, zum restlichen Amplifikat aus der ersten IS900-PCR wurde der Ladebuffer im Verhältnis 1:5 zugegeben und gemischt.

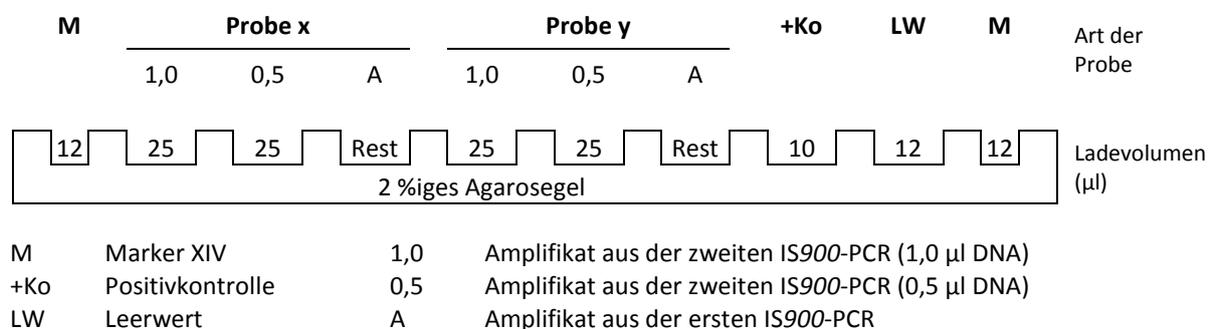


Abb. 7: Ladeschema des präparativen Agarosegels zur Isolierung des IS900-PCR-Produkts

Die Gelelektrophorese erfolgte zunächst bei 100 V, bis die Proben in das Gel diffundierten, anschließend wurde auf 125 V erhöht. Nach etwa eineinhalb Stunden wurde das Agarosegel für eine weitere Stunde im Ethidiumbromid-Bad gefärbt, genauso lange entfärbt und unter UV-Licht (Wellenlänge 302 nm) betrachtet. Waren Banden im Bereich von 853 Basenpaaren zu sehen, wurden diese unter UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten, in je ein Eppendorf Tube gegeben und die DNA mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits* (Qiagen; siehe Anhang, 9.2.19) nach Protokoll (*QIAquick® Spin Handbook*, Qiagen) extrahiert. Das gewonnene Produkt wurde am Schluss mit 30 µl EB-Puffer eluiert und erneut elektrophoretisch auf die richtige Größe überprüft bzw. mit Hilfe des eingesetzten Markers quantifiziert. Da es sich um eine Kontrolle des Eluates handelte, wurden die Positivkontrolle und der Leerwert nicht mitgeführt. Nach der anschließenden Gelelektrophorese bei 125 V für circa eine Stunde wurde das Gel im Ethidiumbromid-Bad gefärbt, im Wasserbad entfärbt, im Anschluss unter UV-Licht betrachtet sowie zur Dokumentation fotografiert.

3.6.2 DNA-Sequenzanalyse

Für die Sequenzanalyse wurde die aus dem Gel extrahierte DNA (siehe Kapitel 3.6.1) in je ein 0,2 ml-Reagiergefäß pipettiert und 20 µM Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer – getrennt voneinander – zugegeben. Das Gesamtvolumen der zu sequenzierenden Probe inklusive zugegebenem Primer überstieg nicht das Volumen von 7 µl. Die Proben wurden in den dafür vorgesehenen Boxen zur Sequenzanalyse an die Firma *Seqlab* (Göttingen) gesendet. Die Qualität der erhaltenen DNA-Sequenz wurde mit Hilfe der Software *Chromas Lite* überprüft und gegebenenfalls einzelne Nukleotide korrigiert. Die ermittelten Sequenzdaten der IS900-PCR-Produkte wurden mit Hilfe eines *BLAST*-Programms (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) mit in der *GenBank*-Datenbank zur Verfügung stehenden Sequenzen für MAP (taxid: 1770) verglichen und das Ergebnis des Sequenzalignements mittels *Lasergene MegAlign* Software von *DNASTAR*, Inc. dargestellt.

3.8 Statistische Auswertung

Die statistische Datenauswertung erfolgte durch die AG Biomathematik und Datenverarbeitung (Fachbereich Veterinärmedizin, JLU Gießen). Die Aufstellung der Daten erfolgte in Anlehnung einer According-to-protocol-Analyse (ein Patient/ eine Probe).

Zunächst wurde die **BMDP Statistical Software**, Version 8.1 (Dixon, 1993) eingesetzt. Die deskriptive Darstellung der qualitativen und quantitativen Einflussgrößen der Proben auf das Vorhandensein von MAP/-DNA wurde mit Hilfe des **BMDP1D**-Programms für die einfache bzw. des **BMDP2D**-Programms für die detaillierte Datenbeschreibung mit eindimensionaler Häufigkeitsauszählung erstellt. Zweidimensionale Häufigkeitsauszählungen bezüglich Zeit, Medium oder Methode wurden in Form von Kontingenztabellen mittels **BMDP4F** dargestellt. Zwei- wie auch mehrfach-dimensionale Häufigkeitsauszählungen bezüglich der Ergebnisse aus den molekular-basierten Methoden wurden ebenfalls mit Hilfe des **BMDP4F**-Programms erzeugt. Die Wahrscheinlichkeit, ob ermittelte Unterschiede statistisch signifikant waren, konnte durch die Anwendung des McNemar-Tests für abhängige Stichproben ermittelt werden. Gegebenenfalls wurde der exakte McNemar-Test zur Berechnung herangezogen.

Für die multiple logistische Regressionsanalyse zur Untersuchung der Zusammenhänge bei quantitativen bzw. qualitativen Merkmalen des Patienten- bzw. Probenkollektivs und positivem MAP-Befund wurde das Programm **BMDPLR** angewendet. Neben dem p-Wert (probability) wurde das Chancenverhältnis (odds ratio, OR) sowie das Konfidenzintervall (confidence interval, CI) angegeben.

Zur Prüfung der zweifachen Wechselwirkung bzw. einfachen Wirkung von Zeit, Medium und Methode auf den Nachweis von MAP/-DNA wurde eine logistische Regressionsanalyse durchgeführt. Es wurde die Funktion *glmmPQL* (Fit Generalized Linear Models via PQL) aus dem Package „**MAAS**“ der **Statistiksoftware R** (Anonymous, 2014) verwendet.

Für alle Berechnungen wurde ein Signifikanzniveau (α) von 0,05 zugrunde gelegt, wobei sich der p-Wert vom Signifikanzniveau ableitet. Bei einem p-Wert $\leq 0,05$ wurden die ermittelten Unterschiede als statistisch signifikant angesehen.

Sämtliche in der Dissertation aufgeführten Tabellen und Graphiken wurden mit dem Excel- bzw. Word-Programm aus dem Microsoft Office-Paket 2013 und 2016 erstellt.

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse aus den molekular-basierten Verfahren (nested und Triplex-PCR) zum Nachweis von MAP-DNA in humanen intestinalen Biopsaten in Abhängigkeit der unterschiedlichen Einflussgrößen des Patienten- bzw. Probenkollektives dargestellt. Als mögliche Einflussgrößen auf den Nachweis von MAP zählen die Patientengruppen (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, nicht chronisch entzündliche Darmerkrankung/Kontrolle) **(1)**, das Alter **(2)** und das Geschlecht **(3)** des Patienten, der Darmabschnitt **(4)**, der Entzündungscharakter der Probe **(5)** – wobei dieser sowohl makroskopisch im Rahmen der durchgeführten Koloskopie als auch mikroskopisch bei der anschließenden Histologie ermittelt wurde – sowie die entnommene Biopsatmasse **(6)**. Des Weiteren werden die Ergebnisse aus den unterschiedlichen Kultivierungs- (MGIT) bzw. Resuszitationsmedien (VIB- und RAF-Medium), den unterschiedlichen Inkubationszeiträumen (12, 24 und 48 Wochen) sowie der Untersuchungsmethode (nested bzw. Triplex-PCR, Ziehl-Neelsen-Färbung), bezogen auf den Nachweis des Erregers bzw. der MAP-DNA gegenübergestellt. Bei der Darstellung der Ergebnisse der humanen Darmbiopsate wurde jeweils nur eine Probe eines Patienten berücksichtigt.

4.1 Molekular-basierte Untersuchungsergebnisse

4.1.1 Abhängigkeit der Einflussgrößen aus dem Patienten- und Probenkollektiv

Wie aus Tabelle 19 ersichtlich wird, konnte bei 81 von insgesamt 203 untersuchten Patienten **(39,9 %)** MAP-DNA, **unabhängig von den Kultivierungsbedingungen und der molekularbiologischen Untersuchungsmethode nachgewiesen** werden. MAP-DNA konnte zu 47,5 % (n = 38) bei den Morbus Crohn-Patienten detektiert werden. Ein positiver Nachweis gelang zu 48,1 % (n = 26) bei Colitis ulcerosa-Patienten. Somit wurde MAP-DNA bei Patienten mit Colitis ulcerosa häufiger nachgewiesen. Bei der Gruppe der Kontrollpatienten gelang der DNA-Nachweis lediglich bei 17 von 69 (24,6 %) der Erkrankten.

Tab. 19: Nachweis von MAP-DNA bei verschiedenen Patientengruppen

Gruppe	positiv		negativ		Gesamt
	absolut	relativ (%)	absolut	relativ (%)	
MC	38	(47,5)	42	(52,5)	80
CU	26	(48,1)	28	(51,9)	54
nCED	17	(24,6)	52	(75,4)	69
Gesamt	81	(39,9)	122	(60,1)	∑ 203

MC = Morbus Crohn, CU = Colitis ulcerosa, nCED = nicht chronisch-entzündliche Darmerkrankung (Kontrollpatienten).

In der Regel erfolgte die Entnahme der Darmbiopsate in Verbindung mit einer Koloskopie (Koloskopie „Standard“; siehe Kapitel 3.2). Bei sieben der insgesamt 203 Patienten wurde das Verfahren der konfokalen Laserendomikroskopie mit der Probenentnahme gekoppelt (Koloskopie „CLE“). Drei dieser sieben Patienten (42,9 %) wiesen einen positiven Nachweis auf MAP-DNA auf, davon jeweils zwei von vier Morbus Crohn- und einer von zwei Colitis ulcerosa-Patienten. Bei dem Kontrollpatienten konnte keine MAP-DNA detektiert werden.

Der **Nachweis von MAP-DNA** gelang bei 40 von 100 (**19,7 % weiblichen** bzw. 41 von 103 (**20,2 % männlichen Patienten**). Die Verteilung der positiven Ergebnisse war zwischen den beiden Geschlechtern annähernd gleich. Bei der Gruppe der Morbus Crohn-Patienten (n = 80) lag der Anteil positiver Nachweise sowohl bei den weiblichen (n = 19) als auch bei männlichen Patienten (n = 19) bei exakt 23,8 %.

Zur Auswertung der **positiven MAP-DNA Nachweise** im Hinblick auf die Verteilung der **Darmabschnitte** lagen Daten von 195 Patienten vor. Von den insgesamt 203 Biopsaten konnten acht Proben aufgrund von Anastomosen oder fehlenden Daten keinem Darmabschnitt eindeutig zugeordnet werden. Ein positiver Nachweis gelang bei 42 Proben aus dem **Colon sigmoideum (IV)**. Im Vergleich aller beprobten Darmabschnitte wies das Colon sigmoideum mit **21,5 % den höchsten Anteil positiver Nachweise** auf (terminales Ileum 7,2 %; Appendix, Caecum 2,1 %; Colon transversum 5,1 %, Colon ascendens 3,1 %, Colon descendens 0 %, Rectum 3,1 %).

Der Nachweis von **MAP-DNA** gelang zu **20,3 % (n = 41) aus entzündlichen** bzw. zu **19,3 % (n = 39) aus nicht-entzündlichen Bereichen des Darmes**. Am Universitätsklinikum Erlangen konnten 202 von 203 Biopsaten makroskopisch eindeutig einer Entzündungsart zugeordnet werden („**Emakros**“). Bei der Gruppe der Morbus Crohn-Patienten (n = 79) konnten in 19 der makroskopisch entzündlich beurteilten Darmabschnitte und in 18 der nicht-entzündlichen

MAP-DNA nachgewiesen werden. Demnach ergibt sich eine annähernd gleiche Verteilung der MAP-DNA-positiven Ergebnisse von entzündlichen (24,1 %) zu nicht-entzündlichen (22,8 %) Proben bei Patienten mit Morbus Crohn.

Zudem lagen am Universitätsklinikum Erlangen 203 Biopsate zur mikroskopischen Beurteilung des Entzündungscharakters („**Emikros**“) vor. Da acht Biopsate keiner Entzündungsart eindeutig zugeordnet werden konnten, beispielsweise aufgrund fehlender histopathologischer Berichte, wurden anschließend nur Daten von 195 Biopsaten zur Auswertung einbezogen. Die Verteilung MAP-DNA-positiver Ergebnisse von „Emikros“-Biopsaten (n = 195) war annähernd gleich verteilt: Bei 39 als **entzündlich (20,0 %)** und bei 40 als **nicht-entzündlich (20,5 %) eingeteilten Proben** konnte **MAP-DNA nachgewiesen** werden. Aus der Gruppe der Morbus Crohn-Patienten (n = 76) wiesen 25 % der als entzündlich charakterisierten (n = 19) bzw. 23,7 % der als nicht-entzündlich charakterisierten Biopsate (n = 18) einen positiven MAP-Befund auf. Damit gelang der Nachweis von MAP-DNA häufiger bei Proben aus dem entzündeten Darmabschnitt.

Unabhängig von den Beobachtungen des Nachweises von MAP-DNA ist in Tabelle 20 die Anzahl entzündlicher und nicht-entzündlicher Proben aus „Emakros“ und „Emikros“ gegenübergestellt. Bei 195 miteinander verglichenen Proben wurden 86 übereinstimmend als nicht-entzündlich und 73 übereinstimmend als entzündlich charakterisiert.

Tab. 20: Verteilung der Biopsate mit unterschiedlichem Entzündungscharakter

Entzündungsart	Emikros		Gesamt
	NE	E	
Emakros	NE	86 (78,9 %)	109 (100 %)
	E	13 (15,1 %)	86 (100 %)
Gesamt	99 (50,8 %)	96 (49,2 %)	Σ 195* (100 %)

Emakros = makroskopische Einteilung des Entzündungscharakters, Emikros = mikroskopische Einteilung des Entzündungscharakters, E = entzündlich, NE = nicht-entzündlich; n = 203, * acht Proben nicht eindeutig zuzuordnen. Die Untersuchungen zur Einteilung des Entzündungscharakters wurden am Universitätsklinikum Erlangen durchgeführt.

Zur Untersuchung der **Zusammenhänge quantitativer und qualitativer Merkmale des Patienten- bzw. Probenkollektivs und positivem MAP-DNA-Befund** wurde eine multiple logistische Regressionsanalyse angewendet (siehe Tab. 21). Dabei wurden der Darmabschnitt II (Appendix, Caecum) sowie VI (Colon descendens) aus statistischen Gründen nicht in die Berechnung miteingeschlossen. Die vorhandene Anzahl an Biopsaten aus den beiden Darmabschnitten war zu gering. Das **Alter** und **Geschlecht** der Patienten, der beprobte **Darmabschnitt**, die **Biopsatmasse** sowie der **makroskopisch beurteilte Entzündungscharakter** der Proben wiesen **keinen statistisch signifikanten Einfluss** auf. Die Ergebnisse aus der Regressionsanalyse für die **Patientengruppe** und der **mikroskopisch beurteilte Entzündungscharakter** der Proben stellten diese Merkmale jedoch als **signifikante Einflussgrößen** dar.

In den betrachteten **Patientengruppen** „CU“ zu „MC“ lag die Odds Ratio über dem Wert 1. Obwohl sich MAP-DNA häufiger bei CU-Patienten nachweisen ließ, war dieser Effekt statistisch nicht signifikant. Das Chancenverhältnis der Gruppen „nCED“ zu „MC“ bzw. „nCED“ zu „CU“ lag weit unter dem Wert von 1 (0,224 bzw. 0,186). Das bedeutet, dass bei Patienten ohne chronische Darmentzündung seltener MAP-DNA bzw. bei Patienten mit einer chronischen Darmentzündung (MC oder CU) häufiger MAP-DNA als bei Kontrollpatienten nachgewiesen wurde. Dieser Effekt erwies sich als statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Parallel wurde der Einfluss des **Entzündungscharakters der Biopsate** geprüft. Bei gleichzeitiger Berücksichtigung des Gruppeneinflusses und Emikros ergab sich ein Effekt für Emikros: In mikroskopisch als entzündlich charakterisierten Proben wurde seltener MAP-DNA nachgewiesen als in nicht-entzündlichen ($p = 0,021$). Die Chance, MAP-DNA bei entzündlichen Proben, die mittels „Emikros“ charakterisiert wurden, nachzuweisen, ist etwa ein Drittel ($OR = 0,317$) geringer als bei nicht-entzündlichen Proben.

Der Grad der Entzündlichkeit ist unterschiedlich bei den verschiedenen Gruppen. Dies erklärt, dass bei roher Betrachtung der Entzündung kein Effekt statistisch nachgewiesen werden kann, jedoch in der multiplen Regressionsanalyse unter gleichzeitiger Berücksichtigung des Gruppeneinflusses für die Entzündlichkeit ein Effekt auftritt.

Tab. 21: Darstellung des Einflusses durch Merkmale des Patienten- (A) bzw. Probenkollektivs (B) ohne Darmabschnitt II (Caecum, Appendix) und VI (Colon descendens)

A)	Merkmale des Patientenkollektivs				
	Alter	Gruppe			Geschlecht
		CU : MC	nCED : MC	nCED : CU	
p	0,48	0,0047 (global)			0,66
OR	1,008	1,310	0,244	0,186	1,166
95 %-CI für OR	[0,986–1,03]	[0,543–3,16]	[0,094–0,631]	[0,065–0,534]	[0,597–2,28]

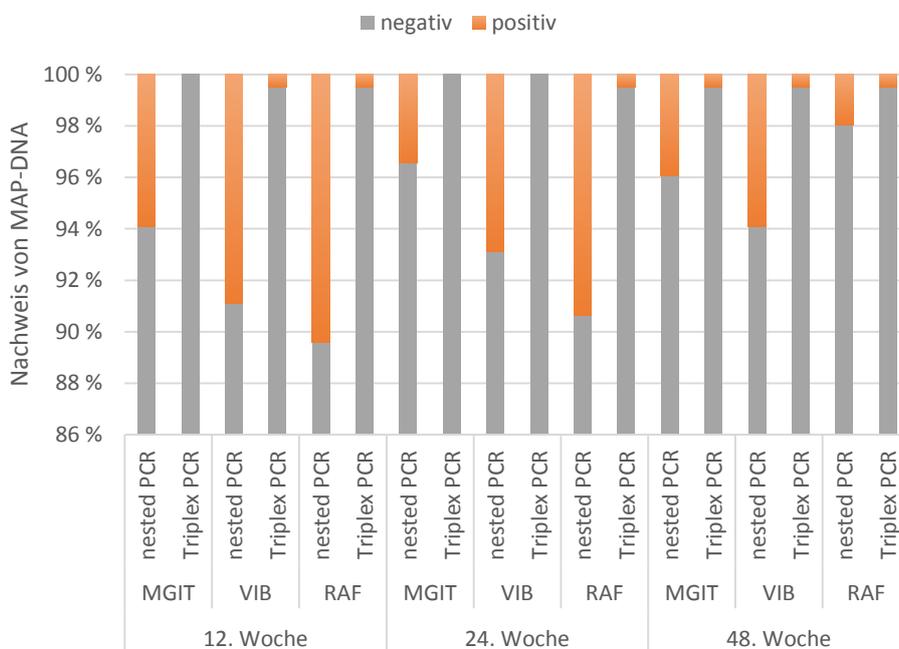
B)	Merkmale des Probenkollektivs						
	Biopsat- masse	Darmabschnitt				Emakros	Emikros
		I : III	I : IV	I : V	I : VII		
p	0,18	0,74 (global)				0,24	0,021
OR	0,153	1,767	0,856	1,147	0,646	1,784	0,317
95 %-CI für OR	[0,011–2,22]	[0,460–6,79]	[0,321–2,28]	[0,258–5,11]	[0,156–2,69]	[0,683–4,66]	[0,122–0,824]

p = p-Wert, OR = Odds Ratio (Chancenverhältnis), 95 %-CI = 95 %iges-Konfidenzintervall, MC = Morbus Crohn, CU = Colitis ulcerosa, nCED = nicht chronisch-entzündliche Darmerkrankung (Kontrollpatient), I = terminales Ileum, III = Colon transversum, IV = Colon sigmoideum, V = Colon ascendens, VII = Rectum, Emakros = makroskopische Einteilung des Entzündungscharakters, Emikros = mikroskopische Einteilung des Entzündungscharakters.

4.1.3 Abhängigkeit der Einflussgrößen: Zeit – Medium – Methode

Beim Vergleich der insgesamt in Betracht zu nehmenden Parameter, wie unterschiedliche Medien (MGIT-Bouillon, VIB- und RAF-Medium), Inkubationsdauer (12, 24, 48 Wochen) und molekular-basierte Methoden (nested PCR, Triplex-PCR) ergaben sich 3.648 auswertbare Einzelergebnisse.

In Abbildung 8 sind die darauf basierenden Ergebnisse gegenübergestellt. Diese Übersicht veranschaulicht, dass in der Mehrheit der Fälle keine MAP-DNA in den Proben nachgewiesen werden konnte. Werden die jeweiligen Methoden im Vergleich betrachtet, konnten deutlich mehr positive Ergebnisse mit Hilfe der nested PCR als mit der Triplex-PCR ermittelt werden. Zusammengefasst konnte **MAP-DNA in 39,9 %** der 203 **Proben** nachgewiesen werden (siehe auch Tab. 19).



MGIT = Mycobacterial Growth Indicator Tube, VIB = Modifizierte Kalbfleischbrühe, RAF = Reid's A Agar mit fetalem Kälberserum.

Abb. 8: Nachweis von MAP-DNA (in %) in Abhängigkeit vom Nährmedium, PCR-Methode und Zeitpunkt der Untersuchung

Eine detaillierte Übersicht der absoluten und prozentualen Verteilung der positiven sowie negativen Ergebnisse wird in Tabelle 22 wiedergegeben. Das Vorhandensein von MAP-DNA wird in Abhängigkeit der unterschiedlichen Inkubationszeiträume, dem Nährmedium und dem ausgewählten molekular-basierten Verfahren dargestellt. Ist MAP-DNA nicht nachweisbar, ist das Einzelergebnis negativ.

Insgesamt lagen 3.654 Einzelergebnisse vor, wobei sechs nicht in die Auswertung einfließen. Bei den verbliebenen 3.648 auswertbaren **Einzelergebnissen** ließen sich in **121 (3,3 %) MAP-DNA** nachweisen.

Tab. 22: Vergleich aller Einzelergebnisse bezüglich Zeit, Medium und Methode auf den Nachweis von MAP-DNA

Zeit	12. Woche						24. Woche						48. Woche						Gesamt (%)
	MGIT		VIB		RAF		MGIT		VIB		RAF		MGIT		VIB		RAF		
PCR-Methode	Nested	Triplex																	
positiv (%)	12 (9,9)	0 (0)	18 (14,9)	1 (0,8)	21 (17,4)	1 (0,8)	7 (5,8)	0 (0)	14 (11,6)	0 (0)	19 (15,7)	1 (0,8)	8 (6,6)	1 (0,8)	12 (9,9)	1 (0,8)	4 (3,3)	1 (0,8)	121 (100)
negativ (%)	190 (5,4)	202 (5,7)	184 (5,2)	201 (5,7)	181 (5,1)	201 (5,7)	196 (5,6)	203 (5,8)	189 (5,4)	203 (5,8)	184 (5,2)	202 (5,7)	195 (5,5)	202 (5,7)	191 (5,4)	202 (5,7)	199 (5,6)	202 (5,7)	3.527 (100)
Gesamt	202	202	202	202	202	202	203	3.648*											

MGIT = Mycobacterial Growth Indicator Tube, VIB = Modifizierte Kalbfleischbrühe, RAF = Reid's A Agar mit fetalem Kälberserum; n = 3.654, * sechs Einzelergebnisse nicht auswertbar.

Mit Hilfe der logistischen Regressionsanalyse konnte nachgewiesen werden, dass zwischen der **zweifachen Wechselwirkung „Zeit“ und „Medium“** eine **statistische Signifikanz** besteht ($p < 0,001$). Das bedeutet, dass die Inkubationsdauer den Nachweis von MAP-DNA im jeweiligen Medium beeinflusst. In der Tabelle 23 wurden insgesamt 3.648 Einzelergebnisse berücksichtigt. Unabhängig von der Methode, konnte MAP-DNA häufiger nach dem ersten Inkubationszeitraum (12 Wochen) und nach dem zweiten (24 Wochen) sowie vermehrt in den Medien, welche zur Resusztation angewendet werden (VIB- und RAF-Medium), als in der MGIT-Bouillon nachgewiesen werden.

Tab. 23: Vergleich der Einzelergebnisse bezüglich Zeit und Medium auf den Nachweis von MAP-DNA

Zeit	12. Woche			24. Woche			48. Woche			Gesamt (%)
	MGIT	VIB	RAF	MGIT	VIB	RAF	MGIT	VIB	RAF	
positiv (%)	12 (9,9)	19 (15,7)	22 (18,2)	7 (5,8)	14 (11,6)	20 (16,5)	9 (7,4)	13 (10,7)	5 (4,1)	121 (100)
negativ (%)	392 (11,1)	385 (10,9)	382 (10,8)	399 (11,3)	392 (11,1)	386 (10,9)	397 (11,3)	393 (11,1)	401 (11,4)	3.527 (100)
Gesamt	404	404	404	406	406	406	406	406	406	3.648*

MGIT = Mycobacterial Growth Indicator Tube, VIB = Modifizierte Kalbfleischbrühe, RAF = Reid's A Agar mit fetalem Kälberserum; siehe auch Tab. 22 (Σ über PCR-Methoden); n = 3.654, * sechs Einzelergebnisse nicht auswertbar.

Die **zweifache Wechselwirkung** zwischen „Zeit“ und „Methode“ wies in der logistischen Regressionsanalyse ebenfalls einen **signifikanten Einfluss** auf den Nachweis von MAP-DNA auf ($p = 0,0014$). In Tabelle 24 wird deutlich, dass vor allem mittels nested PCR in den früheren Inkubationszeiträumen mehr positive Ergebnisse erzielt wurden ($12 > 24 > 48$ Wochen). Insgesamt lagen 3.648 auswertbare Einzelergebnisse vor. Das Vorhandensein von MAP-DNA wird als positiv in Abhängigkeit der unterschiedlichen Inkubationszeiträume und dem ausgewählten molekular-basierten Verfahren dargestellt.

Tab. 24: Vergleich der Einzelergebnisse bezüglich Zeit und Methode auf den Nachweis von MAP-DNA

Zeit	12. Woche		24. Woche		48. Woche		Gesamt (%)
	nested	Triplex	nested	Triplex	nested	Triplex	
positiv (%)	51 (42,1)	2 (1,7)	40 (33,1)	1 (0,8)	24 (19,8)	3 (2,5)	121 (100)
negativ (%)	555 (15,7)	604 (17,1)	569 (16,1)	608 (17,2)	585 (16,6)	606 (17,2)	3.527 (100)
Gesamt (%)	606 (16,6)	606 (16,6)	609 (16,7)	609 (16,7)	609 (16,7)	609 (16,7)	3.648* (100)

MGIT = Mycobacterial Growth Indicator Tube, VIB = Modifizierte Kalbfleischbrühe, RAF = Reid's A Agar mit fetalem Kälberserum; siehe auch Tab. 22 (Σ über Medien); $n = 3.654$, * sechs Einzelergebnisse nicht auswertbar.

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen **Wechselwirkungen** zeigte die zwischen „Medium“ und „Methode“ ermittelte Wechselwirkung in der logistischen Regressionsanalyse **keinen statistisch signifikanten Einfluss** ($p > 0,05$). In der Tabelle 25 wurden insgesamt 3.654 Einzelergebnisse berücksichtigt, wobei sechs nicht auswertbar waren. Die Resusitationsmedien VIB und RAF wiesen zwar tendenziell häufiger positive Ergebnisse für MAP-DNA in der nested sowie in der Triplex-PCR im Vergleich zum Referenzmedium MGIT auf, jedoch war dieser Aspekt nicht statistisch signifikant.

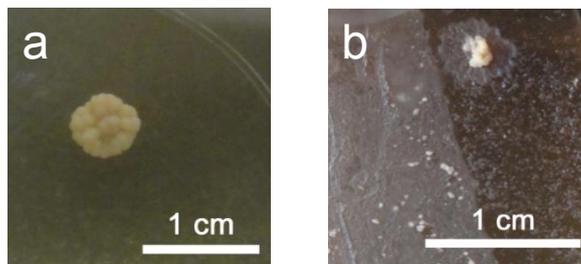
Tab. 25: Vergleich der Einzelergebnisse bezüglich Medium und Methode auf den Nachweis von MAP-DNA

Medium	MGIT		VIB		RAF		Gesamt (%)
	nested	Triplex	nested	Triplex	nested	Triplex	
positiv (%)	27 (22,3)	1 (0,8)	44 (36,4)	3 (2,5)	44 (36,4)	2 (1,7)	121 (100)
negativ (%)	581 (16,5)	607 (17,2)	564 (16,0)	605 (17,2)	564 (16,0)	606 (17,2)	3.527 (100)
Gesamt	608	608	608	608	608	608	3.648*

MGIT = Mycobacterial Growth Indicator Tube, VIB = Modifizierte Kalbfleischbrühe, RAF = Reid's A Agar mit fetalem Kälberserum; siehe auch Tab. 22 (Σ über Zeit); $n = 3.654$, * sechs Einzelergebnisse nicht auswertbar.

Die statistisch signifikanten Wechselwirkungen von „Zeit“ und „Medium“ sowie „Zeit“ und „Methode“ deuten darauf hin, dass die Zeit in Kombination mit den weiteren Variablen einen beeinflussenden Faktor zum Nachweis von MAP-DNA darstellt. In der **logistischen Regressionsanalyse** weist die **Einzelvariable „Zeit“** allerdings **keinen statistisch signifikanten Einfluss** auf ($p = 0,052$).

Wird dagegen das „Medium“ als einzelne Variable betrachtet, ist der **Einfluss statistisch signifikant** ($p = 0,0034$). Aus den zweidimensionalen Häufigkeitsauszählungen wird die Tendenz ersichtlich, dass vermehrt MAP-DNA im RAF- bzw. VIB-Medium als in der MGIT-Bouillon nachgewiesen werden konnte. Während eine beginnende Trübung und/oder Flockung im VIB-Medium auf das Vorhandensein von MAP hinweisen konnte, so war nur auf einem von 203 angelegten RAF-Medien MAP-verdächtige Kolonien sichtbar (siehe Abb. 9). Diese zeigten sich als kleine bis mittelgroße (3–5 mm) beigefarbene, erhabene, aus dem RAF-Medium herauswachsende, runde Kolonien mit unregelmäßigem Rand.



RAF = Reid's A Agar mit fetalem Kälberserum.

Abb. 9: Koloniemorphologie MAP-verdächtiger Kolonien auf RAF-Medium a) nach 24-wöchiger Inkubationsdauer und b) nach 48-wöchiger Inkubationsdauer

Mittels logistischer Regressionsanalyse ließ sich ein **statistisch signifikanter Einfluss** der „Methode“ auf den Nachweis von MAP-DNA ermitteln ($p < 0,001$). In Tabelle 26 wurden die Ergebnisse aus der nested und Triplex-PCR auf das Vorhandensein von MAP-DNA in Abhängigkeit vom Inkubationszeitraum und Nährmedium unter Angabe des p-Wertes verglichen. Von insgesamt 203 Proben war jeweils ein Einzelergebnis aus der 12. Woche nicht auswertbar. In der dargestellten Häufigkeitsauszählung ist ersichtlich, dass MAP-DNA **signifikant häufiger** mittels **nested PCR** bei den Resusitationsmedien nachgewiesen wurde ($p \leq 0,05$).

Tab. 26: Vergleich der nested und Triplex-PCR bezüglich des Nachweises von MAP-DNA

Zeit	Medium	Nested PCR	Triplex-PCR		Gesamt	p-Wert
			-	+		
12. Woche	MGIT	-	190	0	202*	-
		+	12	0		
	VIB	-	184	0	202*	< 0,0001
		+	17	1		
	RAF	-	181	0	202*	< 0,0001
		+	20	1		
24. Woche	MGIT	-	196	0	203	-
		+	7	0		
	VIB	-	189	0	203	-
		+	14	0		
	RAF	-	184	0	203	< 0,0001
		+	18	1		
48. Woche	MGIT	-	195	0	203	0,0082
		+	7	1		
	VIB	-	191	0	203	0,0009
		+	11	1		
	RAF	-	199	0	203	0,083
		+	3	1		

MGIT = Mycobacterial Growth Indicator Tube, VIB = Modifizierte Kalbfleischbrühe, RAF = Reid's A Agar mit fetalem Kälberserum, - negativer Nachweis auf MAP-DNA, + positiver Nachweis auf MAP-DNA; n = 203, * ein Einzelergebnis nicht auswertbar.

Mit Hilfe der **Färbung nach Ziehl-Neelsen** konnten zunächst in acht von 1.218 Präparaten (0,7 %) säurefeste Stäbchen eindeutig dargestellt werden. Nur eine Probe konnte sowohl kulturell als auch molekularbiologisch bestätigt werden: In dieser, von einem Colitis ulcerosa-Patienten stammenden Probe, wurden auf RAF-Medium MAP-verdächtige Kolonien (siehe auch Abb. 9) sowie MAP-DNA mittels nested und Triplex-PCR gleichzeitig nachgewiesen. 62 von insgesamt 1.218 (5,1 %) Präparaten wiesen in der Ziehl-Neelsen-Färbung fragliche Ergebnisse auf, d. h. säurefeste Stäbchen konnten nicht eindeutig identifiziert werden. Neun Präparate mit fraglichen Ergebnissen (14,5 %) konnten durch die parallel durchgeführten molekular-basierten Untersuchungen zum Nachweis von MAP-DNA bestätigt werden. Somit ließen sich in 17 von 1.218 Präparaten (**1,4 %**) **säurefeste Stäbchen** mittels Färbung nach Ziehl-Neelsen nachweisen.

4.2 Ergebnisse aus der kulturellen Anzucht auf HEYM

In Abhängigkeit der positiven Ergebnisse aus der molekular-basierten Untersuchung, der Ziehl-Neelsen-Färbung und der kulturellen Anzucht auf dem Resuszitationsmedium RAF zum Nachweis MAP-verdächtiger Kolonien, wurden aus den entsprechenden Medien eine Teilmenge auf HEYM überimpft (siehe Kapitel 3.5). Eine Übersicht der angelegten HEYM-Röhrchen (n = 128, davon zwei Doppelansätze) bzw. welches Medium zu welchem Zeitpunkt für die Überimpfung zugrunde lag, wird in Tabelle 27 dargestellt.

Tab. 27: Übersicht der angelegten Herrold's Egg Yolk Medium (HEYM)-Röhrchen mit den Auswahlkriterien „Medium“ und „Inkubationsdauer“

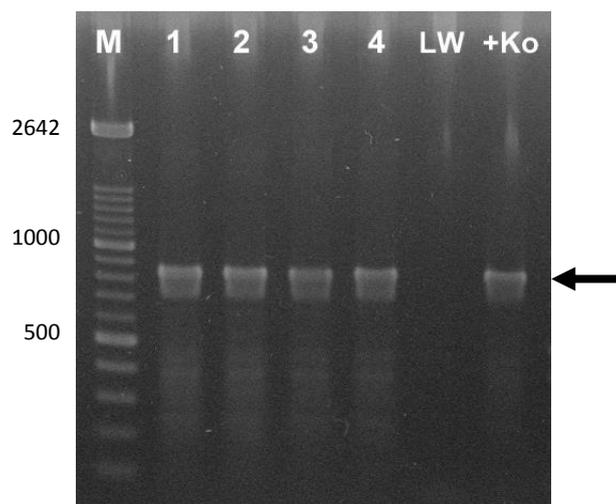
Medium	Inkubationsdauer						Gesamt
	12 Wochen		24 Wochen		48 Wochen		
MGIT (%)	6	(16,2)	12	(32,4)	19	(51,4)	37
VIB (%)	1	(2,6)	17	(43,6)	21	(53,8)	39
RAF (%)	4	(7,7)	29*	(55,8)	19*	(36,5)	52
Gesamt (%)	11	(8,6)	58	(45,3)	59	(46,1)	Σ 128

MGIT = Mycobacterial Growth Indicator Tube, VIB = Modifizierte Kalbfleischbrühe, RAF = Reid's A Agar mit fetalem Kälberserum; n = 128, * Doppelansatz.

Von den 128 angelegten HEYM-Röhrchen wurden **32 weiteren molekular-basierten Verfahren** unterzogen. Von den ausgewählten Proben stammten fünf ursprünglich aus der MGIT-Bouillon (15,6 %), sechs aus dem VIB- (18,8 %) und 21 vom RAF-Medium (65,6 %). Der größte Teil der untersuchten HEYM-Röhrchen (53,1 %; n = 17) konnte auf Proben aus der 24. Inkubationswoche zurückgeführt werden. Lediglich **zwei Proben** wiesen auf HEYM **MAP-spezifisch Kolonien** auf. Sie stammten aus demselben RAF-Medium, jeweils nach einer Inkubationsdauer von 24 und 48 Wochen (siehe auch Abb. 9). Diese im Doppelansatz angelegten Proben zeigten kleine (2–3 mm), beigefarbene, erhabene, runde Kolonien mit glattem Rand auf HEYM und waren sowohl in der nested als auch in der Triplex-PCR positiv für MAP-DNA. Sie stammten von einem Colitis ulcerosa-Patienten. In einer weiteren Probe, welche von einem Patienten der Gruppe nCED stammte, konnte MAP-DNA nach vorhergehender Abschwemmung von HEYM (VIB-Medium, 48. Inkubationswoche) mittels nested PCR nachgewiesen werden. Die Probe wies auf HEYM dunkelgrünes, griseliges, unregelmäßig verteiltes Material auf.

4.3 Charakterisierung der MAP-positiven Probe

Die in Kapitel 4.1.2 und 4.2 beschriebene **positive Probe eines Colitis ulcerosa-Patienten**, die sowohl MAP-verdächtige Kolonien in Kultur (RAF-Medium, HEYM) und MAP-DNA mittels nested und Triplex-PCR sowie säurefeste Stäbchen nach Ziehl-Neelsen-Färbung aufwies, und der **MAP-Referenzstamm 44135** wurden der im IFTN etablierten IS900-PCR unterzogen (siehe Kapitel 3.6.1). In der gelelektrophoretischen Darstellung des 1,5 %igen Agarosegels waren Banden im Bereich von 853 Basenpaaren für die positive Probe und für den MAP-Referenzstamm zu sehen (siehe Abb. 10).



Der **Pfeil** markiert den Bereich der 853 Basenpaare. **M** = Marker / 100 bp DNA-Leiter, **1 und 2** = Probe aus dem positiven RAF-Medium der 48. Inkubationswoche, **3 und 4** = MAP-Referenzstamm 44135 (DSMZ Nr. 44135), **LW** = Leerwert, **+Ko** = Positivkontrolle / MAP K10-Stamm (ATCC® BAA-968™).

Abb. 10: Ergebnis der im IFTN etablierten IS900-PCR zum Nachweis der Insertionssequenz IS900 zur Sequenzierung

Das Ergebnis der Sequenzanalyse aus der aus dem Gel extrahierten DNA, die von der positiven Probe eines Colitis ulcerosa-Patienten stammt, ist in der Abbildung 11 im Anhang 9.3 dargestellt.

Bei der Sequenzsuche mit Hilfe des *BLAST*-Programms und der *GenBank*-Datenbank (taxid: 1770) wies die ermittelte Sequenz generell eine hohe Übereinstimmung mit der Spezies *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* auf. Sie war vollständig homolog zu einer humanen sowie zwei bovinen Sequenzen (siehe Tab. 28). Zusätzlich stimmte die Sequenz mit den von Bull *et al.* (2000) beschriebenen Loci 2 bis 8 sowie Locus 11 zur Insertionssequenz IS900 zu 99 % überein. In der Tabelle 28 erfolgt neben der Darstellung aller zur 853 bp-langen ermittelten Sequenz vollständig homologen Sequenzen und deren Eigenschaften auch drei

weitere ausgewählte Sequenzen. Beim Vergleich der ermittelten Sequenz mit der eines weiteren humanen MAP-Stammes (**Ben**, *GenBank*: X16293.1) konnten zwei SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), darunter eine Insertion und eine Deletion, sowie ein Dinukleotidpolymorphismus an Position 57/58 festgestellt werden. Ein SNP an Position 360 lag beim Vergleich mit der Sequenz des caprinen MAP-Stammes **MAP 2A/03** vor (*GenBank*: AY660658.1). Dagegen konnte keine sichere Aussage über das Vorliegen von zwei SNPs an Position 94 und 151 im Vergleich zur Sequenz des caprinen MAP-Feldstammes **CAM 86** getroffen werden (*GenBank*: FJ775182.1). Grund dafür sind die in der Vergleichssequenz nicht eindeutig bestimmbaren Nukleotide. Dagegen stimmt die 853 bp lange DNA-Sequenz der positiven Probe des Colitis ulcerosa-Patienten und die des MAP-Referenzstammes 44135 vollständig überein. Eine detaillierte Darstellung des multiplen Sequence Alignment befindet sich in der Abbildung 12 im Anhang 9.4.

Tab. 28: Darstellung der mittels Sequenzanalyse identifizierten und zur positiven, aus dem CU-Patienten isolierten, Probe ähnlichen Sequenzen

Akronym	Beschreibung	Zugangsnr. bei GenBank	Ursprung d. Isolates	Herkunft d. Isolates	Abdeckung d. Zielsequenz	Übereinstimmung	Bemerkungen
MAP4	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> MAP4, complete genome (4.829.424 bp)	CP005928.1	humaner Stamm; isoliert aus der Muttermilch von MC-Patientinnen	USA	100 %	100 %	16 Kopien im gesamten MAP4-Genom
ATCC 53950	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> disrupted steroyl-ACP-desaturase (desA1) gene, complete sequence; and insertion sequence IS900 transposase gene, complete cds (2.800 bp)	AF305073.1	boviner Feldstamm	Neuseeland	100 %	100 %	
K10	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> str. k10, complete genome (4.829.781 bp)	AE016958.1	boviner Referenzstamm; isoliert aus Rinderkot	USA	100 %	100 %	17 Kopien im gesamten K10-Genom
Ben	<i>Mycobacterium paratuberculosis</i> insertion element IS900 (1.451 bp)	X16293.1	humaner Stamm; isoliert aus einem 58-jährigen MC-Patienten	USA	100 %	99 %	siehe Abb. 12 (Anhang 9.4)
MAP 12A/03	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> isolate Caprine insertion sequence IS900 transposase gene, partial cds (626 bp)	AY660658.1	capriner MAP-Stamm	Indien	73 %	99 %	siehe Abb. 12 (Anhang 9.4)
CAM 86	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> clone CAM 86 insertion sequence IS900, partial sequence (623 bp)	FJ775182.1	capriner Feldstamm (Rasse: Guadarrama)	Spanien	68 %	99 %	siehe Abb. 12 (Anhang 9.49.3)

MC = Morbus Crohn, cds = kodierende Region / Sequenz.

5.1 Einfluss der Probenentnahme und des damit verbundenen Patienten- und Probenkollektivs auf den Nachweis von MAP/-DNA)

5.1.1 Probenentnahme

Für die eigenen Untersuchungen wurden am Universitätsklinikum Erlangen mittels Biopsiezange gewonnene **humane Darmbiopsate** (Koloskopie) genutzt. Gewebeproben aus dem Darm gehören zu dem Probenmaterial, welches am häufigsten bei CED-Erkrankten – insbesondere Morbus Crohn-Patienten – untersucht wurde (Chiodini *et al.*, 2012). Der MAP-Nachweis kann aus Resektaten (Wall *et al.*, 1993; Hulten *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2005) oder Biopsaten (Sanderson *et al.*, 1992; Bull *et al.*, 2003a; Füllgrabe, 2008) erfolgen. Der Studie von Schwartz *et al.* (2000) zufolge konnte MAP-DNA aus Darmgewebeproben von zehn der insgesamt 27 MC-Patienten isoliert werden. Dabei lag der Anteil MAP-DNA-positiver Proben bei 20 % (4 aus 20) beim Nachweis aus Biopsaten bzw. bei 86 % (6 aus 7) aus Resektaten von MC-Patienten. Das könnte darauf hindeuten, dass MAP eher in der submukosalen Gewebeschicht des Darmes lokalisiert ist und eine Probenahme von Resektaten zu einer höheren Nachweisrate von MAP führt, als bei einer Probenahme oberflächlicher Gewebeschichten.

Auch der **Zustand der entnommenen Biopsate** kann möglicherweise den späteren Nachweis von MAP/-DNA beeinflussen. Die Proben aus dem Universitätsklinikum Erlangen wurden sofort nach der Entnahme in MGIT-Bouillon mit Supplementen gegeben und an das IFTN in Gießen versandt. Ebenso verwendeten Bull *et al.* (2003a) sowie Füllgrabe (2008) „frische“ Biopsate statt gefrorene (Autschbach *et al.*, 2005) oder in Paraffin-eingebettete Proben (Cheng *et al.*, 2005). Um eine mögliche Schädigung vorhandener MAP-Zellen zum Beispiel durch einen Gefrierprozess zu vermeiden, wurde entschieden, die frisch entnommenen Biopsate keiner weiteren Behandlung zu unterziehen.

Bei sieben Patienten wurde das **Probenentnahmeverfahren** am Universitätsklinikum Erlangen **mit einer konfokalen Laserendomikroskopie (CLE)** gekoppelt. Dies ermöglicht eine histologische Darstellung der Darmmukosa *in vivo*. Durch die vorherige intravenöse Gabe von Fluorescein können zusätzlich intramukosale Bakterien nachgewiesen werden. Mit Hilfe dieser in den letzten Jahren neu etablierten Methode gelingt die zielgenaue Entnahme von

Biopsaten aus verschiedenen Verdachtsregionen wie beispielsweise Ösophagus, Magen, Dün- und Dickdarm oder Lunge (Neumann *et al.*, 2011; Goetz, 2012). Die bisherigen Ergebnisse der im Universitätsklinikum Erlangen mittels CLE-gekoppelt entnommenen Proben bieten noch keine verlässliche Aussage: Bei sieben untersuchten Patienten gelang bei zwei von vier MC-Patienten sowie bei einem von zwei CU-Patienten der Nachweis auf MAP-DNA. Beim einzigen beprobten Kontrollpatient wurde keine MAP-DNA nachgewiesen. Es ist anzunehmen, dass diese gezielte Probenentnahme einen Vorteil gegenüber der Standard-Koloskopie aufweist. Für diese Aussage wird jedoch eine höhere Anzahl an Proben erforderlich sein.

5.1.2 Patientenkollektiv

Die Wahl des Patientenkollektives – unter anderem die Art der Erkrankung, das Alter oder Geschlecht, sowie medikamentöse Vorbehandlungen – kann einen Einfluss auf das Auffinden von MAP-Zellen bewirken. Für die Untersuchungen wurden **Patienten des Universitätsklinikums Erlangen** nach deren Einwilligung zur Teilnahme an der Studie beprobt, wodurch sich ein gewisser Pool an Patienten etablierte. Es ist durchaus üblich Patienten aus (nur) einem Krankenhaus in eine Studie zu inkludieren (Sechi *et al.*, 2005b; Kirkwood *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2015), dadurch wird sowohl die Handhabung als auch die Interpretation der Ergebnisse vereinfacht. Ein interessanter Aspekt wäre, neben Patienten, die im Krankenhaus stationär aufgenommen werden oder die ambulant zur Ileoskopie/Koloskopie vor Ort sind, Probanden durch Zufallsbeprobungen auszuwählen, um eine repräsentative Aussage über den Nachweis von MAP in der „allgemeinen Bevölkerung“ zu erhalten. Da dies allein schon aus ethischen Gründen nicht möglich ist, sollte eventuell über eine globale oder zumindest weitläufig regionale Studie nachgedacht werden. Ein ähnliches Konzept wurde bereits in der Studie von Shivananda *et al.* (1996) zur Erfassung der Inzidenzen für Morbus Crohn unter gleichzeitiger Berücksichtigung geographischer Unterschiede durchgeführt. Wichtig wäre bei einer globalen Studie möglichst viele unterschiedliche Parameter des Probandenkollektives wie beispielsweise die ethnische Herkunft, der Wohnort (ländlich oder städtisch), das Alter oder der sozioökonomische Status zu erfassen, um alle Einflussfaktoren auf den Nachweis von MAP in MC-Patienten in Erwägung zu ziehen.

Die Einteilung der **Patientengruppen** erfolgte durch die am Universitätsklinikum Erlangen tätigen Gastroenterologen anhand der Anamnese, der Symptome und weiterer zur Verfügung stehender Daten des Patienten. Neben den im Fokus stehenden Morbus Crohn-Patienten, wurden auch Colitis ulcerosa-Patienten beprobt. Beide Krankheitsbilder gehören zur Gruppe der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. In der eigenen Studie wurden beide

Patientengruppen berücksichtigt, da zuweilen die Differenzierung nicht immer eindeutig ist. Jedoch war es möglich, die Patienten nach denen in der Koloskopie erhobenen makroskopischen und mikroskopischen Befunde nachträglich dem richtigen Krankheitsbild zuzuordnen. Die meisten Studien erfassen in ihrem Probandenkollektiv sowohl MC- als auch CU-Patienten (Füllgrabe, 2008; Tuci *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2015), doch es gibt auch zahlreiche Studien, in denen nur MC- und Kontrollpatienten untersucht wurden (Bull *et al.*, 2003a; Cheng *et al.*, 2005; Molicotti *et al.*, 2013). Selbst wenn die Durchführbarkeit einer Studie sich durch das Vorhandensein von zwei Patientengruppen vereinfacht und die Aussage der Ergebnisse damit eindeutiger ist, bietet die Erfassung beider CED-Gruppen – Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten – und der Kontrollpatienten möglicherweise ein differenzierteres Bild zum Nachweis von MAP/-DNA.

Bei der **Kontrollgruppe** handelte es sich hauptsächlich um Patienten die Polypen, Adenome, Karzinome, aber auch akute Entzündungsformen im Magen-Darm-Trakt aufwiesen. Aufgrund der Vielfältigkeit der beteiligten Krankheitsbilder lassen sich die Kontrollpatienten aus den verschiedenen Studien nur schwer miteinander vergleichen (Feller *et al.*, 2007). Jedoch ist ersichtlich, dass in zahlreichen Veröffentlichungen der Nachweis von MAP-DNA bei Kontrollpatienten gelang (Füllgrabe, 2008; Tuci *et al.*, 2011). In den eigenen Untersuchungen konnten bei 17 Kontrollpatienten (24,6 %) MAP-DNA nachgewiesen werden. Dieser Anteil positiver Kontrollpatienten ist vergleichbar mit dem Anteil aus der Studie von Bull *et al.* aus dem Jahr 2003 (26,5 %, 9 aus 24) bzw. Sechi *et al.* aus 2005 (20,6 %; 7 aus 34). Generell liegt der Anteil positiver Nachweise bei Kontrollpatienten niedriger als bei MC-Patienten (Bull *et al.*, 2003a; Sechi *et al.*, 2005a), wie das systematische Review und die Meta-Analyse von Feller *et al.* (2007) demonstriert. Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen unterstützen diese Aussage: Bei 38 von 80 MC-Patienten (47,5 %) gelang der Nachweis von MAP-DNA aus dem Darmgewebe.

Mit insgesamt **203 teilnehmenden Patienten** handelt es sich hier um eine Studie der oberen Größenordnung. Besonders angesichts der Probenentnahme, mehrere Biopsieschläge von mehreren Darmabschnitten zu tätigen, ist eine hohe Compliance der Patienten erforderlich. Daher ist es verständlich, dass in den meisten vergleichbaren Veröffentlichungen – Nachweis von MAP/-DNA aus humanen Darmgewebeproben – niedrigere Probenzahlen existieren (Waddell *et al.*, 2008). Die Anzahl der Probanden insgesamt, jedoch auch die Verteilung innerhalb der Patientengruppen, können einen Einfluss auf den Nachweis von MAP/-DNA und auf die Aussagekraft der daraus resultierenden Ergebnisse ausüben. In den eigenen Untersuchungen beteiligten sich 80 Patienten mit Morbus Crohn (39,4 %), 54 mit Colitis

ulcerosa (26,6 %) und 69 Patienten ohne chronisch-entzündliche Darmerkrankung (34,0 %). Je homogener die Verteilung ist und je höher gleichzeitig die Patientenzahlen sind, desto präziser und statistisch signifikanter ist die Aussage der Ergebnisse.

In der eigenen Studie wurden 36 **Mehrfachpatienten** integriert. Diese Patienten wurden innerhalb des einjährigen Zeitraumes der Studie mehrmals bei den Gastroenterologen des Universitätsklinikums Erlangen vorstellig. Bei jedem Untersuchungstermin wurde dem Patienten eine Probe entnommen. Für die Ergebnisse hatte diese mehrmalige Beprobung keine Auswirkung, da für die statistische Auswertung immer nur die Probe aus dem ersten Untersuchungstermin beim Gastroenterologen ausgewählt wurde. Diese According-to-protocol-Analyse schließt eine Verschiebung der Ergebnisse aus. Eine Verzerrung käme zustande, wenn beispielsweise bei einem Patienten, der insgesamt dreimal beprobt wurde, bei jeder Probe ein positiver Nachweis auf MAP-DNA vorläge und alle Ergebnisse in die Berechnung miteinbezogen werden. Für die Fragestellung in dieser Studie wird also nicht auf eine sogenannte Intention-to-treat-Analyse, in der alle Ergebnisse erfasst werden, zurückgegriffen. Es wäre jedoch interessant zu wissen, zu welchem Ergebnis man kommt, wenn alle Proben von einem Patienten berücksichtigt werden, und ob sich die Nachweishäufigkeit durch die unterschiedlichen Zeitpunkte der Entnahme verändert. Die Ergebnisse der Intention-to-treat-Analyse sollen separat veröffentlicht werden.

Das **Geschlecht** der Patienten könnte einen Einfluss auf den Nachweis von MAP ausüben. In der eigenen Studie mit insgesamt 203 Teilnehmern ist der Anteil männlicher ($n = 103$) und weiblicher ($n = 100$) Probanden annähernd gleich verteilt. Generell konnte unabhängig von der Patientengruppe (MC, CU, nCED) gleich häufig MAP-DNA in männlichen (20,2 %) und weiblichen (19,7 %) Patienten isoliert werden. Dies ist ein erster Hinweis, dass der Nachweis von MAP nicht geschlechtsspezifisch gebunden sein muss. Auch bei der Betrachtung der Gruppe der MC-Patienten ist ersichtlich, dass kein statistisch signifikanter Unterschied besteht: Es konnte bei exakt gleich vielen männlichen und weiblichen Probanden (23,8 %, 19 aus 80) MAP-DNA detektiert werden. Gemäß der Studie von Hulten *et al.* (2001) beeinflusst das Geschlecht nicht das Ergebnis des Nachweises von MAP-Zellen und -Sphäroblasten mittels *in situ*-Hybridisierung in Gewebeproben von MC-, CU- und Kontrollpatienten. Bezüglich des geschlechtsspezifischen Einflusses im Zusammenhang mit der Patientengruppe und dem Nachweis von MAP/-DNA liegen kaum Informationen aus Veröffentlichungen vor. Der Schwerpunkt liegt dagegen beispielsweise in der Ermittlung von Inzidenzen für Morbus Crohn und dem geschlechtsabhängigen Zusammenhang. Einigen Studien zufolge betrifft MC in Deutschland häufiger Frauen als Männer (Löffler und Glados, 1993; Shivananda *et al.*, 1996;

Timmer *et al.*, 1999). In dem systematischen Review von Molodecky *et al.* (2012), das 50 CU- bzw. 59 MC-Studien umfasst, die die Inzidenzrate nach Geschlecht geschichtet ermittelt haben, ist keine eindeutige geschlechtsspezifische Inzidenz zu erkennen. Die Ergebnisse sind zu inhomogen; das Verhältnis Frau:Mann schwankt zwischen 0,51 bis 1,58 bei CU-Studien und 0,34 bis 1,65 bei MC-Studien. Es wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass möglicherweise sowohl die Morbus Crohn- als auch Colitis ulcerosa-Erkrankung gleich häufig bei beiden Geschlechtern auftritt. In der eigenen Studie wurde bezüglich der Geschlechterverteilung in den Patientengruppen auf eine weitgehend homogene Auswahl geachtet.

Der **Altersdurchschnitt** in dieser Studie liegt bei 45 Jahren; der jüngste Patient ist 19 Jahre, der Älteste 92 Jahre. Das Alter der Probanden in der Studie von Füllgrabe (2008) lag zwischen 17 und 76 Jahren. Ihren Untersuchungen zufolge nahm die Nachweishäufigkeit von MAP-DNA mit steigendem Alter signifikant zu. Dem Ergebnis der multiplen logistischen Regressionsanalyse der eigenen Studie zufolge, beeinflusst das Alter der Patienten nicht signifikant die Nachweishäufigkeit von MAP/-DNA; eine Zunahme der Nachweishäufigkeit im Alter (unabhängig von der Patientengruppe) wurde nicht nachgewiesen. Wie zuvor beim Geschlecht sind Hulten *et al.* (2001) der Ansicht, dass das Alter nicht den Nachweis von MAP-Zellen und -Sphäroblasten mittels *in situ*-Hybridisierung in Gewebeproben von MC-, CU- und Kontrollpatienten beeinflusst.

Generell wird bei MC-Patienten von einem typischen zwei-gipfligen Altersverlauf bei der Inzidenz (Molodecky *et al.*, 2012) – zwischen 20 und 40 Jahren sowie bei Patienten über 60 Jahren – und von einem Erstdiagnosealter von 30 Jahren ausgegangen (Timmer *et al.*, 1999). Ebenfalls steht zur Diskussion, ob die Beteiligung von jüngeren Patienten (Kindern) an der Studie einen Einfluss auf die Nachweishäufigkeit ausüben würde. Gemäß der Studie von Kirkwood *et al.* (2009) kann auf eine mögliche Mitbeteiligung von MAP in frühen Stadien der Entwicklung von MC bei Kindern geschlossen werden. Dies wurde mittels kultureller Anzucht und nested PCR (IS900) in intestinalen Biopsaten sowie Blutproben von Kindern nachgewiesen. Dabei handelte es sich um Patienten zwischen einem Jahr und 17 Jahren, die an MC oder CU erkrankt waren bzw. um Kinder, die an keiner chronisch-entzündlichen Darmerkrankung litten und als Kontrollgruppe mitgeführt wurden. In der eigenen Studie konnte auf keinen zwei-gipfligen Altersverlauf bei Morbus Crohn-Patienten, aufgrund der homogenen Altersverteilung innerhalb der Patientengruppe, geschlossen werden. Der Einfluss auf die Nachweishäufigkeit von MAP/-DNA in der Altersgruppe unter 17 Jahren konnte nicht beurteilt werden, da der jüngste Patient in der Studie 19 Jahre alt war.

Entscheidend für die Studie ist, dass **keine Vorbehandlung** der Patienten mit einer antimykobakteriellen Therapie erfolgt ist. Dadurch könnte sonst die Nachweisrate von MAP sinken, was wiederum zu einer Verzerrung der Untersuchungsergebnisse führen würde. In der eigenen Studie wurde ein Patient ausgeschlossen, der eine antimykobakterielle Therapie erhalten hatte. Inwiefern andere Medikamente wie beispielsweise 6-Mercaptopurin und Methotrexate, Amino-Salicylsäure, Cyclosporin/Tacrolimus oder Biologika – die bekanntesten darunter sind Adalimumab und Infliximab – oder eine kombinierte Behandlung das Krankheitsbild des Morbus Crohns verbessern und gleichzeitig mögliche vorhandene MAP-Zellen zerstören, ist noch nicht ausreichend untersucht worden. Vermutlich ist nur eine Teilmenge an Patienten mit MC gut empfänglich für eine antimykobakterielle Therapie (Chiodini *et al.*, 2012). Dennoch muss dieser Aspekt beachtet und sicherheitshalber ausgeschlossen werden.

Nicht weiter ausgeführt werden der Einfluss der erhobenen **Komorbiditäten** der Probanden sowie die bisherigen **Krankenhausaufenthalte, Ernährungsgewohnheiten, Kontakte** zu bestimmten Tierarten oder betroffenen Patientengruppen, die **genetische Empfänglichkeit** und das individuelle **Immunsystem**. Einige der hier genannten Faktoren wurden separat mit Hilfe einer Fragebogenstudie, die im Rahmen der eigenen Untersuchungen etabliert wurde, ermittelt. Es ist geplant, die erhobenen Daten gesondert – nicht im Rahmen der Dissertation – zu veröffentlichen.

5.1.3 Probenkollektiv

Inwiefern das Probenkollektiv, darunter der Darmabschnitt, das Gewicht der Biopsatmasse und die Art des Entzündungscharakters der Probe, eine Rolle für den Nachweis von MAP bzw. -DNA spielt, wird im Folgenden diskutiert.

In den durchgeführten Untersuchungen wurde eine Entnahme von mindestens zwei Biopsaten pro **Darmabschnitt** bei den in der Studie involvierten MC-, CU- und Kontrollpatienten vorgegeben. Eine durchgehend stufenweise Beprobung der Darmabschnitte war nicht in allen Fällen möglich; über die Durchführbarkeit und den damit eventuell verbundenen Risiken entschied der Gastroenterologe, der die Koloskopie leitete. Daher konnte nicht jeder Darmabschnitt (terminales Ileum, Appendix/Caecum, Colon transversum, Colon sigmoideum, Colon ascendens, Colon descendens, Rectum) bei jedem Patienten biopsiert werden, was wiederum in keiner Gleichverteilung der beprobten Darmabschnitte resultierte. Aus dem Dickdarmabschnitt „Colon sigmoideum“ wurde bei allen Patienten am häufigsten entnommen (52,3 %, n = 195). Auch bei dem Nachweis von MAP-DNA dominierten die Proben aus dem Colon sigmoideum im Vergleich zu den anderen Darmabschnitten. Die Inhomogenität der Ergebnisse kann entweder darauf hindeuten, dass die Nachweisrate von MAP/-DNA in diesem Abschnitt tatsächlich höher liegt oder dass es sich um eine Verzerrung der Ergebnisse zugunsten des Colon sigmoideums durch die inhomogene Probenentnahme handelt. Sollte letzteres vorliegen, ist zu diskutieren, ob die Ergebnisse mit einem Faktor in Abhängigkeit der beprobten Darmabschnitte multipliziert werden sollten. Betrachtet man andere Studien wie die von Kirkwood *et al.* (2009), stellt man fest, dass auch in diesen Untersuchungen keine Normalverteilung bei den beprobten Darmabschnitten stattfand: So wurden aus dem Ileum von MC-Patienten 48 Biopsate, aus dem Colon sigmoideum nur acht entnommen. Dagegen fand bei der Kontrollgruppe keine Beprobung des gesamten Kolons – mit Ausnahme des Caecums – statt. Auch das Poolen und die grobe Einteilung von Proben in die Abschnitte Dünn- und Dickdarm (Sanderson *et al.*, 1992) sowie die Auswahl bestimmter Darmabschnitte wie terminales Ileum und/oder Colon (Bull *et al.*, 2003a) weisen darauf hin, dass nicht von allen Patienten alle Darmabschnitte vollständig vorliegen. Des Weiteren können in anderen Darmabschnitten als dem Colon sigmoideum MAP-Zellen in geringer Anzahl (vergleichbar mit dem paucibazillären Typ der Paratuberkulose) oder in einem Zustand vorliegen, in dem sie nur eingeschränkt zu detektieren sind (z. B. als Sphäroblasten).

Eine Verschiebung der Ergebnisse aufgrund der inhomogenen Beprobung der Darmabschnitte ist indirekt möglich. Aufgrund der oben genannten Punkte ist eine Normalverteilung bei der Probenahme zwar wünschenswert, aber in den meisten Fällen nicht möglich. Zudem ist der

Einfluss des Darmabschnittes laut der multiplen logistischen Regressionsanalyse in den eigenen Untersuchungen nicht signifikant.

Die Frage, ob die **Menge des Probenmaterials** einen Einfluss auf die Nachweisrate von MAP ausübt, wurde in keiner der bisherigen Studien diskutiert. Dabei ist es vorstellbar, dass eine gewisse Probenmenge erforderlich ist, um aussagekräftige Nachweise zu erhalten. In den eigenen Untersuchungen wurde in der Regel jeder Darmabschnitt mindestens zweimal biopsiert und anschließend gepoolt. Somit lag durchschnittlich 0,13 g Probenmaterial für die kulturelle Anzucht vor. Direkte Vergleiche mit anderen Studien sind kaum möglich, denn diese geben in ihren Veröffentlichungen keinen Aufschluss darüber, wieviel Material durchschnittlich bzw. pro beprobten Darmabschnitt entnommen wurde. Dabei könnte nicht nur die Qualität der Biopsate, sondern auch die Quantität eine Rolle spielen. In der multiplen logistischen Regressionsanalyse der eigenen Studie konnte bezüglich der Biopsatmasse kein statistisch signifikanter Einfluss auf den Nachweis von MAP festgestellt werden.

In den Untersuchungen wurden neben dem **Entzündungscharakter der Proben** (entzündlich oder nicht-entzündlich) auch der **Aspekt der Entzündungsbeurteilung** (makroskopisch oder mikroskopisch) betrachtet, um einen Hinweis zu erhalten, ob und in welcher Weise diese Parameter den Nachweis von MAP/-DNA beeinflussen. In den meisten Studien wird eine makroskopische Beurteilung der Proben aus den Darmabschnitten durchgeführt. Der – die Ileo- bzw. Koloskopie durchführende – Gastroenterologe teilt anhand der vorliegenden Gewebemerkmale und nach seinem Sachverständnis die zu entnehmende Probe als entzündlich oder nicht-entzündlich ein. Ein Vorteil dieser Studie, der durch den Vergleich zwischen makroskopisch und mikroskopisch/histologisch beurteilten Gewebeproben entsteht, ist die Ermittlung einer eindeutigen Aussage über den Entzündungscharakter der Proben. Dadurch gewinnt die Aussage mehr an Objektivität; der durchführende Gastroenterologe erhält ein Feedback über seine Einteilung und die teilweise subjektive Wahrnehmung des Beurteilers, die auf seinem Sachverständnis und seinen Erfahrungen begründet ist, kann zudem objektiviert werden. Generell wurde in den Untersuchungen eine hohe Übereinstimmung zwischen den am Universitätsklinikum Erlangen als makroskopisch sowie mikroskopisch entzündlich bzw. nicht-entzündlich charakterisierten Proben nachgewiesen. Nur 18,5 % der Proben konnten nicht übereinstimmend zugeordnet werden.

Die nach unterschiedlichem Entzündungscharakteren unterteilten Biopsate wurden nach der Entnahme – auch wenn es sich um denselben Darmabschnitt handelte – getrennt voneinander in Kryoröhrchen mit MGIT-Bouillon und Supplementen versandt und untersucht. In

zahlreichen Studien wurden die Proben nur auf eine Art des Entzündungscharakters beschränkt: hauptsächlich Proben aus entzündeten Regionen des Darmes (Bull *et al.*, 2003a; Sechi *et al.*, 2005a; Sechi *et al.*, 2005b). Oder es wurden, wie bei Kirkwood *et al.* (2009), sowohl Biopsate aus entzündlichen und nicht-entzündlichen Darmabschnitten entnommen, jedoch fand im Nachhinein keine differenzierte Betrachtung der Ergebnisse statt, da keine getrennte Untersuchung des Probenmaterials erfolgte. Teilweise stand auch die makroskopische und histologische Betrachtung des Probenmaterials im Vordergrund, aber ein Bezug auf MAP wurde nicht dargestellt (Jevon und Madhur, 2010).

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen weisen für makroskopisch eingeteilte Proben eine MAP-DNA-Nachweisrate von 19–21 %, für mikroskopisch eingeteilte Proben eine Nachweisrate von 20–21 %, unabhängig von den Patientengruppen, auf. Die Nachweisrate der als entzündlich und nicht-entzündlich eingeteilten Regionen ist somit aufgrund der hohen Übereinstimmung bei der makros- bzw. mikroskopischen Einteilung vergleichbar. Bei diesem Vergleich ist jedoch der Einfluss der Patientengruppen (MC, CU, nCED) nicht miteinberechnet. Wird dieser berücksichtigt, ergibt sich ein statistisch signifikanter Einfluss durch den Entzündungscharakter der mikroskopisch beurteilten Proben auf die Nachweishäufigkeit: Der Nachweis von MAP-DNA gelang bei nicht-entzündlich beurteilten Biopsaten häufiger als bei entzündlichen. Dies muss wiederum differenziert betrachtet werden, da die Anzahl nicht-entzündlicher Proben bei nCED-Patienten um ein Vielfaches (Faktor 3,6) höher lag als die Anzahl der entzündlichen. Dadurch könnte es zu einer Verzerrung der Ergebnisse kommen. Im Rahmen der eigenen Studie wurden Biopsate aus entzündeten Regionen entnommen. Bull *et al.* (2003a) empfahlen ebenfalls diese Art der Probenahme. Jedoch handelte es sich dabei nicht direkt um die entzündete Stelle, sondern um das unmittelbar umliegende Darmgewebe. Laut Füllgrabe (2008) könnten höhere Konzentrationen an MAP-Zellen in und um diese Bereiche vorliegen, zum einen aufgrund einer originären Entzündung, zum anderen durch den nicht aktiven Transport mittels infiltrierender Immunzellen. In der eigenen Studie wurden diese Aussagen berücksichtigt, und die Entnahme der als „entzündlich“ bezeichneten Proben erfolgte teilweise im entzündeten und teilweise in der Umgebung des Entzündungsherd. Folglich konnte allerdings kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Entzündungscharakteren (entzündlich bzw. nicht-entzündlich) beim Nachweis von MAP-DNA aus MC- und CU-Patienten ermittelt werden.

5.2 Einfluss der Methodik

Mit hoher Wahrscheinlichkeit spielt die ausgewählte Methode zum Nachweis von MAP/-DNA eine entscheidende Rolle für die Nachweishäufigkeit. Doch auch die Probenvorbereitung und -aufbereitung, die Dekontamination, die verwendeten Medien zur kulturellen Anzucht und die Bestätigungsverfahren können einen Einfluss ausüben.

Im Rahmen der eigenen Untersuchungen wurde zunächst zur **Probenvorbereitung** die Biopsate mechanisch mittels Mörser und Pistill sowie sterilem Seesand bearbeitet. Es musste darauf geachtet werden, dass nur die minimalste Menge an Seesand zugegeben wurde – gerade so viel, dass eine mechanische Aufbereitung möglich war. Bei einer höheren Zugabe konnte der Seesand ansonsten bei Aufwirbelungen der inkubierten Flüssigmedien MGIT und VIB mit tatsächlich vorliegenden MAP-Zellen verwechselt werden. Zudem konnte Seesand Artefakte bei der lichtmikroskopischen Untersuchung im Rahmen der Färbung nach Ziehl-Neelsen verursachen. Um der Seesand-Problematik entgegenzuwirken, wäre eine automatisierte mechanische Probenaufbereitung vorteilhaft, zum Beispiel mit Hilfe eines Ribolysers. Jedoch kann durch den Einsatz extremer Scherkräfte nicht garantiert werden, ob die Lebensfähigkeit eventuell vorhandener MAP-Zellen nach der Homogenisierung der Biopsate für die kulturelle Anzucht erhalten bleibt. Diese Art der mechanischen Aufbereitung ist bislang noch nicht für humanes Probenmaterial in Verbindung mit der kulturellen Anzucht von MAP getestet worden. In den Untersuchungen von Füllgrabe (2008) wurde zur Probenvorbereitung ebenfalls die mechanische Homogenisation mit Hilfe von Mörser, Pistill und sterilem Seesand verwendet. Dort wurde auf keine möglichen falsch-positiven Ergebnisse durch den Einsatz von Seesand verwiesen.

Generell stand den eigenen Untersuchungen wenig **Ausgangsmaterial** – durchschnittlich 0,13 g – zur Verfügung, wenn man im Vergleich die Anzahl der nachfolgenden Untersuchungen betrachtet. Das zuvor homogenisierte Probenmaterial wurde auf drei verschiedene Nährmedien für die kulturelle Anzucht aufgeteilt. Für die molekular-basierten und mikroskopischen Untersuchungen wurden jeweils kleine Teilmengen aus den beimpften Medien entnommen. Dieses war dem Umstand geschuldet, dass jeweils drei verschiedene Untersuchungszeitpunkte (nach der 12., 24. und 48. Inkubationswoche) vorlagen und aus diesem Grund das Probenmaterial nicht für einen Untersuchungsgang alleinig vollständig aufgebraucht werden durfte. Diese Vorgehensweise ließ sich nicht ändern. Nichtsdestotrotz muss berücksichtigt werden, dass eine Entnahme von Teilmengen bei einer gleichzeitig inhomogenen Verteilung von MAP-Zellen der Grund sein kann, warum keine reproduzierbaren

Ergebnisse erzielt werden konnten. Der Lösungsweg, bereits am Anfang mehr Probenmaterial einzusetzen, um einen „Verdünnungseffekt“ durch die Teilmengentnahme zu vermeiden, war sowohl aufgrund der Compliance der Patienten als auch wegen möglichen Komplikationen nicht durchführbar.

5.2.1 Dekontamination und kulturelle Anzucht

Die **Dekontamination** der Biopsate erfolgte im Rahmen der Probenvorbereitung mit NALC-NaOH-Lösung (N-Acetyl-L-Cystein-Natriumhydroxid), welches ursprünglich zur Dekontamination von humanen Sputumproben zum kulturellen Nachweis von *M. tuberculosis* eingesetzt wurde (Kubica *et al.*, 1963). In der Literatur wurde auch eine Anwendung von HPC (Hexadecylpyridiniumchlorid-Monohydrat) als Dekontaminationsmittel für humane Darmgewebeproben beschrieben (Graham *et al.*, 1987). Dafür verwendeten Graham *et al.* (1987) eine 0,1 %ige HPC-Lösung, in der das Probenmaterial einen Tag lang inkubierte. Bei Bradner *et al.* (2013b) dagegen lag die optimale HPC-Konzentration bei 0,75 % mit einem Inkubationszeitraum von fünf Stunden bei Raumtemperatur zur Dekontamination von Milchproben zum anschließenden kulturellen Nachweis von MAP. Diese Studien zeigen, dass neben der Auswahl des Dekontaminationsmittels auch die Konzentration und Einwirkzeit, abhängig von der Probenmatrix, für die Effizienz des späteren Nachweises entscheidend sein kann. In den eigenen Untersuchungen wurde die NALC-NaOH-Lösung eingesetzt. In der Studie von Schwartz *et al.* (2000) kam zur Dekontamination humaner Darmgewebeproben – sowohl Resektate als auch Biopsate – ebenfalls die NALC-NaOH-Lösung zur Anwendung: Es wurde ein Volumen von 0,5 ml NALC-NaOH zugegeben und 15 bis 20 Minuten inkubiert. Auch Bull *et al.* (2003a) verwendeten dasselbe Volumen und eine Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur, um humane Darmbiopsate zu dekontaminieren. Gemeinsam war zudem bei beiden Studien das gelegentliche Schwenken bzw. Aufschütteln der Proben während der Inkubation. Wichtig ist, dass die NALC-NaOH-Lösung direkt nach der Herstellung ohne nennenswerte Zeitverzögerung verwendet und gegebenenfalls verworfen wird, sollte die Lösung nicht an dem gleichen Tag aufgebraucht worden sein (Martin *et al.*, 1968). Nichtsdestotrotz steht die Frage im Vordergrund, ob ein vorgeschalteter Dekontaminationsschritt notwendig ist oder womöglich vorhandene MAP-Zellen geschädigt werden können, wodurch falsch-negative Ergebnisse entstehen. In der Dissertation von Füllgrabe (2008) wurde die Dekontaminationswirkung der NALC-NaOH-Lösung auf MAP untersucht. Ihren Untersuchungen zufolge verzögert sich das Wachstum von MAP in der Nährmedienbouillon zwischen einem bis maximal 14 Tage, und die Wachstumsrate sank

maximal um eine semiquantitative Stufe. Die Validierung zeigte, dass der Einsatz des Dekontaminationsmittels gerechtfertigt und unvermeidlich ist, um die Effizienz des Nachweises von MAP zu steigern. Die daraus resultierenden Folgen der Wachstumsverzögerung und Keimreduktion sind demgegenüber zu vernachlässigen.

Für die **kulturelle Anzucht** von MAP wurden in den eigenen Untersuchungen drei verschiedene Nährmedien, davon ein Agar sowie zwei Flüssigmedien, verwendet. Auch wenn die kulturelle Anzucht als Goldstandard gilt, ist sie mit einigen Nachteilen im Vergleich zu molekular-basierten Verfahren behaftet: In der Regel handelt es sich um einen **langwierigen Prozess** (Twort und Ingram, 1912; Bradner *et al.*, 2013a); es kann kein definierter Zeitraum angegeben werden. Frühestens nach acht bis zwölf Wochen können MAP-Kolonien detektiert werden. Dabei handelt es sich hauptsächlich um aus bovinem Kot oder Milch isolierte Stämme und darf nicht mit der Anzucht sogenannter Laborstämme verwechselt werden. Diese benötigen aufgrund der häufigen Subkultivierung unter Laborbedingungen in manchen Fällen lediglich vier Wochen für die Anzucht. Je länger der Inkubationszeitraum ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit einer **Kontamination**. Das Überwachsen vor allem mit Schimmelpilzen ist mit dem Einsatz eines ineffizienten Dekontaminationsmittels – sei es bezüglich der Konzentration, der Einwirkzeit oder dem verwendeten Mittel – verbunden. Auch in den eigenen Untersuchungen kam eine Überwucherung mit Schimmelpilzen vor: Dies ereignete sich vereinzelt beim beimpften Flüssigmedium VIB (Modifizierte Kalbfleischbrühe) bei einer 48 Wochen andauernden Inkubationszeit. Neben einer Trübung, die als Indikator für ein kulturelles Wachstum gilt und hier differenziert betrachtet werden musste, kam es auch zur Ausflockung größerer Fragmente von teilweise weiß-grünlicher Farbe. Diese Medien wurden nach Feststellen der Kontamination entsorgt. Womöglich existieren im VIB-Medium Zusätze, die die Wirkung der NALC-NaOH-Lösung beeinträchtigen, oder die Konzentration des Dekontaminationsmittels ist bei diesem Flüssigmedium nicht angemessen und müsste erhöht werden. Vorstellbar ist zudem, dass eine Kontamination als Folge der an mehreren unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten durchgeführten Teilmengenentnahme auftritt. Dabei ist jedoch anzumerken, dass die Entnahme immer unter der Sicherheitswerkbank durchgeführt und sowohl vor als auch nach der Entnahme die Öffnung der die Nährmedien enthaltenen Gefäße mittels Bunsenbrennerflamme dekontaminiert wurde. Statt einer Kontamination mit Schimmelpilzen wurde hingegen bei HEYM (Herrold's Egg Yolk Medium), welches zur Bestätigung positiver MAP-Ergebnisse aus molekular-basierten und lichtmikroskopischen Untersuchungen eingesetzt wurde, eher ein **Eintrocknen** des Festmediums registriert. Es ist davon auszugehen, dass es sich um einen Materialfehler bzw.

eine Undichtigkeit zwischen Deckel und Röhrchen handelt, denn trotz geschlossenem Deckel und dem Umwickeln des Verschlusses mit Parafilm trockneten gewisse Chargen des Festmediums bei längeren Inkubationszeiten ein. Dieser Vorgang konnte von der eigenen Seite her nicht weiter beeinflusst werden und war daher unvermeidbar.

Flüssigmedien wie die **MGIT-Bouillon** (Mycobacterial Growth Indicator Tube) sind teilweise sensitiver als Festmedien. Durch die inhaltliche Zusammensetzung und den Zusatz des OADC-Komplexes, des Antibiotika-Gemisches PANTA und den für MAP essentiellen Wachstumsfaktor Mycobactin J, ist die MGIT-Bouillon für die Anreicherung von MAP-Zellen sehr gut geeignet und wird als Nährmedium zum Nachweis von MAP in humanen Proben beispielsweise aus Brustmilch (Naser *et al.*, 2000b), Blut (Naser *et al.*, 2004), Biopsaten aus dem Mundbereich (Molicotti *et al.*, 2013) sowie Biopsaten aus dem Darmgewebe (Bull *et al.*, 2003a; Sechi *et al.*, 2005b; Füllgrabe, 2008) eingesetzt. Die Handhabung der MGIT-Bouillon gestaltet sich als einfach; die Auswertung erfolgt qualitativ: eine Trübung des Flüssigmediums sowie ein positives Fluoreszenzsignal unter UV-Licht sind Indikatoren für das Wachstum von MAP. In den eigenen Untersuchungen wurde letzteres jedoch nicht als kongruent zu den molekular-basierten Ergebnissen angesehen; zumeist konnte keine Fluoreszenz detektiert werden. Da MAP eine Tendenz zur Aggregatbildung besitzt (Songer und Post, 2005), ist ein regelmäßiges Schütteln der Bouillon indiziert, um ein Verklumpen zu vermeiden und stattdessen das Wachstum der MAP-Zellen zu fördern. In der eigenen Studie wurden die MGIT-Bouillons wöchentlich mittels Vortexer geschüttelt. Die Nachweisgrenze der kulturellen Anzucht in MGIT-Bouillon liegt gemäß der Studie von Grant *et al.* (2003) bei zehn MAP-Zellen pro Milliliter ultrahoherhitze Kuhmilch; mit einem vorgeschalteten Dekontaminationsschritt – in dem Fall mit Cetylpridiniumchlorid – erhöht sich die Nachweisgrenze um 100 bis 1000 MAP-Zellen pro Milliliter Milch. Das bedeutet im Umkehrschluss, dass die Nachweisrate für MAP nur dementsprechend hoch sein kann, wenn von vornherein höhere MAP-Konzentrationen im Probenmaterial vorliegen.

Vor dem Hintergrund, dass Zellwand-geschädigte Formen von MAP – sogenannte Sphäroblasten – insbesondere am Morbus Crohn-Geschehen beteiligt sein könnten, wurden in den eigenen Untersuchungen **Resuszitationsmedien** eingesetzt. Die Umwandlung Zellwand-intakter MAP-Formen in Sphäroblasten kann *in vitro* beispielsweise durch Lysozym provoziert werden. Doch auch in humanem Gewebe befindet sich physiologisch Lysozym (Klockars und Reitamo, 1975); zudem ließ sich dieses Enzym in hoher Konzentration in Granulomen von Morbus Crohn-Patienten nachweisen (Klockars *et al.*, 1977). Da sich Sphäroblasten nur sehr schwierig detektieren lassen, wurde die modifizierte Kalbfleischbrühe (VIB-Medium) sowie

der Reid's A Agar mit fetalem Kälberserum (RAF-Medium) verwendet, um eventuell als Sphäroblasten vorliegende MAP-Zellen über die kulturelle Anzucht wieder in Zellwand-intakte Formen zu überführen. In Vorversuchen (hier nicht beschrieben) wurden die beiden Medien bei *in vitro* hergestellten Sphäroblasten von *M. smegmatis* getestet (Nguyen *et al.*, 2011a; 2011b). Die Anzahl der *M. smegmatis*-Zellen sowie die Koloniemorphologie wurden vor der Provokation mit enzymatischen Zusätzen, nach der Sphäroblasten-Herstellung und anschließend nach der Resusztation in VIB- bzw. RAF-Medium mittels Zählkammer, (semi-)quantitativer Zählung auf den Festmedien HEYM (Herrold's Egg Yolk Medium) bzw. Middlebrook 7H11-Agar sowie licht- (Färbung nach Ziehl-Neelsen), fluoreszenz- (Auramin-Orange- und Acridin-Orange-Färbung) und elektronenmikroskopisch (Negativ-Kontrastierung sowie Ultradünnschnittverfahren) ermittelt. Die Untersuchungen ergaben, dass zwar statistisch signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Umwandlungsstufen vorhanden waren, jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Resusztationsmedien vorlag. Somit waren beide Medien gleichwertig. In den eigenen Untersuchungen wurden sowohl das VIB- als auch das RAF-Medium zur Resusztation eingesetzt, um jeweils die Vorteile des jeweiligen Mediums auszuschöpfen und um zu prüfen, ob die Erkenntnisse aus dem Vorversuch mit *M. smegmatis* auf MAP übertragbar sind.

Das **VIB-Medium** nach Markesich *et al.* (1988) enthält neben Kalbfleischbrühe auch 10 % Pferdeserum. Dieses soll eventuell vorhandene toxische Substanzen absorbieren und durch die im Serum enthaltenen Nährstoffe und anderen bisher nicht bekannten Faktoren das Wachstum von MAP-Zellen verstärken (Mattman *et al.*, 1960; Markesich *et al.*, 1988). Weiterhin beinhaltet das VIB-Medium Mycobactin J, der als essentieller Wachstumsfaktor für MAP gilt. Die Handhabung – die Herstellung und das Beimpfen – gestaltet sich beim VIB-Medium wie beim MGIT-Bouillon vergleichsweise einfach. Da es sich hier ebenfalls um ein Flüssigmedium handelt, muss, wie bei der MGIT-Bouillon, der Tendenz von MAP zur Aggregatbildung durch regelmäßiges Schütteln entgegengewirkt werden. Dieses geschah durch wöchentliches Schwenken der mit VIB-Medium versetzten Gewebekulturflaschen. Bei der anschließenden Auswertung handelte es sich um eine qualitative bzw. semiquantitative Aussage über das Wachstum von MAP: Eine zunehmende Trübung und Flockenbildung wurden als positive Indikatoren gewertet. Ein Nachteil des VIB-Mediums ist die zuvor bereits beschriebene Anfälligkeit für Kontaminationen, beispielsweise mit Schimmelpilzen, nach einer längeren Inkubationszeit. Neben der zu Beginn stattfindenden Dekontamination des Probenmaterials mit NALC-NaOH-Lösung wurden keine weiteren antibiotischen Zusätze zum Flüssigmedium gegeben, um die Begleitflora zu unterdrücken.

Im Gegensatz zum VIB-Medium gestaltet sich die Handhabung des *RAF-Mediums* nach Bull (2009; 2010) als schwierig: Bei der Beimpfung ist der Zeitpunkt wichtig, an dem der Agar für den Overlay die richtige Temperatur (60 °C) hat. Der geschmolzene Agar wird der Aliquot-Flüssig-Agar-Mischung beigemischt und in zwei Zügen auf das bereits in Gewebekulturflaschen vorbereitete feste RAF-Medium pipettiert. Es muss dabei zügig gearbeitet werden; ein direktes Verteilen des Aliquot-Agar-Gemisches durch leichtes Schwenken ist essentiell, da die Mischung schnell erstarrt. Zudem sollten sich keine Luftblasen bilden. Eventuell vorhandene Luftblasen wurden mit dem vorderen Teil einer sterilen Pipettenspitze entfernt. Die Temperatur des für den Overlay geschmolzenen Agars ist insofern entscheidend, da eine zu geringe Temperatur zu einer Klumpenbildung führt und damit keine gleichmäßige Verteilung des Aliquot-Agar-Gemisches mehr möglich ist. Eine zu hohe Temperatur dagegen könnte eventuell im Probenmaterial enthaltene MAP-Zellen abtöten und die im Agar vorhandenen antibiotischen Substanzen inaktivieren. Gleichzeitig bergen die zahlreichen Schritte der Beimpfung die Gefahr einer Kontamination. Andererseits waren die Vorteile – die Darstellung der Koloniemorphologien und die Möglichkeit einer quantitativen Auswertung – für die zusätzliche Wahl dieses festen Resusziationsmediums für den kulturellen Nachweis von MAP ausschlaggebend. Die Verwendung von fetalem Kälberserum, dem essentiellen Wachstumsfaktor Mycobactin J und einem Gemisch antibiotischer Zusätze zur Unterdrückung der Begleitflora sowie weitere Inhaltsstoffe im RAF-Medium begünstigen nicht nur das Wachstum von MAP, sondern auch die Resuszipation eventuell vorhandener Sphäroblasten. Bei der Auswertung muss beachtet werden, dass der zur Homogenisierung der Biopsate eingesetzte Seesand Schlieren auf dem RAF-Medium verursachen und damit die Identifizierung vor allem kleinerer Kolonien erschweren kann. Aufgrund dessen sollte die Verwendung des sterilen Seesandes sparsam erfolgen. Bei der Abnahme von Kolonien vom Festmedium mittels Plastiköse muss man Vorsicht walten lassen, da der Agar eine sehr weiche Konsistenz besitzt. Die MAP-Kolonien können sowohl direkt auf dem Agar als auch als stecknadelspitzgroße bis 1 mm kleine Kolonien unter dem Overlay nachgewiesen werden. Befinden sich die Kolonien unter der oberen Agarschicht, muss diese für bestimmte Untersuchungen (Färbung nach Ziehl-Neelsen, Subkultivierung auf HEYM) abgenommen bzw. die Kolonien ausgestanzt werden. Präzises und steriles Arbeiten ist dabei essentiell, um die (kleine) Öffnung der Gewebekulturflasche, in der sich der Agar befindet, nicht zu kontaminieren. Zusätzlich wird die Öffnung jeweils vor und nach einer Entnahme mittels Bunsenbrennerflamme dekontaminiert.

Generell bietet die kulturelle Anzucht einen entscheidenden Vorteil gegenüber den molekular-basierten Untersuchungen: Sie ist eine zuverlässige Methode, um lebensfähige MAP-Zellen nachzuweisen (Kralik *et al.*, 2012). In den eigenen Untersuchungen wurde eine vermehrte Trübung bzw. Ausflockung in den Flüssigmedien (MGIT-Bouillon und VIB-Medium) sowie die Ausbildung von Kolonien auf dem Festmedium (RAF-Medium) als positives Wachstum von MAP-Zellen angesehen. Auf dem RAF-Medium selbst wurde lediglich bei einer Probe MAP-spezifische Kolonien nachgewiesen. Entweder lagen bereits bei der Probenentnahme keine lebensfähigen MAP-Zellen im Biopsat vor oder die Anzahl der lebensfähigen Zellen war so gering, dass sie unterhalb der Nachweisgrenze der kulturellen Anzucht auf dem RAF-Medium lag, wodurch kein Wachstum zu verzeichnen war.

Durch den zusätzlichen Einsatz der Resuszitationsmedien in dieser Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass die **Art des Nährmediums** einen Einfluss auf die Nachweisrate von MAP-DNA hat. Es wurde häufiger MAP-DNA bei aus VIB- bzw. RAF-Medium stammenden Proben detektiert. Dieser Unterschied zur MGIT-Bouillon war statistisch signifikant. Der Einsatz von Resuszitationsmedien ist folglich empfehlenswert; jedoch konnte nicht zwischen einer tatsächlichen Resuszitation von Sphäroblasten und einem möglichen überwuchernden Wachstum Zellwand-intakter Formen unterschieden werden.

In dieser Studie wurden die beimpften Nährmedien (MGIT-Bouillon, VIB- und RAF-Medium) bis zu fast einem Jahr inkubiert. Drei verschiedene Zeitpunkte – **12., 24. und 48. Inkubationswoche** – wurden für die Entnahme einer Teilprobe für die molekular-basierten Untersuchungen festgelegt. Die Dauer der Inkubationszeiten richtete sich nach Daten aus bisherigen Veröffentlichungen. In Brustmilch von Morbus Crohn-Patienten konnte bereits nach zwölf Wochen kultureller Anzucht in MGIT-Bouillon MAP nachgewiesen werden (Naser *et al.*, 2000b). Für die Untersuchungen von Füllgrabe (2008) wurden Biopsate aus dem humanen Darmgewebe zwölf Wochen lang in MGIT-Bouillon inkubiert. Generell wurden jedoch längere Inkubationszeiten (bis zu einem Jahr) bei Biopsaten aus dem humanen Darmgewebe registriert (Schwartz *et al.*, 2000; Bull *et al.*, 2003a). Während ein Nachweis von MAP-DNA aus MGIT-Bouillon mittels IS900-PCR innerhalb von zehn bis zwölf Wochen aus Resektaten möglich war, gelang ein positiver Nachweis bei Biopsaten frühestens nach einer 40-wöchigen Inkubation (Schwartz *et al.*, 2000). Der Studie von Bull *et al.* (2003a) zufolge konnte bei 60 % der von MC-Patienten entnommenen Proben (n = 15) MAP-DNA isoliert werden, wenn die kulturelle Anzucht in MGIT-Bouillon mehr als 38 Wochen andauerte. Somit wurde geschlussfolgert, dass die 38. Inkubationswoche der optimale Zeitpunkt für die Entnahme einer Probe für die molekular-basierten Untersuchungen sei. In den eigenen Untersuchungen konnte

diese Aussage nur zum Teil untermauert werden: Der MAP-Nachweis fiel nach der 12. und 24. Inkubationswoche – unabhängig vom eingesetzten Nährmedium – im Vergleich zur 48. Woche statistisch signifikant häufiger positiv aus. Dabei gelang der positive Nachweis tendenziell häufiger bei den Resusziationsmedien VIB und RAF. Dass in den ersten beiden Inkubationszeiträumen vermehrt MAP-DNA detektiert wurde, könnte auch an der Probenentnahme aus den Medien für die Untersuchung liegen: Durch die nur sehr geringe Probenmenge zwischen 0,5 ml und 1,5 ml im Vergleich zum Gesamtvolumen des Nährmediums, kann es zu einer Verzerrung der Ergebnisse durch die nicht ausreichend repräsentative Stichprobenahme kommen. Allerdings konnte auch nicht die gesamte Probe für eine Untersuchung verwendet werden, da genügend Material für weitere Untersuchungen bei den nachfolgenden Inkubationszeiträumen vorhanden sein musste.

5.2.2 Färbung nach Ziehl-Neelsen

Die Färbung nach Ziel-Neelsen beruht auf dem Nachweis der Mykolsäureschicht der Bakterienzellwand. Hier wird das Charakteristikum der Mykobakterien – die Säurefestigkeit – genutzt, um diese lichtmikroskopisch sichtbar zu machen. In den eigenen Untersuchungen konnten nur in 1,4 % der Präparate säurefeste Stäbchen ($n = 1.218$) detektiert werden. Die geringe Anzahl positiver Ergebnisse aus der Färbung nach Ziehl-Neelsen im Vergleich zu den Ergebnissen der molekular-basierten Untersuchungen kann an mehreren Faktoren liegen. Im Besonderen ist auf die **niedrige Sensitivität** (19–49 %) des mikroskopischen Verfahrens hinzuweisen. Ist die Bakterienlast in dem Probenmaterial zu gering bzw. liegt sie unterhalb der Nachweisgrenze von ca. 10^4 KbE/ml, ist ein Nachweis von säurefesten Stäbchen kaum möglich (El-Zaatari *et al.*, 2001; Suerbaum *et al.*, 2012). Ein schwerer Durchfall bei der Paratuberkulose kann laut Gilardoni *et al.* (2012) die Konzentration an MAP-Zellen reduzieren; die Hypothese des Verdünnungseffektes ist möglicherweise übertragbar auf CED-Patienten mit entsprechender Klinik.

Das geringe **Probenvolumen** aus der MGIT- bzw. VIB-Bouillon für die Untersuchung und die in Flüssigmedien vorliegende Tendenz zur Aggregatbildung können ebenfalls eine wichtige Rolle spielen. Liegt hingegen nur eine geringe Anzahl an MAP-Zellen in den Anreicherungen vor, reicht die Sensitivität der Färbemethode nicht aus, um diese zu erfassen. Aufgrund dessen wurde in den eigenen Untersuchungen bevorzugt, nur bei Koloniewachstum auf RAF-Medium Probenmaterial für die Färbung zu entnehmen bzw. eine Spülung bei verdächtigem Koloniematerial auf dem Festmedium vorzunehmen.

Die **Auswertung** der lichtmikroskopischen Untersuchung gestaltete sich als schwierig: Zum einen handelte es sich um eine sehr langwierige Prozedur. Um ein entsprechend negatives Ergebnis herausgeben zu können, musste eine möglichst hohe und ausreichende Anzahl an Feldern mikroskopiert werden. Zum anderen musste darauf geachtet werden, dass keine säurefesten Stäbchen durch den eingesetzten Seesand übersehen wurden. Der Seesand erscheint lichtmikroskopisch als kristalline, durchscheinende Strukturen von transparenter oder auch rosafarbener bzw. bläulicher Farbe und kann sich teilweise selbst überlagern. Die Interpretation der Ergebnisse aus Kultur und Mikroskopie wurde von Homuth (2002) für das Krankheitsbild der Paratuberkulose sehr gut beschrieben. Dieses Schema kann nach eigener Einschätzung zum Teil auch auf humane Proben übertragen werden. **(1)** Übereinstimmend positive Ergebnisse in der kulturellen Anzucht (bestätigt mit molekular-basierten Verfahren) und in der lichtmikroskopischen Untersuchung weisen auf eine Beteiligung von MAP an dem Krankheitsgeschehen hin. **(2)** Positive kulturelle Ergebnisse ohne Nachweis säurefester Stäbchen deuten ebenfalls auf eine Beteiligung von MAP, jedoch in geringerer Konzentration, hin. **(3)** Sind dagegen säurefeste Stäbchen mit der Färbung nach Ziehl-Neelsen, jedoch kein Koloniewachstum nach kultureller Anzucht sichtbar, können nicht mehr lebensfähige MAP-Zellen vorliegen. **(4)** Können sowohl mittels mikroskopischer als auch kultureller Untersuchungen keine positiven Ergebnisse detektiert werden, besteht die Möglichkeit, dass keine oder eine unter der Nachweisgrenze der Untersuchungsmethode liegende Konzentration an MAP-Zellen vorliegt oder dass MAP zu dem Zeitpunkt der Probenahme nicht nachweisbar ist.

Um bei den eigenen Untersuchungen falsch-positive und falsch-negative Ergebnisse bei der lichtmikroskopischen Untersuchung auszuschließen, wurden bei jedem Färbvorgang **Kontrollen** mitgeführt. Es wurde jeweils ein Objektträger mit einer Negativkontrolle (*Staphylococcus aureus*) und einer Positivkontrolle (MAP-Referenzstamm 44135) beimpft und gefärbt. Zusätzlich wurde zur Kontrolle der Funktionstüchtigkeit der Färbelösungen jeweils ein leerer, nicht beschichteter Objektträger als Sterilkontrolle mitgeführt.

Da die Färbung nach Ziehl-Neelsen auf einer intakten Mykolsäureschicht der Bakterien beruht, können **Zellwand-geschädigte Formen** von MAP nicht mit dieser Färbemethode detektiert werden (El-Zaatari *et al.*, 2001; Pierce, 2009). Erschwerend kommt hinzu, dass Sphäroblasten kulturell nicht so einfach zu erfassen sind (Naser *et al.*, 2014). Bereits 1986 wiesen Chiodini *et al.* MAP-Sphäroblasten in humanem Darmgewebe von MC-Patienten nach, die mittels der Färbung nach Ziehl-Neelsen nicht detektiert werden konnten (Chiodini *et al.*, 1986). Die Studien von Sechi *et al.* (2005b) und Schwartz *et al.* (2000) zeigten auf, dass Ziehl-Neelsen-

negative Proben im Anschluss an eine Inkubationszeit von 14 Wochen bis zu einem Jahr im Flüssigmedium (u. a. MGIT-Bouillon) säurefeste Stäbchen aufwiesen, die lichtmikroskopisch ermittelt werden konnten. Dabei handelte es sich bei dem Probenmaterial um humane Gewebeproben aus dem Darm von MC- und CU-Patienten bzw. Kontrollpatienten. Die Tatsache, dass sich Sphäroblasten mit Hilfe von Resusziationsmedien wieder in Zellwandintakte Formen umwandeln lassen, wurde in den eigenen Untersuchungen genutzt. Entsprechende Vorversuche mit *M. smegmatis* als Modell zur Validierung der Resusziationsmedien – VIB- und RAF-Medium – im Zusammenhang mit den licht- und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen (Färbung nach Ziehl Neelsen, Auramin-Orange- bzw. Acridin-Orange-Färbung) wurden durchgeführt (hier nicht beschrieben). Es kann jedoch zu keinem Zeitpunkt ausgeschlossen werden, dass der Nachweis der „Resusztation“ von noch vorhandenen Zellwand-intakten Formen maskiert wird.

5.2.3 Molekular-basierte Untersuchungsverfahren

Die beiden molekular-basierten Untersuchungsverfahren – nested PCR und Triplex-PCR – wurden in den eigenen Untersuchungen mit der kulturellen Anzucht der humanen Darmbiopsate gekoppelt.

In der eigenen Studie gelang der Nachweis von MAP-DNA bei 121 von 3.648 Einzelergebnissen (3,3 %). Die hohe Anzahl der Einzelergebnisse generiert sich aus den Kombinationsmöglichkeiten einer Probe eines Patienten in drei verschiedenen Nährmedien bei drei unterschiedlich langen Inkubationszeiträumen und zwei molekular-basierten Untersuchungsmethoden. Werden die Einzelergebnisse auf den einzelnen Patienten zurückgeführt, konnte in 39,9 % der 203 Proben MAP-DNA detektiert werden. Die relativ **niedrige Nachweisrate von MAP-DNA** kann durch mehrere Faktoren zustande kommen: Bereits die **Teilprobenentnahme** kann eine wichtige Rolle spielen. Da nur ein kleines Aliquot aus den entsprechenden Nährmedien – MGIT- und VIB-Bouillon – entnommen wurde bzw. die Spülung des RAF-Mediums mit einer geringen Menge PBS-Lösung erfolgte, könnte aufgrund der inhomogenen Verteilung der MAP-Zellen und deren Tendenz zur Aggregatbildung entweder keine MAP-Zellen oder lediglich eine sehr niedrige MAP-Konzentration (unterhalb der Nachweisgrenze der molekular-basierten Verfahren) in dieser Teilmenge vorliegen. Durch die für die Aufbereitung der Aliquote notwendigen zusätzlichen **Wasch- und Zentrifugationsschritte** können weitere MAP-Zellen „verloren“ gehen. Bei der anschließenden **DNA-Isolierung** muss auf einen ausreichenden Aufschluss, vor allem hinsichtlich der komplexen mykobakteriellen Zellwandstruktur, geachtet werden (Bartos *et al.*, 2006). In den

eigenen Untersuchungen wurde das DNeasy® Blood & Tissue Kit angewendet, welches unter anderem für die DNA-Isolierung aus (tierischem) Gewebe validiert wurde. Das Vorhandensein von **Inhibitoren** in der PCR kann die Nachweisrate für Bakterien negativ beeinflussen (Bartos *et al.*, 2006; Singh und Gopinath, 2011). Insbesondere bei MAP liegt die Anzahl gehemmter Reaktionen höher als bei anderen Subspezies-Formen von *M. avium*: Unter anderem trägt der komplexe Aufbau der Zellwand sowie die verschiedenen, anspruchsvollen Nährmedien, deren Inhaltsstoffe durch entsprechende Waschschriffe vor der DNA-Extraktion essentiell entfernt werden müssen, seinen Teil bei (Bartos *et al.*, 2006). Um falsch-negative Ergebnisse durch PCR-Inhibitoren zu vermeiden, wurden in den eigenen Untersuchungen bei jedem Extraktionsvorgang eine positive Aufbereitungskontrolle (ein Aliquot aus einem mit MAP-Referenzstamm 44135 inokulierten Medium) mitgeführt. Zusätzlich wurde eine negative Aufbereitungskontrolle eingesetzt, die aus einem mit NaCl-Lösung beimpften Medium entnommen wurde. Aus Praktikabilitätsgründen wurde pro Extraktionsvorgang nur aus einem der beimpften Nährmedien (MGIT-Bouillon, VIB- oder RAF-Medium) die positive bzw. negative Aufbereitungskontrolle bereitgestellt; aus welchem die Kontrollen stammten, wurde turnusmäßig festgelegt. Liegt von Anfang an im Probenmaterial eine **geringe Anzahl an Bakterien** vor und fällt diese gleichzeitig unter die Nachweisgrenze der molekular-basierten Verfahren, konnten sie in den eigenen Untersuchungen nicht erfasst werden. Die Hypothese, dass beim Menschen insbesondere der paucibazilläre MAP-Typ vorliegt, bei dem nur wenige bis keine Erreger im Gewebe vorhanden sind, und dagegen bei Tieren mit Paratuberkulose zumeist der pluribazilläre Typ, ist nicht unbegründet (Abubakar *et al.*, 2008; Singh und Gopinath, 2011). Laut Sanderson *et al.* (1992) kann MAP am MC-Geschehen der Patienten aus Südingland beteiligt sein, auch wenn der Nachweis der MAP-DNA-Konzentration in humanen Darmgewebeprobe n 10^5 - bis 10^7 -fach niedriger ausfällt als bei Paratuberkulose-infizierten Tieren. Die falsch-negativen Ergebnisse in den molekular-basierten Verfahren, die durch die geringe Konzentration an MAP-Zellen zustande kommen, müssen von den tatsächlich negativen Ergebnissen, bei denen im vornherein kein MAP im Probenmaterial vorlag, differenziert werden. Technisch wäre dies nur durch eine Sensitivitätssteigerung der ohnehin hohen Sensitivität der molekular-basierten Untersuchungsverfahren oder durch Kombination weiterer Nachweismethoden (z. B. *in situ*-Hybridisierung) möglich.

Um **falsch-positive Ergebnisse** bei den molekular-basierten Verfahren **auszuschließen**, wurden im Rahmen der eigenen Untersuchungen Aufbereitungskontrollen mitgeführt. Neben den zuvor erwähnten Negativ- und Positivkontrollen aus den entsprechenden Nährmedien wurde zusätzlich die PBS-Lösung, die sowohl für das Abschwemmen vom RAF-Medium als

auch bei den Waschschritten der für die PCR bereitgestellten Aliquote aus den Nährmedien verwendet wurde, untersucht. Es wurde die Sterilität der PBS-Lösung geprüft („Leerwert PBS“), um sicherzustellen, dass keine Kontamination mit MAP durch die Lösung erfolgte. Des Weiteren wurden – unabhängig davon, ob es sich um die nested oder die Triplex-PCR handelte – Extraktionskontrollen mitgeführt. Der bovine MAP-Stamm K10 wurde als Positivkontrolle eingesetzt; die Leerwerte bestanden aus einer Kombination des jeweiligen Mastermixes, der bei der PCR verwendet wurde, und Nuklease-freiem Wasser.

Der **Vergleich** der bei der Studie eingesetzten **nested und Triplex-PCR** zum Nachweis von MAP-DNA wies auf, dass die Art der molekular-basierten Untersuchungsmethode eine signifikante Rolle spielt. MAP-DNA konnte mittels nested PCR zum einen signifikant häufiger aus Resuszitationsmedien isoliert werden und zum anderen signifikant häufiger zu den frühen Inkubationszeiten (12 > 24 > 48 Wochen) detektiert werden. In der Studie von Füllgrabe (2008) wurde dagegen eine gleichmäßige Verteilung der Nachweisraten zwischen nested PCR und Triplex-PCR festgestellt: In 17 (7,1 %) von 240 Ansätzen wurde übereinstimmend MAP-DNA detektiert, in jeweils zehn der Ansätze (4,2 %) gelang der positive Nachweis entweder mittels nested PCR oder mittels Triplex-PCR. Die bei Füllgrabe (2008) eingesetzten Primerpaare bzw. Marker für die molekular-basierten Untersuchungen entsprechen denen der eigenen Studie. Jedoch gingen im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen bei der Ergebnisangabe sämtliche Proben mit ein: Die im Doppelansatz beimpfte MGIT-Bouillon sowie mehrere Proben desselben Patienten aus verschiedenen Darmabschnitten wurden als Einzelproben gewertet. Dadurch könnte eine Verzerrung der Ergebnisse stattfinden. Ungeachtet einer möglichen Verzerrung, kann die in der Studie von Füllgrabe gleichmäßige Verteilung der Nachweisraten aus den molekular-basierten Verfahren nicht mit den Ergebnissen aus den eigenen Untersuchungen bestätigt werden: In der eigenen Studie wurde mittels nested PCR häufiger MAP-DNA detektiert als mit der Triplex-PCR.

Bei der angewendeten **nested PCR** handelte es sich um eine konventionelle PCR mit zwei Primerpaaren zur Detektion des MAP-spezifischen Insertionselements IS900. Diese nested PCR wurde bei zwei Studien zuvor zum Nachweis von MAP-DNA aus humanen Darmbiopsaten angewendet (Bull *et al.*, 2003a; Füllgrabe, 2008). Die **niedrige Nachweisgrenze** von einem Genom pro PCR-Lauf und die **hohe Sensitivität** durch das Vorkommen einer Vielzahl an IS900-Kopien im Genom sind entscheidende Vorteile für diese PCR-Methode (Bull *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2005). Ebenfalls wurden zahlreiche Studien veröffentlicht, die eine IS900-PCR mit nur einem Primerpaar durchführten (Sanderson *et al.*, 1992; Sechi *et al.*, 2005a; Sechi *et al.*, 2005b; Carvalho *et al.*, 2015).

Die hohe – auch in der eigenen Studie vorliegende – Nachweisrate von MAP-DNA mittels IS900-PCR-Verfahren, kann jedoch auf falsch-positiven Ergebnissen begründet sein. Andere mit MAP nah verwandte Mykobakterien-Spezies können ebenfalls **IS900** oder sogenannte **IS900-like Sequenzen** in ihrem Genom beinhalten (Harris und Barletta, 2001; Englund *et al.*, 2002). Feller *et al.* (2007) behaupten in ihrem Review, dass es zur Zeit keinen vollständig spezifischen MAP-Nachweis mit der Insertionssequenz IS900 gäbe, und deshalb ein positives MAP-DNA-Ergebnis nicht gleichzeitig mit einer MAP-Infektion gleichzusetzen sei. Um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden, kann die nested IS900-PCR mit einem weiteren molekular-basierten Verfahren im Anschluss kombiniert werden – beispielsweise mit der in der eigenen Studie durchgeführten Sequenzierung zur Bestätigung der MAP-spezifischen IS900-Sequenz. Jedoch konnte die Sequenzierung nicht systematisch durchgeführt werden, da lediglich ein positives Ergebnis vorlag. Ein weiterer Lösungsansatz wäre der Einsatz der von Bull *et al.* (2000) entwickelten Multiplex-PCR (MPIL) zum Nachweis der flankierenden Regionen von 14 IS900-Regionen, wobei sieben der IS900-Loci in allen 81 getesteten MAP-Stämmen konserviert vorlagen.

Des Weiteren müssen falsch-positive Ergebnisse, die durch **Kreuzkontaminationen im Labor** entstehen können, ausgeschlossen werden können. Dieses ist bei Laboren zu beachten, die Proben tierischen Ursprungs (z. B. Kot-, Milch-, oder Gewebeproben) auf MAP/-DNA untersuchen. Eine Kontamination der humanen Proben galt es im eigenen Institut durch entsprechendes Qualitätsmanagement (z. B. räumliche Trennung) zu vermeiden (Singh *et al.*, 2008; Singh und Gopinath, 2011). Bei einer nachträglichen Überprüfung konnten Laborkontaminationen ausgeschlossen werden: Es ergaben sich bei der Durchsicht entsprechender Protokolle von zeitgleichen MAP-Untersuchungen – in Rinderkot und in humanen Darmgewebeproben – im Institut keinerlei Hinweise für eine Kreuzkontamination. Generell ist die nested PCR aufgrund der zahlreichen Schritte in der Handhabung anfälliger für mögliche Kreuzkontaminationen als die Real Time-PCR, bei der die Untersuchung vollständig im geschlossenen System stattfindet.

Die in der Studie angewendete **Triplex-PCR** nach Schönenbrücher *et al.* (2008) ist eine Real Time-PCR und weist die Genabschnitte *f57* und *ISMav2* nach. Die DNA-Fragmente liegen nur in einer bzw. in drei Kopien im MAP-Genom vor. Gleichwohl ergab sich bei der Triplex-PCR eine **Spezifität** von 98,9 % und eine **Sensitivität** von 94,4 %. Die analytische Nachweisgrenze 1 pg DNS pro Ansatz entspricht der Nachweisgrenze der nested PCR nach Bull *et al.* (2003a); somit sind die beiden molekular-basierten Verfahren direkt miteinander vergleichbar. In der Studie von Füllgrabe (2008) wurde geschlussfolgert, dass – wie zuvor bei der nested PCR beschrieben – die Nachweisraten gleichmäßig verteilt seien. Wird die Nachweisrate Patienten-

bezogen betrachtet (n = 32) war kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Markern IS900 und *f57* bzw. IS900 und IS*Mav2* erkennbar. Erfolgt die Betrachtung Probenbezogen (n = 240) konnten statistisch signifikante Unterschiede bei der Nachweisrate festgestellt werden: Während die beiden Marker *f57* und IS900 vergleichbare Ergebnisse aufwiesen, fiel die Nachweisrate mit dem Marker IS*Mav2* dagegen deutlich ab.

In den eigenen Untersuchungen konnten signifikant häufiger positive MAP-DNA-Nachweise mittels nested PCR erzielt werden (in Abhängigkeit der Inkubationszeiten und der eingesetzten Nährmedien). In den systematischen Reviews von Waddell *et al.* (2008; 2015) wurden bei den Fall-Kontroll-Studien, die das Vorkommen von MAP mittels PCR nachwies, hauptsächlich IS900-PCR-Verfahren mit einem oder zwei Primerpaaren aufgeführt und verglichen. Ebenso lag in dem Review und der Meta-Analyse von Abubakar *et al.* (2008) der Schwerpunkt im Vergleich von molekular-basierten Studien mit IS900 als Zielsequenz. Zusätzlich wurde in der Meta-Analyse die *in situ*-Hybridisierung als direkter Nachweis von MAP-DNA aus humanen Gewebeproben mit den PCR-Verfahren verglichen, wobei letztere bezüglich der Nachweisraten besser abschnitten. Somit bleibt nur die Studie von Füllgrabe (2008) zum direkten Vergleich der molekular-basierten Ergebnisse aus den eigenen Untersuchungen. Die Problematik der **Aggregatbildung** von MAP-Zellen spielt bei der Triplex-PCR, die wie alle Real Time-PCR-Verfahren eine Aussage zur Höhe der vorliegenden MAP-Konzentration trifft, keine Rolle. Somit hat ein eventuelles Vorliegen von MAP-Aggregaten in den Nährmedien und in den entnommenen Teilproben keinen Einfluss auf die Nachweisrate. Sowohl **falsch-negative Ergebnisse**, die bei einer Bildung von Primer-Dimeren auftreten können, als auch **falsch-positive Ergebnisse** können durch den Einsatz der internen Amplifikationskontrolle nach Abdulmawjood *et al.* (2002) in der Triplex-PCR nach Schönenbrücher *et al.* (2008) ausgeschlossen werden. In Anbetracht der zuvor genannten Aspekte und im Vergleich zur nested PCR, erscheint die in den eigenen Untersuchungen eingesetzte Triplex-PCR möglicherweise nicht für den Nachweis von MAP-DNA in humanen Darmgewebeproben geeignet.

5.2.4 Bestätigung der Ergebnisse mittels kultureller und molekular-basierter Verfahren

Im Anschluss eines positiven Nachweises von MAP-DNA mittels nested bzw. Triplex-PCR und/oder von säurefesten Stäbchen nach der Ziehl-Neelsen-Färbung wurde eine Subkultur auf **Herrold's Egg Yolk Medium** durchgeführt. Laut Hermon-Taylor und Bull (2002) ist MAP sehr anspruchsvoll und insbesondere humane MAP-Stämme lassen sich auf konventionellen Medien schlecht anzüchten. Das Eigelb-basierte Festmedium HEYM ist aufgrund seiner

Zusammensetzung für die kulturelle Anzucht von MAP geeignet. Die HEYM-Röhrchen wurden in der Regel mindestens zwölf Wochen inkubiert. Den schriftlichen Ausarbeitungen des Arbeitskreises für veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik (AVID) zufolge, soll das Festmedium bis zu drei Monate bei bovinen Proben und bei Proben anderer Wiederkäuer (Schafe, Ziegen, Wildwiederkäuer) bis zu neun Monate inkubiert werden (Anonymous, 2007). Da der Nachweis bei humanen Proben sich bisher als langwierig erwies, sollte mit längeren Inkubationszeiten gerechnet werden. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ; die Morphologie der MAP-Kolonien konnte ebenfalls auf dem Festmedium differenziert betrachtet werden. Wichtig ist, dass die Anzahl der vorhandenen MAP-Zellen auf HEYM nicht unterschätzt wird. Eine nachgewiesene Kolonie auf dem Agar (später umgerechnet in eine Kolonie-bildende Einheit) kann aus mehr als einer MAP-Zelle entstanden sein; diese Aussage wird durch das Entwickeln unterschiedlicher Wachstumsraten und -größen auf dem gleichen Agar unterstützt (Pickup *et al.*, 2005; Kralik *et al.*, 2012). Aus den MAP-DNA-positiv nachgewiesenen Nährmedien wurde jeweils eine Subkultur auf HEYM angelegt. Bei den 128 angelegten HEYM-Röhrchen konnte tatsächlich nur bei zwei Röhrchen MAP-spezifisches Wachstum detektiert werden, die zudem von dem gleichen Patienten nur zu unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten stammten. 30 weitere Proben wiesen MAP-verdächtiges Koloniematerial auf, jedoch konnte nur bei einem HEYM-Röhrchen MAP mittels nested PCR bestätigt werden. Im Vergleich zu den Ergebnissen der vorangegangenen molekular-basierten Untersuchungen wurden somit deutlich weniger Proben mit positivem MAP-Wachstum mittels kultureller Anzucht auf HEYM detektiert. Dies kann zum einen mit der niedrigen Sensitivität der Methode begründet werden: Die Nachweisgrenze der kulturellen Anzucht auf HEYM beträgt in etwa 10^4 Kbe/ml (Whipple *et al.*, 1991; Bradner *et al.*, 2013b). Liegen von vornherein nur wenige MAP-Zellen im humanen Darmgewebe vor, wird es kaum möglich sein, diese über die kulturelle Methode nachzuweisen. Zum anderen kann mit den molekular-basierten Methoden, insbesondere mit der nested und Triplex-PCR, nicht zwischen lebensfähigen und nicht-lebensfähigen MAP-Zellen unterschieden werden. Die kulturelle Anzucht dagegen weist nur lebensfähige MAP-Zellen nach. Als weiteren kritischen Punkt ist das geringe Inokulationsvolumen zu erwähnen: Es wurden nur Aliquots von 100 μ l aus der originären MGIT-Bouillon bzw. dem VIB-Medium entnommen oder eine Abschwemmung mit 500 μ l PBS von dem originären RAF-Medium durchgeführt. Es konnten verständlicherweise nicht mehr die gleichen Proben verwendet werden, die zur Aufbereitung der molekular-basierten Untersuchungen zur Verfügung standen. Durch die Tendenz von MAP in Flüssigmedien Aggregate zu bilden, ist möglicherweise ein positiver Nachweis trotz ausreichendem Durchmischen vor der Teilprobenentnahme aus der MGIT-Bouillon bzw. aus dem VIB-

Medium nicht reproduzierbar. Eventuell kann vom RAF-Medium direkt Koloniematerial für die Subkultur auf HEYM abgenommen werden, aber dieses liegt nicht immer vor. Eine weitere Schwierigkeit ergab sich bei der Auswertung der HEYM-Röhrchen. Bei einigen Proben wurde dunkelgrünes, griseliges Material auf der Agaroberfläche festgestellt. Die Differenzierung, ob es sich tatsächlich um Kolonien oder um begleitendes Probenmaterial (u. a. Seesand) handelt, konnte nur mittels lupenmikroskopischer Betrachtung im Zusammenhang mit einer molekular-basierten Untersuchung erfolgen. Es ist durchaus empfehlenswert, alle auf HEYM vorhandenen Kolonien, und gegebenenfalls verdächtiges Koloniematerial, mittels molekular-basierter Untersuchungen – in dieser Studie mittels nested und Triplex-PCR – zu bestätigen, um eine eindeutige Identifizierung von MAP zu gewährleisten (Anonymous, 2007). Bereits in dem Kapitel 5.2.1 wurde auf das Austrocknen und Schrumpfen des Agars bei längerer Inkubationszeit und die damit verbundene Tatsache, dass diese HEYM-Röhrchen (5 von 128) nicht mehr der Auswertung zur Verfügung stehen, hingewiesen.

Die letztendliche Bestätigung des zuvor in Kultur, Mikroskopie und molekular-basierten Untersuchungen (nested und Triplex-PCR) einzig ermittelten positiven Ergebnisses erfolgte in der eigenen Studie mittels **Sequenzierung**. Dabei wurde eine spezifische 853 bp große IS900-Sequenz aus dem MAP-positiven CU-Patienten und aus dem (bovinen) MAP-Referenzstamm 44135 isoliert und miteinander verglichen. Die Ergebnisse der Sequenzierung deuten darauf hin, dass der nachgewiesene humane Stamm eine hohe Ähnlichkeit zu bovinen MAP-Stämmen aufweist. In der Literatur wurde diese Ähnlichkeit ebenfalls beschrieben: Die MAP-Isolate von MC-Patienten gehören nachgewiesenermaßen (IS900-RFLP-Typisierung) alle zum C-Typ/Typ II; bovine MAP-Stämme besitzen ein weites Wirtsspektrum (Scanu *et al.*, 2007; Singh und Gopinath, 2011). Laut dem systematischen Review und der Meta-Analyse von Waddell *et al.* (2015) wiesen molekular-epidemiologische Studien nach, dass humane und bovine MAP-Isolate aus derselben geographischen Region sich gleichen. In einer von Wynne *et al.* (2011) durchgeführten Genomanalyse von sieben humanen MAP-Stämmen, die aus MC-Patienten isoliert wurden, und bovinen sowie ovinen MAP-Stämmen wurde festgestellt, dass sich die humanen Stämme sowohl untereinander genetisch als auch phylogenetisch einem bovinen MAP-Stamm ähneln. Letztendlich kann nur eine vollständige Genomsequenzierung („Whole genome sequencing“) der MAP-positiven Probe des CU-Patienten mit anschließendem Vergleich anderer bereits sequenzierter MAP-Stämme animalen (z. B. bovinen) oder humanen Ursprungs einen Aufschluss über die Originalität des Stammes bieten. Laut Singh und Gopinath (2011) unterliegt MAP einem ständigen Prozess der Veränderung und dadurch kann mit der Entwicklung typenspezifischer Eigenschaften humaner MAP-Stämme gerechnet werden.

5.3 Nachweis von MAP in humanen Darmgewebeproben

In den eigenen Untersuchungen gelang der **Nachweis von MAP-DNA** bei 38 MC-Patienten (47,5 %), bei 26 CU-Patienten (48,1 %) sowie bei 17 Kontrollpatienten (24,6 %) aus humanen Darmbiopsaten. Den Ergebnissen zufolge konnte MAP-DNA häufiger bei CU- als bei MC-Patienten detektiert werden, jedoch war dieser Aspekt nicht statistisch signifikant. Signifikant dagegen war, dass der positive Nachweis von MAP-DNA häufiger bei CED-Erkrankten – sowohl MC- als auch CU-Patienten – als bei Kontrollpatienten auftrat. Füllgrabe (2008) wies in ihren Untersuchungen bei vier MC-Patienten (33,3 %), zwei CU-Patienten (25,0 %) und bei neun Kontrollpatienten (75,0 %) MAP-DNA – ebenfalls aus humanen Darmbiopsaten isoliert – nach. Somit wurde bei dieser Studie dominierend MAP-DNA bei nCED-Patienten nachgewiesen. In der Studie von Bernstein *et al.* (2003) konnte bei sechs der Kontrollpatienten (31,6 %) MAP-DNA im Vergleich zu einem positiven Befund bei einem CU-Patienten (3,6 %) bzw. keinem bei 24 MC-Patienten festgestellt werden. Andere Studien wiesen ebenfalls MAP-DNA bei Kontrollpatienten nach, jedoch war der Anteil nicht dominierend (Bull *et al.*, 2003a; Sechi *et al.*, 2005b; Kirkwood *et al.*, 2009).

Aus den 15 positiven mittels molekular-basierten Verfahren ermittelten Proben von Füllgrabe (2008) konnte lediglich bei einer Probe eines Kontrollpatienten (6,7 %) **Kolonwachstum auf HEYM** nachgewiesen und mittels Sequenzanalyse als MAP bestätigt werden. In den eigenen Untersuchungen wurde bei 128 angelegten HEYM-Röhrchen letztendlich nur bei einem CU-Patienten MAP-spezifisches Koloniewachstum (ursprünglich vom RAF-Medium aus der 24. und 48. Inkubationswoche, im Doppelansatz angelegt) detektiert. Die Probe eines Kontrollpatienten wies MAP-verdächtiges Koloniematerial auf und bestätigte sich auch als MAP in der nested PCR. Es wurde bei keiner der beiden Studien lebensfähige MAP-Zellen aus Proben von MC-Patienten nachgewiesen.

Sowohl in der eigenen als auch in der Studie von Füllgrabe (2008) gelang der Nachweis von MAP-DNA aus Proben des **Kolons** auffallend häufig. Vornehmlich betraf dies jedoch die Proben von Kontrollpatienten bei der Studie von Füllgrabe (2008): In zehn von 18 Proben (55,6 %) wurde MAP-DNA in Biopsaten des Colon transversum nachgewiesen – damit statistisch signifikant häufiger als in anderen Darmabschnitten. Bei MC-Patienten dagegen wurde MAP nahezu gleich häufig bei allen untersuchten Darmabschnitten (terminales Ileum, Appendix, Colon transversum, Colon sigmoideum) detektiert. In den eigenen Untersuchungen wurde bei 13 MC-Patienten (17,8 %), 18 CU-Patienten (34,0 %) sowie elf Kontrollpatienten (15,9 %) MAP-DNA aus Biopsaten des Colon sigmoideum isoliert. Auch wenn der positive

Nachweis bei Proben aus dem Colon sigmoideum im Vergleich zu den Proben aus dem terminalen Ileum, Caecum, Colon transversum, Colon ascendens und Colon descendens dominierte, hat der beprobte Darmabschnitt keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Nachweisrate. Gemäß dem pathologischen Bild von Morbus Crohn müssten – auch wenn grundsätzlich alle Darmabschnitte betroffen sein können – Entzündungen vor allem im Übergangsbereich vom Ileum zum Caecum vorhanden sein (Sands und Siegel, 2010; Akbariqomi und Heidari, 2014). Demnach sollten sich auch in dem Bereich vermehrt MAP-Zellen, die im kausalen Zusammenhang mit der Entzündung stehen oder durch infiltrierende Immunzellen dorthin gelangt sind, nachweisen lassen; diese Hypothese konnte jedoch nicht im Rahmen der eigenen Studie mittels Nachweis von MAP-DNA bestätigt werden.

In den eigenen Untersuchungen beeinflussten die Biopsatmasse, der Darmabschnitt und der makroskopisch beurteilte Entzündungscharakter der Probe die Nachweisrate von MAP-DNA nicht signifikant. Auch das Alter und das Geschlecht der Patienten stellten keinen signifikanten Einfluss dar. Im Gegensatz dazu beeinflusste das **Alter der Patienten** in der Studie von Füllgrabe (2008) die Ergebnisse signifikant: Mit zunehmendem Alter der Probanden stieg ebenfalls die Häufigkeit des Nachweises von MAP mittels molekular-basierter Untersuchungsmethoden. Dies konnte trotz ähnlicher Altersspannweite nicht belegt werden (in eigener Studie: jüngster Patient 19 Jahre, ältester Patient 92 Jahre, Altersdurchschnitt 45 Jahre; in Studie von Füllgrabe (2008): jüngster Patient 17 Jahre, ältester Patient 76 Jahre, Altersdurchschnitt 44 Jahre).

Die laut Molodecky *et al.* (2012) zweigipflige Kurve für die altersspezifische Inzidenz von Morbus Crohn (20- bis 40-Jährige und Patienten ab 60 Jahren) oder überhaupt eine Tendenz zu einer höheren Inzidenz bei einer bestimmten Altersgruppe (Timmer *et al.*, 1999) im Zusammenhang mit dem Nachweis von MAP-DNA konnte in den eigenen Untersuchungen nicht nachgewiesen werden.

Generell sind die Ergebnisse unterschiedlicher Studien zum Nachweis von MAP aus humanen Gewebeproben inkonsistent und ein Vergleich aufgrund **unterschiedlicher Studienbedingungen** nur schwer möglich. Beginnend bei der Anzahl der beteiligten Probanden und deren Verteilung in den verschiedenen Patientengruppen (MC, CU, nCED) divergieren die Studien: Bei Bull *et al.* (2003a) wurden annähernd gleich viele Patienten beprobt (37 MC-Patienten versus 34 Kontrollpatienten), doch es fand keine Beteiligung von CU-Patienten statt wie auch bei den Studien von Cheng *et al.* (2005) und Sechi *et al.* (2005b). Studien von Sanderson *et al.* (1992) und Kirkwood *et al.* (2009) integrierten CU-Patienten, jedoch im Vergleich zu den anderen Patientengruppen in geringerem Maße. Die homogene

Verteilung der Patientengruppen ist entscheidend, um eine Verzerrung der Ergebnisse zu vermeiden bzw. um ein differenziertes Bild über das Vorkommen von MAP-DNA darzustellen. Die Studie von Füllgrabe (2008) bietet eine annähernde Gleichverteilung der Patientengruppen, jedoch ist die Anzahl der Probanden mit insgesamt 32 Patienten sehr niedrig und die Ergebnisse möglicherweise in Bezug auf die Nachweishäufigkeit von MAP-DNA in den einzelnen Patientengruppen nicht aussagekräftig. Im Gegensatz dazu bietet die eigene Studie neben einem annähernd gleich hohen Anteil von Patienten pro Gruppe (39,4 % MC-, 26,6 % CU- und 34,0 % Kontrollpatienten), ein beachtliches Kollektiv von 230 Probanden. Die Verteilung der Patienten bezüglich Alter und Geschlecht sind in den Studien unterschiedlich; der Einfluss dieser Parameter wurde bereits in Kapitel 5.1.2 diskutiert.

Doch auch die medikamentöse Vorbehandlung der Patienten, die individuellen Voraussetzungen und die beeinflussenden Umwelt- und Risikofaktoren können für die Ergebnisse zum Nachweis von MAP in MC-Patienten eine wichtige Rolle spielen (siehe Kapitel 2.5.3.1 und 2.5.3.2). Diese Parameter finden in dem Zusammenhang – auch wenn sie im Rahmen der Patientendaten teilweise erhoben werden – zu wenig Beachtung in den Studien. Zu der eigenen Fall-Kontroll-Studie wurde zeitgleich eine Fragebogenstudie zu eben diesen Faktoren erhoben, um mögliche Einflussfaktoren zu ermitteln (hier nicht beschrieben). Die Datenauswertung wird demnächst erfolgen und anschließend veröffentlicht.

Die Heterogenität der Studien zeigt sich auch in deren Fragestellungen und Nachweismethoden: Soll MAP vermehrt aus MC-Patienten nachgewiesen werden, welche Probenmatrix liegt zu Grunde (Gewebe-, Blut-, Milch- oder Stuhlproben), sollen molekular-basierte oder kulturelle Nachweismethoden angewendet werden, welche Nährmedien werden eingesetzt, mit welchen (antibiotischen) Zusätzen und mit welcher Inkubationszeit, ist eine Dekontamination der Proben zuvor erforderlich und sollen mehrere Untersuchungsmethoden kombiniert werden, um die Sensitivität bzw. Spezifität zum Nachweis von MAP zu erhöhen. Beispielsweise führte der Nachweis von MAP-DNA direkt aus Darmbiopsaten mittels PCR (IS900-PCR bzw. nested IS900-PCR) bei Carvalho *et al.* (2015) zu einem positiven (20,0 %) und bei Bull *et al.* (2003a) zu 34 positiven MC-Patienten (91,9 %). Eine annähernd gleiche Verteilung positiver MAP-DNA-Ergebnisse aus MC- und CU-Patienten (47,5 % bzw. 48,1 %) konnte in den eigenen Untersuchungen ermittelt werden. Auch wenn der Odds Ratio bei den Patientengruppen CU zu MC bei 1,31 lag, war die Tendenz zu einer höheren Nachweisrate bei CU-Patienten statistisch nicht signifikant. In den Reviews und Meta-Analysen von Naser *et al.* (2014) und Waddell *et al.* (2008; 2015) sind sowohl Studien gelistet, die aufgrund ihrer Ergebnisse entweder einen oder keinen Zusammenhang zwischen MAP und Morbus Crohn vermuten lassen. In keiner der Studien wurde auf eine höhere Nachweisrate von MAP-DNA bei CU-Patienten hingewiesen.

Es kann sich demnach um einen Zufallsbefund handeln oder dass eine diesbezügliche Aussage nur mit adäquat hohen Probenzahlen von CU-Patienten – die in den meisten Studien nicht gegeben sind – möglich ist. Der Odds Ratio der mit den Kontrollpatienten verglichenen Gruppen lag in den eigenen Untersuchungen unter 1,0 (nCED:MC 0,24 bzw. nCED:CU 0,19); im Umkehrschluss dazu ließen sich bei Patienten, die an einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung litten, statistisch signifikant häufiger MAP-DNA nachweisen. Die systematischen Reviews und Meta-Analysen von Feller *et al.* (2007) und Waddell *et al.* (2015) wiesen einen Odds Ratio von 7,01 (18 Fall-Kontroll-Studien) bzw. 5,24 (40 Studien) beim Nachweis mittels molekular-basierter Verfahren und einen Odds Ratio von 8,44 (15 Studien) beim Nachweis von MAP mittels kultureller Verfahren aus humanen Proben von MC-Patienten nach. Ein Zusammenhang zwischen MAP und Morbus Crohn kann möglicherweise bei einer Subpopulation der Patienten vorliegen.

Mit Hilfe der eingesetzten Resusziationsmedien (VIB- und RAF-Medium) sollte in der eigenen Studie eine potentielle Beteiligung von **Sphäroblasten** am MC-Geschehen untersucht werden. Ein direkter Nachweis von Sphäroblasten aus dem humanen Darmgewebe ist nur schwer und mit einer sehr langen Inkubationsdauer von Monaten bis Jahren auf anspruchsvollen Nährmedien für die kulturelle Anzucht von MAP verbunden (siehe Kapitel 2.1.3.2). Jedoch gelang der Nachweis von MAP-Sphäroblasten auch ohne Einsatz von Resusziationsmedien bei vereinzelt Studien; dabei ließen sich bei Kontrollpatienten keine oder lediglich eine geringe Anzahl Zellwand-geschädigte MAP-Formen detektieren (Graham *et al.*, 1987; Markesich *et al.*, 1988; Wall *et al.*, 1993; Hulten *et al.*, 2001). Dies spricht für eine denkbare Beteiligung von MAP-Sphäroblasten bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. Zudem konnte in den Studien von Graham *et al.* (1987) und Markesich *et al.* (1988) tendenziell häufiger Zellwand-geschädigte MAP-Formen aus kultureller Anzucht humaner Darmresektate als -biopsate von CED-Patienten nachgewiesen werden. Durch die Verwendung der beiden Resusziationsmedien in den eigenen Untersuchungen sollten Sphäroblasten miterfasst werden. Allerdings kann die Resusziationsrate in den entsprechenden Nährmedien nicht eingeschätzt werden. Folglich kann die in der Studie registrierte höhere Nachweisrate von MAP-DNA aus dem VIB- bzw. RAF-Medium im Vergleich zur MGIT-Bouillon durch eine echte Umwandlung der MAP-Sphäroblasten in Zellwand-intakte Formen, allerdings auch durch ein gesteigertes Wachstum bereits vorliegender intakter MAP-Zellen infolge der Inkubation in den Resusziationsmedien entstanden sein. Diesbezüglich müssen weitere Untersuchungen unternommen werden, um die Zellwand-intakten von den Zellwand-geschädigten Formen sicher zu unterscheiden. Die Tatsache, dass potentiell resuszierte MAP-Zellen aus den

Resusziationsmedien bei der anschließenden Beimpfung auf HEYM kein Koloniewachstum aufwiesen, könnte in der unterschiedlichen Sensitivität der Nährmedien begründet sein. Die Verwendung von Resusziationsmedien zur Verbesserung der Nachweisrate von MAP-DNA aus humanen Darmgewebeproben bleibt dennoch empfehlenswert.

Basierend auf den eigenen Ergebnissen kann nicht davon ausgegangen werden, dass MAP das alleinige ätiologische Agens für die Entstehung von Morbus Crohn ist. Für eine Mitbeteiligung von MAP an diesen Krankheitsgeschehen spricht jedoch die hohe Nachweisrate von MAP-DNA bei CED-Patienten. Mit den eigenen Untersuchungen konnte nicht geklärt werden, ob MAP primär für die Entzündungen im Darmbereich verantwortlich ist, durch infiltrierende Entzündungszellen dahin transportiert wurde, aufgrund einer Darmschädigung sekundär nachweisbar ist oder im Darmgewebe als persistierender Sphäroblast vorliegt. Diese Fragestellungen müssen in einem separaten Untersuchungsansatz bearbeitet werden. Feller *et al.* (2007) schlugen prospektive statt retrospektive Fall-Kontroll-Studien vor, um festzustellen, ob MAP bereits vor dem Erkrankungsbeginn oder erst nach dem Vorliegen von entzündetem Darmgewebe nachzuweisen ist. Die Forschergruppe Hines II und Styer (2003) stellten die Hypothese auf, dass aufgrund der bei Sphäroblasten auftretenden morphologischen und chemischen Abweichungen gegenüber Zellwand-intakten MAP-Zellen die Diagnose, Virulenz, Pathogenität, Immunantwort sowie das Ausmaß der Erkrankung bei Mensch und Tier signifikant beeinflusst werden können. Auch stehen die Überlegungen im Raum, dass MAP vermutlich nur als Kommensale auftritt und erst durch eine individuelle Immundefizienz als Trigger für MC fungiert, oder dass eine MAP-Infektion nur bei einem Bruchteil der MC-Patienten eine Erkrankung auslösen kann (Molodecky und Kaplan, 2010; Rosenfeld und Bressler, 2010).

Aus den Daten der bisherigen Veröffentlichungen kann davon ausgegangen werden, dass die Ätiologie des Morbus Crohns aus einem komplexen Zusammenspiel verschiedenster – genetischer, immunologischer, mikrobiologischer, sozioökonomischer und umweltbedingter – Faktoren besteht und MAP potentiell an diesem multifaktoriellen Geschehen beteiligt sein könnte (Economou und Pappas, 2008; Akbariqomi und Heidari, 2014; Naser *et al.*, 2014; Waddell *et al.*, 2015).

- Die Färbung nach Ziehl-Neelsen mit anschließender lichtmikroskopischer Untersuchung eignet sich aufgrund der hohen Nachweisgrenze von 10^4 KBE/ml und der schwierigen Interpretation bei der Auswertung nicht zum Nachweis von MAP aus humanen Gewebeproben.
- Der Einsatz von Resusziationsmedien ist empfehlenswert: Die Nachweisrate von MAP-DNA beim VIB- und RAF-Medium liegt im Vergleich zum konventionellen Medium (MGIT-Bouillon) höher. Eine Mitbeteiligung von MAP-Sphäroblasten ist nicht auszuschließen. Die Resuszipation von Zellwand-geschädigten Formen kann jedoch nicht von einem möglichen überwuchernden Wachstum Zellwand-intakter Formen differenziert werden.
- Bei den molekular-basierten Untersuchungsmethoden liegt die Nachweisrate von MAP-DNA bei der nested PCR im Vergleich zur Triplex-PCR höher. Die nested PCR ist – trotz höherer Kontaminationsanfälligkeit – der Triplex-PCR für den Nachweis von MAP-DNA aus humanen Darmgewebeproben vorzuziehen.
- Einflussfaktoren auf die Nachweisrate von MAP-DNA sind die Art der Patientengruppe (CU > MC >> nCED) und der mikroskopisch beurteilte Entzündungscharakter der Probe (nicht-entzündlich > entzündlich). Weitere Faktoren konnten in den eigenen Untersuchungen nicht ermittelt werden.
- Auch wenn die nested bzw. Triplex-PCR auf das Vorhandensein von MAP-DNA insbesondere bei CED-Patienten hinweisen, kann nicht auf die Lebensfähigkeit der Bakterien geschlossen werden. Nur bei einer Probe wurden vermehrungsfähige MAP-Zellen (auf HEYM und RAF-Medium) nachgewiesen.
- Bei dem in allen Untersuchungsmethoden positiv nachgewiesenen MAP-Stamm aus einem Colitis ulcerosa-Patienten handelt es sich um einen humanen Stamm mit hoher Ähnlichkeit zu bovinen MAP-Stämmen.
- Der Mensch ist ein Fehlwirt für MAP – dies lässt sich aus der geringen Nachweisrate lebensfähiger MAP-Zellen schlussfolgern. Die Hypothese, dass MAP am MC-Geschehen beim Menschen beteiligt ist, kann somit nicht verifiziert werden.

Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* (MAP) ist der Erreger der Paratuberkulose, einer chronischen, nicht therapierbaren Darmentzündung bei Wiederkäuern. Insbesondere Rinder sind für eine MAP-Infektion empfänglich (Ayele *et al.*, 2001). MAP konnte jedoch auch bei Wildwiederkäuern (Pavlik *et al.*, 2000a), anderen Wildtieren (Beard *et al.*, 2001a), Dipteren (Fischer *et al.*, 2001) und sogar Primaten (Münster *et al.*, 2013) nachgewiesen werden. Die Detektion von MAP gelang ebenfalls aus humanen Darmgewebe- und Blutproben (Chiodini *et al.*, 1984b; Naser *et al.*, 2004). Der Nachweis von MAP/-DNA bei Morbus Crohn-Patienten lässt eine Mitbeteiligung des Erregers am Krankheitsgeschehen vermuten. Andererseits werden zahlreiche andere Einflussfaktoren, beispielsweise Alter und genetische Prädisposition der Patienten, diskutiert (Akbariqomi und Heidari, 2014). Umstritten ist weiterhin, ob Zellwandgeschädigte Formen von MAP – sogenannte Sphäroblasten – an der Ätiologie des Morbus Crohns beteiligt sind.

Um ein mögliches zoonotisches Potential von MAP besser abschätzen zu können, wurde eine Fall-Kontroll-Studie in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Erlangen zur Untersuchung humaner Darmbiopsate auf das Vorliegen von MAP-Zellen durchgeführt. Dafür wurden kulturelle, mikroskopische und molekular-basierte Nachweismethoden eingesetzt. Zusätzlich wurden sogenannte Resuszitationsmedien einbezogen, um der Fragestellung einer möglichen Mitbeteiligung von MAP-Sphäroblasten nachzugehen.

Insgesamt wurde in 39,9 % der 203 Proben MAP-DNA mittels molekular-basierter Untersuchungsmethoden – der nested PCR nach Bull *et al.* (2003b) zum Nachweis der IS900-Sequenz und der Triplex-PCR nach Schönenbrücher *et al.* (2008) zum Nachweis der Marker *f57* und *ISMav2* mit interner Amplifikationskontrolle – detektiert. Der Nachweis von MAP-DNA aus humanen Darmbiopsaten gelang bei 47,5 % der Morbus Crohn (MC)-Patienten (38 aus 80), bei 48,1 % der Colitis ulcerosa (CU)-Patienten (26 aus 54) sowie bei 24,6 % der Kontrollpatienten ohne chronisch-entzündliche Darmerkrankung (17 aus 69). Die nested PCR wies eine höhere Nachweisrate für MAP-DNA aus humanen Darmgewebeprobe als die Triplex-PCR auf und ist dieser vorzuziehen.

Mit Hilfe der Resuszitationsmedien (VIB- und RAF-Medium) wurde statistisch signifikant häufiger MAP-DNA nachgewiesen als mit der MGIT-Bouillon. Demzufolge ist eine Beteiligung von MAP-Sphäroblasten nicht auszuschließen und der Einsatz von Resuszitationsmedien empfehlenswert. Jedoch konnte bei der Verwendung dieser Medien nicht unterschieden werden, ob die Anreicherung durch eine tatsächliche Resuszitation von

Sphäroblasten oder durch eine Überwucherung bereits in der Probe vorliegender, intakter MAP-Zellen begründet ist.

Die Nachweisrate von MAP-DNA ist in den kürzeren Inkubationszeiträumen (12 > 24 > 48 Wochen) und bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (MC und CU) statistisch signifikant höher. Das Alter und Geschlecht der Patienten, die Biopsatmasse, der beprobte Darmabschnitt wie auch der makroskopisch beurteilte Entzündungscharakter der Biopsate haben keinen Einfluss auf die Nachweisrate. Die als nicht-entzündlich mikroskopisch beurteilten Proben beeinflussten hingegen die MAP-DNA-Nachweisrate (nicht-entzündlich > entzündlich).

Anhand der Färbung nach Ziehl-Neelsen mit anschließender lichtmikroskopischer Untersuchung konnten in acht von 1.218 Präparaten (0,7 %) säurefeste Stäbchen eindeutig dargestellt werden. Aufgrund der hohen Nachweisgrenze von 10^4 KBE/ml und der schwierigen Interpretation bei der Auswertung eignet sich die Färbemethode nicht zum Nachweis von MAP in humanen Darmgewebeproben.

Aus einem CU-Patienten konnte MAP isoliert und auf Herrold's Egg Yolk Medium (HEYM) kultiviert werden, die darauffolgende Sequenzierung ergab Homologien zu anderen humanen und bovinen MAP-Stämmen. Insgesamt wurden nur in einer Probe vermehrungsfähige MAP-Zellen nachgewiesen (auf HEYM und RAF-Medium). Trotz positiver Nachweisrate von MAP-DNA bei MC- und CU-Patienten kann nicht auf die Lebensfähigkeit der Bakterien geschlossen werden und somit wiederum nicht auf eine potentielle Infektion mit MAP.

Die Beteiligung von MAP am Morbus Crohn-Geschehen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Denn zum einen liegen widersprüchliche Ergebnisse vor: In der Studie von Bull *et al.* (2003a) wurde MAP in 14 Darmgewebeproben (42,4 %) von MC-Patienten sowohl kulturell als auch molekularbiologisch nachgewiesen; Parrish *et al.* (2009) wiesen dagegen in keiner der 130 Blutproben von MC-Patienten MAP/-DNA nach. Zum anderen muss die Frage nach der Kausalität für jede Studie einzeln bewertet werden. Zahlreiche Reviews und Meta-Analysen deuten darauf hin, dass MAP als mikrobieller Trigger beim Morbus Crohn des Menschen beteiligt sein kann (Büttner *et al.*, 2005; Rosenfeld und Bressler, 2010; Hruška und Pavlik, 2012). Demnach ist nicht auszuschließen, dass MAP zumindest bei einer Subpopulation der Morbus Crohn-Patienten eine Rolle spielt, obgleich der Mensch für diesen Mikroorganismus anscheinend ein Fehlwirt ist. Ob MAP eine zoonotische Bedeutung besitzt oder nicht, kann mit der eigenen Studie nicht abschließend geklärt werden. Die neuen Möglichkeiten der High Throughput Experimentation (HTE) und von Big Data-Analysen werden helfen, die Rolle von MAP bei Morbus Crohn besser zu verstehen.

Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* (MAP) is the causative agent of paratuberculosis – a chronic and untreatable intestinal inflammation of ruminants. Cattle are particularly susceptible for an infection with MAP (Ayele *et al.*, 2001). However, MAP was also detected in wild ruminants (Pavlik *et al.*, 2000a), other wildlife animals (Beard *et al.*, 2001a), diptera (Fischer *et al.*, 2001) as well as in primates (Münster *et al.*, 2013). MAP was even detected in human intestinal tissue and blood samples (Chiodini *et al.*, 1984b; Naser *et al.*, 2004). The detection of MAP / MAP DNA in patients with Crohn's disease sparks a debate whether this causative agent is involved in the etiology of Crohn's disease. On the other hand, several factors can influence the disease, for example age and predisposition of the patient (Akbariqomi und Heidari, 2014). There is also a controversial discussion whether cell wall deficient MAP cells (spheroplasts) can cause Crohn's disease.

A case-control study for the detection of MAP cells in human intestinal biopsies was carried out in cooperation with the university hospital in Erlangen to estimate the possible zoonotic potential of MAP. Throughout the study, culture, microscopic investigations and molecular based detection methods were applied. Additionally, resuscitation media were involved to assess the participation of MAP spheroplasts.

Overall, MAP DNA was detected in 39.9 % of 203 samples via molecular biological methods. The nested PCR according to Bull *et al.* (2003b) for the detection of IS900 and the triplex PCR according to Schönenbrücher *et al.* (2008) for the detection of *f57* and IS*Mav2* including an internal amplification control were applied. 38 patients with Crohn's Disease (CD; 47.5 %), 26 with ulcerative colitis (UC; 48.1 %) and 17 control patients without any inflammatory bowel disease (24.6 %) were MAP DNA positive. The detection rate for MAP DNA was higher with nested PCR than triplex PCR. Therefore, nested PCR is the preferred method.

MAP was detected statistically significantly more frequent by using the resuscitation media VIB and RAF than the MGIT bouillon. Hence, a participation of MAP spheroplasts may be possible. Although the use of resuscitation media is recommendable, it could not be differentiated whether the accumulation of MAP was caused by an actual resuscitation of spheroplasts or by overgrowth of pre-existing cell wall competent forms.

The detection rate of MAP DNA is statistically significantly higher in the 12th and 24th week of incubation than after 48 weeks and increases significantly in patients with inflammatory bowel diseases like CD or UC. Certain parameters do not influence the detection rate like age and gender of the patients, the sample weight and intestinal section as well as the type of

inflammation which was determined macroscopically. However, the type of inflammation which was determined microscopically affects the detection rate (not-inflammable > inflammable).

Acid-fast bacilli were detected in eight of 1,218 slides (0.7 %) after staining with Ziehl-Neelsen and light microscopic investigation. This staining method is not recommended for the detection of MAP in human intestinal samples due to the high detection limit ($> 10^4$ cfu/ml) and the difficult interpretation.

MAP was isolated from a patient with UC and showed colony growth on Herrold's egg yolk medium (HEYM). This MAP isolate was homologue to other human and bovine MAP strains demonstrated by sequencing. Overall, viable MAP cells were detected in just one sample (on HEYM and RAF medium). The positive detection rate of MAP DNA in patients with CD and UC however does not indicate the viability of the bacteria and, consequently, not a potential infection with MAP.

The role of MAP in Crohn's disease is subject of controversial discussion. Firstly, there are contradictory study results: Bull *et al.* (2003a) were able to detect MAP in 14 intestinal samples of CD patients (42.4 %) via culture and molecular based methods; Parrish *et al.* (2009) however, did not detect MAP / MAP DNA in any of the investigated 130 blood samples of CD patients. Secondly, the question of causality has to be assessed in each study independently. Numerous reviews and meta-analyses indicate that MAP might be involved as a microbial trigger in Crohn's disease (Büttner *et al.*, 2005; Rosenfeld und Bressler, 2010; Hruška und Pavlik, 2012). Therefore, a possible involvement of MAP in a subpopulation of CD patients cannot be ruled out although human hosts seem to be accidental hosts for this particular microorganism. The question whether MAP acts as a zoonotic agent or not cannot be conclusively determined by this study. However, recent advances in High Throughput Experimentation (HTE) as well as Big Data Analytics might be beneficial in helping to understand the role of MAP in Crohn's disease.

9 ANHANG

9.1 Laborbedarf

9.1.1 Laborgeräte und -materialien

Name / Bezeichnung	Typ	Firma
Abzugseinrichtung	851007	Wesemann GmbH
Brutschrank (+37 °C)	BVM 50	Memmert GmbH & Co. KG
Dampfersterilisator	Varioklav 500 E	HP Labortechnik GmbH
Diamantschreiber		
Digitaler Thermo-Drucker	P93D	Mitsubishi Electric
diverse Ständer für Kulturmedien und Reagiergefäße		
DNA/RNA UV-Cleaner UVC	T-M-AR	Kisker Biotech GmbH & Co. KG
Einmalhandschuhe	Nitril Einweg-Untersuchungshandschuhe, HANSA-MEDICAL 24	Kirchhoff Gruppe
Einmal-Impfösen	Gammasterile Impfschlingen aus Polystyrol, 10 µl und 1 µl	Sarstedt AG & Co.
Energieversorgung für Gelelektrophoresekammer	Seriennr. 57042	Micro-Bio-Tec-Brand (MTB)
Färbebank		
Flüssigkeitsdispenser	Perifill IQ 2000	Zinsser Analytik GmbH
Gelelektrophoresekammer	MBT 30 EL	Fisher
Gelelektrophoresekammer-Zubehör	Gelträger, Gießdichtungen, Kammblock	
Glasflaschen mit Schraubverschluss	DURAN® Laborflasche mit DIN Gewinde, GL 45 und Ausgießring, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml	Duran Group GmbH
Horizontalschüttler	HS 500	IKA® Labortechnik
Immersionöl	Immersol™ 518 F	Carl Zeiss AG
Impföse aus Platin		
Kamera	PowerShot A640 PowerShot A650/S	Canon Deutschland GmbH Canon Deutschland GmbH
Keramikkügelchen	SiLibeads Typ Zy 1,40–1,60 mm	Sigmund Lindner GmbH
Kryoröhrchen	Cryo.s™ Einfrierröhrchen 2 ml	Greiner Bio-One GmbH
Magnetrührstäbchen		
Magnetrührer	mit elektronischer Heizautomatik, IKA-Magnetrührer RCH	IKA® Labortechnik
	mit Heizplatte, IKAMAG RCT basic	IKA® Labortechnik
Messkolben aus Glas	1 L und 2 L	
Messpipetten aus Glas	völliger Ablauf, 10 ml	VWR International GmbH
Messzylinder aus Glas	50 ml, 100 ml, 250 ml	
Metallspatel		
Mikroskop	Axiostar plus	Carl Zeiss AG
Mikroskop-Objektträger	Objektträger Stärke ca. 1 mm Superfrost®, mit Mattrand	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG VWR International GmbH
Mikrowelle	Dimension 4 NE-973	Panasonic
Mörser	410-9111	VWR International GmbH
Objektträger-Kästen	mit Deckel für 100 Objektträger	VWR International GmbH

Name / Bezeichnung	Typ (Fortsetzung)	Firma
Pasteur-Pipetten	Glas, gestopft, 230 mm	VWR International GmbH
PCR-Platte	PCR-Platte PP natur, 96x0,2 ml, halbummantelt	nerbe plus GmbH
PCR-Verschlussfolie	Adhäsive Verschlussfolie für Realtime PCR, 70 µm	nerbe plus GmbH
pH-Meter	pH 539 (Microprozessor-Präzisions- pH/mv-Meter)	WTW GmbH
Pipette	0,1–2,5 µl: Eppendorf Pipette Research, Eppendorf Research variabel 0,5–10 µl: Eppendorf Pipette Reference, Eppendorf Pipette Research, Eppendorf Pipette Varipette 4710 2–10 µl: Eppendorf Pipette Reference 10–100 µl: Eppendorf Pipette Reference, Eppendorf Research Family 50–200 µl: Eppendorf Pipette Reference 100–1000 µl: Eppendorf Pipette Reference, Eppendorf Research Family	Eppendorf AG
Pipettenspitzen	Filterspitze PP natur 0,1–10 µl, super slim, Typ Gilson P2/P10 und eppendorf Filterspitze PP natur 0–100 µl, graduiert Filterspitze PP natur 100–1.000 µl Biosphere® Pipettenspitze mit Filter, 1250 µl	nerbe plus GmbH nerbe plus GmbH nerbe plus GmbH Sarstedt AG & Co.
Pipettierhilfe	pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG
Pistill	410-9131	VWR International GmbH
Plastikwanne		
Polaroid Instant Camera System	Polaroid MP4+	Polaroid GmbH
Rasierklinge		
Reagenz- und Zentrifugenröhrchen	Schraubröhre 15 ml SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml Reagenzröhrchen PP, 16 x 54 mm, 5 ml Multiply®-Pro 0,2 ml	Sarstedt AG & Co. Sarstedt AG & Co. nerbe plus GmbH Sarstedt AG & Co.
Reagenzglasschüttler	Vortex Genie 2, Model G-560E Mixomat VV3	Scientific Industries, Inc. Boskamp VWR International GmbH
Real Time-Cycler	ABI PRISM 7000 Sequence	Applied Biosystems®/Life Technologies™
Sammelgefäße	Collection Tubes (2 ml)	Qiagen GmbH
Säulen	Spin-Säulen	Qiagen GmbH
Schüttelapparat	3014	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH
Seesand zur Analyse, steril		
Sicherheitsbrenner	Schütt flammly S bzw. L Gasi 3.340102	Schütt Labortechnik GmbH/ schuett-biotec GmbH
Sicherheitswerkbank	Hera Safe KS 12	Kendro Laboratory Products GmbH
Stoppuhr	laborüblich	
Thermocycler	GeneAmp PCR System 9600	PerkinElmer
Thermomixer	Thermomixer 5436 Thermomixer comfort	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH Eppendorf AG

Name / Bezeichnung	Typ (Fortsetzung)	Firma
Thermopapier	Mitsubishi Thermopapier K91 HG-CE/K91 HG-CE	GMM Griebel Medizin- und Modelltechnik
Ultraviolett Transilluminator	Mighty Bright UVTM	Hoefler Scientific Instruments/ Hoefler, Inc.
UV-Brille		
UV-Lampe	Min UVIS 230V/110V	Desaga GmbH
UV-Spectrophotometer	NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Verschlussfolie	Parafilm®M	VWR International GmbH
Waagen	Analyse- und Präzisionswaage BA 210 S-OD1 Elektronische Präzisionswaage YDP 03-0 CE / BP 4100 S	Sartorius AG
Wasserbad	1002	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH
Zellkulturflaschen	Nunclon, vent/close, 25cm ² , abgewinkelt	VWR International GmbH
Zentrifuge	Perfect Spin 24 Multifuge 1 S-R Centrifuge 5415 C MiniCentrifuge MZ001 (HCF-120 Capsulae Mini Centrifuge) Minizentrifuge Sprout Centrifuge 5403	Peqlab Biotechnologies GmbH Heraeus Instruments GmbH Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH Qualitron Corporation Kisker Biotech GmbH & Co. KG Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH

9.1.2 Reagenzien und Kits

Name	Typ	Marke	Produktnr.
Agar Noble	Difco™ Agar Noble, Solidifying agent essentially free of impurities used for electrophoretic and nutritional procedures wherever increased purity is required	Difco	214220
Agarose	Biozym LE Agarose	Biozym Scientific	840004
Alkohol, vergällt	Ethanol vergällt mit ca. 1 % Ethylmethylketon zur Analyse EMSURE®	Merck	100974
Ammonium Iron (III) Citrate Brown	Ammoniumeisen(III)-citrat, etwa 28 % Fe DAC	Merck	103761
Amphotericin B	Amphotericin B, <i>Streptomyces</i> sp.	Merck; Calbiochem®	171375
AmpliQ DNA Polymerase	AmpliQ® DNA Polymerase with Buffer I	Applied Biosystems®/ Life Technologies	N8080166
AmpliQ Gold DNA Polymerase	AmpliQ Gold® DNA Polymerase with Buffer I	Applied Biosystems®/ Life Technologies	N8080242/ N8080244
Asparagin	L(+)-Asparagine, 99 %	ALFA (AESAR)	B21473.22
Basen	dATP PCR-Grade dCTP PCR-Grade dGTP PCR-Grade dTTP PCR-Grade	Roche Diagnostics GmbH	11934511001
Borsäure	Borsäure, zur Analyse EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph. Eur.	Merck	100165
Bromphenolblau	Bromphenolblau, Indikator ACS, Reag. Ph. Eur.	Merck	108122

Name	Typ (Fortsetzung)	Marke	Produktnr.
Chloroform	Chloroform für die Flüssigkeitschromatographie LiChrosolv®	Merck	102444
D(+)-Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	D(+)-Glucose, wasserfrei für biochemische Zwecke Reag. Ph. Eur.	Merck	108337
Desinfektionsmittel	DNA AWAY®	Carl Roth GmbH & Co. KG	X996.1
destilliertes Wasser (Aqua dest.)			
Dimethylsulfoxid (DMSO)	DMSO, ≥ 99,5 %, BioScience-Grade, für die Molekularbiologie	Roth	A994.1
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O)	di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat zur Analyse EMSURE®	Merck	106580
DNA-Extraktionskit	DNeasy Blood & Tissue Kit (50/250)	Qiagen GmbH	69504/69506
EDTA Tritriplex II	Tritriplex® II, zur Analyse (Ethylendinitrilotetraessigsäure) ACS, Reag. Ph. Eur.	Merck	108417
ETDTA Tritriplex III	Tritriplex® III, zur Analyse (Ethylendinitrilotetraessigsäure; Dinatriumsalz-Dihydrat) ACS, ISO, Reag. Ph. Eur.	Merck	108418
Eisenammoniumsulfat (Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O)	Ammonium iron (II) sulfate hexahydrate, ACS reagent, 99 %	Sigma-Aldrich	F3754
Ethanol (99 %)	Ethanol (ROTISOLV® HPLC Gradient Grade)	Carl Roth GmbH & Co. KG	P076.1/P076.2
Ethidiumbromid	Ethidiumbromid (1 %ige Lösung in Wasser) für die Elektrophorese	Merck	111608
Fetales Kälberserum	FBS South America, COS-certified	PAN-BIOTECH GmbH	3302-Lot#
Ficoll	Ficoll® PM 70, Type 70	Sigma-Aldrich	F2878
Glycerol (C ₃ H ₈ O ₃)	Glycerin 85 % geeignet für die Verwendung als Expicent EMPROVE® exp Ph. Eur., BP	Merck	104091
Hefeextrakt	Yeast Extract	Oxoid	LP0021
HEYM	BD BBL™ Herrold's Egg Yolk Agar with Mycobactin J and ANV	Becton Dickinson	222233
Kalbfleischbrühe	Difco™ Veal Infusion Broth	Becton Dickinson	234420
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Kaliumdihydrogenphosphat zur Analyse EMSURE® ISO	Merck	104873
Lysozym	Lysozym (aus Hühnereiweiß) ≥ 30.000 FIP-U/mg cryst. (Hydrochlorid) für biochemische Zwecke	Merck	105281
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ x 7 H ₂ O)	Magnesiumsulfat-Heptahydrat zur Analyse EMSURE® ACS, Reag. Ph. Eur.	Merck	105886
Marker XIV	DNA Molecular Weight Marker XIV (100–1500 bp)	Roche Diagnostics GmbH	1172193 001
Mastermix	qPCR MasterMix Plus without UNG	Eurogentec Deutschland GmbH	RT-QP2X-03WOU+
MB 7H9-Flüssigmedium	Difco™ Middlebrook 7H9 Broth	Difco	271310
MGIT	BD BBL™ MGIT™ Röhrchen (manuell)	Becton Dickinson	245113
Mycobactin J	Ferric Mycobactin J	Allied Monitor	62-0002
N-Acetyl-L-Cystein	N-Acetyl-L-Cystein für biochemische Zwecke	Merck	112422
Nalidixinsäure	Nalidixic acid, ≥ 98 %	Sigma-Aldrich	N8878
Natriumchlorid (NaCl)	Natriumchlorid zur Analyse EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph. Eur.	Merck	106404

Name	Typ (Fortsetzung)	Marke	Produktnr.
Natriumcitrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇) bzw. Tri-Natriumcitrat- Dihydrat (Na ₃ Citrat x 2 H ₂ O)	tri-Natriumcitrat-Dihydrat zur Analyse EMSURE® ACS, Iso, Reag. Ph. Eur.	Merck	106448
Natriumhydroxid (NaOH)	Natriumhydroxid, Plättchen rein	Merck	106462
Nuklease-freies Wasser	Nuclease-free water	Qiagen GmbH	129115
OADC	Middlebrook-OADC-Anreicherung	Becton Dickinson	212240
PANTA	BD BBL™ MGIT™ PANTA™; 6 Flaschen	Becton Dickinson	245114
PBS	PBS Tablets, Phosphate Buffered Saline Tablets, pH 7,4	Merck; Calbiochem®	524650-1
Pferdeserum	Horse Serum (Donor Herd, Heat inactivated, USA origin)	Sigma-Aldrich	H1138
Polymerase-Puffer 15 mM MgCl ₂	GeneAmp® 10X PCR Buffer I containing 15 mM MgCl ₂	Applied Biosystems®/ Life Technologies™	im Set mit N8080242/ N8080244
Primer IS900	seq1 seq2	Sigma-Aldrich/ Sigma Life Science	ST01312816 ST01312817
Primer nested PCR	TJ1 TJ2 TJ3 TJ4	Eurofins MWG Operon	PCR Primer
Primer Triplex-PCR	ISMav2-896R ISMav2-735F f57po-244F f57po-306R	Eurofins MWG Operon	PCR Primer
Saccharose	Saccharose für biochemische Zwecke, Reag. Ph. Eur.	Merck	107687
Salzsäure (HCl)	Salzsäure, c(HCl) = 1 mol/l (1 N) TitriPUR®	Merck	109.057
Sonden Triplex-PCR	TaqMan®MGB probe: F57po-VIC TaqMan®MGB probe: IAK0607-NED TaqMan®MGB probe: IS_IFTN (FAM)	Life Technologies GmbH	4316034
Triammoniumcitrat (NH ₄) ₃ C ₅ H ₅ O ₇)	Ammoniumcitrat tribasisch, wasserfrei	Sigma	A1332
Tris-(hydroxymethyl)- amminomethan	TRIS, Pufferan®, ≥ 99,9 %, Ultra Qualität	Roth	5429.3
Triton X 100	Triton X 100, reinst, nichtionisches Detergens, für biochemische Zwecke und für die Molekularbiologie, Alkylphenylpoly- ethylenglykol	Roth	3051.1
Vancomycin	Vancomycin, Hydrochloride, <i>Streptomyces orientalis</i>	Merck; Calbiochem®	627850
ZN-Färbeset	Ziehl-Neelsen-Färbeset; 1 Kit	Becton Dickinson	212520

9.2 Medien, Puffer und Lösungen

9.2.1 MGIT-Bouillon und Supplemente

Die **MGIT-Bouillon** (Mycobacterial Growth Indicator Tube) ist ein kommerziell erhältliches Flüssigmedium (Fa. Becton Dickinson) zum Nachweis von Mykobakterien und besteht aus 4 ml Bouillon und 110 µl in Silikon eingebettetem Fluoreszenzindikator (Tris-4,7-Diphenyl-1,10-Phenanthrolin-Rutheniumchlorid-Pentahydrat). Die bei +2 bis +8 °C zu lagernde Bouillon sollte vor der Inokulation klar und farblos erscheinen und fördert aufgrund ihrer Zusammensetzung in Verbindung mit den Zusätzen – OADC, PANTA und Mycobactin J – das Wachstum der Mykobakterien.

OADC (Oleic Acid Albumin Dextrose Complex, Fa. Becton Dickinson) ist ein flüssiges Supplement, welches im Dunkeln bei +2 bis +8 °C gelagert wird und mit einem Volumen von 0,5 ml zur MGIT-Bouillon zugesetzt wird um das Wachstum der Mykobakterien zu unterstützen.

PANTA (Becton Dickinson) liegt als Lyophilisat vor, welches vor der Verwendung mit 3 ml sterilem Aqua dest. aufgelöst wird und für die nächsten 72 Stunden kühl gelagert oder in Aliquoten bei -20 °C bis zu sechs Monaten aufbewahrt werden kann. Nach dem Auftauen ist PANTA sofort zu verwenden und die Reste zu entsorgen. Das antibiotische Gemisch wird mit einem Volumen von 0,1 ml zur MGIT-Bouillon zugesetzt.

Bei Bedarf kann **Mycobactin J** (Endkonzentration 2 mg/l) – ein Eisenchelatbildner, der bei der kulturellen Anzucht Mykobaktin-abhängiger Mykobakterien als Wachstumsförderer eingesetzt wird – als Zusatz zur MGIT-Bouillon verwendet werden. Das Lyophilisat wird in 2 ml absolutem Alkohol (95 %iger Ethanol) aufgelöst und anschließend bei Raumtemperatur gelagert.

BBL MGIT-Indikatorröhrchen [pro L destilliertem Wasser]

5,9 g	Modifizierte Middlebrook 7H9 Bouillonbasis
1,25 g	Casein-Pepton

BBL Middlebrook OADC Enrichment [pro L]

8,5 g	Natriumchlorid
20,0 g	Dextrose
50,0 g	Rinderalbumin (Fraktion V)
0,03 g	Katalase
0,6 ml	Ölsäure

BBL MGIT PANTA [pro Fläschchen]

6.000 Einheiten	Polymyxin B
600 µg	Amphotericin B
2.400 µg	Nalidixinsäure
600 µg	Trimethoprim
600 µg	Azlocillin

9.2.2 NALC-NaOH-Lösung

Zur Dekontamination der humanen Darmbiopsate wurde jeweils am Tag der Aufbereitung eine frische NALC-NaOH-Lösung angesetzt und die Reste nach Gebrauch verworfen. In Abhängigkeit der Anzahl der Proben wurde ein Vielfaches der Lösung angesetzt.

1,0 ml	sterile 2,9 %ige Natriumcitrat -Lösung	}	mischen
1,0 ml	sterile 4 %ige Natriumhydroxid -Lösung		
0,01 g	N-Acetyl-L-Cystein (NALC)		abwiegen und zur Lösung zugeben, gut mischen

9.2.3 Phosphatpuffer nach Sörensen

Der Phosphatpuffer nach Sörensen wurde zur Neutralisation bzw. zum Abstoppen der Dekontamination der Proben verwendet. Der pH-Wert der $1/15$ molaren Puffer-Lösung liegt bei 6,8.

4,84 g	Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	abwiegen	}	In 1 L-Messkolben geben
5,53 g	Natriumdihydrogenphosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	abwiegen		
Auf 1 L	Mit sterilem Aqua dest. auffüllen			

9.2.4 VIB-Medium (Modifizierte Kalbfleischbrühe)

Das VIB-Medium nach Markesich *et al.* (1988) wurde als Resuszitationsmedium zur Wiederherstellung Zellwand-intakter MAP-Formen aus Zellwand-geschädigten Formen (sogenannte Sphäroblasten) eingesetzt. Das in Gewebekulturflaschen abgefüllte Flüssigmedium wurde bei +4 bis +8 °C kühl und lichtgeschützt gelagert.

Veal infusion broth (Kalbfleischbrühe) nach Herstellerangaben (Difco Laboratories) ansetzen und autoklavieren (121 °C, 15 min) → **25 g/l**



10 %ige Hefeextrakt-Lösung separat ansetzen und autoklavieren (121 °C, 15 min)



1 % Hefeextrakt-Lösung zur Kalbfleischbrühe zusetzen



Pferdeserum hitzeinaktivieren (56°C, 30 min) und zur abgekühlten, auf pH 5,3 eingestellten, modifizierten Kalbfleischbrühe zugeben bis zur **Endkonzentration 10 %**



Zugabe von:

0,3 M	Saccharose	
0,2 %	Magnesiumsulfat	MgSO ₄
0,1 %	Eisenammoniumsulfat	Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂
0,1 %	Natriumcitrat	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇
+ 2 µg/ml	Mycobactin J	



20 ml Medium jeweils in 25 cm²-Gewebekulturflaschen füllen und aufrecht stellen

9.2.5 RAF-Medium (Reid's A Agar mit fetalem Kälberserum)

Die Herstellung des RAF-Mediums (Bull, 2008; Bull *et al.*, 2009; Bull, 2010) erfolgte in drei Schritten. Als erstes wurde das eigentliche Medium nach dem vorliegenden Schema (für ein Liter) hergestellt und in Gewebekulturflaschen abgefüllt. Als nächstes wurde eine geringere Menge des Mediums ebenfalls unter Verwendung des Agar noble hergestellt und Aliquote von 1 ml in 1,5 ml-Eppendorf Tubes abgefüllt (RAF „fest“). Als letztes wurde das Medium ohne Zusatz von Agar noble hergestellt und ebenfalls jeweils 1 ml in 1,5 ml-Eppendorf Tubes abgefüllt (RAF „flüssig“). Alle hergestellten Medien wurden bei +4 bis +8 °C kühl und lichtgeschützt gelagert.

Asparagin-Lsg. unter Rühren auf der Heizplatte herstellen

5 g D/L-Asparagin
200 ml Aqua dest.



Nährmedien-Lsg. herstellen

600 ml Aqua dest.
2 g Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4
1 g Magnesiumsulfat $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
2 g Triammoniumcitrat $(\text{NH}_4)_3\text{C}_5\text{H}_5\text{O}_7$
2 g Natriumchlorid NaCl
10 g D(+)-Glucose $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$
8 mg Ammonium Iron (III) Citrate Brown
48 ml Glycerol (85 %) $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_3$
2 mg Mycobactin J



Asparagin-Lsg. zur Nährmedien-Lsg. geben und unter Rühren auflösen



pH 5,7 einstellen



{ 15 g Agar Noble zugeben bis Endkonzentration 1,5 % } entfällt bei der Herstellung von RAF „flüssig“



Autoklavieren (121 °C, 15 min) und auf 50 °C abkühlen



Zugabe von:

50 ml Fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert (56 °C, 30 min)
500 µl Amphotericin B STOCK 25 mg/ml in DMSO
125 µl Nalidixinsäure STOCK 100 mg/ml in Chloroform
125 µl Vancomycin STOCK 100 mg/ml in DMSO



9ml in 25 cm²-Gewebekulturflaschen pipettieren und über Nacht bei Raumtemperatur erstarren lassen

Die Beimpfung des RAF-Mediums sowie alle vorhergehenden Schritte wurden unter der Sicherheitswerkbank durchgeführt.

1. Die zuvor kühl gelagerten Medien wurden vor der Inokulation auf eine geeignete Temperatur gebracht. Dazu wurde das RAF-Medium in der Gewebekulturflasche und RAF „flüssig“ im Eppendorf Tube im Brut- oder Trockenschrank bei 37 ± 1 °C für mindestens 30 min gelagert. Das RAF „fest“ im Eppendorf Tube wurde im Thermomixer verflüssigt und anschließend auf etwa 60 °C abgekühlt.
2. Die zu beimpfende Suspension – in dem Falle 200 µl – wurde in einem 5 ml-Tube vorgelegt.

3. Anschließend wurde 1 ml von RAF „flüssig“ zur vorliegenden Suspension zugegeben und mittels Pipette gemischt.
4. Die Öffnung sowie der Verschluss der Gewebekulturflasche des RAF-Mediums wurden zwecks Desinfektion kurz durch die Bunsenbrennerflamme gezogen um eine Kontamination der sterilen Agarfläche zu vermeiden.
5. 1 ml vom abgekühlten RAF „fest“ wurde zur Mischung im 5 ml-Tube zugegeben und mit einer vorgewärmten Pipettenspitze einmal gemischt. Anschließend erfolgte die zügige Zugabe der Mischung auf den Agar der Gewebekulturflasche. Durch leichtes Schwenken wurde die Suspension verteilt.
6. Das RAF-Medium wurde mit halbzugedrehtem Verschluss unter der Sicherheitswerkbank stehen gelassen. Nach dem Erstarren der oberen Schicht wurde die Gewebekulturflasche verschlossen und bei 37 °C mit der Agarfläche nach oben zeigend inkubiert.

9.2.6 Middlebrook 7H9-Flüssigmedium und Supplemente

Das Middlebrook 7H9-Flüssigmedium mit Zusatz von OADC (Oleic Acid Albumin Dextrose Complex; siehe 9.2.1) und Mycobactin J (siehe 9.2.1) wird zur Anzucht von *Mycobacterium* sp. verwendet, darunter auch für den in den Versuchen eingesetzten MAP-Referenzstamm 44135 (DSMZ Nr. 44135). Zur Herstellung von einem Liter Flüssigmedium wurden 4,7 g Pulver (*Difco™ Middlebrook 7H9 Broth*, Becton Dickinson) in 900 ml Aqua dest. gelöst, 2 ml Glycerol (85 %) und 2 ml in Ethanol aufgelöstes Mycobactin J zugegeben. Je 9 ml der Flüssigkeit wurden in ein Glasfläschchen mit Schraubverschluss und darin enthaltenen Keramikkügelchen abgefüllt. Anschließend wurden die Aliquote bei 121 °C für zehn Minuten autoklaviert und bis zur Verwendung bei +4 bis +8 °C im Dunkeln gelagert. Vor Inokulation wurde 1 ml OADC pro Aliquot zugegeben (Endkonzentration 10 %).

Difco™ Middlebrook 7H9 Broth [pro 900 ml]

0,5 g	Ammoniumsulfat
0,5 g	L-Glutaminsäure
0,1 g	Natriumcitrat
1,0 mg	Pyridoxin
0,5 mg	Biotin
2,5 g	Dinatriumphosphat
1,0 g	Monokaliumphosphat

Difco™ Middlebrook 7H9 Broth [pro 900 ml] (Fortsetzung)

0,04 g	Eisenammoniumcitrat
0,05 g	Magnesiumsulfat
0,5 mg	Calciumchlorid
1,0 mg	Zinksulfat
1,0 mg	Kupfersulfat

9.2.7 PBS-Lösung

Zur Herstellung einer phosphatgepufferten Saline wurde ein Liter destilliertes Wasser bei 121 °C über 15 Minuten autoklaviert und eine PBS-Tablette anschließend darin aufgelöst (Novabiochem/Merck). Es wurden entsprechende Aliquote in sterile Glasflaschen mit Schraubverschluss abgefüllt und bei +4 bis +8 °C gelagert. Der pH-Wert der Lösung liegt bei 7,4 bei 25 °C. Ein Liter PBS-Puffer enthält:

140 mM	Natriumchlorid
10 mM	Phosphatpuffer
3 mM	Kaliumchlorid

9.2.8 TB Stain Kit ZN

Das *TB Stain Kit ZN* (Becton Dickinson) ist ein kommerziell erhältliches Färbekit zum Nachweis säurefester Bakterien inklusive Mykobakterien, jedoch ohne weitere Unterscheidung der Spezies. Das Kit besteht aus zwei Färbereagenzien (*TB Carbofuchsin ZN*, *TB Methylene Blue*) und einer Entfärbelösung (*TB Decolorizer*) und sollte bei 15–30 °C im Dunkeln gelagert werden.

TB Carbofuchsin ZN [pro Liter]

1,7 g	Basisches Fuchsin
50,0 g	Phenol, USP
95,0 ml	Isopropanol
905,0 ml	Aqua dest.

TB Decolorizer [pro Liter]

30,0 ml	Salzsäure
970,0 ml	Ethanol/ Methanol

TB Methylene Blue [pro Liter]

2,4 g	Methylenblau, USP
300,0 ml	Ethanol/ Methanol
700,0 ml	Aqua dest.

9.2.10 Enzymatischer Lysispuffer

Der enzymatische Lysispuffer wurde gemäß dem Protokoll zur DNA-Aufbereitung gram-positiver Bakterien mit dem *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Qiagen) hergestellt und eingesetzt. Es wurde zunächst der „einfache Lysispuffer“ angesetzt und bei Raumtemperatur gelagert. Kurz vor Gebrauch wurde der enzymatische Lysispuffer, abhängig von der benötigten Menge, aus 20 mg Lysozym/ml „einfachem Lysispuffer“ hergestellt, kühl gelagert und die Reste nach 24 Stunden verworfen.

„Einfacher Lysispuffer“ [für 50 ml]

10 ml	100 mM Tris-HCl Stammlösung (pH 8,0)	abmessen	} In 1 L-Messkolben geben
2 ml	50 mM EDTA Titriplex III Stammlösung	abmessen	
0,6 g	Triton X-100	abwiegen	
Auf 50 ml	Mit sterilem Aqua dest. auffüllen	sterilfiltrieren, autoklavieren	

Enzymatischer Lysispuffer [für 1 ml]

1 ml	„einfacher Lysispuffer“	vorlegen
20 mg	Lysozym (30.000 U/mg)	abwiegen und zugeben, gut mischen (vortexen)

9.2.11 DNeasy® Blood & Tissue Kit

Das *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Qiagen) wurde zur Extraktion der DNA aus den Proben, die für die nested und Triplex-PCR vorgesehen sind, eingesetzt und beinhaltet eine gebrauchsfertige Proteinase K-Lösung. Die im Kit befindlichen Reagenzien wurden bei Raumtemperatur gelagert.

DNeasy® Blood & Tissue Kit (50)

50	DNeasy Mini-Spin-Säulen in 2 ml Sammelgefäße	
100	Sammelgefäße (2 ml)	
10 ml	ATL-Buffer	
12 ml	AL-Puffer	
19 ml	AW1-Puffer (konzentriert)	} Vor Gebrauch mit Ethanol (96–100 %) auflösen
13 ml	AW2-Puffer (konzentriert)	
22 ml	AE-Puffer	
1,25 ml	Proteinase K (40 mAU/mg Protein)	

9.2.12 Ladepuffer

Ein Teil Ladepuffer wurde zusammen mit vier Teilen der amplifzierten Probe in die Tasche eines Agarosegels pipettiert, um das nach Basenpaarlängen aufgetrennte Produkt unter UV-Licht (Wellenlänge 302 nm) sichtbar zu machen. Die Ladepuffer-Stammlösung wurde aus einer 15 %igen Ficoll- und einer 5 %igen Bromphenolblau-Lösung hergestellt. Die Ficoll-Lösung war bei Raumtemperatur lagerbar, die Bromphenolblau-Lösung sollte gekühlt bei +4 bis +8 °C aufbewahrt werden.

15 %ige Ficoll-Lösung

1,5 g	Ficoll	abwiegen
10 ml	Aqua dest. sterilfiltriert	zugeben, evtl. unter leichter Erwärmung (max. 50 °C) lösen

5 %ige Bromphenolblau-Lösung

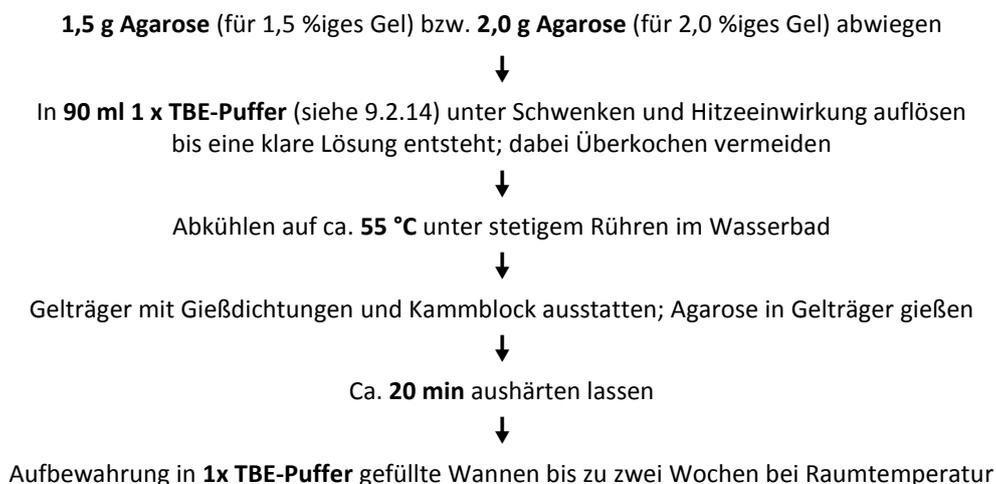
0,5 g	Bromphenolblau	abwiegen
9,5 ml	Aqua dest. sterilfiltriert	zugeben und gut mischen

Ladepuffer-Stammlösung

10 ml	15 %ige Ficoll-Lösung
0,25 ml	5 %ige Bromphenol-Lösung

9.2.13 Agarosegel (1,5 % bzw. 2,0 %)

Das Agarosegel wurde für die Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Amplifikaten verwendet. In der Regel wurde in den Versuchen zum Nachweis der IS900-Sequenz ein 1,5 %iges, zur Auftrennung und späterem Herausschneiden der Banden für die DNA-Sequenzierung ein 2,0 %iges Agarosegel eingesetzt.



9.2.14 TBE-Puffer

Der TBE-Puffer kam sowohl als Laufpuffer für die Gelelektrophorese als auch bei der Herstellung von Agarosegelen zum Einsatz. Aus dem 10 x TBE-Puffer, der gleichzeitig als Stammlösung diente und deswegen bei +4 bis +8 °C gelagert wurde, kann der 1 x TBE-Puffer für die oben genannten Verwendungszwecke hergestellt werden. Dieser wurde bei Raumtemperatur gelagert.

<i>10 x TBE-Puffer</i>			
60,60 g	Tris(hydroxymethyl)aminomethan	abwiegen	} In 1 L-Messkolben geben
30,09 g	Borsäure	abwiegen	
2,92 g	EDTA Tritriplex II	abwiegen	
Auf 1 L	Mit sterilem Aqua dest. auffüllen	autoklavieren	
<i>1 x TBE-Puffer</i>			
200 ml	10 x TBE-Puffer	abmessen; in 2 L-Messkolben geben	
Auf 2 L	Mit sterilem Aqua dest. auffüllen		

9.2.15 DNA-Marker XIV

Der *DNA Molecular Weight Marker XIV* (Roche Diagnostics) ist ein 100 bp-DNA-Leiter für den Größenbereich von 100 bis 1.500 Basenpaaren und liegt in einem Konzentrationsverhältnis von 250 µg/ml vor. In der unverdünnten Lösung befinden sich neben dem Marker auch 10 mM Tris-HCl und 1 mM EDTA. Es wurden in der Regel 10 µl der Marker XIV-Verdünnung, die kühl zu lagern ist, in die Taschen eines 1,5 %igen Agarosegels pipettiert.

<i>Marker XIV-Verdünnung [1:10-Verdünnung]</i>			
10 µl	Unverdünnte Marker XIV-Lösung (pH 8,0)	} mischen	
20 µl	Ladepuffer (siehe 9.2.12)		
70 µl	Nuklease-freies Wasser		

9.2.16 Ethidiumbromid-Bad

Es wurde zunächst eine Ethidiumbromid-Stammlösung aus 0,1 g Ethidiumbromid und 10 ml Aqua dest. hergestellt, wovon 50 µl zu 1,5 l Aqua dest. in eine Kunststoffwanne zum Färben des Agarosegels pipettiert wurden.

9.2.17 HEYM (Herrold's Egg Yolk Medium)

Das kommerziell erhältliche HEYM (Herrold's Egg Yolk Medium) mit Mycobactin J und ANV (Amphotericin B, Nalidixinsäure, Vancomycin) der Firma Becton Dickinson wurde bei +2 bis +8 °C vor Lichteinfall geschützt gelagert. Das Schrägmedium auf Eigelbbasis wird zur Kultivierung von MAP verwendet und setzt sich folgendermaßen zusammen:

15,3 g	Agar
9,0 g	Pankreatisch abgebautes Casein
4,1 g	Natriumpyruvat
4,0 g	Natriumchlorid
2,7 g	Rindfleischextrakt
0,1 g	Malachitgrün
0,05 g	Amphotericin B
0,05 g	Nalidixinsäure
0,05 g	Vancomycin
0,002 g	Mycobactin J
100 ml	Eigelb
27,0 ml	Glycerol
873 ml	Aqua dest.

9.2.18 QIAquick PCR Purification Kit

Das QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) wurde zur Aufreinigung von PCR-Produkten mit einer Länge von 100 bis 10.000 Basenpaaren eingesetzt. Die im Mastermix verwendeten Primer, Nukleotide, DNA-Polymerasen und Salzen wurden entfernt, wodurch das gereinigte Produkt zum Beispiel erneut als DNA-Template zur Verfügung stehen konnte. Die im Kit befindlichen Reagenzien wurden bei Raumtemperatur gelagert.

QIAquick PCR Purification Kit (50)

50	QIAquick Spin-Säulen	
30 ml	PB-Puffer	
2 x 6 ml	PE-Puffer (konzentriert)	Vor Gebrauch mit Ethanol (96–100 %) auflösen
15 ml	EB-Puffer	
800 µl	pH Indikator I	
50	Sammelgefäße (2 ml)	
110 µl	Ladepuffer	

9.2.19 QIAquick Gel Extraction Kit

Das *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) eignet sich zur DNA-Extraktion und -Aufreinigung aus Standard- oder niedrig schmelzenden Agarosegelen in TAE- oder TBE-Laufpuffer oder zur Aufreinigung von DNA-Sequenzen mit einer Länge von 70 bis 10.000 Basenpaaren von enzymatischen Reaktionen. Die Reagenzien des *QIAquick Gel Extraction Kits* wurden bei Raumtemperatur gelagert.

QIAquick Gel Extraction Kit (50)

50	QIAquick Spin-Säulen	
2 x 50 ml	QG-Puffer	
2 x 10 ml	PE-Puffer (konzentriert)	Vor Gebrauch mit Ethanol (96–100 %) auflösen
15 ml	EB-Puffer	
50	Sammelgefäße (2 ml)	
110 µl	Ladepuffer	

9.3 Ergebnis der IS900-Sequenzanalyse

GGGTATGGCTTTCATGTGGTTGCTGTGTTGGATGGCCGAAGGAGATTGGC	50
CGCCCGGCGTCCC GCGACGACTCGACCGCTAATTGAGAGATGCGATTGGA	100
TCGCTGTGTAAGGACACGTCGGCGTGGTTCGTCTGCTGGGTTGATCTGGAC	150
AATGACGGTTACGGAGGTGGTTGTGGCACAACCTGTCTGGGCGGGCGTGG	200
ACGCCGGTAAGGCCGACCATTACTGCATGGTTATTAACGACGACGCGCAG	250
CGATTGCTCTCGCAGCGGGTGGCCAACGACGAGGCCGCGCTGCTGGAGTT	300
GATTGCGGCGGTGACGACGTTGGCCGATGGAGGCGAGGTCACGTGGGCGA	350
TCGACCTCAACGCCGGCGGGCGCCGCGTTGCTGATCGCCTTGCTCATCGCT	400
GCCGGGCAGCGGCTGCTTTATATTCCCGGGCGCACGGTCCATCACGCCGC	450
GGGTAGTTACCGCGGCGAAGGCAAGACCGACGCCAAAGACGCTGCGATCA	500
TCGCCGATCAGGCCCGGATGCGCCACGACTTGCAGCCTCTGCGCGCCGGC	550
GATGACATCGCAGTCGAGCTGCGCATCCTGACCAGCCGACGTTCCGATCT	600
GGTGGCTGATCGGACCCGGGCGATCAACCGAATGCGCGCCAGCTGCTGG	650
AATACTTTCCGGCGCTGGAACGCGCCTTCGACTACAACAAGAGCCGTGCC	700
GCGCTGATCCTGCTTACTGGCTACCAAACCTCCCGACGCGCTGCGCAGCGC	750
CGGTGGCGCTCGAGTAGCCGCGTTCTTGCGTAAACGCAAGGCCCGCAACG	800
CCGATACCGTCGCAGCCACCGCGCTGCAGGCCGCTAACGCCCAACACAGC	850
ATC	853

Abb. 11: DNA-Sequenz des 853 bp-langen IS900-Amplifikates, isoliert aus der Probe eines Colitis ulcerosa-Patienten (siehe Kap. 4.3)

9.4 Multiple Sequence Alignment für IS900

```

-----+-----+-----+-----+-----+
          10         20         30         40         50
-----+-----+-----+-----+
1  GGGTATGGCTTTCATGTGGTTGCTGTGTTGGATGGCCGAAGGAGATTGGC
1  .....
1  .....
-----+-----+-----+-----+
1  .....
-----+-----+-----+-----+
          60         70         80         90        100
-----+-----+-----+-----+
51 CGCCCGGCGTCCC GCGACGACTCGACCGCTAATTGAGAGATGCGATTGGA
51 .....
51 .....CG.....
-----+-----+-----+-----+
51 .....
-----+-----+-----+-----+
          110        120        130        140        150
-----+-----+-----+-----+
101 TCGCTGTGTAAGGACACGTCGGCGTGGTCGTCTGCTGGGTTGATCTGGAC
101 .....
101 .....
-----+-----+-----+-----+
101 ...Y.....
-----+-----+-----+-----+
          160        170        180        190        200
-----+-----+-----+-----+
151 AATGACGGTTACGGAGGTGGTTGTGGCACAACCTGTCTGGGCGGGCGTGG
151 .....
151 .....
-----+-----+-----+-----+
151 R.....
-----+-----+-----+-----+
          210        220        230        240        250
-----+-----+-----+-----+
201 ACGCCGGTAAGGCCGACCATTACTGCATGGTTATTAACGACGACGCGCAG
201 .....
201 .....
-----+-----+-----+-----+
1  .....
201 .....
-----+-----+-----+-----+
          260        270        280        290        300
-----+-----+-----+-----+
251 CGATTGCTCTCGCAGCGGGTGGCCAACGACGAGGCCGCGCTGCTGGAGTT
251 .....
251 .....
-----+-----+-----+-----+
22 .....
251 .....
-----+-----+-----+-----+
          310        320        330        340        350
-----+-----+-----+-----+
301 GATTGCGGCGGTGACGACGTTGGCCGATGGAGGCGAGGTCACGTGGGCGA
301 .....
301 .....
-----+-----+-----+-----+
72 .....
301 .....

```

Isolat_humaner-Stamm
 Referenz_MAP44135
 X16293.1_Ben
 AY660658.1_MAP12A-03
 FJ775182.1_CAM86

```

-----+-----+-----+-----+-----+
          360      370      380      390      400
-----+-----+-----+-----+
351 TCGACCTCAACGCGGCGGGCGCGGTTGCTGATCGCCTTGCTCATCGCT
351 .....
351 .....
122 .....G.....
351 .....

-----+-----+-----+-----+
          410      420      430      440      450
-----+-----+-----+-----+
401 GCGGGCAGCGGCTGCTTTATATTCCCGGGCGCACGGTCCATCACGCCGC
401 .....
401 .....
172 .....
401 .....

-----+-----+-----+-----+
          460      470      480      490      500
-----+-----+-----+-----+
451 GGGTAGTTACCGCGGCGAAGGCAAGACCGACGCCAAAGACGCTGCGATCA
451 .....
451 .....
222 .....
451 .....

-----+-----+-----+-----+
          510      520      530      540      550
-----+-----+-----+-----+
501 TCGCCGATCAGGCCCGGATGCGCCACGACTTGACGCTCTGCGCGCCGGC
501 .....
501 .....
272 .....
501 .....

-----+-----+-----+-----+
          560      570      580      590      600
-----+-----+-----+-----+
551 GATGACATCGCAGTCGAGCTGCGCATCTGACCAGCCGACGTTCCGATCT
551 .....
551 .....
322 .....
551 .....

-----+-----+-----+-----+
          610      620      630      640
-----+-----+-----+-----+
601 GGTGGCTGATCGGACCCGGGCGATC-AACCGAATGCGCGCCAGCTGCTG
601 .....
601 .....G.....
372 .....
583 .....

-----+-----+-----+-----+
          650      660      670      680      690
-----+-----+-----+-----+
650 GAATACTTTCCGGCGCTGGAACGCGCCTTCGACTACAACAAGAGCCGTGC
650 .....
651 .....-.....
421 .....
583 .....

```

Isolat_humaner-Stamm
Referenz_MAP44135
X16293.1_Ben
AY660658.1_MAP12A-03
FJ775182.1_CAM86

```

+-----+-----+-----+-----+-----+
700      710      720      730      740
+-----+-----+-----+-----+-----+
700 CGCGCTGATCCTGCTTACTGGCTACCAAAC TCCGACGCGCTGCGCAGCG
700 .....
700 .....
471 .....
583 -----

+-----+-----+-----+-----+-----+
750      760      770      780      790
+-----+-----+-----+-----+-----+
750 CCGGTGGCGCTCGAGTAGCCGCGTTCTTGCGTAAACGCAAGGCCGCAAC
750 .....
750 .....
521 .....
583 -----

+-----+-----+-----+-----+-----+
800      810      820      830      840
+-----+-----+-----+-----+-----+
800 GCCGATACCGTCGCAGCCACCGCGCTGCAGGCCGCTAACGCCAACACAG
800 .....
800 .....
571 .....
583 -----

+---
850
+---
850 CATC
850 ....
850 ....
621 ....
583 ----

Isolat_humaner-Stamm
Referenz_MAP44135
X16293.1_Ben
AY660658.1_MAP12A-03
FJ775182.1_CAM86

```

Vergleich der 853 bp langen DNA-Sequenz, isoliert aus dem humanen Darmgewebe eines Colitis ulcerosa-Patienten (Isolat_humaner-Stamm) mit den Sequenzen des bovinen MAP-Referenzstammes (Referenz_MAP44135), eines humanen MAP-Stammes (X16293.1_Ben) sowie zweier capriner MAP-Stämme (AY660658.1_MAP12A-03, FJ775182.1_CAM86). Die Sequenzunterschiede sind farblich markiert (nähere Erläuterungen siehe Kap. 4.3 und Tab. 28). Y = Pyrimidin (C oder T), R = Purin (A oder G).

Abb. 12: Darstellung Multipler Sequence Alignements aus humanen und tierischen MAP-Stämmen.

- Abdulmawjood A, Roth S, Bülte M (2002):** Two methods for construction of internal amplification controls for the detection of *Escherichia coli* O157 by polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes* **16** (5): 335–339.
- Aboagye G und Rowe MT (2011):** Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw water and water treatment operations for the production of potable water. *Water Res.* **45** (11): 3271–3278.
- Abubakar I, Myhill D, Aliyu SH, Hunter PR (2008):** Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from patients with Crohn's disease using nucleic acid-based techniques: a systematic review and meta-analysis. *Inflamm. Bowel Dis.* **14** (3): 401–410.
- Adam O und Golly I (2005):** Morbus Crohn: die Kühlkettenhypothese Morbus Crohn: the Cold-Chain-Hypothesis. *Aktuel. Ernähr. Med.* **30** (5): 273–276.
- Aisenberg J und Janowitz HD (1993):** Cluster of inflammatory bowel disease in three close college friends? *J. Clin. Gastroenterol.* **17** (1): 18–20.
- Akbariqomi M und Heidari R (2014):** A Review of Crohn's disease: Pathophysiology, Genetics, Immunology, Environmental factors, Clinical presentation, Diagnosis, management. Review Article. Molecular Medicine Department, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences. Online verfügbar unter https://www.researchgate.net/publication/261721541_Review_Article_Crohn%27s_disease_A_Review_of_Crohn%27s_disease_Pathophysiology. Zuletzt geprüft am 25.06.2017.
- Anonymous (2007):** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Arbeitskreis für veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik (AVID) der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) (Hrsg.). Online verfügbar unter http://www.dvg.net/fileadmin/Bilder/PDF_AVID_Alt/methoden/AB_AVID-Methode_Paratb.pdf. Zuletzt geprüft am 19.01.2014.
- Anonymous (2012):** Testcharakteristika der zugelassenen ELISA-Tests für den Nachweis von Antikörpern gegen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* beim Rind gemessen an den Referenzpanels Serum und Milch des NRL. Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit (Hrsg.). Online verfügbar unter <https://www.fli.de/de/institute/institut-fuer-molekulare-pathogenese-imp/referenzlabore/nrl-fuer-paratuberkulose/>.
- Anonymous (2014):** Statistiksoftware R. Free Software Foundation's GNU project. Online verfügbar unter <http://www.r-project.org>.
- Anonymous (2015):** Nationales veterinärmedizinisches Referenzlabor für Tuberkulose Institut für molekulare Pathogenese. Online verfügbar unter <https://www.fli.bund.de/de/startseite/institute/institut-fuer-molekulare-pathogenese/referenzlabore/nrl-fuer-tuberkulose.html>. Zuletzt geprüft am 08.05.2015.
- Anonymous (2016a):** Paratuberkulose. Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit (Hrsg.). Online verfügbar unter https://openagrar.bmel-forschung.de/servlets/MCRFileNodeServlet/Document_derivate_00013606/Steckbrief-Paratuberkulose-2016-01-20.pdf. Zuletzt geprüft am 25.06.17.
- Anonymous (2016b):** Liste der nach § 17 c TierSG / § 11 Abs. 2 zugelassenen Mittel. Stand: 2016-02-29. Zulassungsstelle des Friedrich-Loeffler-Institutes (FLI), Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit (Hrsg.). Online verfügbar unter <https://www.fli.de/de/service/zulassungsstelle-des-fli/>.
- Anonymous (2017a):** HEMAP – Hessisches Paratuberkulose-Untersuchungsprogramm. Landesbetrieb Hessisches Landeslabor (Hrsg.), Gießen. Online verfügbar unter <https://lhl.hessen.de/veterinärmedizin/bakteriologie-mykologie/hessisches-paratuberkulose-untersuchungsprogramm>. Zuletzt geprüft am 25.06.2017.

Anonymous (2017b): OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2017. OIE – World organisation for animal health (Hrsg.). Online verfügbar unter <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2017/>. Zuletzt geprüft am 25.06.2017.

Antognoli MC, Garry FB, Hirst HL, Lombard JE, Dennis MM, Gould DH, Salman MD (2008): Characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* disseminated infection in dairy cattle and its association with antemortem test results. *Vet. Microbiol.* **127** (3–4): 300–308.

Atreya R (2011): MAP und Morbus Crohn. 52. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG), Arbeitsgebiet Lebensmittelhygiene, Garmisch-Partenkirchen, 28.09.2011, (Vortrag).

Atreya R, Bülte M, Gerlach G-F, Goethe R, Hornef MW, Köhler H, Meens J, Möbius P, Roeb E, Weiss S (2014): Facts, myths and hypotheses on the zoonotic nature of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Int. J. Med. Microbiol.* **304** (7): 858–867.

Autschbach F, Eisold S, Hinz U, Zinser S, Linnebacher M, Giese T, Löffler T, Büchler MW, Schmidt J (2005): High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* IS900 DNA in gut tissues from individuals with Crohn's disease. *Gut* **54** (7): 944–949.

Ayele WY, Bartos M, Svastova P, Pavlik I (2004): Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. *Vet. Microbiol.* **103** (3–4): 209–217.

Ayele WY, Macháčková M, Pavlík I (2001): The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. *Vet. Med. Czech.* **7–8** (46): 205–224.

Ayele WY, 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** (3): 1210–1214.

Balseiro A, García Marín JF, Solano P, Garrido JM, Prieto JM (2008): Histopathological classification of lesions observed in natural cases of paratuberculosis in free-ranging fallow deer (*Dama dama*). *J. Comp. Pathol.* **138** (4): 180–188.

Bang B (1906): Chronische pseudotuberkulöse Darmentzündung beim Rinde. *Berl. Tierärztl. Wochenschrift* **42**: 759–763.

Bartos M, Hlozek P, Svastova P, Dvorska L, Bull T, Matlova L, Parmova I, Kuhn I, Stubbs J, Moravkova M, Kintr J, Beran V, Melicharek I, Ocepek M, Pavlik I (2006): Identification of members of *Mycobacterium avium* species by Accu-Probes, serotyping, and single IS900, IS901, IS1245 and IS901-flanking region PCR with internal standards. *J. Microbiol. Methods* **64** (3): 333–345.

Baumgart DC und Sandborn WJ (2012): Crohn's disease. *Lancet* **380** (9853): 1590–1605.

Beard PM, Daniels MJ, Henderson D, Pirie A, Rudge K, Buxton D, Rhind S, Greig A, Hutchings MR, McKendrick I, Stevenson K, Sharp JM (2001a): Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *J. Clin. Microbiol.* **39** (4): 1517–1521.

Beard PM, Rhind SM, Buxton D, Daniels MJ, Henderson D, Pirie A, Rudge K, Greig A, Hutchings MR, Stevenson K, Sharp JM (2001b): Natural paratuberculosis infection in rabbits in Scotland. *J. Comp. Pathol.* **124** (4): 290–299.

Begon J, Juillerat P, Cornuz J, Clair C (2015): Smoking and digestive tract: a complex relationship. Part 1: Inflammatory bowel disease and cigarette smoking. *Rev. Med. Suisse* **11** (478): 1282–1287.

Benedictus G, Dijkhuizen AA, Stelwagen J (1987): Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. *Vet. Rec.* **121** (7): 142–146.

Beran V, Havelkova M, Kaustova J, Dvorska L, Pavlik I (2006): Cell wall deficient forms of mycobacteria: a review. *Vet. Med. Czech.* **51** (7): 365–389.

Bernstein CN, Blanchard JF, Rawsthorne P, Collins MT (2004): Population-based case control study of seroprevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *J. Clin. Microbiol.* **42** (3): 1129–1135.

- Bernstein CN, Nayar G, Hamel A, Blanchard JF (2003):** Study of animal-borne infections in the mucosae of patients with inflammatory bowel disease and population-based controls. *J. Clin. Microbiol.* **41** (11): 4986–4990.
- Bibiloni R, Mangold M, Madsen KL, Fedorak RN, Tannock GW (2006):** The bacteriology of biopsies differs between newly diagnosed, untreated, Crohn's disease and ulcerative colitis patients. *J. Med. Microbiol.* **55** (Pt 8): 1141–1149.
- Bisping W und Amtsberg G (1988):** Farbatlas zur Diagnose bakterieller Infektionserreger der Tiere. Paul Parey Scientific Publishers, Berlin, ISBN: 9783489507161.
- Borgaonkar MR, MacIntosh DG, Fardy JM (2000):** A meta-analysis of antimycobacterial therapy for Crohn's disease. *Am. J. Gastroenterol.* **95** (3): 725–729.
- Botsaris G, Slana I, Liapi M, Dodd C, Economides C, Rees C, Pavlik I (2010):** Rapid detection methods for viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk and cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **141**: 87–90.
- Bradner L, Robbe-Austerman S, Beitz DC, Stabel JR (2013a):** Chemical decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide improves recovery of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* organisms from cultured milk. *J. Clin. Microbiol.* **51** (7): 2139–2146.
- Bradner L, Robbe-Austerman S, Beitz DC, Stabel JR (2013b):** Optimization of hexadecylpyridinium chloride decontamination for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. *J. Clin. Microbiol.* **51** (5): 1575–1577.
- Brady C, O'Grady D, O'Meara F, Egan J, Bassett H (2008):** Relationships between clinical signs, pathological changes and tissue distribution of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in 21 cows from herds affected by Johne's disease. *Vet. Rec.* **162** (5): 147–152.
- Brandes JW und Lorenz-Meyer H (1983):** Epidemiologic aspects of Crohn regional enterocolitis and ulcerative colitis in Marburg/Lahn (West Germany) between 1962 and 1975. *Z. Gastroenterol.* **21** (2): 69–78.
- Brennan PJ und Nikaido H (1995):** The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 29–63.
- Buergelt CD, Layton AW, Ginn PE, Taylor M, King JM, Habecker PL, Mauldin E, Whitlock R, Rossiter C, Collins MT (2000):** The Pathology of Spontaneous Paratuberculosis in the North American Bison (*Bison bison*). *Vet. Pathol.* **37** (5): 428–438.
- Bull TJ (2008):** Herstellung des RAF-Mediums (Reid's A Agar mit fetalem Kälberserum). Gießen, 2008. E-Mail an das Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Bull TJ (2010):** Zur Herstellung und Inkubation des RAF-Mediums (Reid's A Agar mit fetalem Kälberserum). Ergänzung zur Mitteilung von 2008. Kassel, 2010. Schriftliche Mitteilung an Kim Nguyen.
- Bull TJ, Hermon-Taylor J, Pavlik I, El-Zaatari F, Tizard M (2000):** Characterization of IS900 loci in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and development of multiplex PCR typing. *Microbiology* **146** (9): 2185–2197.
- Bull TJ, Linedale R, Hinds J, Hermon-Taylor J (2009):** A rhodanine agent active against non-replicating intracellular *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Gut Pathog.* **1**: 25.
- Bull TJ, McMinn EJ, Sidi-Boumedine K, Skull A, Durkin D, Neild P, Rhodes G, Pickup R, Hermon-Taylor J (2003a):** Detection and Verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Fresh Ileocolonic Mucosal Biopsy Specimens from Individuals with and without Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol.* **41** (7): 2915–2923.
- Bull TJ, Sidi-Boumedine K, McMinn EJ, Stevenson K, Pickup R, Hermon-Taylor J (2003b):** Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) differentiate *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from other species of the *Mycobacterium avium* complex. *Mol. Cell. Probes* **17** (4): 157–164.

- Bülte M, Schönenbrücher H, Abdulmawjood A (2005):** From farm to fork – *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) als Zoonoseerreger? From farm to fork – *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) as zoonotic agent? Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. **118** (9/10): 377–385.
- Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (2014):** Empfehlungen für hygienische Anforderungen an das Halten von Wiederkäuern vom 7. Juli 2014 (WdkHH). BAnz. AT 01.08.2014 B1, S. 1–17.
- Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (2015):** Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten vom 09. August 1983 (TKrMedlpflV). BGBl. I S. 1474.
- Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft (2005):** Leitlinien für den Umgang mit der Paratuberkulose in Wiederkäuerbeständen (Paratuberkuloseleitlinien) vom 17. Januar 2005. BAnz. Nr. 28 vom 10.02.2005, S. 2165.
- Burisch J, Jess T, Martinato M, Lakatos PL (2013):** The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *J. Crohns Colitis* **7** (4): 322–337.
- Burnham WR, Lennard-Jones JE, Stanford JL, Bird RG (1978):** Mycobacteria as a possible cause of inflammatory bowel disease. *Lancet* **2** (8092 Pt 1): 693–696.
- Büttner M, Gerbermann H, Naumann L, Neuendorf E, Rinder H, Wildner M, Zapf A (2005):** Paratuberkulose beim Rind – Morbus Crohn beim Menschen: ein ursächlicher Zusammenhang? Bayrisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittel (LGL) (Hrsg.). Online verfügbar unter https://www.lgl.bayern.de/tiergesundheit/tierkrankheiten/bakterielle_pilzinfektionen/paratuberkulose/doc/paratuberkulose_ag.pdf. Zuletzt geprüft am 25.06.2017.
- Calkins BM (1989):** A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sci.* **34** (12): 1841–1854.
- Carta T, Álvarez J, Pérez de la Lastra JM, Gortázar C (2013):** Wildlife and paratuberculosis: A review. *Res. Vet. Sci.* **94** (2): 191–197.
- Carvalho IA, Schwarz DGG, Pietralonga PAG, Faria ACS, Braga IFE, Carvalho GD, Valente FL, Machado JP, Guimarães LMP, Ferrari MLA, Silva Júnior A, Moreira MAS (2015):** Presence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) in Brazilian patients with inflammatory bowel diseases and in controls. *Sao Paulo Med. J.* **134** (1): 13–19.
- Castellanos E, Juan L de, Domínguez L, Aranaz A (2012):** Progress in molecular typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Res. Vet. Sci.* **92** (2): 169–179.
- Çetinkaya B, Erdogan HM, Morgan KL (1997):** Relationships between the presence of Johne's disease and farm and management factors in dairy cattle in England. *Prev. Vet. Med.* **32** (3–4): 253–266.
- Chacon O, Bermudez LE, Barletta RG (2004):** Johne's disease, inflammatory bowel disease, and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**: 329–363.
- Chen W, Li D, Paulus B, Wilson I, Chadwick VS (2000):** Detection of *Listeria monocytogenes* by polymerase chain reaction in intestinal mucosal biopsies from patients with inflammatory bowel disease and controls. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **15** (10): 1145–1150.
- Cheng J, Bull TJ, Dalton P, Cen S, Finlayson C, Hermon-Taylor J (2005):** *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in the inflamed gut tissues of patients with Crohn's Disease in China and its potential relationship to the consumption of cow's milk: a preliminary study. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **21** (6–7): 1175–1179.
- Chiba M, Fukushima T, Inoue S, Horie Y, Iizuka M, Masamune O (1998):** *Listeria monocytogenes* in Crohn's disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **33** (4): 430–434.
- Chiodini RJ (1989):** Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. *Clin. Microbiol. Rev.* **2** (1): 90–117.

- Chiodini RJ, Chamberlin WM, Sarosiek J, McCallum RW (2012):** Crohn's disease and the mycobacterioses: A quarter century later. Causation or simple association? *Crit. Rev. Microbiol.* **38** (1): 52–93.
- Chiodini RJ und Hermon-Taylor J (1993):** The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. *J. Vet. Diagn. Invest.* **5** (4): 629–631.
- Chiodini RJ und Van Kruiningen HJ (1983):** Eastern white-tailed deer as a reservoir of ruminant paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **182** (2): 168–169.
- Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Merkal RS (1984a):** Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell. Vet.* **74** (3): 218–262.
- Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Merkal RS, Thayer WR, Jr., Coutu JA (1984b):** Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol.* **20** (5): 966–971.
- Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Thayer WR, Coutu JA (1986):** Spheroplastic phase of mycobacteria isolated from patients with Crohn's disease. *J. Clin. Microbiol.* **24** (3): 357–363.
- Clarke CJ (1997):** The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J. Comp. Pathol.* **116** (3): 217–261.
- Collins DM, Gabric DM, de Lisle GW (1989):** Identification of a repetitive DNA sequence specific to *Mycobacterium paratuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **51** (1): 175–178.
- Collins DM, Gabric DM, de Lisle GW (1990):** Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *J. Clin. Microbiol.* **28** (7): 1591–1596.
- Corn JL, Manning EJB, Sreevatsan S, Fischer JR (2005):** Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from free-ranging birds and mammals on livestock premises. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** (11): 6963–6967.
- Cornish JA, Tan E, Simillis C, Clark SK, Teare J, Tekkis PP (2008):** The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* **103** (9): 2394–2400.
- Cosnes J, Carbonnel F, Beaugerie L, Le Quintrec Y, Gendre JP (1996):** Effects of cigarette smoking on the long-term course of Crohn's disease. *Gastroenterology* **110** (2): 424–431.
- Cossu D, Masala S, Cocco E, Paccagnini D, Tranquilli S, Frau J, Marrosu MG, Sechi LA (2013):** Association of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *SLC11A1* polymorphisms in Sardinian multiple sclerosis patients. *J. Infect. Dev. Ctries.* **7** (3): 203–207.
- Cousins DV, Whittington R, Marsh I, Masters A, Evans RJ, 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** (6): 431–442.
- Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD (1932):** Regional ileitis: A pathologic and clinical entity. *JAMA. (Journal of the American Medical Association)* **99** (16): 1323–1329.
- Daiss W, Scheurlen M, Malchow H (1989):** Epidemiology of inflammatory bowel disease in the county of Tübingen (West Germany). *Scand. J. Gastroenterol.* **24 Suppl. 170**: 39–43.
- Dalziel TK (1913):** Chronic intestinal enteritis. *BMJ.* **2**: 1068–1070.
- Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser A-L, Barnich N, Bringer M-A, Swidsinski A, Beaugerie L, Colombel J-F (2004):** High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* **127** (2): 412–421.

- Dignass A, Preiß JC, Aust DE, Autschbach F, Ballauff A, Barretton G, Bokemeyer B, Fichtner-Feigl S, Hagel S, Herrlinger KR, Jantschek G, Kroesen A, Kruis W, Kucharzik T, Langhorst J, Reinshagen M, Rogler G, Schleiermacher D, Schmidt C, Schreiber S, Schulze H, Stange E, Zeitz M, Hoffmann JC, Stallmach A (2011):** Aktualisierte Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der Colitis ulcerosa 2011 Ergebnisse einer Evidenzbasierten Konsensuskonferenz. *Z. Gastroenterol.* **49** (9): 1276–1341.
- Dixon WF (1993):** BMDP Statistical Software Manual. Volume 1 and 2, Version 8.1. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London.
- Djønne B, Jensen MR, Grant IR, Holstad G (2003):** Detection by immunomagnetic PCR of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from dairy goats in Norway. *Vet. Microbiol.* **92** (1–2): 135–143.
- Doetsch RN (1981):** Determinative Methods of Light Microscopy. In: Gerhardt P, Murray RGE, Costilow RN, Nester EW, Wood WA, Krieg NR, Phillips GB (Hrsg.): Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA: 21–33.
- Donaghy JA, Totton NL, Rowe MT (2004):** Persistence of *Mycobacterium paratuberculosis* during manufacture and ripening of cheddar cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **70** (8): 4899–4905.
- Dubaniewicz A, Jamieson SE, Dubaniewicz-Wybieralska M, Fakiola M, Nancy Miller E, Blackwell JM (2005):** Association between *SLC11A1* (formerly *NRAMP1*) and the risk of sarcoidosis in Poland. *Eur. J. Hum. Genet.* **13** (7): 829–834.
- Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A, Dassopoulos T, Bitton A, Yang H, Targan S, Datta LW, Kistner EO, Schumm LP, Lee AT, Gregersen PK, Barnada MM, Rotter JI, Nicolae DL, Cho JH (2006):** A genome-wide association study identifies *IL23R* as an inflammatory bowel disease gene. *Science* **314** (5804): 1461–1463.
- Dufour B, Pouillot R, Durand B (2004):** A cost/benefit study of paratuberculosis certification in French cattle herds. *Vet. Res.* **35** (1): 69–81.
- Economou M und Pappas G (2008):** New global map of Crohn's disease: Genetic, environmental, and socioeconomic correlations. *Inflamm. Bowel Dis.* **14** (5): 709–720.
- Economou M, Zambeli E, Michopoulos S (2009):** Incidence and prevalence of Crohn's disease and its etiological influences. *Ann. Gastroenterol.* **22** (3): 158–167.
- Ekbohm A (2007):** The changing faces of Crohn's disease and ulcerative colitis. In: Targan SR, Shanahan F, Karp LC (Hrsg.): Inflammatory Bowel Disease: From Bench to Bedside. 2nd edition. Springer, New York, USA: 5–20.
- Ellinghaus D, Bethune J, Petersen B-S, Franke A (2015):** The genetics of Crohn's disease and ulcerative colitis – status quo and beyond. *Scand. J. Gastroenterol.* **50** (1): 13–23.
- Ellingson JL, Anderson JL, Koziczkowski JJ, Radcliff RP, Sloan SJ, Allen SE, Sullivan NM (2005):** Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. *J. Food Prot.* **68** (5): 966–972.
- Ellingson JLE, Bolin CA, Stabel JR (1998):** Identification of a gene unique to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and application to diagnosis of paratuberculosis. *Mol. Cell. Probes* **12** (3): 133–142.
- Eltholth MM, Marsh VR, van Winden S, Guitian FJ (2009):** Contamination of food products with *Mycobacterium avium paratuberculosis*: a systematic review. *J. Appl. Microbiol.* **107** (4): 1061–1071.
- El-Zaatari FAK, Osato MS, Graham DY (2001):** Etiology of Crohn's disease: the role of *Mycobacterium avium paratuberculosis*. *Trends. Mol. Med.* **7** (6): 247–252.
- 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** (2): 267–271.

- European Commission (2000):** Possible links between Crohn's disease and paratuberculosis Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare. Adopted 21 March 2000. Unter Mitarbeit von Badiola JJ, Bakker D, Garcia marin JF, Gilot P, Hermon-Taylor J, Sharp JM, Shivananda S, Thorel M-F und Vuitton D. Directorate-General Health & Consumer Protection, Directorate B - Scientific Health Opinions, Unit B3 – Management of scientific committees II. Online verfügbar unter http://www.johnes.org/handouts/files/out38_en.pdf. Zuletzt geprüft am 25.06.2017.
- Falkinham JO, III. (2003):** Factors influencing the chlorine susceptibility of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*. Appl. Environ. Microbiol. **69** (9): 5685–5689.
- Falkinham JO, III., Norton CD, LeChevallier MW (2001):** Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other Mycobacteria in drinking water distribution systems. Appl. Environ. Microbiol. **67** (3): 1225–1231.
- Fang Y, Wu WH, Pepper JL, Larsen JL, Marras SAE, Nelson EA, Epperson WB, Christopher-Hennings J (2002):** Comparison of real-time, quantitative PCR with molecular beacons to nested PCR and culture methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine fecal samples. J. Clin. Microbiol. **40** (1): 287–291.
- Feller M, Huwiler K, Stephan R, Altpeter E, Shang A, Furrer H, Pfyffer GE, Jemmi T, Baumgartner A, Egger M (2007):** *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect. Dis. **7** (9): 607–613.
- Fischer O, Mátlová L, Dvorská L, Švástová P, Bartl J, Melichárek I, Weston RT, Pavlík I (2001):** Diptera as vectors of mycobacterial infections in cattle and pigs. Med. Vet. Entomol. **15** (2): 208–211.
- Fischer OA, Matlova L, Bartl J, Dvorska L, Svastova P, du Maine R, Melicharek I, Bartos M, Pavlik I (2003a):** Earthworms (*Oligochaeta*, *Lumbricidae*) and mycobacteria. Vet. Microbiol. **91** (4): 325–338.
- Fischer OA, Matlova L, Dvorska L, Svastova P, Pavlik I (2003b):** Nymphs of the Oriental cockroach (*Blatta orientalis*) as passive vectors of causal agents of avian tuberculosis and paratuberculosis. Med. Vet. Entomol. **17** (2): 145–150.
- Fischer OA, Matlova L, Dvorska L, Svastova P, Bartos M, Weston RT, Kopecna M, Trcka I, Pavlik I (2005):** Potential risk of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* spread by syrphid flies in infected cattle farms. Med. Vet. Entomol. **19** (4): 360–366.
- Fischer OA, Matlova L, Dvorska L, Svastova P, Peral DL, Weston RT, Bartos M, Pavlik I (2004):** Beetles as possible vectors of infections caused by *Mycobacterium avium* species. Vet. Microbiol. **102** (3–4): 247–255.
- Forbes A und Kalantzis T (2006):** Crohn's disease: the cold chain hypothesis. Int. J. Colorectal Dis. **21** (5): 399–401.
- Füllgrabe RAR (2008):** Untersuchungen zum kulturellen und molekularbiologischen Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) aus humanen Darmbiopptaten. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen, ISBN: 3-8359-5353-2.
- Garcia AB und Shalloo L (2015):** Invited review: The economic impact and control of paratuberculosis in cattle. J. Dairy Sci. **98** (8): 5019–5039.
- Gay JM und Sherman DM (1992):** Factors in the epidemiology and control of ruminant paratuberculosis. Vet. Med. **87** (11): 1133–1139.
- Gerlach GF (2002):** Paratuberkulose: Erreger und Übertragungswege. In: Hartung J und Homuth M (Hrsg.): Schwerpunkt 12/02. Paratuberkulose. Verlag M. & H. Schaper, Alfeld. Dtsch. tierärztl. Wschr. **109** (12): 504–506.
- Ghuri YA, Richards DM, Rahimi EF, Krill JT, Jelinek KA, DuPont AW (2014):** Systematic review of randomized controlled trials of probiotics, prebiotics, and synbiotics in inflammatory bowel disease. Clin. Exp. Gastroenterol. **7**: 473–487.

- Gilardoni LR, Paolicchi FA, Mundo SL (2012):** Bovine paratuberculosis: a review of the advantages and disadvantages of different diagnostic tests. *Rev. Argent. Microbiol.* **44** (3): 201–215.
- Gill CO, Saucier L, Meadus WJ (2011):** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy products, meat, and drinking water. *J. Food Prot.* **74** (3): 480–499.
- Glasser AL, Boudeau J, Barnich N, Perruchot MH, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A (2001):** Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infect. Immun.* **69** (9): 5529–5537.
- Godet PG, May GR, Sutherland LR (1995):** Meta-analysis of the role of oral contraceptive agents in inflammatory bowel disease. *Gut* **37** (5): 668–673.
- Goebell H, Dirks E, Förster S, Strey B, Quebe-Fehling E (1994):** A prospective analysis of the incidence and prevalence of Crohn's disease in an urban population in Germany. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **6** (11): 971–1071.
- Goetz M (2012):** Confocal Laser Endomicroscopy: Applications in Clinical and Translational Science – A Comprehensive Review. *ISRN Pathology* **2012**: 1–13.
- González J, Geijo MV, García-Pariente C, Verna A, Corpa JM, Reyes LE, Ferreras MC, Juste RA, García Marín JF, Pérez V (2005):** Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle. *J. Comp. Pathol.* **133** (2–3): 184–196.
- Graham DY, Markesich DC, Yoshimura HH (1987):** Mycobacteria and inflammatory bowel disease. Results of culture. *Gastroenterology* **92** (2): 436–442.
- Grant I, Pope CM, O'Riordan LM, Ball HJ, Rowe MT (2000):** Improved detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by immunomagnetic PCR. *Vet. Microbiol.* **77** (3–4): 369–378.
- Grant IR (2005):** Zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: the current position. *J. Appl. Microbiol.* **98** (6): 1282–1293.
- Grant IR, Ball HJ, Neill SD, Rowe MT (1996):** Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in cows' milk at pasteurization temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** (2): 631–636.
- Grant IR, Ball HJ, Rowe MT (2002):** 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** (5): 2428–2435.
- Grant IR, Kirk RB, Hitchings E, Rowe MT (2003):** Comparative evaluation of the MGIT™ and BACTEC culture systems for the recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. *J. Appl. Microbiol.* **95** (1): 196–201.
- Green EP, Moss MT, Hermon-Taylor J, McFadden JJ (1989):** Insertion elements in mycobacteria. *Acta Leprol.* **7 Suppl. 1**: 239–242.
- Greenstein RJ (2003):** Is Crohn's disease caused by a mycobacterium? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease. *Lancet Infect. Dis.* **3** (8): 507–514.
- Greig A, Stevenson K, Perez V, Pirie AA, Grant JM, Sharp JM (1997):** Paratuberculosis in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet. Rec.* **140** (6): 141–143.
- Hagemann PKH (1938):** Fluoreszenzfärbung von Tuberkelbakterien mit Auramin. *Münch. Med. Wschr.* **85**: 1066–1068.
- Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeyer A, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG (2001):** Association between insertion mutation in *NOD2* gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* **357** (9272): 1925–1928.
- Harris NB und Barletta RG (2001):** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clin. Microbiol. Rev.* **14** (3): 489–512.

- Hasonova L und Pavlik I (2006):** Economic impact of paratuberculosis in dairy cattle herds: a review. *Vet. Med. Czech.* **51** (5): 193–211.
- Hein R, Köster I, Bollschweiler E, Schubert I (2014):** Prevalence of inflammatory bowel disease: estimates for 2010 and trends in Germany from a large insurance-based regional cohort. *Scand. J. Gastroenterol.* **49** (11): 1325–1335.
- Hermon-Taylor J, Barnes N, Clarke C, Finlayson C (1998):** *Mycobacterium paratuberculosis* cervical lymphadenitis, followed five years later by terminal ileitis similar to Crohn's disease. *BMJ.* **316** (7129): 449–453.
- Hermon-Taylor J und Bull T (2002):** Crohn's disease caused by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: a public health tragedy whose resolution is long overdue. *J. Med. Microbiol.* **51** (1): 3–6.
- Hermon-Taylor J, Bull TJ, Sheridan JM, Cheng J, Stellakis ML, Sumar N (2000):** Causation of Crohn's disease by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Can. J. Gastroenterol.* **14** (6): 521–539.
- Hermon-Taylor J, Moss M, Tizard M, Malik Z, Sanderson J (1990):** Molecular biology of Crohn's disease mycobacteria. *Bailleres Clin. Gastroenterol.* **4** (1): 23–42.
- Hielta SK (1992):** The options in diagnosing ruminant paratuberculosis. *Vet. Med.* **87**: 1122–1132.
- Hines II ME und Styer EL (2003):** Preliminary characterization of chemically generated *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cell wall deficient forms (spheroplasts). *Vet. Microbiol.* **95** (4): 247–258.
- Hodgson HJF und Bhatti M (1995):** Assessment of disease activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **1** (2): 117–134.
- Hoffmann JC, Preiß JC, Autschbach F, Buhr HJ, Häuser W, Herrlinger K, Höhne W, Koletzko S, Krieglstein C, Kruis W, Matthes H, Moser G, Reinshagen M, Rogler G, Schreiber S, Schreyer AG, Sido B, Siegmund B, Stallmach A, Bokemeyer B, Stange EF, Zeitz M (2008):** S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn“ Ergebnisse einer Evidenz-basierten Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten zusammen mit dem Kompetenznetz Chronisch entzündliche Darmerkrankungen. Clinical Practice Guideline on Diagnosis and Treatment of Crohn's Disease. Results of a German Evidence-based Consensus Conference. *Z. Gastroenterol.* **46** (09): 1094–1146.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST (Hrsg.) (1994):** *Bergey's Manual® of Determinative Bacteriology*. 9th edition. Williams & Wilkins, Maryland, USA.
- Homuth M (2002):** Diagnostik der Paratuberkulose. In: Hartung J und Homuth M (Hrsg.): Schwerpunkt 12/02. Paratuberkulose. Verlag M. & H. Schaper, Alfeld. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* **109** (12): 516–519.
- Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, Kieser T, Bruton CJ, Kieser HM, Lydiate DJ, Smith CP, Ward JM, Schrempf H (1986):** Genetic manipulation of streptomycetes: a laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich, UK, ISBN: 0-7084-0036-0.
- Hruska K, Bartos M, 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** (8): 327–335.
- Hruska K, Slana I, Kralik P, Pavlik I (2011):** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in powdered infant milk: *F57* competitive real time PCR. *Vet. Med. Czech.* **56** (5): 226–230.
- Hruška K und Pavlik I (2012):** Paratuberculosis and Crohn's disease: Premises and open questions. Centaur global network information 2012-08-21-131 (Hrsg.): Centaur Global Network, CGN minireviews on mycobacteria: Introductory document:1–3.
- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G (2001):** Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411** (6837): 599–603.

- Hugot J-P, Alberti C, Berrebi D, Bingen E, Cézard J-P (2003):** Crohn's disease: the cold chain hypothesis. *Lancet* **362** (9400): 2012–2015.
- Hulten K, El-Zimaity HMT, Karttunen TJ, Almashhrawi A, Schwartz MR, Graham DY, El-Zaatari FAK (2001):** Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Crohn's diseased tissues by *in situ* hybridization. *Am. J. Gastroenterol.* **96** (5): 1529–1535.
- Hulten K, Karttunen TJ, El-Zimaity HMT, Naser SA, Collins MT, Graham DY, El-Zaatari FA (2000a):** Identification of cell wall deficient forms of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in paraffin embedded tissues from animals with Johne's disease by *in situ* hybridization. *J. Microbiol. Methods* **42** (2): 185–195.
- Hulten K, Karttunen TJ, El-Zimaity HMT, Naser SA, Almashhrawi A, Graham DY, El-Zaatari FA (2000b):** *In situ* hybridization method for studies of cell wall deficient *M. paratuberculosis* in tissue samples. *Vet. Microbiol.* **77** (3–4): 513–518.
- Ikonomopoulos J, Pavlik I, Bartos M, Svastova P, Ayele WY, Roubal P, Lukas J, Cook N, Gazouli M (2005):** Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail cheeses from Greece and the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** (12): 8934–8936.
- Inamdar S, Volfson A, Rosen L, Sunday S, Katz S, Sultan K (2015):** Smoking and early infliximab response in Crohn's disease: a meta-analysis. *J. Crohns Colitis* **9** (2): 140–146.
- Ireng LM, Walravens K, Govaerts M, Godfroid J, Rosseels V, Huygen K, Gala J-L (2009):** Development and validation of a triplex real-time PCR for rapid detection and specific identification of *M. avium* sub sp. *paratuberculosis* in faecal samples. *Vet. Microbiol.* **136** (1–2): 166–172.
- Jaravata CV, Smith WL, Rensen GJ, Ruzante J, Cullor JS (2007):** Survey of ground beef for the detection of *Mycobacterium avium paratuberculosis*. *Foodborne Pathog. Dis.* **4** (1): 103–106.
- Jensen KA (1932):** Reinzüchtung und Typenbestimmung von Tuberkelbazillenstämmen. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I Orig.* **125**: 222–239.
- Jevon GP und Madhur R (2010):** Endoscopic and histologic findings in pediatric inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol* **6** (3): 174–180.
- Johne HA und Frothingham L (1895):** Ein eigenthuemlicher Fall von Tuberkulose beim Rind. *Dtsch. Ztschr. Tiermed. Path.* **21**: 438–454.
- Jørgensen JB (1977):** Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry. *Nord. Vet. Med.* **29** (6): 267–270.
- Juan L de, Mateos A, Domínguez L, Sharp JM, Stevenson K (2005):** Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* **106** (3–4): 249–257.
- Keown D (2010):** The role of cholesterol in the uptake and pathogenesis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in human monocytes. Masterarbeit, University of Canterbury, Christchurch, New Zealand.
- Kirkwood CD, Wagner J, Boniface K, Vaughan J, Michalski WP, Catto-Smith AG, Cameron DJS, Bishop RF (2009):** *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Children with Early-Onset Crohn's Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **15** (11): 1643–1655.
- Klanicova B, Seda J, Slana I, Slany M, Pavlik I (2013):** The tracing of mycobacteria in drinking water supply systems by culture, conventional, and real time PCRs. *Curr. Microbiol.* **67** (6): 725–731.
- Klanicova B, Slana I, Roubal P, Pavlik I, Kralik P (2012):** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* survival during fermentation of soured milk products detected by culture and quantitative real time PCR methods. *Int. J. Food Microbiol.* **157** (2): 150–155.
- Klement E, Cohen RV, Boxman J, Joseph A, Reif S (2004):** Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* **80** (5): 1342–1352.
- Klijn N, Herrewegh AA, Jong P de (2001a):** Heat inactivation data for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: implications for interpretation. *J. Appl. Microbiol.* **91** (4): 697–704.

- Klijn N, Herrewegh AAPM, Jong P de (2001b):** Heat inactivation data for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: implications for interpretation. J. Appl. Microbiol. **91** (4): 697–704.
- Klockars M und Reitamo S (1975):** Tissue distribution of lysozyme in man. J. Histochem. Cytochem. **23** (12): 932–940.
- Klockars M, Reitamo S, Reitamo JJ, Möller C (1977):** Immunohistochemical identification of lysozyme in intestinal lesions in ulcerative colitis and Crohn's disease. Gut **18** (5): 377–381.
- Kopecky KE, Larsen AB, Merkal RS (1967):** Uterine infection in bovine paratuberculosis. Am. J. Vet. Res. **28** (125): 1043–1045.
- Kornbluth A und Sachar DB (2010):** Ulcerative colitis practice guidelines in adults: American College Of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. Am. J. Gastroenterol. **105** (3): 501–523.
- Kralik P, Beran V, Pavlik I (2012):** Enumeration of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by quantitative real-time PCR, culture on solid media and optical densitometry. BMC Res. Notes **5**: S. 114.
- Kubica GP, Dye WE, Cohn ML, Middlebrook G (1963):** Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide for culture of mycobacteria. Am. Rev. Respir. Dis. **87** (5): 775–779.
- Lambrecht RS, Carriere JF, Collins MT (1988):** A model for analyzing growth kinetics of a slowly growing *Mycobacterium* sp. Appl. Environ. Microbiol. **54** (4): 910–916.
- Lamps LW, Madhusudhan KT, Havens JM, Greenson JK, Bronner MP, Chiles MC, Dean PJ, Scott MA (2003):** Pathogenic *Yersinia* DNA is detected in bowel and mesenteric lymph nodes from patients with Crohn's disease. Am. J. Gastroenterol. **27** (2): 220–227.
- Larsen AB und Kopecky KE (1970):** *Mycobacterium paratuberculosis* in reproductive organs and semen of bulls. Am. J. Vet. Res. **31** (2): 255–258.
- Larsen AB, Merkal RS, Vardaman TH (1956):** Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*. Am. J. Vet. Res. **17** (64): 549–551.
- Li L, Bannantine JP, Zhang Q, Amonsin A, May BJ, Alt D, Banerji N, Kanjilal S, Kapur V (2005):** The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **102** (35): 12344–12349.
- Liu Y, Van Kruiningen, H J, West AB, Cartun RW, Cortot A, Colombel JF (1995):** Immunocytochemical evidence of *Listeria*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus* antigens in Crohn's disease. Gastroenterology **108** (5): 1396–1404.
- Liverani E, Scaioli E, Cardamone C, Dal Monte P, Belluzzi A (2014):** *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in the etiology of Crohn's disease, cause or epiphenomenon? World J. Gastroenterol. **20** (36): 13060–13070.
- Lloyd JB, Whittington RJ, 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** (9): 261–263.
- Löffler A und Glados M (1993):** Data on the epidemiology of Crohn disease in the city of Cologne. Med. Klin. (Munich) **88** (9): 516–519.
- Lovell R, Levi M, Francis J (1944):** Studies on the survival of Johne's bacilli. J. Comp. Pathol. **54**: 120–129.
- Löwenstein E (1931):** Die Züchtung der Tuberkelbazillen aus dem strömenden Blute. Zentralbl. Bakteriologie Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I Orig. **120**: 127–129.
- Lund BM, Gould GW, Rampling AM (2002):** Pasteurization of milk and the heat resistance of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review of the data. Int. J. Food Microbiol. **77** (1–2): 135–145.
- Mahid SS, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S (2006):** Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. Mayo Clin. Proc. **81** (11): 1462–1471.

- Markesich DC, Graham DY, Yoshimura HH (1988):** Progress in culture and subculture of spheroplasts and fastidious acid-fast bacilli isolated from intestinal tissues. *J. Clin. Microbiol.* **26** (8): 1600–1603.
- Martin ME, Horton CL, Sheffner AL, Solomon JD (1968):** Direct comparison of the N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide and the trisodium phosphate digestion methods for the culture of mycobacteria. *Appl. Microbiol.* **16** (3): 506–508.
- Mattman LH, Tunstall LH, Gordon DL (1960):** L Variation in Mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.* **82** (2): 202–2011.
- Mawdsley JE und Rampton DS (2005):** Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut* **54** (10): 1481–1491.
- McClure HM, Chiodini RJ, Anderson DC, Swenson RB, Thayer WR, Coutu JA (1987):** *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a colony of stump-tail macaques (*Macaca arctoides*). *J. Infect. Dis.* **155** (5): 1011–1019.
- McFadden JJ, Butcher PD, Chiodini R, Hermon-Taylor J (1987):** Crohn's disease-isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*, as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species. *J. Clin. Microbiol.* **25** (5): 796–801.
- Meadus WJ, Gill CO, Duff P, Badoni M, Saucier L (2008):** Prevalence on beef carcasses of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA. *Int. J. Food Microbiol.* **124** (3): 291–294.
- Mendoza JL, San-Pedro A, Culebras E, Cies R, Taxonera C, Lana R, Urcelay E, de la Torre F, Picazo JJ, Díaz-Rubio M (2010):** High prevalence of viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Crohn's disease. *World J. Gastroenterol.* **16** (36): 4558–4563.
- Merkal RS (1973):** Laboratory diagnosis of bovine paratuberculosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **63** (9): 1100–1102.
- Merkal RS, Whipple DL, Sacks JM, Snyder GR (1987):** Prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in ileocecal lymph nodes of cattle culled in the United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **190** (6): 676–680.
- 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** (9): 3446–3452.
- Möbius P, Hotzel H, Raßbach A, Köhler H (2008a):** Comparison of 13 single-round and nested PCR assays targeting IS900, IS*Mav2*, f57 and locus 255 for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* **126** (4): 324–333.
- Möbius P, Luyven G, Hotzel H, Köhler H (2008b):** High genetic diversity among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains from German cattle herds shown by combination of IS900 restriction fragment length polymorphism analysis and mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem-repeat typing. *J. Clin. Microbiol.* **46** (3): 972–981.
- Molicotti P, Scanu AM, Lumbau A, Cannas S, Bua A, Lugliè P, Zanetti S (2013):** Molecular identification of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in oral biopsies of Crohn's disease patients. *Gut Pathog.* **5** (1): S. 18.
- Molitor A (2014):** Vergleichende Untersuchungen zum molekularbiologischen Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in Milch und Säuglingsanfangsnahrung. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen, ISBN: 978-3-86345-213-1.
- Molodecky NA und Kaplan GG (2010):** Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol* **6** (5): 339–346.
- Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG (2012):** Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* **142** (1): S. 46.

- Moser M (2004):** Entwicklung und Validierung eines Direktnachweisverfahrens für *Mycobacterium avium* subspezies *paratuberculosis*. Diplomarbeit, Fachhochschule Weihenstephan.
- Motiwala AS, Strother M, Amonsin A, Byrum B, Naser SA, Stabel JR, Shulaw WP, Bannantine JP, Kapur V, Sreevatsan S (2003):** Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Evidence for limited strain diversity, strain sharing, and identification of unique targets for diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* **41** (5): 2015–2026.
- Münster P, Fechner K, Völkel I, Buchholz A von, Czerny C-P (2013):** Distribution of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in a German zoological garden determined by IS900 semi-nested and quantitative real-time PCR. *Vet. Microbiol.* **163** (1–2): 116–123.
- Murty MV und Venkitasubramanian TA (1983):** Growth and macromolecular synthesis of spheroplasts of *Mycobacterium smegmatis* ATCC 14468. *Ann. Microbiol.* **134B** (3): 359–365.
- Mutharia LM, Klassen MD, Fairles J, Barbut S, Gill CO (2010):** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in muscle, lymphatic and organ tissues from cows with advanced Johne's disease. *Int. J. Food Microbiol.* **136** (3): 340–344.
- Naser SA, McCarthy CM, Smith GB, Tupponce AK (1993):** Low temperature protocol for efficient transformation of *Mycobacterium smegmatis* spheroplasts. *Curr. Microbiol.* **27** (3): 153–156.
- Naser SA, Hulten K, Shafran I, Graham DY, El-Zaatari FA (2000a):** Specific seroreactivity of Crohn's disease patients against p35 and p36 antigens of *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* **77** (3–4): 497–504.
- Naser SA, Schwartz D, Shafran I (2000b):** Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from breast milk of Crohn's disease patients. *Am. J. Gastroenterol.* **95** (4): 1094–1095.
- Naser SA, Ghobrial G, Romero C, Valentine JF (2004):** Culture of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet* **364** (9439): 1039–1044.
- Naser SA, Sagrarsingh SR, Naser AS, Thanigachalam S (2014):** *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* causes Crohn's disease in some inflammatory bowel disease patients. *World J. Gastroenterol.* **20** (23): 7403–7415.
- National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (2010):** Assessment of food as a source of exposure to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP). *J. Food Prot.* **73** (7): 1357–1397.
- Nebbia P, Robino P, Ferroglio E, Rossi L, Menequz G, Rosati S (2000):** Paratuberculosis in red deer (*Cervus elaphus hippelaphus*) in the western Alps. *Vet. Res. Commun.* **24** (7): 435–443.
- Neumann H, Fuchs FS, Vieth M, Atreya R, Siebler J, Kiesslich R, Neurath MF (2011):** Review article: in vivo imaging by endocytoscopy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **33** (11): 1183–1193.
- Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Wu JCY, Chan FKL, Sung JY, Kaplan GG (2017):** Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: A systematic review of population-based studies. *Lancet*: 1–10.
- Nguyen K, Akineden Ö, Arnhold S, Bülte M (2011a):** First results of trials for detection and resuscitation of cell wall deficient forms (spheroplasts) of *Mycobacterium smegmatis* as surrogate for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP). ZooMAP Meeting. Helmholtz-Centre for Infection Research, Braunschweig, 02.11.2011 (Vortrag).
- Nguyen K, Akineden Ö, Bülte M (2011b):** Formation and detection of cell wall deficient forms (spheroplasts) of *Mycobacterium smegmatis* as a model for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP). In: National Research Platform for Zoonoses (Hrsg.): National Symposium on Zoonoses Research 2011. Berlin, 06.–07. Oktober 2011: 118–119.
- Nielsen SS (2009):** Programmes on Paratuberculosis in Europe. In: International Association for Paratuberculosis (Hrsg.): Proceedings of 10th International Colloquium on Paratuberculosis. Minneapolis, USA, 9.–14. August 2009: 101–108.

- Nielsen SS und Toft N (2009):** A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev. Vet. Med.* **88** (1): 1–14.
- Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nuñez G, Cho JH (2001):** A frameshift mutation in *NOD2* associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411** (6837): 603–606.
- Ott C, Obermeier F, Thielier S, Kemptner D, Bauer A, Schölmerich J, Rogler G, Timmer A (2008):** The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: a prospective population-based study. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **20** (9): 917–923.
- Ott SL, Wells SJ, Wagner BA (1999):** Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prev. Vet. Med.* **40** (3–4): 179–192.
- Over K, Crandall PG, O'Bryan CA, Ricke SC (2011):** Current perspectives on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Johne's disease, and Crohn's disease: a Review. *Crit. Rev. Microbiol.* **37** (2): 141–156.
- Paccagnini D, Sieswerda L, Rosu V, Masala S, Pacifico A, Gazouli M, Ikononopoulos J, Ahmed N, Zanetti S, Sechi LA (2009):** Linking chronic infection and autoimmune diseases: *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, SLC11A1 polymorphisms and type-1 diabetes mellitus. *PLoS One* **4** (9): e7109.
- Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Anderson CA, Fisher SA, Roberts RG, Nimmo ER, Cummings FR, Soars D, Drummond H, Lees CW, Khawaja SA, Bagnall R, Burke DA, Todhunter CE, Ahmad T, Onnie CM, McArdle W, Strachan D, Bethel G, Bryan C, Lewis CM, Deloukas P, Forbes A, Sanderson J, Jewell DP, Satsangi J, Mansfield JC, Cardon L, Mathew CG (2007):** Sequence variants in the autophagy gene *IRGM* and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat. Genet.* **39** (7): 830–832.
- Parrish NM, Radcliff RP, Brey BJ, Anderson JL, Clark DL, Jr., Kozičkowski JJ, Ko CG, Goldberg ND, Brinker DA, Carlson RA, Dick JD, Ellingson JLE (2009):** Absence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Crohn's patients. *Inflamm. Bowel Dis.* **15** (4): 558–565.
- Pavlik I, Ayele WY, 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* subsp. *paratuberculosis*. In: International Association for Paratuberculosis (Hrsg.): Proceedings of 7th International Colloquium on Paratuberculosis. Bilbao, Spanien, 11.–14. Juni 2002: 90–91.
- Pavlik I, Bartl J, Dvorska L, Svastova P, du Maine R, Machakova M, Yayo Ayele W, Horvathova A (2000a):** Epidemiology of paratuberculosis in wild ruminants studied by restriction fragment length polymorphism in the Czech Republic during the period 1995–1998. *Vet. Microbiol.* **77** (3–4): 231–251.
- Pavlik I, Matlova L, Bartl J, Svastova P, Dvorska L, Whitlock R (2000b):** Parallel faecal and organ *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* culture of different productivity types of cattle. *Vet. Microbiol.* **77** (3–4): 309–324.
- Pavlik I, Bejčková L, Pavlas M, Rozsypalová Z, Kosková S (1995):** Characterization by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization using IS900 of bovine, ovine, caprine and human dependent strains of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated in various localities. *Vet. Microbiol.* **45** (4): 311–318.
- Periasamy S, Tripathi BN, Singh N (2013):** Mechanisms of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* induced apoptosis and necrosis in bovine macrophages. *Vet. Microbiol.* **165** (3–4): 392–401.
- Pickup RW, Rhodes G, Arnott S, Sidi-Boumedine K, Bull TJ, 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** (4): 2130–2139.

- Pickup RW, Rhodes G, Bull TJ, 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** (6): 4067–4077.
- Pierce ES (2009):** Where are all the *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in patients with Crohn's disease? *PLoS Pathog.* **5** (3): 1–11.
- Pierce ES (2010):** Ulcerative colitis and Crohn's disease: is *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* the common villain? *Gut Pathog.* **2** (1): S. 21.
- Pittard WB, III. (1979):** Breast milk immunology. A frontier in infant nutrition. *Am. J. Dis. Child.* **133** (1): 83–87.
- 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** (6): 1601–1605.
- Preiß JC, Bokemeyer B, Buhr HJ, Dignaß A, Häuser W, Hartmann F, Herrlinger KR, Kaltz B, Kienle P, Kruis W, Kucharzik T, Langhorst J, Schreiber S, Siegmund B, Stallmach A, Stange EF, Stein J, Hoffmann JC (2014):** Aktualisierte S3-Leitlinie – „Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn“ 2014 AWMF-Registriernummer: 021–004. Updated German Clinical Practice Guideline on “Diagnosis and treatment of Crohn's disease” 2014. AWMF registration no.: 021-004. *Z. Gastroenterol.* **52** (12): 1431–1484.
- Pribylova R, Slana I, Kaevska M, Lamka J, Babak V, Jandak J, Pavlik I (2011):** Soil and plant contamination with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* after exposure to naturally contaminated mouflon feces. *Curr. Microbiol.* **62** (5): 1405–1410.
- Price AB (1978):** Overlap in the spectrum of non-specific inflammatory bowel disease – 'colitis indeterminate'. *J. Clin. Pathol.* **31** (6): 567–577.
- Pugazhendhi S, Sahu MK, Subramanian V, Pulimood A, Ramakrishna BS (2011):** Environmental factors associated with Crohn's disease in India. *Indian J. Gastroenterol.* **30** (6): 264–269.
- QIAGEN (2006):** DNeasy® Blood & Tissue Handbook Protocol: Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol). Online verfügbar unter http://diagnostics1.com/MANUAL/General_Qiagen.pdf. Zuletzt geprüft am 25.06.2017.
- Qual DA, Kaneene JB, Varty TJ, Miller R, Thoen CO (2010):** Lack of association between the occurrence of Crohn's disease and occupational exposure to dairy and beef cattle herds infected with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *J. Dairy Sci.* **93** (6): 2371–2376.
- Rahimi R, Nikfar S, Rezaie A, Abdollahi M (2006):** A meta-analysis of broad-spectrum antibiotic therapy in patients with active Crohn's disease. *Clin. Ther.* **28** (12): 1983–1988.
- Rani PS, Sechi LA, Ahmed N (2010):** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as a trigger of type-1 diabetes: destination Sardinia, or beyond? *Gut Pathog.* **2** (1): 1–6.
- Rastogi N und David HL (1981):** Ultrastructural and chemical studies on wall-deficient forms, spheroplasts and membrane vesicles from *Mycobacterium aurum*. *J. Gen. Microbiol.* **124** (1): 71–79.
- Rastogi N und Venkitasubramanian TA (1979):** Preparation of protoplasts and whole cell ghosts from *Mycobacterium smegmatis*. *J. Gen. Microbiol.* **115** (2): 517–521.
- Richards OW, Kline EK, Leach RE (1941):** Demonstration of tubercle bacilli by fluorescence microscopy. *Am. Rev. Tuberc.* **44**: 255–266.
- Rigas A, Rigas B, Glassman M, Yen YY, Lan SJ, Petridou E, Hsieh CC, Trichopoulos D (1993):** Breast-feeding and maternal smoking in the etiology of Crohn's disease and ulcerative colitis in childhood. *Ann. Epidemiol.* **3** (4): 387–392.
- Rodríguez-Lázaro D, D'Agostino M, Herrewegh A, Pla M, Cook N, Ikononopoulos J (2005):** Real-time PCR-based methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in water and milk. *Int. J. Food Microbiol.* **101** (1): 93–104.

- Rosenfeld G und Bressler B (2010):** *Mycobacterium avium paratuberculosis* and the etiology of Crohn's disease: a review of the controversy from the clinician's perspective. *Can. J. Gastroenterol.* **24** (10): 619–624.
- Rossiter CA und Henning WR (2001):** Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* (*M. ptb*) from thin market cows at slaughter. *J. Dairy Sci.* **84** (Suppl. 1): 113–114.
- Rosu V, Bandino E, Cossu A (2013):** Unraveling the transcriptional regulatory networks associated to mycobacterial cell wall defective form induction by glycine and lysozyme treatment. *Microbiol. Res.* **168** (3): 153–164.
- Runyon EH (1959):** Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med. Clin. North Am.* **43** (1): 273–290.
- Ryan P, Kelly RG, Lee G, Collins JK, O'Sullivan GC, O'Connell J, Shanahan F (2004):** Bacterial DNA within granulomas of patients with Crohn's disease – detection by laser capture microdissection and PCR. *Am. J. Gastroenterol.* **99** (8): 1539–1543.
- Sanderson JD, Moss MT, Tizard ML, Hermon-Taylor J (1992):** *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. *Gut* **33** (7): 890–896.
- Sands BE und Siegel CA (2010):** Crohn's Disease. In: Feldman M, Friedman LS, Brandt LJ (Hrsg.): Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease. Pathophysiology, Diagnosis, Management. 9th edition, Volume 2. Saunders/Elsevier, Philadelphia, PA, USA: 1941–1973.
- Scanu AM, Bull TJ, Cannas S, Sanderson JD, Sechi LA, Dettori G, Zanetti S, Hermon-Taylor J (2007):** *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cases of irritable bowel syndrome and comparison with Crohn's disease and Johne's disease: common neural and immune pathogenicities. *J. Clin. Microbiol.* **45** (12): 3883–3890.
- Schneider T, Geue L, Köhler H, Gerlach G-F, Klawonn W, Schött S, Polten B, Conraths F-J, Planer J (2007):** Paratuberkulose beim Rind. Unter Mitarbeit von Schneider T und Roesicke E. 2. überarb. Aufl., Band-Nr. 1531. AID, Bonn, ISBN: 978-3-8308-0720-9.
- 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** (9): 2751–2758.
- Schrauder A, Ammon A, Stark K, Euler U, Bräunig J, Weise E (2003):** Morbus Crohn und *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* – eine Literaturstudie. Robert Koch-Institut (RKI), Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) (Hrsg.). Online verfügbar unter http://www.bfr.bund.de/cm/343/morbus_crohn_und_mycobacterium_avium_ssp_paratuberculosis_literaturstudie.pdf. Zuletzt geprüft am 07.11.2013.
- Schwartz D, Shafran I, Romero C, Piromalli C, Biggerstaff J, Naser N, Chamberlin W, Naser SA (2000):** Use of short-term culture for identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue from Crohn's disease patients. *Clin. Microbiol. Infect.* **6** (6): 303–307.
- Sechi LA und Dow CT (2015):** *Mycobacterium avium* ss. *paratuberculosis* Zoonosis – The Hundred Year War – Beyond Crohn's Disease. *Front. Immunol.* **6** (96): 1–7.
- Sechi LA, Gazouli M, Ikonomopoulos J, Lukas JC, Scanu AM, Ahmed N, Fadda G, Zanetti S (2005a):** *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Genetic Susceptibility to Crohn's disease, and Sardinians: the Way Ahead. *J. Clin. Microbiol.* **43** (10): 5275–5277.
- Sechi LA, Scanu AM, Mollicotti P, Cannas S, Mura M, Dettori G, Fadda G, Zanetti S (2005b):** Detection and Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from Intestinal Mucosal Biopsies of Patients with and without Crohn's disease in Sardinia. *Am. J. Gastroenterol.* **100** (7): 1529–1536.
- 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, and the Antibiotics in Crohn's Disease Study Group (2007):** Two-year combination antibiotic therapy with clarithromycin, rifabutin, and clofazimine for Crohn's disease. *Gastroenterology* **132** (7): 2313–2319.

- Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, van Blankenstein M, EC-IBD Study Group (1996):** Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* **39** (5): 690–697.
- Shoda R, Matsueda K, Yamato S, Umeda N (1996):** Epidemiologic analysis of Crohn disease in Japan: increased dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids and animal protein relates to the increased incidence of Crohn disease in Japan. *Am. J. Clin. Nutr.* **63** (5): 741–745.
- Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott IDR, Bernstein CN, Brant SR, Caprilli R, Colombel J-F, Gasche C, Geboes K, Jewell DP, Karban A, Loftus EV, JR, Peña AS, Riddell RH, Sachar DB, Schreiber S, Steinhardt AH, Targan SR, Vermeire S, Warren BF (2005):** Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can. J. Gastroenterol.* **19 Suppl. A**: 5–36.
- Singh AV, Singh SV, Makharia GK, Singh PK, Sohal JS (2008):** Presence and characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from clinical and suspected cases of Crohn's disease and in the healthy human population in India. *Int. J. Infect. Dis.* **12** (2): 190–197.
- Singh S und Gopinath K (2011):** *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's regional ileitis: how strong is association? *J. Lab. Physicians.* **3** (2): 69–74.
- Slana I, Kralik P, Kralova A, Pavlik I (2008a):** 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** (2): 250–257.
- Slana I, Paolicchi F, Janstova B, Navratilova P, Pavlik I (2008b):** Detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and milk products: a review. *Vet. Med. Czech.* **52** (6): 283–306.
- Smithwick RW, Bigbie MR, Jr., Ferguson RB, Karlix MA, Wallis CK (1995):** Phenolic acridine orange fluorescent stain for mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* **33** (10): 2763–2764.
- Sohal JS, Singh SV, Singh AV, Singh PK (2010):** Strain diversity within *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* – A review. *Indian J. Exp. Biol.* **48** (1): 7–16.
- Sohal JS, Singh SV, Singh B, Thakur S, Aseri GK, Jain N, Jayaraman S, Yadav P, Khare N, Gupta S, Chaubey KK, Dhama K (2015):** Control of Paratuberculosis: Opinions and Practices. *Adv. Anim. Vet. Sci.* **3** (3): 156–163.
- Songer JG und Post KW (2005):** Veterinary Microbiology Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease. Chapter 11. The Genus *Mycobacterium*. 1st edition. Elsevier Saunders, St. Louis, MO, USA, ISBN: 0721687172.
- Soon IS, Molodecky NA, Rabi DM, Ghali WA, Barkema HW, Kaplan GG (2012):** The relationship between urban environment and the inflammatory bowel diseases: a systematic review and meta-analysis. *BMC Gastroenterol.* **12**: S. 51.
- 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** (9): 4199–4205.
- Spehlmann ME, Begun AZ, Burghardt J, Lepage P, Raedler A, Schreiber S (2008):** Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study. *Inflamm. Bowel Dis.* **14** (7): 968–976.
- Stabel JR und Bannantine JP (2005):** Development of a nested PCR method targeting a unique multicopy element, ISMap02, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples. *J. Clin. Microbiol.* **43** (9): 4744–4750.
- Stallmach A, Häuser W, L'hoest H, Marschall U (2012):** Die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa: Herausforderungen an die Versorgung. In: Repschläger U, Schulte C, Osterkamp N (Hrsg.): BARMER GEK Gesundheitswesen aktuell 2012. Beiträge und Analysen. BARMER GEK: 286–309.

- Stephan R (2007):** Diagnostische Systeme zum Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. J. Verbr. Lebensm. **2** (2): 222–227.
- Stephan R, Schumacher S, Tasara T, Grant IR (2007):** Prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss raw milk cheeses collected at the retail level. J. Dairy Sci. **90** (8): 3590–3595.
- Stratmann J, Dohmann K, Heinzmann J, Gerlach GF (2006):** Peptide aMptD-mediated capture PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bulk milk samples. Appl. Environ. Microbiol. **72** (8): 5150–5158.
- Stratmann J, Strommenger B, Stevenson K, Gerlach GF (2002):** Development of a peptide-mediated capture PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. J. Clin. Microbiol. **40** (11): 4244–4250.
- 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** (1): 31–37.
- Suenaga K, Yokoyama Y, Nishimori I, Sano S, Morita M, Okazaki K, Onishi S (1999):** Serum antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis* in patients with Crohn's disease. Dig. Dis. Sci. **44** (6): 1202–1207.
- Suerbaum S, Hahn H, Burchard G-D, Kaufmann SHE, Schulz TF (Hrsg.) (2012):** Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 7. Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Sung N und Collins MT (1998):** Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*. Appl. Environ. Microbiol. **64** (3): 999–1005.
- Sung N und Collins MT (2000):** Effect of three factors in cheese production (pH, salt, and heat) on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability. Appl. Environ. Microbiol. **66** (4): 1334–1339.
- Sweeney RW, Whitlock RH, Rosenberger AE (1992):** *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease. Am. J. Vet. Res. **53** (4): 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** (10): 5957–5968.
- Taylor TK, Wilks CR, McQueen DS (1981):** Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of a cow with Johne's disease. Vet. Rec. **109** (24): 532–533.
- Thorel MF, Krichevsky M, Lévy-Frébault VV (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** (3): 254–260.
- Timmer A, Breuer-Katschinski B, Goebell H (1999):** Time trends in the incidence and disease location of Crohn's disease 1980–1995: a prospective analysis in an urban population in Germany. Inflamm. Bowel Dis. **5** (2): 79–84.
- Timpe A und Runyon EH (1954):** The relationship of atypical acid-fast bacteria to human disease; a preliminary report. J. Lab. Clin. Med. **44** (2): 202–209.
- Tortoli E (2006):** The new mycobacteria: an update. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **48** (2): 159–178.
- Tremelling M und Parkes M (2007):** Genome-wide association scans identify multiple confirmed susceptibility loci for Crohn's disease: lessons for study design. Inflamm. Bowel Dis. **13** (12): 1554–1560.
- Tuci A, Tonon F, Castellani L, Sartini A, Roda G, Marocchi M, Caponi A, Munarini A, Rosati G, Ugolini G, Fuccio L, Scagliarini M, Bazzoli F, Belluzzi A (2011):** Fecal detection of *Mycobacterium avium* paratuberculosis using the IS900 DNA sequence in Crohn's disease and ulcerative colitis patients and healthy subjects. Dig. Dis. Sci. **56** (10): 2957–2962.

- Turenne CY, Wallace R, Jr., Behr MA (2007):** *Mycobacterium avium* in the postgenomic era. Clin. Microbiol. Rev. **20** (2): 205–229.
- Twort FW und Ingram GLY (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 pseudo-tuberculous enteritis of bovines. Proc. Roy. Soc. **84**: 517–542.
- Udou T, Ogawa M, Mizuguchi Y (1982):** Spheroplast formation of *Mycobacterium smegmatis* and morphological aspects of their reversion to the bacillary form. J. Bacteriol. **151** (2): 1035–1039.
- Udou T, Ogawa M, Mizuguchi Y (1983):** An improved method for the preparation of mycobacterial spheroplasts and the mechanism involved in the reversion to bacillary form: electron microscopic and physiological study. Can. J. Microbiol. **29** (1): 60–68.
- Valentin-Weigand P (2002):** Pathomechanismen und Immunreaktionen bei der Paratuberkulose. In: Hartung J und Homuth M (Hrsg.): Schwerpunkt 12/02. Paratuberkulose. Verlag M. & H. Schaper, Alfeld. Dtsch. tierärztl. Wschr. **109** (12): 507–509.
- Van Kruiningen HJ, Colombel JF, Cartun RW, Whitlock RH, Koopmans M, Kangro HO, Hoogkamp-Korstanje JA, Lecomte-Houcke M, Devred M, Paris JC (1993):** An in-depth study of Crohn's disease in two French families. Gastroenterology **104** (2): 351–360.
- Vansnick E, Rijk P de, Vercammen F, Geysen D, Rigouts L, Portaels F (2004):** Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Vet. Microbiol. **100** (3–4): 197–204.
- Waddell LA, Rajić A, Sargeant J, Harris J, Amezcua R, Downey L, Read S, McEwen SA (2008):** The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* A Systematic Review. Can. J. Public Health **99** (2): 145–155.
- Waddell LA, Rajić A, Stärk KDC, McEwen SA (2015):** The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: a systematic review and meta-analyses of the evidence. Epidemiol. Infect. **143** (15): 3135–3157.
- Wagner J, Sim WH, Lee KJ, Kirkwood CD (2013):** Current knowledge and systematic review of viruses associated with Crohn's disease. Rev. Med. Virol. **23** (3): 145–171.
- Wall S, Kunze ZM, Saboor S, Soufleri I, Seechurn P, Chiodini R, McFadden JJ (1993):** Identification of spheroplast-like agents isolated from tissues of patients with Crohn's disease and control tissues by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. **31** (5): 1241–1245.
- Weirich S (2012):** Entwicklung und Validierung eines fluoreszenzmikroskopischen Schnellnachweisverfahrens für lebensfähige *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP)-Zellen in Milch und Säuglingsnahrungsmittel. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen, ISBN: 978-3-8359-5942-2.
- Weiss DJ und Souza CD (2008):** Review paper: modulation of mononuclear phagocyte function by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Vet. Pathol. **45** (6): 829–841.
- Wells JE, Bosilevac JM, Kalchayanand N, Arthur TM, Shackelford SD, Wheeler TL, 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** (7): 1457–1462.
- Whan L, Ball HJ, Grant IR, Rowe MT (2005):** Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in untreated water in Northern Ireland. Appl. Environ. Microbiol. **71** (11): 7107–7112.
- Whipple DL, Callihan DR, Jarnagin JL (1991):** Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedure. J. Vet. Diagn. Invest. **3** (4): 368–373.
- Whitlock RH und Buergelt C (1996):** Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). Vet. Clin. North Am. Food. Anim. Pract. **12** (2): 345–356.

- Whitlock RH und Rosenberger AE (1990):** Fecal culture protocol for *Mycobacterium paratuberculosis* a recommended procedure. Proceedings of the 94th Annual Meeting of the USAHA (Hrsg.). Denver, CO, USA: 280–285.
- Whittington RJ (2009):** Factors affecting isolation and identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from fecal and tissue samples in a liquid culture system. *J. Clin. Microbiol.* **47** (3): 614–622.
- Whittington RJ und Sergeant ES (2001):** Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in animal populations. *Aust. Vet. J.* **79** (4): 267–278.
- Whittington RJ und Windsor PA (2009):** In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: A critical review and meta-analysis. *Vet. J.* **179** (1): 60–69.
- Williams ES, Snyder SP, Martin KL (1983):** Pathology of Spontaneous and Experimental Infection of North American Wild Ruminants with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Pathol.* **20** (3): 274–290.
- Wilson DJ, Rossiter C, Han HR, Sears PM (1993):** Association of *Mycobacterium paratuberculosis* infection with reduced mastitis, but with decreased milk production and increased cull rate in clinically normal dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* **54** (11): 1851–1857.
- Wynne JW, Bull TJ, Seemann T, Bulach DM, Wagner J, Kirkwood CD, Michalski WP (2011):** Exploring the zoonotic potential of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* through comparative genomics. *PLoS One* **6** (7): e22171.
- Wynne JW, Seemann T, Bulach DM, Coutts SA, Talaat AM, Michalski WP (2010):** Resequencing the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* K10 genome: improved annotation and revised genome sequence. *J. Bacteriol.* **192** (23): 6319–6320.
- Yau Y, Leong RW, Zeng M, Wasinger VC (2013):** Proteomics and metabolomics in inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **28** (7): 1076–1086.
- Zimmer K, Drager KG, Klawonn K, Hess RG (1999):** Contribution to the diagnosis of Johne's disease in cattle. Comparative studies on the validity of Ziehl-Neelsen staining, faecal culture and a commercially available DNA-Probe® test in detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in faeces from cattle. *J. Vet. Med. B* **46** (2): 137–140.
- Zwick LS, Walsh TF, Barbiers R, Collins MT, Kinsel MJ, Murnane RD (2002):** Paratuberculosis in a mandrill (*Papio sphinx*). *J. Vet. Diagn. Invest.* **14** (4): 326–328.

11 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Michael Bülte gebührt mein tiefster Dank. Als Direktor des Institutes für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, als Doktorvater und als Mentor hat er meinen wissenschaftlichen Bildungsweg und meine persönliche Entwicklung bedeutend geprägt. Durch sein in mich gesetztes Vertrauen, seiner Förderung und seiner gelebten Begeisterung für die Thematik der Lebensmittel- und Fleischhygiene habe ich viel gelernt. Auch seiner lieben Familie danke ich von Herzen.

Mein besonderer Dank gilt Rosemarie Bambey für ihre unermüdliche Hilfe von Anbeginn des Projektes, für die vielen gemeinsamen Arbeitsstunden, die guten Gespräche und für ihre Freundschaft.

Ein großer Dank gilt Prof. Dr. Raja Atreya und Photini Drummer für die hervorragende und sympathische Zusammenarbeit am Universitätsklinikum Erlangen sowie für die fundierte fachliche Unterstützung und ihre Hilfsbereitschaft.

Herrn Dr. Klaus Failing, Frau Marion Sparenberg und Herrn Andreas Schaubmar danke ich sehr für die wertvolle Beratung und Unterstützung bei der Auswertung der immensen Datenmengen aus meiner Dissertation.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold und Sigrid Kettner aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie, Dr. Werner Herbst aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Dr. Tim Bull vom St. George's University of London, den Partnern des ZooMAP-Projektes sowie den zahlreichen weiteren Wissenschaftlern, die meine Arbeit unterstützt haben, ihre Freude an der Forschung mit mir teilten, und für den fachlichen Austausch auf Augenhöhe. Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung danke ich für die Förderung meiner Dissertation im Rahmen des ZooMAP-Projektes (Förderzeichen: 01KI1003E).

Mit großer Dankbarkeit blicke ich auf die Zeit an meiner ehemaligen Wirkungsstätte zurück. Meinen Kollegen des Institutes für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde danke ich für die gute Zusammenarbeit, die fundierte Einarbeitung in die Laborarbeit, deren Vertrauen und Freundschaft. Insbesondere möchte ich mich bei Cornelia Dürschmidt, Claudia Walter, Karin Simon, Brigitte Marx, Malik M'Bodj, Maria Forster und Anne Prigge für ihre Unterstützung bedanken.

Mein aufrichtiger Dank gilt meinen neuen Kollegen am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit. Insbesondere Dr. Gesine Schulze, Dr. Hans Bauer, Dr. Ursula Pudich und Kristina Babić Stegelmann danke ich für ihren Zuspruch und ihre Unterstützung in der Endphase meiner Dissertation. Ich freue mich auf die weitere gemeinsame Zeit.

Meinen Freunden und meiner Familie danke ich für ihre treue Begleitung in dieser langen Zeit. Insbesondere Christina Huck, Lara Stein und Michael Richter fanden immer wieder motivierende Worte.

Mein herzlicher Dank gilt meiner Schwester Lillie Nguyen und meiner Freundin Sandra Starke für ihr geduldiges Zuhören, ihren stetigen Zuspruch und für das Korrekturlesen der Arbeit. Ohne die hilfreiche Kritik hätte meine Dissertation sicher einige Seiten mehr!

Mein größter Dank gebührt meiner Mutter und meinem Vater für ihre Liebe und Geduld, für die zahlreichen Opfer und ihrem bedingungslosen Rückhalt. Sie ermöglichten mir das Studium der Tiermedizin, damit ich meinen Traumberuf ergreifen konnte.

Einem besonderen Menschen in meinem Leben möchte ich von Herzen danken: meinem Verlobten und künftigen Ehemann Stefan Starke. Durch seine immerwährende Unterstützung und seinen Glauben an mich, gibt er mir Halt und Kraft.

ERKLÄRUNG

Erklärung gemäß § 10 Abs. 6 der Promotionsordnung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität vom 6. Februar 2002, in der Fassung vom 14. Juli 2015.

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.

Kim Katherine Nguyen

MAP und Morbus Crohn?

Untersuchungen zum Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in humanen Darmgewebeproben

Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* (MAP) ist der Erreger der Johné'schen Krankheit – einer chronischen, nicht therapierbaren Darmentzündung bei Wiederkäuern. MAP steht im Verdacht bei der Entstehung von Morbus Crohn – einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung des Menschen – mitbeteiligt zu sein. Die Ähnlichkeiten in Bezug auf die Symptomatik und pathomorphologischen Veränderungen des Darmgewebes bei Morbus Crohn des Menschen und der Johné'schen Krankheit der Wiederkäuer lassen die Frage nach einem zoonotischen Potential von MAP aufkommen.

In der Dissertation wurden folgende Fragestellungen behandelt:

- Ist MAP mitbeteiligt an der Entstehung von Morbus Crohn beim Menschen?
- Sind MAP-Sphäroblasten mitbeteiligt an der Entstehung von Morbus Crohn?

Um ein mögliches zoonotisches Potential von MAP besser abschätzen zu können, wurde am Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen in Kooperation mit der Medizinischen Klinik 1 des Universitätsklinikums Erlangen eine Fall-Kontroll-Studie durchgeführt: Humane Darmgewebeproben von Morbus Crohn-, Colitis ulcerosa- und Kontrollpatienten wurden mittels unterschiedlicher Nachweisverfahren auf das Vorhandensein von MAP-Zellen bzw. MAP-DNA untersucht. In der Studie wurden sogenannte Resusziationsmedien zur Erfassung von Sphäroblasten miteinbezogen.

Die Untersuchungen wurden vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen des Projektes „*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* – von der Johné'schen Krankheit zum Morbus Crohn – ZooMAP“ gefördert (Förderzeichen: 01K11003E).



édition scientifique 
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-6701-4



9 783835 196701 4