



Vergleichende Untersuchungen zum molekularbiologischen Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in Milch und Säuglingsanfangsnahrung

Annalena Molitor

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

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über http://dnb.ddb.de abrufbar.

1. Auflage 2014

© 2014 by Verlag: **D**eutsche **V**eterinärmedizinische **G**esellschaft Service GmbH,
Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-213-1

Verlag: DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
0641/24466
info@dvg.de
www.dvg.de

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

Betreuer: Prof. Dr. Michael Bülte

Vergleichende Untersuchungen zum molekularbiologischen Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in Milch und Säuglingsanfangsnahrung

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

eingereicht von
Annalena Molitor
Tierärztin aus Weinheim

Gießen 2014

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. hc. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Michael Bülte

Prof. Dr. Christoph Lämmler

Tag der Disputation: 05. Juni 2014

Meinem Vater

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Molitor, A., Abdulmawjood, A., Akineden, Ö. und Bülte, M. (2010): Optimization and validation of DNA extraction methods for rapid detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in milk. ZooMAP Meeting, 02. – 03.11.2010, Kassel (Vortrag)

Molitor, A., Akineden, Ö., Failing, K., Abdulmawjood, A. und M. Bülte (2011): Schnellnachweis von *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis (MAP)* mittels optimiertem DNA-Extraktionsverfahren und Real Time-PCR in Milch. 52. Arbeitstagung des „Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene" der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), 26. – 30. September 2011, Garmisch-Partenkirchen (Poster)

Weirich, S., Molitor, A., Akineden, Ö., Failing, K. und M. Bülte (2011): Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in Säuglingsanfangsnahrung auf Milchpulverbasis. 52. Arbeitstagung des „Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene" der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), 26. – 30. September 2011, Garmisch-Partenkirchen (Poster)

Molitor, A., Akineden, Ö., Failing, K., Abdulmawjood, A. und M. Bülte (2011): Rapid detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in milk with optimized DNA extraction and Real Time-PCR. ZooMAP Meeting, 02. – 03.11.2011, Braunschweig (Poster)

Molitor, A., Failing, K., Abdulmawjood, A., Akineden, Ö. und M. Bülte (2012): Schnellnachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in Milch und Säuglingsanfangsnahrung. 53. Arbeitstagung des „Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene" der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), 25. – 28. September 2012, Garmisch-Partenkirchen (Vortrag)

Weirich, S., Molitor, A., Akineden, Ö., Failing, K. und M. Bülte (2013): Detection of MAP in milk and powdered infant milk by a new fluorescence staining method, phage assay, real time-PCR and culture. ZooMAP Meeting, 12. – 13.03.2013, Hannover (Vortrag)

Molitor, A., Failing, K., Abdulmawjood, A., Akineden, Ö. und M. Bülte (2013): Comparison of DNA extraction methods for detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in raw milk and powdered infant milk. ZooMAP Meeting, 12. – 13.03.2013, Hannover (Poster)

Inhalt

Inhalt I

Abbildungsverzeichnis VI

Tabellenverzeichnis VIII

Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen, Einheiten und Sonderzeichen XV

1 Einleitung 1

2 Literaturübersicht 2

2.1 Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis (MAP) 2

2.1.1 Allgemeines 2

2.1.2 Vorkommen und Tenazität 4

2.2 Nachweisverfahren für *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) 7

2.2.1 Probenvorbereitung 7

2.2.1.1 Magnetische Separation 7

2.2.1.2 DNA-Extraktion 9

2.2.1.3 Dekontamination 10

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 12

2.2.2.1 Das Prinzip der PCR 12

2.2.2.2 PCR zum Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* 13

2.2.2.3 Formen der PCR 15

2.2.2.4 Interne Amplifikationskontrolle 17

2.2.3 Kultureller Nachweis 17

2.3 Paratuberkulose 21

2.3.1 Übertragungswege 21

2.3.2 Klinisches Bild 24

2.3.3 Ökonomische Aspekte 27

2.3.4 Bekämpfungsmaßnahmen 28

2.4 Morbus Crohn 32

2.5 *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Lebensmitteln 35
2.5.1 Milch 35
2.5.2 Säuglingsnahrung 39
2.5.3 Andere Milchprodukte 40
2.5.4 Fleisch und Fleischerzeugnisse 41
2.5.5 Wasser 42
2.5.6 Lebensmittel pflanzlichen Ursprungs 43
3 Eigene Untersuchungen 44
3.1 Arbeitskonzept 44
3.2 Material 45
3.2.1 Referenz- und Feldstämme 45
3.2.2 Rohmilch 46
3.2.3 Säuglingsanfangsnahrung 46
3.2.4 Labormaterialien 47
3.2.5 Geräte 48
3.2.6 Chemikalien 49
3.2.7 Nährmedien für die Anzucht und den mikrobiellen Nachweis von MAP 50
3.2.7.1 Herrold's Egg Yolk-Medium (HEYM) 50
3.2.7.2 Middlebrook 7H9-Bouillon 50
3.2.7.3 Middlebrook 7H10-Agar 51
3.2.8 Puffer und Lösungen 52
3.2.8.1 PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung) 52
3.2.8.2 PBS-T (phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Tween® 20) 52
3.2.8.3 TE-Puffer 52
3.2.8.4 Lysispuffer zur Vorbehandlung grampositiver Bakterien 53
3.2.8.5 Lysispuffer mit Triton und Zugabe von Lysozym vor Gebrauch 53
3.3 Methoden 54
3.3.1 Anzucht der Referenzstämme 54
3.3.2 Herstellung einer dekadischen Verdünnungsreihe 54

3.3.3 Quantitative Bestimmung der Zellzahl aus den Verdünnungsstufen 55

3.3.3.1 Zählkammer 55

3.3.3.2 Molekularbiologischer Nachweis 56

3.3.3.3 Kultureller Nachweis 56

3.3.4 Artifizielle Kontamination von Rohmilch und Säuglingsanfangsnahrung 57

3.3.5 Extraktion von DNA aus Mykobakterienkulturen 58

3.3.5.1 Kochen 58

3.3.5.2 *High Pure PCR Template Preparation Kit* 58

3.3.6 Extraktion von MAP-DNA aus Rohmilch und Säuglingsanfangsnahrung 58

3.3.6.1 Precellys® 24 58

3.3.6.2 *Maxwell® 16 System* 59

3.3.6.3 *High Pure PCR Template Preparation Kit* 60

3.3.6.4 *DNeasy® Blood & Tissue Kit* 61

3.3.6.5 Kontrollen 62

3.3.7 Molekularbiologischer Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* 62

3.3.8 Kulturelle Anzucht von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* aus Rohmilch und Säuglingsanfangsnahrung 66

3.3.9 Vorversuche 67

3.3.9.1 Vorversuch 1: *Maxwell® 16 System* 68

3.3.9.2 Vorversuch 2: *High Pure PCR Template Preparation Kit* 70

3.3.9.3 Vorversuch 3: *DNeasy® Blood & Tissue Kit* 72

3.3.10 Hauptversuche 74

3.3.10.1 Hauptversuch1: Rohmilch 74

3.3.10.2 Hauptversuch 2: Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ 78

3.3.10.3 Hauptversuch 3: Säuglingsanfangsnahrung „One“ 83

3.3.11 Säuglingsanfangsnahrung aus dem Handel 88

3.3.11.1 Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ und „Pre HA“ 88

3.3.11.2 Säuglingsanfangsnahrung „One“ 88

3.3.12 Statistische Auswertung 89

4 Ergebnisse 90

4.1 Vorversuch 1: *Maxwell® 16 System* ... 90
4.2 Vorversuch 2: *High Pure PCR Template Preparation Kit* ... 92
4.3 Vorversuch 3: *DNeasy® Blood & Tissue Kit* ... 94
4.4 Hauptversuch1: Rohmilch ... 96
4.4.1 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen ... 96
4.4.2 Zusammenfassung der molekularbiologischen Ergebnisse ... 104
4.4.3 Ergebnisse der kulturellen Untersuchungen ... 106
4.5 Hauptversuch 2: Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ ... 110
4.5.1 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen ... 110
4.5.2 Zusammenfassung der molekularbiologischen Ergebnisse ... 117
4.6 Hauptversuch 3: Säuglingsanfangsnahrung „One“ ... 119
4.6.1 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen ... 119
4.6.2 Zusammenfassung der molekularbiologischen Ergebnisse ... 121
4.7 Säuglingsanfangsnahrung aus dem Handel ... 122
4.7.1 Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ und „Pre HA“ ... 122
4.7.2 Säuglingsanfangsnahrung „One“ ... 122
5 Statistische Auswertung ... 123
5.1 Regressionsanalyse ... 123
5.2 Nachweisgrenzen ... 126
5.3 Analyse der Aufbereitungen und Läufe ... 127
5.4 Einfaktorielle Kovarianzanalyse ... 134
6 Diskussion ... 135
6.1 Analyse der Vorversuche ... 135
6.2 Molekularbiologischer Nachweis ... 136
6.2.1 Zählkammer ... 136
6.2.2 Extraktionsverfahren ... 138
6.2.3 Real Time-PCR ... 145

6.2.4 Vergleich von Rohmilch und Säuglingsanfangsnahrung 147
6.3 Kulturelle Anzucht 149
6.4 Nachweis in Säuglingsanfangsnahrung 154
7 Schlussfolgerungen 157
8 Zusammenfassung 158
9 Summary 160
10 Anhang 162
10.1 Fließdiagramme 162
10.2 Ergebnistabellen 174
11 Literaturverzeichnis 183
Danksagung 221
Erklärung 223

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung einer Polymerase-Kettenreaktion 12

Abbildung 2: Status der Strategien zur Eindämmung der Paratuberkulose in europäischen Ländern..... 29

Abbildung 3: Übertragungswege für *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*..... 35

Abbildung 4: Anzucht der *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*-Stämme auf Herrold's Egg Yolk-Medium und in Middlebrook 7H9..... 54

Abbildung 5: Wachstum von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* auf Middlebrook 7H10, Anzucht aus der Verdünnungsreihe, Darstellung der unterschiedichen Koloniemorphologien..... 56

Abbildung 6: Aufbau der Vorversuche zum Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Milch 67

Abbildung 7: Versuchsaufbau zum Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Milch 74

Abbildung 8: Darstellung des Amplifikationsplots am Beispiel von MAP-Stamm Niebüll ... 75

Abbildung 9: Darstellung der Standardkurve der dekadischen Verdünnungsreihe am Beispiel von MAP-Stamm Niebüll..... 76

Abbildung 10: Versuchsaufbau zum Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Säuglingsanfangsnahrung „Pre" 79

Abbildung 11: Darstellung des Amplifikationsplots am Beispiel von MAP-Stamm 44135 ... 80

Abbildung 12: Darstellung der Standardkurve der dekadischen Verdünnungsreihe am Beispiel von MAP-Stamm 44135..... 81

Abbildung 13: Versuchsaufbau zum Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Säuglingsanfangsnahrung „One" 84

Abbildung 14: Darstellung des Amplifikationsplots am Beispiel von MAP-Stamm 423 85

Abbildung 15: Darstellung der Standardkurve der dekadischen Verdünnungsreihe am Beispiel von MAP-Stamm 423..... 86

Abbildung 16: Wachstum von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) auf HEYM, hier MAP-Stamm K10, Anzucht aus Rohmilch 107

Abbildung 17: Eintrocknung des Agars im HEYM-Röhrchen und Kontamination mit Begleitflora, hier MAP-Stamm 44135, Anzucht aus Rohmilch..... 109

Abbildung 18: Grafische Darstellung der Regressionsgeraden der eingesetzten Verfahren in Rohmilch 125

Abbildung 19: Grafische Darstellung der Regressionsgeraden der eingesetzten Verfahren in Säuglingsanfangsnahrung „Pre“..... 125

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überleben von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in der Umwelt 5

Tabelle 2: Vorkommen von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* bei verschiedenen Tierarten 6

Tabelle 3: Optimierung der Sensitivität PCR-basierter Methoden mittels magnetischer Separation 8

Tabelle 4: Effizienz der Verfahren für die Extraktion von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*-DNA, untersucht mit IS900 PCR 10

Tabelle 5: DNA-Sequenzen für den Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* mittels PCR 13

Tabelle 6: Ausscheidung von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Kot, Milch, Kolostrum und Sperma 23

Tabelle 7: Der "Eisberg-Effekt" und die verschiedenen Stadien der *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*-Infektion 26

Tabelle 8: Prävalenz von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Milch unterschiedlicher Prozessstufen 36

Tabelle 9: Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Käse 41

Tabelle 10: Primer und Sonden im Oligonukleotid-Mix des MAPsureEasy® Kits 63

Tabelle 11: Pipettierprotokoll (25 µl Ansatz) für die MAPsureEasy® Real Time-PCR 64

Tabelle 12: Thermocycler-Programm für die Real Time-PCR 65

Tabelle 13: Interpretation der Ct-Werte der MAPsureEasy® Real Time-PCR 65

Tabelle 14: Ermittelte Zellzahlen für *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in den Vorversuchen 1 bis 3 mittels Zählkammer und kultureller Anzucht 67

Tabelle 15: Übersicht der Modifikationen für das *Maxwell® 16 System* in Vorversuch 1 69

Tabelle 16:Übersicht der Modifikationen für das *DNeasy® Blood & Tissue Kit* in Vorversuch 3 72

Tabelle 17: Ermittelte Zellzahlen für *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in Hauptversuch 1 mittels Zählkammer und kultureller Anzucht 75

Tabelle 18: DNA-Aufbereitungen im Hauptversuch 1 unter Berücksichtigung aller Stämme (n=4) und Verfahren (n=3) 77

Tabelle 19: PCR-Ergebnisse im Hauptversuch 1 unter Berücksichtigung aller Stämme (n=4), Verfahren (n=3) und Aufbereitungen (n=3) 77

Tabelle 20: Ermittelte Zellzahlen für *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in Hauptversuch 2 mittels Zählkammer und kultureller Anzucht 80

Tabelle 21: DNA-Aufbereitungen im Hauptversuch 2 unter Berücksichtigung aller Stämme (n=4) und Verfahren (n=2) 82

Tabelle 22: PCR-Ergebnisse im Hauptversuch 2 unter Berücksichtigung aller Stämme (n=4), Verfahren (n=2) und Aufbereitungen (n=3) 82

Tabelle 23: Ermittelte Zellzahlen für *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in Hauptversuch 3 mittels Zählkammer und kultureller Anzucht 84

Tabelle 24: DNA-Aufbereitungen im Hauptversuch 3 unter Berücksichtigung aller Stämme (n=1) und Verfahren (n=1) 87

Tabelle 25: PCR-Ergebnisse im Hauptversuch 3 unter Berücksichtigung aller Stämme (n=1), Verfahren (n=1) und Aufbereitungen (n=3) 87

Tabelle 26: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit dem MAP-Stamm K10 und Aufbereitung mit dem *Maxwell® 16 System* – Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s) der PCR-Läufe jeder Aufbereitung (Ct-Werte) mit unterschiedlichen Protokollen 90

Tabelle 27: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit dem MAP-Stamm K10 und Aufbereitung mit dem *High Pure PCR Template Preparation* Kit – Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s) der PCR-Läufe jeder Aufbereitung (Ct-Werte) mit unterschiedlichen Protokollen 93

Tabelle 28: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit dem MAP-Stamm K10 und Aufbereitung mit dem *DNeasy® Blood & Tissue Kit* – Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s) der PCR-Läufe jeder Aufbereitung (Ct-Werte) mit unterschiedlichen Protokollen 94

Tabelle 29: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit dem MAP-Stamm K10 – Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s) der PCR-Läufe jeder Aufbereitung (Ct-Werte) mit unterschiedlichen Verfahren 97

Tabelle 30: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit dem MAP-Stamm K10 – Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale in der Real Time-PCR unter Berücksichtigung der Läufe der einzelnen Aufbereitungen (n=3)..... 98

Tabelle 31: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit dem MAP-Stamm 423 – Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s) der PCR-Läufe jeder Aufbereitung (Ct-Werte) mit unterschiedlichen Verfahren 99

Tabelle 32: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit dem MAP-Stamm 423 – Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale in der Real Time-PCR unter Berücksichtigung der Läufe der einzelnen Aufbereitungen (n=3)..... 100

Tabelle 33: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit dem MAP-Stamm 44135 – Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s) der PCR-Läufe jeder Aufbereitung (Ct-Werte) mit unterschiedlichen Verfahren 101

Tabelle 34: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit dem MAP-Stamm 44135 – Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale in der Real Time-PCR unter Berücksichtigung der Läufe der einzelnen Aufbereitungen (n=3)..... 102

Tabelle 35: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit dem MAP-Stamm NB – Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s) der PCR-Läufe jeder Aufbereitung (Ct-Werte) mit unterschiedlichen Verfahren 103

Tabelle 36: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit dem MAP-Stamm NB – Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale in der Real Time-PCR unter Berücksichtigung der Läufe der einzelnen Aufbereitungen (n=3)..... 104

Tabelle 37: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit verschiedenen MAP-Stämmen (n=4) - Mittelwerte der Ct-Werte aller Aufbereitungen (n=3) und Läufe (n=3) für die einzelnen Verdünnungsstufen 105

Tabelle 38: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit verschiedenen MAP-Stämmen (n=4) - Nachweisrate und Anzahl positiver Signale für die einzelnen Verfahren unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufen 106

Tabelle 39: Kultureller Nachweis verschiedener MAP-Stämme nach Dekontamination auf HEYM 108

Tabelle 40: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „Pre“ mit dem MAP-Stamm K10 – Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s) der PCR-Läufe jeder Aufbereitung (Ct-Werte) mit unterschiedlichen Verfahren 112

Tabelle 41: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „Pre“ mit dem MAP-Stamm K10 – Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale in der Real Time-PCR unter Berücksichtigung der Läufe der einzelnen Aufbereitungen (n=3)..... 112

Tabelle 42: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „Pre“ mit dem MAP-Stamm 44135 – Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s) der PCR-Läufe jeder Aufbereitung (Ct-Werte) mit unterschiedlichen Verfahren 113

Tabelle 43: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „Pre“ mit dem MAP-Stamm 44135 – Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale in der Real Time-PCR unter Berücksichtigung der Läufe der einzelnen Aufbereitungen (n=3)..... 114

Tabelle 44: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „Pre“ mit dem MAP-Stamm 423 – Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s) der PCR-Läufe jeder Aufbereitung (Ct-Werte) mit unterschiedlichen Verfahren 115

Tabelle 45: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „Pre“ mit dem MAP-Stamm 423 – Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale in der Real Time-PCR unter Berücksichtigung der Läufe der einzelnen Aufbereitungen (n=3)..... 115

Tabelle 46: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „Pre“ mit dem MAP-Stamm NB – Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s) der PCR-Läufe jeder Aufbereitung (Ct-Werte) mit unterschiedlichen Verfahren 116

Tabelle 47: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „Pre“ mit dem MAP-Stamm NB – Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale in der Real Time-PCR unter Berücksichtigung der Läufe der einzelnen Aufbereitungen (n=3)..... 117

Tabelle 48: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „Pre“ mit verschiedenen MAP-Stämmen (n=4) - Mittelwerte der Ct-Werte aller Aufbereitungen (n=3) und Läufe (n=3) für die einzelnen Verdünnungsstufen 118

Tabelle 49: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „Pre“ mit verschiedenen MAP-Stämmen (n=4) - Nachweisrate und Anzahl positiver Signale für die einzelnen Verfahren unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufen 118

Tabelle 50: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „One“ mit dem MAP-Stamm 423 – Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s) der PCR-Läufe jeder Aufbereitung (Ct-Werte) mit unterschiedlichen Verfahren 120

Tabelle 51: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „One“ mit dem MAP-Stamm 423 – Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale in der Real Time-PCR unter Berücksichtigung der Läufe der einzelnen Aufbereitungen (n=3)..... 120

Tabelle 52: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „One“ mit einem MAP-Stamm - Mittelwert der Ct-Werte aller Aufbereitungen (n=3) und Läufe (n=3) für die einzelnen Verdünnungsstufen 121

Tabelle 53: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „One“ mit einem MAP-Stamm - Nachweisrate und Anzahl positiver Signale für das verwendete Verfahren unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufen 122

Tabelle 54: Übersicht der durchgeführten Untersuchungen im Rahmen der Einmischversuche 123

Tabelle 55: Regressionsgeraden der unterschiedlichen Verfahren für Milch und Säuglingsanfangsnahrung..... 124

Tabelle 56: Ermittlung der Nachweisgrenzen der unterschiedlichen Verfahren in unterschiedlichen Matrizes basierend auf den Regressionsanalysen (Ermittlung der Zellzahl, die mit 95%iger Wahrscheinlichkeit vom Ct-Wert 40 abgegrenzt werden kann) 126

Tabelle 57: Übersicht über die Aufbereitungen, deren Läufe unterschiedliche Ergebnisse lieferten..... 127

Tabelle 58: Verteilung der Aufbereitungen mit unterschiedlichen Ergebnissen innerhalb der Läufe unter Berücksichtigung der verwendeten Extraktionsverfahren..... 128

Tabelle 59: Detaillierte Darstellung verschiedener Kombinationen bei Aufbereitungen mit unterschiedlichen Ergebnissen innerhalb der Läufe..... 129

Tabelle 60: Übersicht über die Proben, die bei Betrachtung des ersten Laufes jeder Aufbereitung unterschiedliche Ergebnisse lieferten 130

Tabelle 61: Darstellung verschiedener Ergebniskombinationen bei Betrachtung des ersten Laufes jeder Aufbereitung (berücksichtigt wurden Aufbereitungen mit unterschiedlichen Ergebnissen im ersten Lauf)..... 131

Tabelle 62: Standardabweichungen zwischen den Aufbereitungen und zwischen den Läufen innerhalb einer Aufbereitung für unterschiedliche Extraktionsverfahren in Milch und Säuglingsanfangsnahrung 132

Tabelle 63: Standardabweichungen für unterschiedliche Anzahlen von Aufbereitungen mit unterschiedlichen Extraktionsverfahren in Milch und Säuglingsanfangsnahrung 133

Tabelle 64: Sensitivität des Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* aus Milch mittels PCR 141

Tabelle 65: Kosten und Einsatzmöglichkeiten für die einbezogenen DNA-Extraktionsverfahren 143

Tabelle 66: Zusammensetzung von Kuhmilch, Muttermilch und Säuglingsanfangsnahrung im Vergleich 147

Tabelle 67: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit MAP-Stamm K10 – Ct-Werte der Real Time-PCR für den Marker *f*57 nach DNA-Aufbereitung mit unterschiedlichen Verfahren 174

Tabelle 68: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit MAP-Stamm 423 – Ct-Werte der Real Time-PCR für den Marker *f*57 nach DNA-Aufbereitung mit unterschiedlichen Verfahren 175

Tabelle 69: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit MAP-Stamm 44135 – Ct-Werte der Real Time-PCR für den Marker *f*57 nach DNA-Aufbereitung mit unterschiedlichen Verfahren 176

Tabelle 70: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit MAP-Stamm NB – Ct-Werte der Real Time-PCR für den Marker *f*57 nach DNA-Aufbereitung mit unterschiedlichen Verfahren 177

Tabelle 71: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „Pre“ mit MAP-Stamm K10 – Ct-Werte der Real Time-PCR für den Marker *f*57 nach DNA-Aufbereitung mit unterschiedlichen Verfahren 178

Tabelle 72: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „Pre“ mit MAP-Stamm 44135 – Ct-Werte der Real Time-PCR für den Marker *f*57 nach DNA-Aufbereitung mit unterschiedlichen Verfahren 179

Tabelle 73: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „Pre“ mit MAP-Stamm 423 – Ct-Werte der Real Time-PCR für den Marker *f*57 nach DNA-Aufbereitung mit unterschiedlichen Verfahren 180

Tabelle 74: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „Pre“ mit MAP-Stamm NB – Ct-Werte der Real Time-PCR für den Marker *f*57 nach DNA-Aufbereitung mit unterschiedlichen Verfahren 181

Tabelle 75: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „One“ mit MAP-Stamm 423 – Ct-Werte der Real Time-PCR für den Marker *f*57 nach DNA-Aufbereitung mit unterschiedlichen Verfahren..... 182

Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen, Einheiten und Sonderzeichen

±*s*	Standardabweichung
Ø	kein Koloniewachstum
=	gleich
>	größer als
≥	größer als oder gleich
<	kleiner als
≤	kleiner als oder gleich
°C	Grad Celsius
%	Prozent
+	positiv, plus
-	negativ, minus
®	geschütztes Warenzeichen (engl.: registered)
™	geschütztes Warenzeichen (engl.: trademark)
µl	Mikroliter
$\bar{x}$	arithmetischer Mittelwert
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Abs.	Absatz
AGID	Agargel-Immunodiffusionstest
Aqua dest.	Aqua destillata
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
Ct	Schwellenwert-Zyklus (engl.: threshold cycle)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
ebd.	ebenda
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
engl.	englisch
et al.	und andere (lat.: et alteri, et alii)
EUR	Euro (Währung)
Fa.	Firma

g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
HEYM	Herrold's Egg Yolk-Medium
HPC	Hexadecylpyridiniumchlorid
Hrsg.	Herausgeber
i.d.R.	in der Regel
IFTN	Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde
IMS	immunomagnetische Separation
k.A.	keine Angabe
Kap.	Kapitel
KbE	Kolonie-bildende Einheiten
KBR	Komplementbindungsreaktion
KCl	Kaliumchlorid
Lsg.	Lösung
MAP	*Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*
MGIT	Mycobacterial Growth Indicator Tube (Flüssignährmedium)
min	Minute(n)
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MSE	MAPsureEasy®
Mwst.	Mehrwertsteuer
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
n.d.	nicht durchgeführt
n.n.	nicht nachweisbar
Nr.	Nummer
o.g.	oben genannt
p	Wahrscheinlichkeit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PFGE	Puls-Feld-Gelelektrophorese
PMS	peptidvermittelte Separation (engl.: peptide mediated separation)
Primer F	Forward Primer
Primer R	Reverse Primer

RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
s	Sekunde(n)
SAN	Säuglingsanfangsnahrung
sp./spp.	Spezies (Singular/Plural)
ssp.	Subspezies
sog.	so genannte
Std.	Stunde(n)
u.a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
USD	US-Dollar (Währung)
u.z.	und zwar
verw.	verwendet
vgl.	vergleiche
w/v	Gewicht/Volumen (engl.: weight/volume)
z.B.	zum Beispiel
zzgl.	zuzüglich

1 Einleitung

Seit Beginn des 20. Jahrhunderts wird für *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), dem Erreger der Paratuberkulose bei Wiederkäuern, immer wieder ein kausaler Zusammenhang mit dem beim Menschen vorkommenden Morbus Crohn (MC) diskutiert. Milch und Milchprodukte sind ein wichtiger Bestandteil der menschlichen Ernährung (Hruska et al., 2005). Die möglicherweise erhöhte Thermoresistenz (Grant et al., 2002a) und der mögliche Zusammenhang von MAP und Morbus Crohn führen somit zu einer besonderen milchhygienischen Relevanz (Stephan et al., 2007).

Aufgrund der kurzen Haltbarkeit von Milch und Milchprodukten ist die kulturelle Anzucht durch die lange Wachstumsdauer des Erregers unpraktisch für Routinediagnostik und Überwachung (Tasara und Stephan, 2005).

Die kulturelle Diagnostik von MAP kann weiterhin durch MAP-Zellen, die aufgrund eines Hitzeverfahrens überlebt haben, aber nicht mehr anzüchtbar sind („Viable But Non Culturable“; VBNC), erschwert werden. Immunologisch basierte Nachweismethoden haben geringe Sensitivitäten und neigen zu Kreuzreaktionen (Nielsen et al., 2000; Geue et al., 2007). Für eine schnelle und zuverlässige Diagnostik sind daher molekularbasierte Methoden empfehlenswert.

In den eigenen Untersuchungen sollten DNA-Extraktionsverfahren zum Nachweis von MAP unter Einsatz einer spezifischen und gleichzeitig sensitiven TaqMan® Real Time-PCR optimiert werden. Dazu wurden sowohl Rohmilch als auch Säuglingsanfangsnahrung mit vier unterschiedlichen MAP-Referenzstämmen artifiziell kontaminiert. Die DNA-Extraktion erfolgte mit modifizierten Protokollen zweier unterschiedlicher DNA-Extraktionskits, u.z. dem *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche, Mannheim, Stammsitz in Basel, Schweiz) und dem *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Fa. Qiagen, Hilden), sowie dem automatisierten System *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega, Mannheim, Stammsitz in Madison, Wisconsin, USA). Die kulturelle Anzucht wurde parallel vorgenommen. Ziel der eigenen Untersuchungen war es, ein Verfahren zur Erfassung von MAP-Zellen als routinetaugliche Screeningmethode zur Verfügung zu stellen.

2 Literaturübersicht

2.1 Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis (MAP)

2.1.1 Allgemeines

Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* (MAP) ist der Erreger der Paratuberkulose der Wiederkäuer, erstmals 1895 von dem Pathologen Albert Johne beschrieben. Mykobakterien repräsentieren eine Gruppe, die von freilebenden Saprophyten bis hin zu Erregern, die obligat auf einen lebenden Wirt angewiesen sind, reichen (Hett und Rubin, 2008; Ventura et al., 2007). Phylogenetisch ist MAP Teil des *Mycobacterium avium*-Komplexes, zu dem auch *Mycobacterium avium* ssp. *avium*, *Mycobacterium avium* ssp. *silvaticum* (bei Ringeltauben) und *Mycobacterium intracellulare* gehören.

MAP zeigt eine DNA-Homologie von mehr als 90% zu *Mycobacterium avium* ssp. *avium* (MAA) (Imaeda et al., 1988; Saxegaard et al., 1988). Es unterscheidet sich aber von anderen MAA-Subspezies durch seine Abhängigkeit von Mycobactin J bei der kulturellen Anzucht (Merkal und McCullough, 1982) und der Anwesenheit von Mehrfachkopien der Gensequenz IS*900* (Green et al., 1989) und ISMav2 (Strommenger et al., 2001). Mycobactin ist ein Siderophor, das unter anderem von den MAA-Subspezies gebildet wird. Siderophore werden von der Mykobakterienzelle gebildet und an die Umwelt abgegeben. Dort bilden sie Komplexe mit Eisen und werden erneut in die Zelle, die sie gebildet hat, aufgenommen. Sie fungieren als „Eisentransportproteine“ (Neilands, 1995). Die Mycobactin-Abhängigkeit von MAP ist ein Beispiel für die Anpassung an das intrazelluläre Dasein. Anders als in der Umwelt wird Mycobactin dabei nicht für die Eisenbeschaffung benötigt (Lambrecht und Collins, 1992).

MAP hat eine Länge von 0,3-2 µm und eine Breite von 0,3 - 0,5 µm (Bisping und Amtsberg, 1988). Das MAP-Genom hat eine molekulare Größe von 4,4 - 4,7x10^6 bp. Damit ist es größer als das Genom eng verwandter Mykobakterien – 3,5x10^6 bp bei *M. avium*, 3,0 - 4,2x10^6 für *M. tuberculosis* und 2,0 - 3,3x10^6 bp für *M. leprae* (Antoine et al., 1988; Athwal et al., 1984; Clark-Curtiss, 1990; Clark-Curtiss et al., 1985; Imaeda, 1985; Imaeda et al., 1982; Imaeda et al., 1988; McFadden et al., 1987a). Die Zellwand von MAP ist hoch spezialisiert und besteht zu 60% aus einer Vielzahl von Lipiden, die vor Stressoren schützen, und sie so gut wie undurchlässig für viele Chemikalien macht (Brennan und Nikaido, 1995). Diese dicke Zellwand verhilft MAP zu seinen charakteristischen Eigenschaften. Dazu gehören unter anderem ein erhöhter Widerstand gegen Chemikalien, wie z.B. Chlor (Whan et al., 2001) und

physikalische Prozesse wie z. B. Pasteurisation (Grant et al., 1996; Grant et al., 1998a). Die lipidreiche Zellwand gibt MAP einen Überlebensvorteil, ist aber gleichzeitig durch die daraus resultierende restriktive Aufnahme von Nährstoffen (Domingue und Woody, 1997) für das langsame Wachstum von MAP verantwortlich.

Aufgrund dieser wächsernen Zellwand sind MAP und andere Mykobakterien nach dem Färben durch saurem Alkohol nicht vollständig zu entfärben (Doetsch, 1981). Sie werden daher auch als säurefeste Stäbchen bezeichnet. Ein weiteres Charakteristikum ist die Hydrophobizität (McNeil et al., 1991; Primm et al., 2004), durch die MAP Zellen in wässrigen Suspensionen die starke Tendenz zum Aggregieren haben (Borrego et al., 2000) und sich in Lebensmitteln und Gewebehomogenaten mit Fetten verbinden (Gao et al., 2007).

Die Familie der Mykobakterien beinhaltet sowohl schnell- als auch langsamwachsende Spezies (Wayne und Kubica, 1986). Von den kultivierbaren Mykobakterien wächt MAP am langsamsten (Lambrecht et al., 1988). Bei optimalen Bedingungen liegt die Generationszeit bei über 20 Stunden (ebd.). Der Versuch einer biochemischen Charakterisierung durch Chiodini (1986) zeigte, dass MAP überwiegend inert ist. Das optimale Wachstum erfolgt bei 37 °C. Bei 30 °C findet eine langsame, bei 42 °C keine Vermehrung mehr statt.

Zahlreiche Studien zum Überleben von MAP in der Umwelt (Whittington et al., 2004; Whittington et al., 2005; Pickup et al., 2005) zeigen unregelmäßige Verhaltensmuster bei der Wiederfindung von MAP. Dies wird als eine Art Ruhezustand interpretiert, durch den nicht-sporenbildende Zellen ihr Überleben sichern, ohne dass Replikation erforderlich ist (Whittington et al., 2004) bzw. die Annahme eines vorübergehend nicht kultivierbaren Zustandes (Mukamolova et al., 2003). Dieser ist genetisch vorgesehen, reversibel und induziert durch ungünstige Umweltbedingungen. Auch Sporen-ähnliche Zustände wurden beschrieben (Lamont et al., 2012). Whittington et al. (2004) beobachteten in drei von vier Fällen eine Änderung der Lebensfähigkeit und beschrieben Gensequenzen, die denen von anderen Mykobakterien ähneln und an solchen Mechanismen beteiligt sind. Sie wurden als indirekter Hinweis für einen physiologischen Mechanismus interpretiert, der einen solchen Ruhezustand ermöglicht (ebd.). Hiervon zu unterscheiden sind sogenannte Zellwand-defekte Formen von MAP, die ihre Zellwand teilweise (Spheroblasten) oder vollständig (Protoblasten) verloren haben und eine veränderte zelluläre Form aufweisen (Beran et al., 2006). Diese Zellen spielen *in vivo* eine Rolle bei Morbus Crohn (Markesich et al., 1988). Mit Standardmethoden sind Zellwand-defekte Zellen so gut wie nicht zu erfassen (Ulrichs und Kaufmann, 2002).

Die Bildung von Biofilmen als Überlebensstrategien wurde für andere Mykobakterienarten beschrieben, MAP wurde bisher nicht aus Biofilmen in Wasserverteilungssystemen isoliert (Falkinham et al., 2001).

Die Entdeckung der Gensequenz IS*900* durch Green et al. (1989) und die Verwendung als Sonde beim Restriktionsfraktionslängenpolymorphismus (RFLP) zeigte mehr als 20 Genotypen von MAP (Collins et al., 1990). Es entstand die Klassifizierung von S- („sheep“) und C- („cattle“) Stämmen sowie I- („intermediate“) Stämmen (ebd.). Diese sind auch als Typ I, II und III bekannt (De Juan et al., 2005; Stevenson et al., 2002). Intermediäre Stämme sind eine Untergruppe der S-Stämme und wurden in Schafen und Ziegen gefunden (Stevenson et al., 2009). S-Stämme gelten als schwieriger anzuzüchten. Die genetische Vielfalt der verschiedenen Stämme wurde später identifiziert. Hierbei wurden Deletionen, Insertionen und Polymorphismen gefunden (Dohmann et al., 2003; Marsh et al., 2006; Marsh und Whittington, 2005; Marsh und Whittington, 2007).

2.1.2 Vorkommen und Tenazität

Die Haltbarkeit von MAP in der Umwelt steht in direktem Zusammenhang mit der lipidreichen Zellwand des Organismus (Sung und Collins, 1998; Whan et al., 2001; Beckler et al., 2008). Niedrige Temperatur, Feuchtigkeit und fehlende Sonneneinstrahlung begünstigen die Lebensdauer des Bakteriums (Lovell et al., 1944; Larsen et al., 1956; Jørgensen, 1977). Kazda et al. (2009) beschrieben größere Mengen an MAP-Zellen in Böden mit höherer Feuchtigkeit und organischen Verbindungen. Whittington et al. (2004) dagegen fand keinen Zusammenhang mit Feuchtigkeit.

Eine Übersicht über die Überlebensdauer in unterschiedlichen Matrizes ist in Tabelle 1 gegeben.

Tabelle 1: Überleben von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in der Umwelt

	Dauer	Referenz
Boden		
mit Kotmaterial	55 Wochen	Whittington et al., 2004
Gras, oberer Teil	24 Wochen	Whittington et al., 2004
infizierter Kot	246 Tage	Lovell et al., 1944
Kot erkrankter Tiere auf der Weide	11 Monate	Rosenberger, 1978
Überdauern im Kot über Winter	k.A.	Chiodini und Van Kruiningen, 1983
Kot bei -14 °C	12 Monate	Larsen et al., 1956
Gewässer		
Fließgewässer	163 Tage	Lovell et al., 1944
stehende Gewässer	270 Tage	Larsen et al., 1956
Seewasser (MAP kultivierbar)	632 Tage	Pickup et al., 2005
Seewasser (Nachweis MAP-DNA)	841 Tage	Pickup et al., 2005
Stauwasser	48 Wochen	Whittington et al., 2005
Wassersediment	3 Monate	Whittington et al., 2005
Sonstiges		
Rindergülle (anaerob) bei 5 °C	252 Tage	Jørgensen et al., 1977
Rindergülle (anaerob) bei 15 °C	98 Tage	Jørgensen et al., 1977
Biogasanlage (MAP kultivierbar)	2 Monate	Slana et al., 2011
Biogasanlage (Nachweis MAP-DNA)	16 Monate	Slana et al., 2011
Silage	n.n.	Khol et al., 2010

Außer bei Haus- und Wildwiederkäuern ist MAP auch bei weiteren Haustierspezies zu finden, die aber i.d.R. asymptomatische Ausscheider sind und nicht klinisch erkranken (Chiodini et al., 1984a; Klee, 2002). Klinische Erscheinungen als Reaktion auf die Infektion mit MAP sind für Nicht-Wiederkäuer, mit Ausnahme von Kaninchen (Anderson et al., 2007; Beard et al., 2001b), selten beschrieben worden.

Im Gesamtgeschehen um MAP spielen möglicherweise auch biologische Vektoren eine Rolle. Insekten leben auf sich zersetzendem Material und nehmen die Bakterien auf. Die meisten dieser Bakterien passagieren und werden mit deren Kot wieder ausgeschieden (Holter, 1979). Mykobakterien sind aufgrund ihrer Zellwandstruktur resistent gegen die Aktivität der Verdauungsenzyme und können auch über Speichel ausgeschieden werden (Kazda, 2000). Bei der *in vitro*-Infektion von Larven von *Tenebrio molitor* und *Zophobas atratus* mit MAP konnte gezeigt werden, dass die Käfer den Erreger mechanisch weitergeben können. Die Mykobakterien bleiben im Verdauungstrakt der Käfer lebensfähig (Fischer et al., 2004a). Lloyd et al. (2001) zeigten die Aufnahme von MAP durch Larven von *Haemonchus contortus*, *Ostertagia circumcincta* und *Trichostrongylus colubriformis*, die in Schafkot

vorhanden sind. Der mit Nematoden infizierte Schafkot wurde mit MAP unter feuchten Bedingungen für 7 Tage bei 25 °C inokuliert. Durch Licht wurden die Larven stimuliert, den Kot zu verlassen. MAP wurde daraufhin in den Larven nachgewiesen. Neben Insekten können auch Regenwürmer Vektoren für die Übertragung von MAP sein (Fischer et al., 2001; Fischer et al., 2003a; Fischer et al., 2003b).

Falls sylvatische Zyklen vorhanden sind, könnte über asymptomatische Ausscheider die Bekämpfung von MAP untergraben und die Verbreitung von Betrieb zu Betrieb vereinfacht werden (Beard et al., 2001b). Eine Übersicht über das Vorkommen von Paratuberkulose und MAP-Nachweisen bei verschiedenen Tierarten zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2: Vorkommen von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* bei verschiedenen Tierarten

natürliche Paratuberkulose in wildlebenden Wiederkäuern	
Weißwedelhirsch	Chiodini und Van Kruiningen, 1983
Rot- und Rehwild	Sharp et al., 1995; Robino et al., 2002
Dickhornschaf	Williams et al., 1979; Jessup und Williams, 1999
Elch	Cook et al., 1997; Manning et al., 2003
Bison	Buergelt und Ginn, 2000
Nachweis von MAP bei Nicht-Wiederkäuern	
Füchsen, Wieseln, Krähen, Rabenvögeln, Ratten, Waldmäuse, Wildkaninchen, Hasen und Dachse	Beard et al., 2001a; Beard et al., 2001b
Maus	Amonsin et al., 2004
Wildkaninchen	Greig et al., 1997; Daniels et al., 2001
Feldhase	Mathews und Sargent, 1977
Affen: Mandrills, Makaken	Zwick et al., 2002; McClure et al., 1987
Hunde	Glanemann et al., 2008
Infektion von Nichtwiederkäuern unter experimentellen Bedingungen	
Hasen	Mokresh und Butler, 1990; Mokresh et al., 1989
Lemminge	Larsen und Miller, 1979
Hamster	Hirch, 1956
Meerschweinchen	Francis, 1943
Mäuse	Harding, 1959
Biologische Vektoren	
Regenwürmer	Fischer et al., 2003a
Fliegen	Fischer et al., 2001; Fischer et al., 2004b
Kakerlaken	Fischer et al., 2003b
Nematodenlarven in Schafkot (*Haemonchus contortus*, *Ostertagia circumcincta*, *Trichostrongylus colubriformis*)	Lloyd et al., 2001

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

Die zuverlässige Diagnose einer Infektion mit MAP stellt das Hauptproblem in der Überwachung der Paratuberkulose dar. Für den Nachweis von MAP stehen serologische, mikroskopische, kulturelle und molekularbiologische Methoden zur Verfügung. Diese sind je nach vorliegender Probenmatrix unterschiedlich geeignet. Sie unterscheiden sich vor allem in Spezifität und Sensitivität sowie Kosten und Zeitaufwand.

Serologische Verfahren wie Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), Agargel-Immunodiffusionstest (AGID) und Komplementbindungsreaktion (KBR) werden häufig aufgrund ihrer geringen Kosten und dem schnellen Ergebnis innerhalb von zwei bis drei Tagen verwendet (Colgrove et al., 1989). Messbare Antikörpertiter sind aber erst im späten Stadium der Erkrankung zu finden (Collins, 1996). Subklinische Erkrankungen sind mit diesen Verfahren kaum zu erfassen. Köhler et al. (2008) bewerteten fünf ELISA Test-Kits hinsichtlich der Messung von Antikörpern gegen MAP in Rinder-Serum. Basierend auf den Ergebnissen stellten sie die Eignung des Antikörper-Nachweises für die Diagnose der Paratuberkulose beim Einzeltier in Frage (Köhler et al., 2008). Auch die Untersuchung von Tankmilchproben mittels ELISA (Svanovir Ptb-ELISA) stellte die Brauchbarkeit dieses Nachweisverfahrens in Frage. Wird eine hohe Spezifität von 100% zugrunde gelegt, liegt die Sensitivität bei 32,3%; bei einer gesteigerten Sensitivität von 57% lag die Spezifität nur noch bei 67% (Geue et al., 2007). Die Leistungsfähigkeit eines Serum-ELISA als Indikator für die Wahrscheinlichkeit einer Milchausscheidung ist fraglich (Pinedo et al., 2008). Mikroskopie als Nachweisverfahren für MAP ist nur bei hohen Erregerzahlen geeignet. Im Folgenden wird daher auf diese indirekten Nachweisverfahren nicht weiter eingegangen. Der Schwerpunkt dieses Kapitels liegt auf den direkten Nachweisverfahren mittels PCR und Kultur.

2.2.1 Probenvorbereitung

2.2.1.1 Magnetische Separation

Für den Nachweis von MAP aus Milch kommen als Optimierungsschritte meist eine Kombination aus initialer Zentrifugation eines größeren Probenvolumens, mechanischen Verfahren und DNA-Extraktion zum Einsatz (Grant et al., 1998b; Odumeru et al., 2001). Eine weitere Verbesserung der Nachweisgrenze kann durch immunomagnetische Separation (IMS) und peptidvermittelte magnetische Separation (PMS) in Milch (Grant et al., 1998b; Grant et al., 2000; Stratmann et al., 2002; Djønne et al., 2003; Metzger-Boddien et al., 2006) und

Wasser (Whan et al., 2005b) erlangt werden. Sowohl IMS als auch PMS ermöglichen, ausgehend von einem größeren Probenvolumen, die Konzentrierung der Bakterien auf ein Volumen, das für die kulturelle Anzucht geeignet ist. Tabelle 3 gibt einen Überblick zu diesen Verfahren.

Tabelle 3: Optimierung der Sensitivität PCR-basierter Methoden mittels magnetischer Separation (Quelle: Stephan, 2007; modifiziert)

Angewandtes Verfahren	Zielsequenz	Referenz
IMS	*IS900*	Grant et al., 2000
IMS	IS*900*	Khare et al., 2004
IMS	IS*900*	Whan et al., 2005b
IMS	*f*57	Stephan et al., 2007
aMp3 Peptid	IS*Mav2*	Stratmann et al., 2002
aMptD Peptid	IS*Mav2*	Stratmann et al., 2006
Beads mit Phagen	IS*Mav2*	Stratmann et al., 2006
PMS-Phage	*IS900*	Foddai et al., 2011

IMS beruht auf der Interaktion zwischen den Oberflächenantigenen der Zelle und den MAP-spezifischen Antikörpern, die sich auf der Oberfläche magnetischer Beads befinden. Damit kann der gesuchte Mikroorganismus aus einer heterogenen Mikroorganismenpopulation, wie sie in Futter und klinischen Proben gefunden werden, getrennt werden (Grant et al., 2000). Experimente mit artifizieller Kontamination von Rohmilch zeigten eine Nachweisgrenze von 10^3 KbE/50 ml für IMS-PCR, was deutlich niedriger als bei direkter IS*900* PCR ist (>10^5 KbE/50 ml) (Grant et al., 2000). Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass Zellen separiert werden, die intakt und somit potentiell lebensfähig sind. Bakterien, die immunologisch an magnetische Beads gebunden werden, bleiben gewöhnlich lebensfähig und können sich erneut vermehren, wenn der nötige Nährstoffbedarf gedeckt wird (Torensma et al., 1993).

Die peptidvermittelte magnetische Separation (PMS) ist ähnlich der IMS. Anstelle von Antikörpern befinden sich auf der Oberfläche der magnetischen Beads ein MAP-spezifisches Peptid, an das MAP gebunden wird.

Foddai et al. (2011) kombinieren das Prinzip der peptidvermittelten magnetischen Separation mit einem Phagen-Assay. Mittels PMS werden gezielt MAP-Zellen von der Probenmatrix separiert und konzentriert. Somit wird der Hauptteil der Begleitflora und wachstumshemmender Substanzen wirksam entfernt. Durch den Phagen-Assay wird der

schnelle Nachweis lebensfähiger MAP innerhalb von 24 Stunden ermöglicht. Die Kombination beider Verfahren ermöglicht den Nachweis niedrige Zahlen an MAP ohne die Notwendigkeit chemischer Dekontamination (Foddai et al., 2011).

2.2.1.2 DNA-Extraktion

Mit einer schnellen und zuverlässigen Nachweismethode könnte die Erkrankung Paratuberkulose überwacht werden. Bei klinischen Proben findet sich jedoch häufig eine verringerte Sensitivität. Ursachen dafür sind ineffiziente Extraktion der mykobakteriellen DNA, die Anwesenheit von Inhibitoren oder eine zu niedrige Zellzahl an MAP in der Probe (Englund et al., 1999).

MAP ist durch seine Fähigkeit, aufgrund der speziellen Zellwandstruktur in Makrophagen überleben zu können, resistenter gegen Zelllyse (Stephan et al., 2007). Die Zellwand enthält stark ausgeprägte Lipopolysaccharid-Protein-Komplexe (LPS), die eine Extraktion von MAP-DNA erschweren (Yacoob und Zealey, 1988; Owen und Borman, 1987).

Aufgrund des hohen Fett- und Calciumgehaltes ist Milch eine schwierige Matrix für die PCR (Bickley et al., 1996; Lantz et al., 1994). Ein wichtiger Schritt bei der Steigerung der Sensitivität der PCR ist die Extraktionsmethode (Christopher-Hennings et al., 2003; Stabel et al., 2004). Die häufigste Vorgehensweise für den Nachweis von MAP in Milch basiert auf der Zentrifugation einer größeren Menge Milch, von der nachfolgend das Pellet und/oder die Rahmfraktion für die DNA-Isolation verwendet wird (Bosshard et al., 2006; Rodriguez-Lazaro et al., 2005; Tasara und Stephan, 2005). Pelletwaschen vor der Extraktion wurde von einigen Gruppen zur Entfernung von Inhibitoren durchgeführt (Pillai und Jayarao, 2002; Herthnek et al., 2006). Diese Vorgehensweisen sind für MAP am besten geeignet, Anreicherungsverfahren sind es aufgrund der langen Anzuchtdauer von MAP nicht (Radstrom et al., 2004).

Odumeru et al. (2001) verbesserte die Sensitivität mittels Bead Beating, enzymatischer Lyse, Kochen und Isopropanol-Präzipitation. Durch Bead Beating wird die Probe mechanisch bearbeitet. Die Kombination von Hochgeschwindigkeitsbewegungen und in Vibration versetzte Beads führen zum Aufbrechen der Zellwand. Tabelle 4 zeigt die von ihm untersuchten Kombinationen an Verfahren und die ermittelten Nachweisgrenzen.

Tabelle 4: Effizienz der Verfahren für die Extraktion von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*-DNA, untersucht mit IS*900*-PCR (Quelle: Odumeru et al., 2001)

Verfahren	Kombination der Verfahren für die Extraktion der DNA							
	1	2	3	4	5	6	7*	8
Bead Beating		✓	✓	✓	✓	✓	✓	
Tiefgefrieren (5 Zyklen)								✓
Lysis Puffer					✓	✓	✓	✓
Kochen (20 min)	✓	✓		✓		✓	✓	✓
Präzipitation			✓	✓	✓	✓	✓	✓
PCR mit BSA (0,0037%)							✓	
Sensitivität (KbE/ml)	10^5	10^2-10^3	10^4-10^5	10^2-10^3	10^2	10^2	10-10^2	10^4

* Gleiche DNA wie bei Verfahren 6

O'Mahony und Hill (2004) untersuchten artifiziell kontaminierte Milch mit verschiedenen Extraktionsmethoden und kamen zu dem Schluss, dass die Kombination von Zentrifugation, Zelllyse, mechanischem Aufschluss, Kochen und DNA-Extraktion den Nachweis mittels Real Time-PCR verbessert. Die dabei ermittelte Nachweisgrenze lag bei 40 KbE/ml Milch, dies ist vergleichbar bzw. eine Verbesserung gegenüber den Nachweisgrenzen vorangegangener Untersuchungen (Corti und Stephan, 2002; Grant et al., 2000; Millar et al., 1996; Odumeru et al., 2001; Pillai und Jayarao, 2002).

Im Anschluss an die Zelllyse, bei der die mykobakterielle DNA freigesetzt wird, muss die DNA von der Probenmatrix isoliert und von Fetten, Proteinen und anderen PCR-hemmenden Substanzen gereinigt werden. Für die DNA-Extraktion gibt es kommerziell erhältliche Kits. Diese bestehen aus Säulen mit einem Filter. An diesen Filter, beispielsweise aus einer Silikamembran, bindet die DNA. Verunreinigungen werden durch aufeinanderfolgende Zentrifugationsschritte mit unterschiedlichen Puffern entfernt.

2.2.1.3 Dekontamination

Für den kulturellen Nachweis von MAP ist, aufgrund der Begleitflora der zu untersuchenden Matrix und der langen Inkubationszeit, eine Dekontamination erforderlich. Für die Untersuchung von Kuhmilch wurden unterschiedliche Dekontaminationstechniken sowie Kulturmedien verwendet (Cornejo et al., 1998; Giese und Ahrens, 2000), unter anderem 5% (w/v) Oxalsäure, im Anschluss neutralisiert mit Natronlauge (Taylor et al., 1981), und die modifizierte Cornell-Methode (Rahn et al., 1998), bei der HPC in halbkonzentrierter Hirn-Herz-Bouillon (BHI) gefolgt von einer Antibiotikalösung zur Dekontamination eingesetzt

wurde (Dundee et al., 2001). Weiterhin 0,75% (w/v) Hexadecylpyridiniumchlorid (HPC) für vier Stunden (Sweeney et al., 1992) bzw. eine Über-Nacht-Inkubation (Streeter et al., 1995; Millar et al., 1996). Die Effektivität einer Dekontamination mit HPC wurde sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 37 °C untersucht (Gao et al., 2005).

Dundee et al. (2001) führten vergleichende Untersuchungen von vier Dekontaminationsprotokollen für die Isolation von MAP aus Milch durch. Die Dekontamination mit HPC wurde in diesen Untersuchungen für fünf Stunden durchgeführt. Dies war eine Stunde mehr als bei Sweeney et al. (1992), weil in Sammeltankmilch eine höhere Begleitflora zu erwarten ist, als bei Milch, die direkt aus dem desinfizierten Euter gewonnen wird. Von den vier verglichenen Protokollen erwies sich die Dekontamination mit 0,75% HPC für fünf Stunden bei Raumtemperatur am wirkungsvollsten.

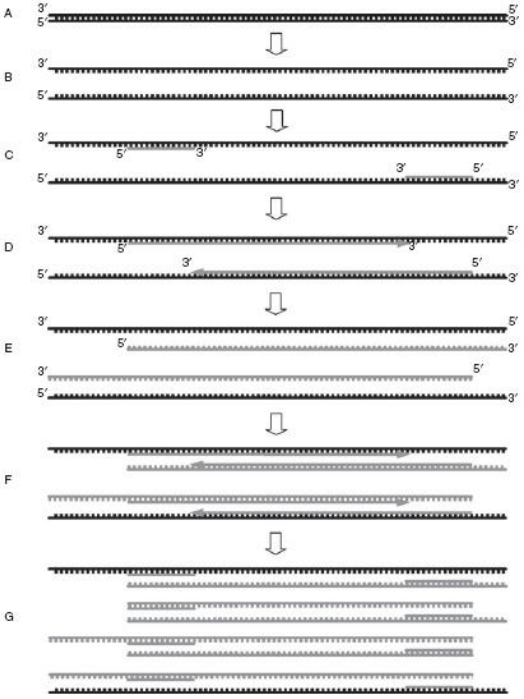
Es gibt bekannte Schwierigkeiten bei der kulturellen Anzucht von MAP aus Milch (Grant und Rowe, 2001). Eine chemische Dekontamination kann einen gegenteiligen Effekt auf die Lebensfähigkeit von MAP haben. Die Untersuchungen von Dundee et al. (2001) zeigten, dass ein signifikanter Anteil der MAP in Milch nach Dekontamination nicht wiedergefunden wird, unabhängig von der verwendeten Methode. Bei der Verwendung von 0,75% HPC für fünf Stunden kam es zu 75-85% Verlust, bei der modifizierten Cornell-Methode sogar zu 99,8%. Die für MAP bekannte Tendenz zur Aggregatbildung verringert die Wiederfindungsrate ebenfalls. Auch die Inkubation bei 37 °C führt zu einem geringeren Nachweis an lebenden MAP (Bradner et al., 2012; Gao et al., 2005). Bei der Verwendung älterer Milch ist zusätzlich die Verwendung eines Antibiotikazusatzes sinnvoll, da Dekontamination alleine die Begleitflora nicht wirkungsvoll beseitigte (Gao et al., 2005).

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.2.2.1 Das Prinzip der PCR

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) handelt es sich um die temperaturabhängige enzymatische Replikation spezifischer DNA-Sequenzen, bei der das entstandene Produkt als Template für die nächste Replikation genutzt wird. Dies führt zu einer exponentiellen Vervielfältigung der DNA. Somit können langsam wachsende oder nicht kultivierbare Bakterien schneller identifiziert werden, verdächtiges Bakterienwachstum kann leichter bestätigt werden.

Abbildung 1 zeigt grafisch den Ablauf einer PCR.



Die Darstellung der Template-DNA ist schwarz, Primer und neu synthetisierte DNA sind grau. Auf die Bezeichnung des 3‘ und 5‘ Endes wurde zugunsten der Übersichtlichkeit in den Abbildungen F und G verzichtet.

A. Template-DNA
B. 1. Zyklus: Denaturierung
C. Annealing
D. Elongation
E. 2. Zyklus: Denaturierung
F. Annealing und Elongation
G. 3.Zyklus: Denaturierung und Annealing.

Stetige Steigerung der Anzahl der Produkte in jedem weiteren Zyklus.

Abbildung 1: Darstellung einer Polymerase-Kettenreaktion (Quelle: Bölske und Herthnek, 2010)

2.2.2.2 PCR zum Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*

Für die Diagnostik mittels PCR muss die DNA-Sequenz, die für die Vervielfältigung ausgewählt wird, über einen angemessenen Grad an Spezifität verfügen (Bölske und Herthnek, 2010). Nur so kann eine gewisse Anzahl an Zyklen dazu führen, dass eine große Anzahl an Kopien produziert wird, die die DNA nachweisbar macht.

Tabelle 5 zeigt eine Übersicht der DNA-Sequenzen, die für den Nachweis von MAP mittels PCR eingesetzt werden.

Tabelle 5: DNA-Sequenzen für den Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* mittels PCR (Quelle: Böhlske und Herthnek, 2010; modifiziert)

DNA Sequenz	Kopienanzahl	Referenz
IS*900*	15-20	Green et al., 1989; Collins et al., 1990; Möbius et al., 2008; Schönenbrücher et al., 2008; Irenge et al., 2009
*f*57	1	Poupart et al., 1993; Vasnick et al., 2004; Tasara und Stephan, 2005; Bosshard et al., 2006; Herthnek und Bölske, 2006; Glanemann et al., 2008; Herthnek et al., 2008; Möbius et al., 2008, Schönenbrücher et al., 2008; Irenge et al., 2009
IS*Mav2*	3	Strommenger et al., 2001; Stratmann et al., 2002, Shin et al., 2004; Glanemann et al., 2008; Möbius et al., 2008; Schönenbrücher et al., 2008
hspX	1	Ellingson et al., 1998; Ellingson et al., 2000; Stabel et al., 2004
Gen 251	1	Bannantine et al., 2002; Sibley et al., 2007
Gen 255	1	Bannantine et al., 2002; Möbius et al., 2008
ISMap*02*	6	Stabel und Bannantine, 2005; Irenge et al., 2009
ISMap*04*	4	Li et al., 2005

Für den Nachweis von MAP ist die bekannteste Sequenz das multi-copy Element IS*900*. Es wurde erstmals von Green et al. (1989) beschrieben, unabhängig davon aber auch von Collins et al. (1990) isoliert. Der erste Einsatz in der Diagnostik wurde von Vary et al. (1990) beschrieben. Diese PCR-Methode wurde verbessert und zu komplexeren Methoden weiter entwickelt. Genutzt wurden unterschiedliche Fragmente von IS*900* – 229 bp bei Vary et al. (1990), 413 bp bei Millar et al. (1996). Die vergleichsweise hohe Anzahl an Kopien von IS*900* führt zu einer besseren Sensitivität (Bull et al., 2000). IS*900* ist in zahlreichen Real

Time-PCR-Assays zum Nachweis von MAP aus Milch verwendet worden (O'Mahony und Hill, 2004; Tasara und Stephan, 2005; Rodriguez-Lazaro et al., 2005; Donaghy et al., 2008).

Die Spezifität von IS*900* wurde angezweifelt, als ein Mykobakterium gefunden wurde, das eine Sequenz mit 94% Gleichheit zu IS*900* aufwies. Über rRNA Sequenzierung wurde ermittelt, dass dieses verwandt ist mit *Mycobacterium cookii* (Englund et al., 2002). Tasara und Stephan (2005) fanden Kreuzreaktionen mit *Mycobacterium chelonae*-, *Mycobacterium terrae*- und *Mycobacterium xenopi*-Stämmen. Eine Kreuzreaktion konnte auch für *Mycobacterium porcinum* gezeigt werden (Taddei et al., 2008).

Andere Zielsequenzen wie *f*57, IS*Mav2, hspX*, ISMap02, Gen 251 und 255 wurden untersucht (Poupart et al., 1993; Strommenger et al., 2001; Ellingson et al., 1998; Stabel und Bannantine, 2005; Bannantine et al., 2002). Der Vorteil von *f*57 liegt vorwiegend in seiner strengen Einzigartigkeit und seiner möglichen Fähigkeit zur Quantifizierung der DNA (Herthnek und Bölske, 2006; Tasara und Stephan, 2005). Kreuzreaktionen konnten für *f*57 nicht nachgewiesen werden (Donaghy et al., 2011). Die Unsicherheiten bezüglich der Spezifität einiger DNA-Abschnitte führten zu der Studie von Möbius et al. (2008), in der verschiedene PCR-Systeme verglichen wurden. Die Single-PCR erwies sich dabei als sehr zuverlässig, gelegentliche Kontaminationen bei der nested PCR wurden als Risiko für die Routinediagnostik gesehen. IS*Mav2* zeigte bei diesen Untersuchungen Kreuzreaktionen mit *Mycobacterium smegmatis* und *Mycobacterium fortuitum*, dagegen konnten der Marker *f*57 und die Sequenz 255 empfohlen werden (ebd.).

Den ersten PCR-Tests basierend auf dem Nachweis von MAP aus Kot mangelte es an Sensitivität im Vergleich zur Kultur (Vary et al., 1990; Whipple et al., 1992). Millar et al. (1996) entwickelten die erste PCR für den Nachweis von MAP in Milch, basierend auf der Zielsequenz IS*900*. Diese PCR war jedoch aufgrund Matrix-spezifischer Inhibitoren von geringer Sensitivität (Giese und Ahrens, 2000). Im Laufe der Jahre gab es Fortschritte in der Verbesserung der Sensitivität der PCR-basierten Methoden (Khare et al., 2004; O'Mahony und Hill, 2004; Gao et al., 2007). Der Nachweis von MAP-DNA mittels PCR hat sich mittlerweile als weit verbreitet und sensitiv für das Untersuchen von Milch und klinischen Proben erwiesen (Bull et al., 2003; Corti und Stephan, 2002; Giese und Ahrens, 2000; Grant et al., 2000; Millar et al., 1996; Moss et al., 1992; Pillai und Jayarao, 2002; Whittington et al., 1999). Clark et al. (2008) verglichen die kulturell erzielten Ergebnisse mit Serum-ELISA und direkter PCR. Sie stellten keinen signifikanten Unterschied zwischen der PCR zur Kultur fest. Im Vergleich zum ELISA liefert dagegen die PCR Ergebnisse schneller und ist sensitiver.

2.2.2.3 Formen der PCR

Bei der **konventionellen PCR** werden die Amplifikate mittels Gelelektrophorese getrennt. Meist handelt es sich um Agarosegele. Die elektrische Spannung zieht die negativ geladene DNA zur positiven Seite, wobei die Geschwindigkeit umgekehrt proportional zur Molekülgröße ist. Das Färben des Geles mit Ethidiumbromid, das an die doppelsträngige DNA bindet und fluoresziert, macht die DNA unter UV-Licht sichtbar. Die Sensitivität der koventionellen PCR ist ausreichend für die Bestätigung gewachsener Kolonien (Manning und Collins, 2001). Für klinische Proben wird für gewöhnlich eine höhere Sensitivität benötigt.

Eine Weiterentwicklung der konventionellen PCR ist die **nested PCR**. Dabei handelt es sich um zwei nacheinander ablaufende PCR-Reaktionen mit zwei unterschiedlichen Primerpaaren. Das Produkt der ersten Reaktion wird hierbei zum Template der zweiten Reaktion. Alle vier Primer haben einen ähnlichen Abschnitt der DNA als Ziel und somit ist die Spezifität verstärkt. Zusätzlich, da für die zweite Reaktion neue Reagenzien zugegeben werden, steigt auch die Sensitivität (Englund et al., 2001; Ikonomopoulos et al., 2004). Ist nach der ersten PCR zu wenig DNA für das Visualisieren vorhanden, so kann nichtsdestotrotz genug DNA vorhanden sein, um in der nested PCR ein nachweisbares Amplifikat zu erhalten. Weiterhin werden PCR-Inhibitoren aus dem ersten Lauf stark verdünnt, wenn das Template für die zweite PCR überführt wird. Die nested PCR ist sensitiver als Single-PCR (Christopher-Hennings, 1995; Collins et al., 1993), da es zu einer exponentiellen Amplifikation eines bereits amplifizierten PCR-Produktes kommt. Sie ist aber auch zeit- und arbeitsintensiver als die konventionelle PCR, und die Übertragung der Produkte von ersten zum zweiten Lauf birgt ein großes Risiko für Kreuz-Kontamination.

Auch die **Real Time-PCR** ist eine methodische Weiterentwicklung der konventionellen PCR. Sie ermöglicht die gleichzeitige Vervielfältigung und den Nachweis von Nukleinsäuren in einem geschlossenen System (Sloan, 2007). Während bei der konventionellen Analyse die Menge der DNA am Ende der Reaktion gemessen wird, wird bei der Real Time-PCR das Fortschreiten der Reaktion durch das Messen des emittierten Lichts verfolgt. Die benötigten Zyklen, die zum Erreichen der Fluoreszenz von einem bestimmten Schwellenwertes benötigt werden, oft als Ct-Wert bezeichnet, sind eine Maßeinheit für die Menge an vorhandener DNA. Die Verwendung einer Standardkurve mit bekannter Menge an DNA ermöglicht eine Quantifizierung in der Probe.

Quantitative PCR-Methoden basieren auf dem Fluoreszenznachweis von SYBR Green, die an die Doppelstrang-DNA bindet während der Amplifikation (O`Mahony und Hill, 2002), dem Nachweis gebundener Fluoreszenz-Sonden (Molekulare Beacons) (Christopher-Hennings et al., 2003; Fang et al., 2002) oder dem Nachweis der 5‘ Nuklease-Spaltung einer gebundenen fluoreszierenden Sonde (TaqMan) (Kim et al., 2002) durch die TaqMan-Polymerase. Molekulare Beacons und TaqMan-Sonden sind sehr spezifisch für die jeweilige Zielsequenz.

Eine Real Time-PCR kann nicht nur spezifischer, sondern auch sensitiver sein als die konventionelle PCR. Ermöglicht wird dies durch den sensitiven Nachweis des Fluoreszenzsignals am Gerät. Der direkte Vergleich von nested PCR mit der Real Time-PCR ergab eine vergleichbare Sensitivität (Fang et al., 2002; Christopher-Hennings et al., 2003; Schönenbrücher et al., 2008). Ein entscheidender Vorteil ist, dass das DNA-Produkt keiner weiteren Laborarbeit, z.B. Auftragen auf Agarosegel oder Färbung mit Ethidiumbromid, unterzogen werden muss.

Der Einsatz verschiedener Primerpaare für unterschiedliche Ziele ermöglicht der **Multiplex-PCR** das gleichzeitige Testen einer Probe auf unterschiedliche Zielsequenzen. In der konventionellen PCR führt das zu unterschiedlichen Banden, in der Real Time-PCR werden die unterschiedlichen Wellenlängen der Fluoreszenzfarbstoffe in unterschiedlichen Kanälen gemessen.

Bei der PCR wird DNA nachgewiesen und damit die Anwesenheit des Erregers. Dieses ist aber nicht gleichzusetzen mit der Anwesenheit intakter lebender Zellen. Die PCR kann MAP innerhalb eines Tages mit hoher Sensibilität nachweisen und quantifizieren (Slana et al., 2008a, Slana et al., 2008b), aber nicht zwischen lebenden und toten Zellen unterscheiden. Dzieciol et al. (2010) veröffentlichten einen neuen Real Time-PCR-Assay für den spezifischen Nachweis von MAP mit der dazu gehörenden **Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen**. Es handelt sich um einen RNA-basierten Nachweis, Zielsequenz dieser PCR ist das Gen Mptb52.16. Dieser MAP-spezifische Genabschnitt codiert für Proteine, von denen gezeigt werden konnte, dass sie in Reinkulturen in Dubos Medium exprimiert werden (Nielsen und Ahrens, 2002). Über den Nachweis von instabiler mRNA konnte in früheren Untersuchungen die Lebensfähigkeit von *Staphylococcus aureus,* Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus, E.coli* und *Staphylococcus epidermidis* in Synovialflüssigkeit nachgewiesen werden (Birmingham et al., 2008). Auch die Behandlung mit DNA-modifizierenden Farbstoffen wie Propidium Monoazid (PMA) oder Ethidium Monoazid (EMA) vor der molekularbiologischen Analyse bietet die Möglichkeit der

Unterscheidung zwischen lebenden und nicht mehr lebensfähigen Zellen. Der Farbstoff gelangt selektiv in Zellen mit defekter Zellwand. Der Vergleich von mit Farbstoff behandelten und unbehandelten Proben kann zu einer Aussage bezüglich der Lebensfähigkeit führen (Kralik et al., 2010).

2.2.2.4 Interne Amplifikationskontrolle

Der Nachweis von MAP mittels PCR gestaltet sich bei heterogen-komplexen Matrizes wie Lebensmitteln, Kot und Bioptaten, die eine Vielzahl an PCR-Inhibitoren beinhalten, als schwierig. Der Einsatz sogenannter interner Amplifikationskontrollen (IAK) wurde bislang nur in wenigen Arbeiten mit PCR-basiertem MAP-Nachweis umgesetzt. Das Prinzip der IAK basiert üblicherweise auf der Amplifikation eines anderen DNA-Abschnittes durch ein anderes Primerpaar (Herthnek und Bölske, 2006; Rodriguez-Lazaro et al., 2005; Schönenbrücher et al., 2008; Tasara und Stephan, 2005). Die IAK ist erforderlich, um die Identifikation von falsch-negativen Ergebnissen zu erleichtern, die durch solche Inhibition der PCR entstehen können (Rademaker et al., 2003). Dieses trifft insbesondere auch auf das Lebensmittel „Milch“ zu.

2.2.3 Kultureller Nachweis

Twort und Ingram (1912) gelang erstmals der kulturelle Nachweis von MAP. Satellitenkolonien von *Mycobacterium phlei* dienten als Lieferant für Mycobactin, dem Eisenchelatbildner, da MAP diesen nicht selbst bilden kann. Sie beschrieben die Kolonien als anfänglich rund, glatt und weiß, mit der Tendenz, sich leicht anzuheben sowie matt und hellgelb zu werden mit Furchenbildung auf der Oberfläche. Merkal und Curran (1974) beschrieben Kolonien, die mehrfach gewölbt waren, während sich andere rund mit konkaver Oberfläche und wieder andere flach darstellten. Ältere Kolonien entwickelten einen Hohlraum zwischen dem Zentrum der Kolonie und der Oberfläche des Agars (ebd.).

In diesen Zusammenhang ist erwähnenswert, dass die Koloniemorphologie durch die Zugabe von Supplementen beeinflusst werden kann. Tween beispielsweise, das hydrolysiert wird und den MAP als Quelle für Ölsäure dient, führt anstelle von begrenzten, glatten, gewölbten Kolonien (Van Boxtel et al., 1990) zu unregelmäßig gekörnten Kolonien auf Middlebrook

7H9-Agarplatten. Bei Whittington et al. (2011) dagegen variierte die Koloniemorphologie zwischen den Isolaten und den verwendeten Medien nicht besonders.

Unter Verwendung von Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE) und IS*900* Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) konnten die Isolate von MAP in drei Typen unterschieden werden. Typ I wächst sehr langsam, meist pigmentiert mit glatten einheitlichen Kolonien. Diese Isolate stammen meist von Schaf und anderen kleinen Wiederkäuern. Typ II dagegen ist langsam wachsend, unpigmentiert, mit rauhen und uneinheitlichen Kolonien von einem sehr breitem Wirtsspektrum (Stevenson et al., 2002). Typ III dagegen wird häufig bei Typ I eingruppiert (Alexander et al., 2009). Dies basiert auf den Beobachtungen, dass sich Typ I- und III-Stämme phänotypisch ähnlichdarstellen.
Die kulturelle Anzucht von MAP auf Fest- und in Flüssigmedien wird als *Goldstandard* angesehen (Merkal et al., 1964; Slana et al., 2008b). Eine Vielzahl an Kultivierungsmethoden ist beschrieben und als Literaturübersicht dargestellt worden (Grant und Rowe, 2001; Nielsen et al., 2001).

Es stehen Festmedien mit Eigelb (Herrold's Egg Yolk-Medium; HEYM) und ohne Eigelb (Middlebrook 7H10) zur Verfügung. Der verbrauchsfertig erhältliche HEYM-Schrägagar enthält enzymatisch abgebautes Casein und Rindfleischextrakt. Diese stellen Aminosäuren, stickstoffhaltige Nährstoffe, Vitamine und Mineralstoffe zur Verfügung, die für mikrobielles Wachstum erforderlich sind. Natriumchlorid hält das osmotische Gleichgewicht aufrecht. Natriumpyruvat dient als Energiequelle für den bakteriellen Stoffwechsel. Eigelb und Glycerol stellen Fettsäuren und andere Nährstoffe zur Verfügung, die für den Stoffwechsel von Mykobakterien benötigt werden. Die meisten Mykobakterien erzeugen endogene Siderophoren (eisenbindende Zusammensetzungen), Mycobactin genannt, und wachsen mit oder ohne Zugabe von Mycobactin auf Eidotter-Agarmedium nach Herrold. *M. paratuberculosis* wächst nicht auf Medien in Abwesenheit von Mycobactin. Mycobactin J ermöglicht schnelleres und vermehrtes Wachstum von *M. paratuberculosis* im Vergleich zu anderen Mycobactinen (Merkal et al., 1982; Thoen und Baum, 1988). Amphotericin B verbessert die Selektivität des Mediums durch Hemmung von Begleitpilzen. Nalidixinsäure hemmt gramnegative Begleitbakterien und Vancomycin hemmt grampositive Begleitbakterien. Malachitgrün dient ebenfalls zur Unterdrückung von Begleitbakterien und verbessert die Sichtbarkeit der Kolonien.

Der durchscheinende 7H10-Agar ist als Agar mit dem frühesten Nachweis und den durchschnittlich höchsten Zellzahlen im Vergleich zu HEYM beschrieben worden (Damato

und Collins, 1990). Middlebrook 7H10-Agar enthält wie auch die Middlebrook 7H9-Bouillon eine Vielzahl anorganische Salze, die unerlässlich sind für das Wachstum von Mykobakterien und verschiedene Zwecke erfüllen. Die Ergänzung der Agarbasis durch Supplemente (siehe Kapitel 3.2.7.3 Middlebrook 7H10-Agar) ist erforderlich, um mykobakterielles Wachstum zu erzielen. Durch die Anwesenheit des Farbstoffes Malachitgrün kommt es zu einer partiellen Hemmung von Bakterien. Die antibiotischen und antimykotischen Inhaltsstoffe des PANTA™ Supplement dienen der Reduktion von Kontaminationen.

Middlebrook 7H10-Agar unterstützt das Wachstum aller Isolate, sie sind innerhalb von 2-3 Wochen sichtbar (Whittington et al., 2011). Mit Ausnahme von S-Stämmen, bei denen die Anzucht nicht gelang, unterstützt auch HEYM das Wachstum der meisten Stämme in der Regel innerhalb von 7 Wochen und in der Größe von „pinpoints“ (ebd.). Eine weitere Studie von De Juan et al. (2006) verglich Festmedien für die Isolation und Anzucht von Typ II- und I/III-MAP-Stämmen von Rindern und Ziegen. Die empfohlenen Festmedien für die Stämme I/III sind Löwenstein-Jensen und Middlebrook 7H11. Die Kombination beider erlaubte in der Studie das Wachstum aller verwendeten Stämme. HEYM dagegen zeigte sich erneut als nicht geeignet. Mit HEYM gelang es bei Typ II-Stämmen zwar mehr Stämme nachzuweisen; aber um Wachstum aller Stämme nachzuweisen, wurden auch hier weitere Medien benötigt (De Juan et al., 2006).

Neben konventionellen Medien steht auch ein radiometrisch gestütztes Analyseverfahren (BACTEC™ 460TB System, Becton Dickinson) zur Verfügung. Das Medium enthält Glukose, die mit ^{14}C-Palmitinsäure markiert ist, sowie antibiotische Zusätze, um das Wachstum der Begleitflora zu hemmen. MAP verstoffwechselt die Palmitinsäure, was zur Freigabe von $^{14}CO_2$ führt, das dann mit dem BACTEC™ Erfassungssystem gemessen wird. Dieses Verfahren bietet den Vorteil eines schnelleren Nachweises und erwies sich als sensitiver im Vergleich zum Nachweis über konventionelle Nährmedien (Cousins et al., 1995). Während für die kulturelle Anzucht 12-16 Wochen zur endgültigen Bestätigung benötigt werden, kann mit dem BACTEC™ System diese Zeitspanne um 4-7 Wochen reduziert werden.

Als Flüssigmedium hat sich Middlebrook 7H9 bewährt. Unter Zusatz von Tween® 80 und Mycobactin J bietet es bei 37 °C ohne CO_2 oder Schütteln in Medien geringer Tiefe optimales Wachstum (Chiodini et al., 1984b). Die große Anzahl anorganischer Salze in diesem Medium liefert Substanzen, die für das Wachstum von Mykobakterien essentiell sind. Die Umwandlung von Natriumcitrat zu Zitronensäure dient dazu, bestimmte anorganische

Kationen in Lösung zu halten. Albumin wirkt durch die Bindung freier Fettsäuren, die für Mykobakterien giftig sein können, als protektives Agens. Im angereicherten Medium befindet sich wärmebehandeltes Albumin, um Lipasen zu neutralisieren, die Fettsäuren aus Tween freisetzen können (Middlebrook et al., 1960). Natriumchlorid hält das osmotische Gleichgewicht aufrecht, Ölsäure sowie andere langkettige Fettsäuren spielen eine wichtige Rolle im Stoffwechsel von Mykobakterien. Katalase zerstört toxische Peroxide, die sich im Medium befinden können. Dextrose ist eine Energiequelle und Natriumchlorid liefert wichtige Elektrolyte. Die Ergänzung des Mediums mit Glycerin und Tween fördert das Wachstum von Mykobakterien.

Das Flüssigmedium MGIT™ (Mycobacterial Growth Indicator Tube) enthält einen Fluoreszenzfarbstoff, der die Verminderung von Sauerstoff beim Wachstum anzeigt. Whitlock et al. (1989) berichteten, dass Flüssigmedien eine höhere Sensitivität haben. Auch bei anderen Untersuchungen gelang der Nachweis von MAP in Flüssigmedien vergleichsweise öfter als auf Festmedien (Ellingson et al., 2005).

Die kulturelle Diagnostik ist sehr spezifisch, sie liegt bei 100%. Die Angaben für die Sensitivität kultureller Nachweisverfahren variieren. Sie liegen bei 45-50% (Sockett et al., 1992). Sie kann durch eine **Vielzahl an Faktoren beeinflusst** werden. Einer dieser Faktoren ist die Dekontamination (Chiodini et al., 1984a) und dem Phänomen, dass manche Stämme *in vitro* nicht wachsen (Pavlik et al., 1999). Bereits früher wurde die Fähigkeit von Mycobacterien bestätigt, sich an Umweltstress anzupassen, indem ein „Viable But Non Culturable"-Status (VBNC) eingenommen wird (Oliver, 2005). Hinzu kommt, dass die meisten Tiere den Erreger intermittierend und in geringer Anzahl ausscheiden, besonders in den frühen Stadien der Erkrankung. Aufgrund der Tendenz von MAP zur Aggregatbildung kann es zu einer Unterschätzung des tatsächlichen Zellgehaltes führen (Pickup et al., 2005), wenn die kulturelle Anzucht als Basis für eine Quantifizierung genutzt wird. Eine Kolonie kann entweder aus einer einzelnen MAP-Zelle hervorgegangen sein oder aber ein MAP-Zellaggregat zum Ursprung haben. Durch die lange Anzuchtdauer von MAP kann es, trotz vorangegangener Dekontamination der Proben, zu einer Überwucherung durch andere Mikroorganismen kommen. Ayele et al. (2004) berichten von 8-9% nicht auswertbaren Proben. Auch Grant et al. (2002a) konnten trotz Dekontamination 6,9% der HEYM-Röhrchen nicht auswerten.

2.3 Paratuberkulose

2.3.1 Übertragungswege

Die Übertragung von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* kann sowohl prä- als auch postnatal erfolgen.

Trächtige, klinisch auffällige Rinder können ihre Frucht kongenital oder intrauterin infizieren (Doyle, 1958; Hole, 1958; Bergmann et al., 1981). Zu intrauteriner Übertragung kommt es vor allem bei erkrankten Tieren (Lambeth et al., 2004). Nach Schaaf und Beerwerth (1960) waren 11 von 13 Feten (85%) klinisch auffälliger Kühe infiziert. Dagegen waren bei subklinisch infizierten Tieren, die klinisch unauffällig, aber serologisch positiv waren, immerhin noch 5 von 11 Feten (45%) infiziert (ebd.). Nach Seitz et al. (1989) erwiesen sich 9 von 34 Feten (26%) positiv. Rohde und Shulaw (1990) konnten MAP aus der Uterusspülflüssigkeit klinisch auffälliger Kühe isolieren.

Metaanalysen von Whittington und Windsor (2009) schätzen, dass bei Tieren, die mit MAP infiziert sind, aber noch keine klinischen Symptome zeigen, 9% der Feten *in utero* infiziert werden, während bei klinisch auffälligen Tieren 39% der Feten durch vertikale Übertragung mit MAP infiziert werden.

Eine Übertragung über Sperma bei der Paarung oder der künstlichen Befruchtung ist ebenfalls möglich (Sweeney, 1996; Buergelt und Williams, 2004). Trotz der Tatsache, dass MAP in Sperma vorhanden sein könnte, wurde das Risiko einer Übertragung *in vivo* nie bewertet.

Einige wenige Studien haben das Vorkommen von MAP im Sperma untersucht. Larsen et al. (1981) fanden bei einem Bullen mit klinischen Symptomen über einen Zeitraum von 21 Monaten 8 von 31 Proben (26%) positiv. In einer Studie mit infizierten, aber klinisch unauffälligen Tieren, war 1 von 100 Proben (1%) positiv (Ayele et al., 2004). In der Studie von Münster et al. (2012) wurde über 3 Jahre hinweg Sperma, Kot und Blut eines infizierten, aber asymptomatischen, Simmentaler Bullen untersucht. Eine intermittierende Ausscheidung von bis zu $5{,}7 \times 10^5$ KbE/ml konnte gezeigt werden (ebd.).

An der Übertragung von MAP auf Kälber ist auch Milch beteiligt (Sweeney, 1996). MAP ist bekannt für seine vielfältigen Überlebensmechanismen (Rowe und Grant, 2006). Als makrophagenreiches Medium wird Kolostrum damit zum Hauptrisiko, wenn es solche MAP-infizierten Zellen enthält.

Streeter et al. (1995) untersuchten 126 subklinische Tiere, von denen 36 Tiere in der Kot-Untersuchung positiv auf MAP getestet werden konnten. Von diesen Tieren wiederum konnte MAP aus acht Kolostrum- sowie drei Milchproben isoliert werden.

Stabel und Lambertz (2004) wiesen im Kolostrum infizierter Tiere 1-2 Tage nach der Kalbung 50 KbE/ml nach. Laurin et al. (2012) haben in ihrer Studie die Ausscheidungswege von MAP in Milch und Kolostrum untersucht. Hier wurde die Kolostrumprobe innerhalb von 24 Stunden nach der Kalbung gewonnen. Untersucht wurde monatlich mit kulturellen Verfahren, PCR sowie ELISA. Mittels Kultur waren bis zu 28,6% der Proben positiv. Bei der PCR lag das Maximum bei 35,7% positiv bestätigten Proben/Monat, bei der Untersuchung mittels ELISA sogar bei 50%.

Die Ergebnisse von Sweeney et al. (1992) zeigten, dass auch subklinisch infizierte Tiere den Erreger über die Milch ausscheiden und damit Überträger der Erkrankung sein können. Auch wenn die Konzentration mit 2-8 KbE/50 ml niedrig ist (ebd.), steigt das Risiko durch die großen Mengen Milch, die das Kalb im Laufe des Tages zu sich nimmt.

Die Fütterung von Kolostrum und Milch mit unbekanntem Paratuberkulose-Status kann in einer weiteren Verbreitung der Erkrankung resultieren (Nielsen et al., 2008). Vor dem Hintergrund des Gutachtens des US National Animal Health Monitoring System (2002), das besagt, dass 87,2% der Milchbetriebe überschüssige Milch an ihre Kälber verfüttern, ist das ein nicht zu verachtender Aspekt.

In einem Review von Doré et al. (2012) wurden die Risikofaktoren in Verbindung mit der Übertragung von MAP auf Kälber in Milchviehherden betrachtet. Dabei erwiesen sich der Kontakt mit Kot erwachsener Tiere als der Hauptrisikofaktor für die Übertragung von MAP. Infizierte Rinder scheiden MAP ab einem Alter von etwa einem Jahr sporadisch im Kot aus (Whittington und Sergeant, 2001). Kontakt mit Kolostrum oder Milch scheint dagegen als Risikofaktor weniger von Bedeutung zu sein.

Eine Übersicht über die in der Literatur zu findenden Angaben zur Ausscheidung von MAP durch infizierte Tiere ist in Tabelle 6 wiedergegeben.

Tabelle 6: Ausscheidung (Kolonie-bildende Einheiten; KbE) von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Kot, Milch, Kolostrum und Sperma

Matrix	Referenz	Bemerkung
Kot		
10^8 KbE/g	Chiodini et al., 1984a	
10^{12} KbE/Tag	Chiodini et al., 1984a	
6,1 x 10^6 KbE/g	Münster et al., 2012	subklinisch infizierte Tiere
>10^8 KbE/Tag	Eamens et al., 2008	
Milch		
2-8 KbE/50 ml	Sweeney et al., 1992	subklinisch infizierte Tiere
< 100 KbE/ml	Giese und Ahrens, 2000	klinisch auffällige Tiere, aseptisch aus dem Euter
Kolostrum		
50 KbE/ml	Stabel und Lambertz, 2004	
Sperma		
5,7 x 10^5 KbE/ml	Münster et al., 2012	subklinisch infizierte Tiere
Blut		
1,7 x 10^5 KbE/ml	Münster et al., 2012	subklinisch infizierte Tiere

Der häufigste Übertragungsweg für Paratuberkulose ist fäkal-oral. Bei der Kolostrumaufnahme kommt es zum Kontakt mit erregerhaltigem Kot, der sich an kontaminierten Zitzen und dem Euter befindet (Sweeney, 1996). Auch nicht infizierte Tiere können ihre Euter mit erregerhaltigem Kot kontaminieren.

Schon früh wurde vermutet, dass Kälber am empfänglichsten sind (Taylor, 1953), aber auch ältere Tiere infiziert werden können (Doyle, 1953; Larsen et al., 1975). Eine kürzlich erschienene Metaanalyse zur Bewertung des Infektionsalters bestätigte, dass neugeborene Kälber signifikant empfänglicher für MAP-Infektionen sind als ältere Kälber (>6 Monate) und erwachsene Rinder (Windsor und Whittington, 2009).

Bei der Frage der Infektionsdosis unterscheiden sich die Angaben in der Literatur. In früheren Veröffentlichungen gab Gilmour (1965) 10^3 KbE/g Kot an. Bei einer Konzentration von 10^6-10^8 KbE/g Kot würden bei einem jungen Kalb einige mg ausreichen (Jørgensen, 1982; Whittington et al., 2000). Aus anderen Literaturübersichten geht hervor, dass 50-1000 KbE für ein junges Kalb infektiös sind (Chiodini, 1996).

Experimentelle Studien haben gezeigt, dass die Gabe von $1{,}5x10^6$ KbE/Gabe an Tag 21 und 22 *post natum* zuverlässig dazu führte, dass MAP drei Wochen nach der Infektion in verschiedenen Geweben kulturell nachgewiesen werden konnte (Sweeney et al., 2006). Höhere Dosen in jüngerem Alter haben stärkere Auswirkungen. In Jejunim- und Ileum-Proben konnten die höchsten MAP-Konzentration nachgewiesen werden (ebd.).

Bei Herden ohne Vorgeschichte an MAP erfolgt die Einschleppung des Erregers meist über zugekaufte Rinder, die den Erreger ausscheiden, aber noch keine klinischen Symptome zeigen (Stähr, 2005).

2.3.2 Klinisches Bild

Johne und Frothingham haben in 1895 erstmals die Verbindung zwischen Rinderenteritis und dem Vorhandensein säure-fester Mikroorganismen in Abschnitten der Darmschleimhaut gezeigt (Johne und Frothingham, 1895). Bang unterschied 1906 zwischen tuberkulöser und nicht-tuberkulöser Enteritis und empfahl die letztere als pseudotuberkulös zu bezeichnen (Bang, 1906). Die Identifikation des ätiologischen Agens gelang Twort und Ingram, die dieses im Jahre 1912 erfolgreich kultivierten und als Mykobakterium charakterisierten (Twort und Ingram, 1912). Erst 1914 konnte experimentell gezeigt werden, dass dieser Erreger eine Enteritis auslösen kann. Nach der vollen Charakterisierung von MAP als eigene Spezies im Genus Mykobakterium, wurde die Erkrankung in Paratuberkulose umbenannt (Chiodini et al., 1984a; Kreeger, 1991).

Der Verlauf der Erkrankung wird von Fecteau und Whitlock (2010), abhängig von Schwere der Symptome, Ausscheidung etc., in vier Stadien eingeteilt: Ist die Infektion des Tieres mit MAP erfolgt (siehe auch Kapitel 2.3.1 Übertragungswege), so invadiert der Erreger die Schleimhaut von Jejunum und Ileum (Momotani et al., 1988). MAP wird dann von subepithelialen und intraepithelialen Makrophagen phagozytiert und vermehrt sich intrazellulär. Es kommt zur Streuung in die regionalen Lymphknoten (Clarke, 1997). Dies wird von den Autoren als **Stadium I** bezeichnet. Möglicherweise wird auch in diesem Stadium MAP ausgeschieden. Bei entsprechend häufiger Beprobung kann MAP dann gelegentlich im Kot in sehr niedriger Konzentration nachgewiesen werden (Waters et al., 2003). Tiere in diesem Stadium sind subklinisch und präpatent, die Ausscheidung von MAP erfolgt in Mengen, die noch nicht mittels Kultur erfasst werden können. Etwa 70% aller infizierten Tiere einer Herde befinden sich in diesem Stadium (Whitlock et al., 2000).

Charakteristisch für das klinische Bild der Paratuberkulose ist die lange Inkubationszeit von zwei bis drei Jahren (Chiodini et al, 1984a), die jedoch eine Streuungsbreite von 6 Monaten bis 15 Jahren aufweist (Chiodini und Van Kruiningen, 1986). Whittington und Sergeant (2001) wiesen nach, dass infizierte Rinder den Erreger bereits ab einem Alter von etwa einem Jahr sporadisch im Kot ausscheiden. Auch Münster et al. (2012) konnten MAP intermittierend in Kot und Sperma eines infizierten, aber subklinischen Simmentaler Bullen in einem Alter von 18 Monaten nachweisen. Die Ausscheidung von MAP wurde aber auch schon bei Tieren mit einem Alter von weniger als zwei Jahren nachgewiesen, eines der jüngsten Tiere hatte ein Alter von nur acht Monaten (Antognoli et al., 2007; Weber et al., 2010).

In **Stadium II** findet sich eine höhere Konzentration an MAP im Darmgewebe wieder. Über den Kot wird der Erreger ausgeschieden, kontaminiert die Umwelt und dient anderen Tieren als Infektionsquelle. Klinische Symptome treten auch in diesem Stadium noch nicht auf.

Erst in **Stadium III** kommt es allmählich zu klinischen Symptomen. Paratuberkulose zeigt sich in Abmagerung, Durchfall und unwirksamer Behandlung der Symptome (Manning und Collins, 2001). Diese klinischen Symptome entwickeln sich in Rindern gewöhnlich erst, wenn die Tiere zwei Jahre und älter sind (Whitlock und Buergelt, 1996). Futteraufnahme und Vitalzeichen dagegen sind unverändert.

Die chronisch katarrhalische Entzündung ist die Hauptreaktion des Darmes bei Rindern mit Paratuberkulose. Diese geht mit einer Hyperplasie und starker Infiltration der *lamina propria* mit Histiozyten einher (Merkal et al., 1970). Die diffuse granulomatöse Reaktion resultiert in einer Proteinverlust-Enteropathie. Es kommt zu einer Hypoproteinämie und durch den verminderten osmotischen Druck zur Ödembildung. Im weiteren Verlauf kommt es zur Verdickung des Darms (Patterson et al., 1967; Patterson und Berrett, 1969; Patterson und Berrett, 1968). Die Darmwand ist gewellt und verdickt, die Schleimhaut durch die Proliferation der Abwehrzellen geschwollen und die regionalen Lymphknoten vergrößert (Manning und Collins, 2001). Die Menge an MAP in der Darmschleimhaut ist sehr hoch und wird in hohen Konzentrationen über den Kot in die Umwelt ausgeschieden.

In **Stadium IV** sind die Tiere schwach, abgemagert und haben chronischen, profusen Durchfall. Im weiteren Verlauf kommt es zum Tod aufgrund von Dehydratation und Kachexie. In Tieren mit disseminierter Infektion ist der Nachweis nicht nur in Darm und regionalen Lymphknoten beschrieben, sondern auch in anderen Organen wie Leber, Milz, Niere, Lunge, Herz und Geschlechtsorganen (Antognoli et al., 2008; Ayele et al., 2004;

Mutharia et al., 2010; Pavlik et al., 2000). Es ist bekannt, dass infizierte Makrophagen den Erreger aus dem peripheren Blut in andere Bereiche des Körpers bringen können (Merkal, 1984; Ayele et al., 2004).

Die klinischen Fälle der Paratuberkulose sind die Spitze des Eisbergs (Whitlock et al., 1986), die erst Monate bis Jahre nach Beginn der fäkalen Ausscheidung auffallen, wenn sie sich in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung befinden (Abbas et al., 1983; Merkal, 1984). Für jede Kuh mit fortgeschrittener Paratuberkulose ist es wahrscheinlich, dass 15-25 weitere Tiere infiziert sind (Whitlock, 1992). Nur 25-30% dieser infizierten Tiere können mit den derzeit erhältlichen Nachweisverfahren erkannt werden (Whitlock, 2009). Eine Übersicht über den „Eisberg-Effekt“ und die verschiedenen Stadien einer Infektion mit MAP gibt Tabelle 7.

Tabelle 7: Der "Eisberg-Effekt" und die verschiedenen Stadien der *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*-Infektion (Quelle: Fecteau und Whitlock, 2010)

Stadium	Art der Infektion	Anzahl der Tiere
IV	Fortgeschrittene klinische Erkrankung	1 Tier
III	Klinische Symptome	1-2 Rinder
II	Inapparente Keimträger	6-8 Rinder
I	Latente Infektion von Kälbern oder Jungtieren	15-25 Rinder

Agnotoli et al. (2008) haben in ihrer Studie 40 Tiere klinisch sowie gleichzeitig Blut und Kot auf MAP untersucht. Nach der Euthanasie wurden unterschiedliche Gewebe steril entnommen und kulturell angelegt. Wurde MAP in einem anderen Gewebe als Darm oder dem asoziierten Lymphknoten nachgewiesen, galt dies als disseminierte Infektion. Im Rahmen der Studie wurde bei 21 Tieren eine disseminierte Infektion nachgewiesen. 57 % der Tiere verfügten über eine durchschnittliche bis hohe körperliche Kondition mit normalem Kotabsatz. In 37% der Fälle gab es keine bis minimale pathologische Veränderungen als Beweis für eine Infektion. Bei 76 % der Tiere gab es einen positiven MAP-Nachweis zu Lebzeiten, aber nur 62 % waren am Schlachthof auffällig. Antognoli et al. (2008) konnten in ihrer Studie zeigen, dass ein großer Teil der Kühe keine klinischen Anzeichen einer Paratuberkulose aufweisen, obwohl eine disseminierte Infektion vorlag. MAP konnte im Darm nachgewiesen werden, obwohl weder klinische Erscheinungen noch makroskopisch erkennbaren Läsionen im Darm vorhanden waren (Brady et al., 2008).

2.3.3 Ökonomische Aspekte

MAP verursacht signifikante wirtschaftliche **Verluste** für die Milchindustrie, in erster Linie aufgrund verminderter Milchleistung (Buergelt und Duncan, 1978; Wilson et al., 1993; Benedictus et al., 1987; Hendrick et al., 2005; Lombard et al., 2005), frühzeitiger Schlachtung (Ott et al., 1999) und verringertem Schlachtwert (Johnson-Ifearulundu und Kaneene, 1997; Johnson-Ifearulundu et al., 1999). Wilson et al. (1993) führten eine Ein-Jahres-Studie mit 180 MAP-negativen und 113 klinisch unauffälligen, aber MAP-positiven, Tieren durch. Es zeigte sich, dass sich die Verluste durch verminderte Milchleistung nach der zweiten Laktation auf 590 bis 1270 kg/Laktation belaufen (Wilson et al., 1993). Eine neuere Studie berichtet über einen Rückgang der Milchleistung in Höhe von 1259,3 kg/Laktation (Richardson und Moore, 2009) und liegt damit in einem ähnlichen Bereich. Eine Zusammenfassung von Produktionsstudien von Nordlund et al. (1996) besagt, dass an Paratuberkulose erkrankte Tiere 2-19% weniger Milch als ihre Herdengenossen liefern. Der verringerte Schlachtwert liegt durchschnittlich um 516 EUR niedriger als bei gesunden Tieren (Richardson und Moore, 2009). Zu den wirtschaftlichen Verlusten durch die subklinische Erkrankung tragen zudem die erhöhte Inzidenz für Mastitis und verlängerte Zwischenkalbezeiten bei (Johnson-Ifearulundu und Kaneene, 1997). Die direkten Effekte der Paratuberkulose (Verringerung von Milchertrag und Schlachtpreis) haben in Kombination mit den indirekten Effekten (vermehrte Schlachtung aufgrund von Unfruchtbarkeit, erhöhte Remontierung) auch negative Auswirkungen auf die Produktivität des Betriebes (Richardson und Moore, 2009).

Die **Kosten**, die durch Paratuberkulose verursacht werden, betragen zwischen 40 und 227 USD pro Kuh (National Health Monitoring System, 1997). Ott et al. (1999) untersuchten ebenfalls die wirtschaftlichen Verluste bei Paratuberkulose. Diese variierten in sechs verschiedenen Studien (Burgelt und Duncan, 1978; Whitlock et al., 1985; Chiodini und Van Kruiningen, 1986; Benedictus et al., 1987; Abbas et al., 1993; Meyer und Hall, 1994). Bei vier der Studien lagen die Kosten zwischen 401 und 959 USD für infizierte Tiere mit klinischen Symptomen und zwischen 123 und 696 USD bei Tieren ohne klinische Anzeichen. Fasst man die sechs Studien zusammen, so lagen die Verluste pro infiziertem Tier zwischen 145 und 1094 USD (Ott et al., 1999).

2.3.4 Bekämpfungsmaßnahmen

Das Vorkommen der Paratuberkulose ist nicht nur in Deutschland unterberichtet. Es gibt Hinweise, dass die Infektion in den meisten Ländern mit entwickelter Milchindustrie endemisch ist (Kennedy et al., 2001). Ebenso ist in den meisten Ländern mit Rinderwirtschaft eine hohe Prävalenz wahrscheinlich, obwohl genaue genaue Schätzungen nicht verfügbar sind (Nielsen und Toft, 2009). Die geschätzten Prävalenzen für Paratuberkulose beim Rind als Einzeltier reichen von <2 bis >20%, die geschätzen Herdenprävalenzen von <10 bis >50% (Adaska und Anderson, 2003; Hirst et al., 2004; Jubb und Galvin, 2004; Kobayashi et al., 2007; Mohan et al., 2009; Nielsen und Toft, 2009; Tiwari et al., 2006). Collins et al. (1994) publizierten eine Prävalenz der Infektion bei bis zu 18% der Rinder in den USA. Laut eines Gutachtens des US National Animal Health Monitoring System (1997) beträgt die Herdenprävalenz für Milchvieh zwischen 30 und 50%. Die Herdenprävalenz hängt stark mit der Herdengröße zusammen. Bei etwa 40% der Herden mit mehr als 300 Tieren wurde eine Infektion mit MAP festgestellt (Manning und Collins, 2001).

Die Vermutung, dass die Tendenz für die Prävalenz der Paratuberkulose steigend ist, wird durch Simulationsmodelle gestützt (Kudahl et al., 2008). Die Übertragungswege zu unterbrechen, scheint die kostengünstigste Methode zu sein, um die Prävalenz von MAP in einer Herde zu senken (Groenendaal et al., 2002; Kudahl et al., 2007). Schweden und Finnland haben eine geschätzte Herdenprävalenz von 0,3% (Viske et al., 1996). Dort wurden große Erfolge in der Bekämpfung erzielt. Infizierte Herden wurden geschlachtet und das Gelände sowie die Räumlichkeiten desinfiziert (Engvall et al., 1994; Viske et al., 1996). Die Wirksamkeit von „Test-and-Cull"-Strategien bei der Paratuberkuloseüberwachung wurde aber auch in Frage gestellt. Daten von Fallbeispielen und Simulationsmodelle führten bei einigen Experten zu dem Schluss, dass eine Änderung des Herdenmanagements wirksamer sein könnte (Collins und Morgan, 1991, Groenendaal et al., 2002). Kudahl et al. (2008) verglichen mit Hilfe von Simulationsmodellen die risikobasierte Überwachung mit anderen Strategien und zeigten, dass die risikobasierte Überwachung einen deutlich geringeren Arbeitsaufwand benötigt als Strategien, welche die ganze Herde betreffen. Dennoch erwies sie sich als sehr effizient und vergleichbar in der Fähigkeit, die Prävalenz zu senken. So kann mit risikobasierter Überwachung innerhalb von 5-7 Jahren die anfängliche Herdenprävalenz auf 10% gesenkt werden (Kudahl et al., 2008). Eine sofortige Keulung hoch ansteckender Tiere ist dabei nur nötig, wenn es nicht möglich ist, die Infektionsmöglichkeiten, die von diesen Tieren ausgehen, effizient zu beseitigen (ebd.).

Multivariate Analysen nach vier Jahren Untersuchung durch Nielsen und Toft (2011) zeigten, dass die Senkung der Prävalenz MAP-spezifischer Antikörper durch den Anteil zugekaufter Tiere, die Merzung wiederholt positiver Tiere und die Verwendung der Milch von spezifischen Gruppen beeinflusst wird (ebd.).

In einigen Ländern laufen bereits Zertifizierung- und Überwachungsprogramme (Bakker, 2010). Nielsen (2009a) stellte die Programme zu Überwachung und Bekämpfung der verschiedenen europäischen Länder zusammen. Abbildung 2 zeigt diese Länder und ihre Angaben, die sie im Rahmen der Studie zu den Überwachungs- und Bekämpfungsmaßnahmen bezüglich der Parauberkulose bekannt gegeben haben.

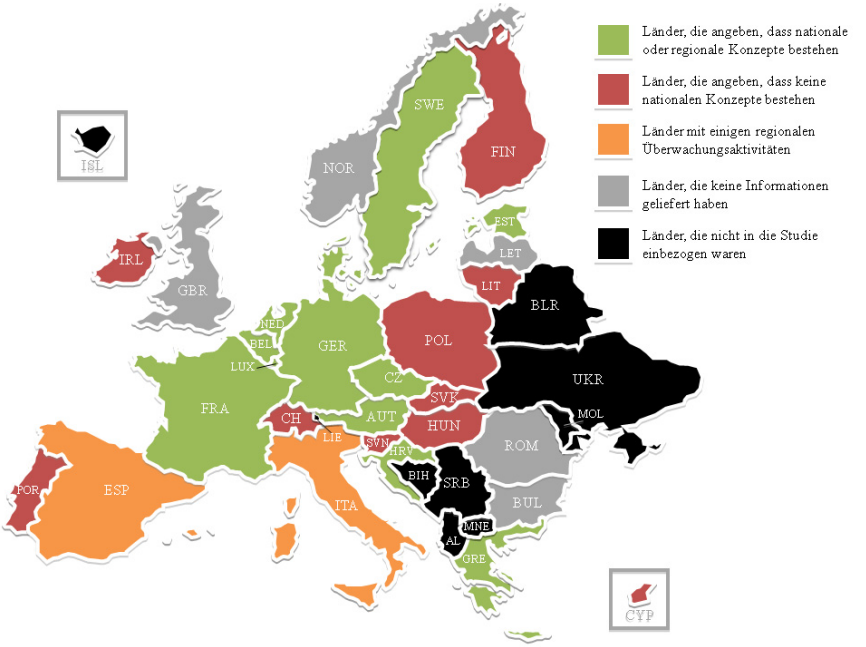


Abbildung 2: Status der Strategien zur Eindämmung der Paratuberkulose in europäischen Ländern (Quelle: Nielsen, 2009a)

Die Ziele der Überwachungsprogramme variieren. In den **Niederlanden** ist nicht die Zertifizierung einer Herde Ziel der Untersuchungen, sondern die Milchqualität. Das Qualitätssicherungsprogramm wurde 2006 ins Leben gerufen. Bis 2008 nahmen etwa 75% der Landwirte freiwillig an dem Programm teil. Alle Herden werden mindestens jedes zweite Jahr

mit einem hochspezifischen, aber wenig sensitiven Antikörper-ELISA getestet. Anhand der Untersuchungsergebnisse werden die Herden mit Status A (negative Testergebnisse), Status B (positives Ergebnis, entsprechendes Tier wurde aber entfernt) oder Status C (positives Ergebnis, entsprechendes Tier ist noch in der Herde) belegt (Weber und Van Schaik, 2009). Ab 2010 wurde die Teilnahme verpflichtend. Zur Sicherung der Milchqualität wird seit 1.1.2011 nur noch die Milch von Herden mit dem Status A oder B von der Milchindustrie verwendet. Ziel der Bekämpfung ist die Reduktion der Ausscheidung von MAP und vorsorgliche Maßnahmen der Lebensmittelsicherheit (Nielsen, 2009a). In **Luxemburg** werden mittels ELISA alle Tiere, die älter als 24 Monate sind, getestet. Basierend auf diesen Ergebnissen wird dem jeweiligen Betrieb ein Status zugewiesen, der wiederum unterschiedliche Maßnahmen nach sich zieht. Eine Herde mit Status A hat 0% ELISA-positive Tiere, Level B hat <5%, Level C 5-10% und Level D >10% ELISA-positive Tiere. Herden ohne Beprobung bzw. ohne Entfernung positiver Tiere werden mit Level O gekennzeichnet. In **Dänemark** existiert seit 2006 ein freiwilliges Überwachungsprogramm. Bis 2009 wurden etwa 28% der dänischen Milchvieh-Herden und 40% der Milchkühe in das Programm aufgenommen. Das Programm läuft als risikobasiertes Überwachungsprogramm (Nielsen, 2009b). Das primäre Ziel der Beteiligten ist es, die Prävalenz von MAP-Infektionen in Milchviehbetrieben zu reduzieren und den Landwirten ein Hilfsprogramm zu bieten, dies zu erreichen (Nielsen, 2007). Alle angemeldeten Herden werden vier mal pro Jahr mittels Antikörper-Test untersucht. Kühe werden als High- und Low-Risk-Kühe eingestuft. Für den Umgang mit High-Risk-Tieren werden besondere Empfehlungen zur Verfügung gestellt (Nielsen, 2007). Die Kosten für die Untersuchungen trägt der Landwirt. In **Frankreich** existieren in einigen Regionen verschiedene Programme, diese sind alle freiwillig. In der Bretagne beispielsweise umfasst die Überwachungsaktivität, dass positiv getestete Tiere innerhalb einer bestimmten Zeitspanne gekeult werden und Maßnahmen zur Einschränkung der Übertragung von MAP auf Kälber umgesetzt werden (Nielsen, 2009a). In **Österreich** wurde Paratuberkulose im Jahr 2006 meldepflichtig, das Bekämpfungsprogramm dort konzentriert sich auf Tiere im klinischen Stadium (Geisbauer et al., 2009). Klinisch auffällige Tiere mit postivem Testergebnis sollen innerhalb von drei Tagen aus der Herde entfernt werden. Abhängig von Alter und Wert des Tieres wird aber eine Entschädigung von der Regierung gezahlt (Khol et al., 2009). Ziel bei der Überwachung der Paratuberkulose ist für Frankreich und Österreich die Minimierung der finanziellen Verluste, die durch Paratuberkulose verursacht werden (Nielsen, 2009a). **Spanien** hat keinen nationalen Ansatz bezüglich MAP. Im Baskenland gibt es Initiativen zur Reduktion der Prävalenz der

Paratuberkulose und den mit der Infektion assoziierten Verlusten. In der Region Gipuzkoa werden die Tiere geimpft. Positiv getestete Tiere werden gekeult (Nielsen, 2009a).

Die Angaben, ob und wann Tiere mit einem positiven Ergebnis entfernt werden sollen, variieren. Handelt es sich um freiwillige Programme ohne Ausgleichszahlung, so liegt die Entfernung dieser Tiere meist im Ermessen des Tierbesitzers.

In **Deutschland** wird die Paratuberkulose z.Z. nicht staatlich bekämpft. Auch hier ist die Erkrankung meldepflichtig. Das Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft hat am 17. Januar 2005 eine Leitlinie für den Umgang mit Paratuberkulose in Wiederkäuerbeständen veröffentlicht. Die Leitlinie (Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft, 2005) basiert auf drei Säulen von Maßnahmen:

I. Hygienemaßnahmen in jedem Bestand zur Vermeidung der Weiterverbreitung von Paratuberkuloseerregern. Dieser Abschnitt der Leitlinien beleuchtet u.a. die Regeln für die Jungtieraufzucht, Kolostrummanagement, Remontierung und Zukauf näher.
II. Bestandsüberwachung mittels klinischer Überwachung, sowie durch serologische und bakteriologische Untersuchung.
III. Vorbereitung einer flächendeckenden, bundesweiten Überwachung bzw. Erfassung der Verbreitung der Paratuberkulose.

Als Ziele werden in der Leitlinie folgende Punkte aufgeführt:

1. Vereinheitlichung der Maßnahmen in Deutschland.
2. Reduktion der Klinik und somit der Schäden einer Infektion in den Betrieben.
3. Eindämmung der Weiterverbreitung der Erreger.
4. Senkung der Prävalenz der Paratuberkulose.

Diese Leitlinie bildet die Grundlage für freiwillige Überwachungsprogramme, die in einer zunehmenden Zahl von Bundesländern umgesetzt werden. Hierzu gehören unter anderem Brandenburg, Niedersachsen, Nordrhein-Westfalen, Saarland und Thüringen.

Antibiotika haben sich bei der Therapie der Paratuberkulose nicht als wirkungsvoll erwiesen, sind teuer und benötigen ausgedehnte Behandlungszeiten (Das et al., 1992; St. Jean, 1996).

Saxegaard (1985) berichtete, dass die **Impfung** mit einem Lebendimpfstoff die klinischen Anzeichen der Paratuberkulose reduziert. Auch Juste et al. (2009) berichten über eine signifikante Reduktion der Ausscheidung des Erregers und eine Verbesserung der Milchproduktion in Milchbetrieben nach der Verwendung eines neuen inaktivierten

Impfstoffes im Feldversuch. Impfung mag ein wertvolles Mittel sein, das Kontaminationsrisiko zu reduzieren sowie Produktionsverluste und pathogene Effekte zu reduzieren oder hinauszuzögern (Bastida und Juste, 2011, Reddacliff et al., 2006). Verhindert wird die Infektion dadurch nicht (Klawonn et al., 2002; Cramwell, 1993; Wentink et al., 1994). Auch wurden große Unterschiede in der Wirksamkeit verschiedener Impfstoffe beobachtet (Bastida und Juste, 2011). Wie lange die Effekte durch die Impfung anhalten, ist nicht bekannt (Thomsen et al, 2012).

Auch wenn Lebendimpfstoffe und attenuierte Impfstoffe vorhanden sind, sind Bekämpfungsstrategien, die darauf basieren, von begrenztem Wert. Diese bieten keinen Schutz vor Infektion und Ausscheidung (Juste et al., 2009; Hines et al., 2007; Reddacliff et al., 2006; Emery und Whittington, 2004). Der Erreger wird letztendlich nicht beseitigt (Pickup et al., 2005). Die Entwicklung von Granulomen an der Injektionsstelle ist möglich (Klawonn et al., 2002). Außerdem können diagnostische Tests gestört werden (Hope, 1995; Kalis et al., 1999), unter anderem kann es durch die Impfung zu Kreuzreaktionen mit Tuberkulose-Tests kommen (Stabel et al., 1996). Neuere Ansätze zeigen jedoch, dass MAP-spezifische Deletionen im MAP-Genom die Basis für Marker-Impfstoffe sein können (Bull et al., 2013).

2.4 Morbus Crohn

Morbus Crohn ist eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung des Menschen, die unheilbar ist und sehr häufig ein chirurgisches Eingreifen erforderlich macht (Dasari et al., 2010). Eine Beteiligung von MAP an dieser Erkrankung wird in der Literatur immer wieder diskutiert (Feller et al., 2007; Behr und Kapur, 2008).

Die erste Beschreibung der Morbus Crohn-Erkrankung erschien 1932 (Crohn et al., 1932) wobei der Dünndarm betroffen war. Erst später wurde erkannt, dass die gleichen Veränderungen auch im Colon auftreten können und mit Colitis Ulcerosa verwechselt wurden (Lockhart-Mummery und Morson, 1960). In Europa liegt die höchste alterspezifische Inzidenz bei den 15- bis 34-jährigen vor (Shivananda et al., 1996). Bei 15-25 % der Patienten treten die ersten Symptome vor dem 20. Lebensjahr auf, vereinzelt beginnt die Erkrankung im Säuglingsalter (Hoffmann et al., 2008).

Morbus Crohn kann Abschnitte des gesamten Magen-Darm-Traktes befallen, meist ist das terminale Ileum, der Dickdarm oder beides betroffen (Hanauer, 1998). 25% der Patienten

entwickeln extraintestinale Symptome. Diese können auf der Haut, in der Muskulatur, im Synovialgewebe oder im Knochen auftreten (Kirsner und Shorter, 1982). Charakteristisch sind Entzündungen, die alle Schichten betreffen, zu tiefen Ulzerationen, verdickter Darmwand und Fistelbildung führen können. Charakteristisch sind nicht-verkäsende Granulome (Jewell, 1987). Schmerz und Durchfall treten häufig auf.

Laut einer Multicenter-Studie liegt die geschätzte **Inzidenz** für Morbus Crohn in den westeuropäischen Ländern bei 5,6 Fällen/100.000 Einwohner/Jahr (Shivananda et al., 1996). Auffallend ist dabei ein Nord-Süd-Gefälle (Island 24,5; Südportugal: 1,6). Die Prävalenz für Morbus Crohn liegt in Deutschland bei 1/500 bis 1/800 (Timmer et al., 1999); dies entspricht 200.000 Erkrankten. Die Inzidenz für Deutschland liegt bei 4,9-5,2/100.000/Jahr. Die höchste Inzidenz findet sich bei 15- bis 24-jährigen (10,5 bzw. 10,2). Die Inzidenz für Morbus Crohn ist in industrialisierten Teilen der Welt ansteigend (Calkins und Mendeloff, 1986; Hermon-Taylor et al., 1994). Eine Studie aus Japan belegt, dass die steigende Inzidenz der Erkrankung stark mit zunehmender Aufnahme von tierischem, einschließlich Milchprotein, korreliert (Shoda et al., 1996). Ebenfalls Einfluss auf die Erkrankung haben Faktoren wie das Rauchen, durch das Erkrankte mehr Rückfälle haben, mehr Zeit im Krankenhaus verbringen und häufiger chirurgische Eingriffe benötigen (Selby, 2000). Satsangi et al. (1997) berichten, dass Eltern, Geschwister und Kinder betroffener Patienten 3 bis 20 mal wahrscheinlicher diese Erkrankung entwickeln als die übrige Gesellschaft.

Chiodini et al. isolierten im Jahre 1984 unspezifische Mykobakterien aus dem Gewebe von drei Patienten, die an Morbus Crohn erkrankt waren. Die Stämme Linda, Ben und Dominic, benannt nach den Patienten, in denen sie gefunden wurden, brauchten 18 Monate zur Erstanzucht. Der anspruchsvolle Mikroorganismus, den er gefunden hatte, war eine Zellwand-defekte Form (Chiodini et al., 1984b; Chiodini et al., 1986). Mittels molekularbiologischer Untersuchungen gelang einige Jahre später die Identifikation als MAP (Yoshimura et al., 1987; McFadden et al., 1987b). Aufgrund der Erkrankung mit typischen pathomorphologischen Veränderungen, die MAP in Rindern und Primaten auslöst, wurde ein möglicher Zusammenhang mit der Entwicklung von Morbus Crohn vermutet (Chiodini et al., 1989). Neben diesen gleichartigen makroskopischen Veränderungen bei Paratuberkulose und Morbus Crohn (Skovgaard, 2007; Behr und Kapur, 2008) bestehen auch histopathologische Ähnlichkeiten (Greenstein, 2003).

In den folgenden Jahren wurden häufiger Zellwand-defekte Formen in Verbindung mit Morbus Crohn isoliert (Schwartz et al., 2000; Haagsma et al., 1989; Gitnick et al., 1989;

Graham et al., 1987; Markesich et al., 1988). Naser et al. (2000b) isolierte den Erreger aus der Milch laktierender Frauen.

Die **Ätiologie** von Morbus Crohn bleibt ungewiss. In einigen Review-Artikeln wurde der Zusammenhang zwischen MAP und Morbus Crohn beleuchtet (Abubakar et al., 2008; Behr und Kapur, 2008; Hermon-Taylor et al., 2000; Mendoza et al., 2009; Waddell et al., 2008). Meta-Analysen ergaben, dass MAP häufiger bei Morbus Crohn-Patienten als bei Kontrollpatienten zu finden ist (Feller et al., 2007; Abubakar et al., 2007), ein kausaler Zusammenhang konnte bisher jedoch nicht bewiesen werden (van Kruiningen, 1999; Rudoler, 2004). MAP könnte demnach eine Rolle als Erreger haben, eine Sekundärinfektion darstellen, die die Erkrankung verschlimmert, oder eine nicht-pathogene Besiedelung darstellen. Der aktuelle Stand geht davon aus, dass Morbus Crohn eine multifaktorielle Erkrankung ist, getriggert durch verschieden Faktoren wie genetische, immunologische, umweltbedingte und infektiöse Komponenten, möglicherweise auch MAP (Economou und Pappas, 2008; Sibartie et al., 2010).

Neben einer Vielzahl von genetisch prädisponierenden Faktoren (Wagner et al., 2013) wird insbesondere das NOD2/CARD15-Gen mit einer erhöhten Empfänglichkeit für Morbus Crohn in Zusammenhang gebracht (Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001). Dieses Gen arbeitet als intrazellulärer Rezeptor, das bakterielle Peptidoglykane erkennt und eine Entzündungsantwort auslöst (Constans, 2005). Neben NOD2/CARD15 (Hugot et al., 2001) sind aber auch IBD5 (Török et al., 2005), DLG5 (Weersma et al., 2009), IL23R und ATG16L1 (Hampe et al., 2007) als Gene identifiziert worden, die möglicherweise die Entstehung von Morbus Crohn begünstigen.

Die **Behandlung** von Morbus Crohn beinhaltet zwei Aspekte. Diese werden in der Veröffentlichung von Selby (2000) ausführlich beschrieben. Das erste Ziel ist das Management der aktiven Erkrankung mit Kortikosteroiden bzw. Mesalazin (5-ASA-Verbindung). Nach Rückbildung der Symptome, ist die Vorbeugung eines Rückfalls das zweite Ziel. Bis zu 80% der Patienten brauchen chirurgische Intervention. Die Wahrscheinlichkeit eines klinischen Rezidivs beträgt nach einem Jahr 22-55% und nach zwei Jahren 40-70%. Kortikosteroide können einen Rückfall nicht verhindern. Mesalazin dagegen reduziert die Rückfallrate signifikant, besonders nach einer Operation, dennoch erleiden 50% der Patienten nach zwei Jahren einen Rückfall.

2.5 *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Lebensmitteln

Die Wege, über die MAP zum Menschen gelangen kann, sind vielfältig. **Abbildung 3** zeigt Übertragungswege für MAP. Die Übertragung kann sowohl über die Umwelt als auch über Lebensmittel erfolgen.

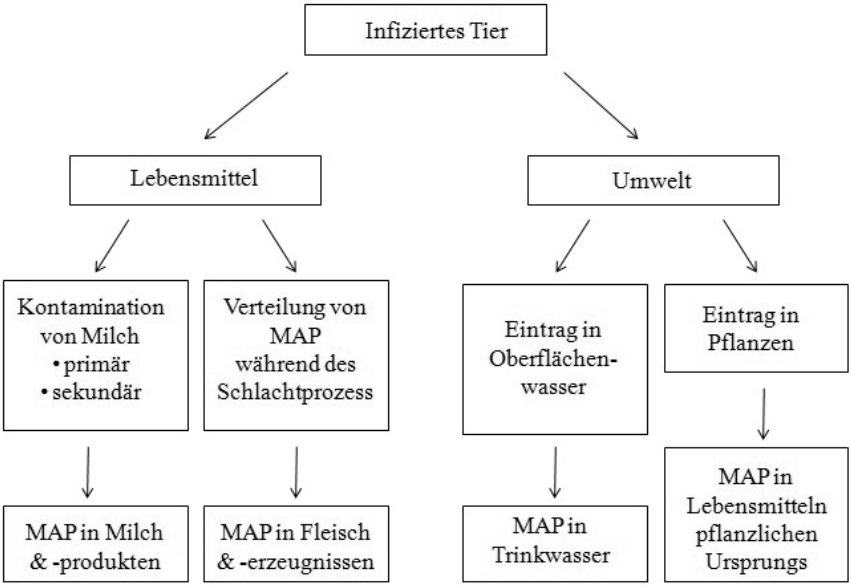


Abbildung 3: Übertragungswege für *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*

Auf weitere Einzelheiten der Übertragungswege von MAP wird in den folgenden Kapiteln eingegangen.

2.5.1 Milch

Die Anwesenheit von MAP in Milch wurde erstmals 1929 von Alexejeff-Goloff gezeigt. Er fand den Erreger in drei von vier an Paratuberkulose erkrankten Kühen. Dieser Nachweis gelang auch in anderen Studien (Smith, 1960; Taylor et al., 1981, Streeter et al., 1995). Auch aus Milch von subklinisch infizierten Tieren gelang die Anzucht von MAP (Sweeney et al., 1992). Damit ist Rohmilch eine wichtige Quelle der Übertragung von MAP auf den Menschen (Hermon-Taylor et al., 2000, Slana et al., 2009).

Die Kontamination von Milch erfolgt entweder über direkte Ausscheidung von MAP mit der Milch, häufiger jedoch aufgrund einer Kontamination während des Melkens (Eltholth et al., 2009, Grant et al., 2002a, Nauta und Van der Giessen, 1998). MAP kann durch den Strichkanal einwandern oder nach systemischer Dissemination zum Euter gelangen (Hines et al., 1987; Koenig et al., 1993; Van der Giessen, 1995).

Tabelle 8 gibt eine Übersicht über die Prävalenz von MAP in Milch auf unterschiedlichen Prozessstufen der Verarbeitung in verschiedenen Ländern.

Tabelle 8: Prävalenz von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Milch unterschiedlicher Prozessstufen (Quelle: Grant, 2010, modifiziert)

Referenz	Anzahl der Proben	% PCR-positiv	% Kultur-positiv	Land
Rohmilch -vom Einzeltier-				
Taylor et al., 1981	36	*	35	Australien
Sweeney et al, 1992	77	*	11,6	USA
Streeter et al., 1995	126	*	8,3	USA
Giese und Ahrens, 2000	11	18	45	Dänemark
Jayarao et al., 2004	1493	13,5	2,8	USA
Bosshard et al., 2006	84	3,6	*	Schweiz
Rohmilch -Sammelmilch-				
Botsaris et al., 2010	220	28,6	*	Zypern
Stephan et al., 2002	501	22,4	*	Schweiz
Stabel et al., 2002	52	68	*	USA
Slana et al., 2009	220	28,6	0	Zypern
Jayarao et al., 2004	29	27,5	20,6	USA
Bosshard et al., 2006	100	3	*	Schweiz
Rohmilch -Verarbeitungsebene-				
Grant et al., 2002a	244	7,8	1,6	UK
O'Reilly et al., 2004	389	12,9	0,3	Irland
Pasteurisierte Milch aus dem Einzelhandel				
Millar et al., 1996	312	7	0	England
Grant et al., 2002a	567	11,8	1,8	UK
Gao et al., 2002	710	15	0	Kanada
O'Reilly et al., 2004	357	9,8	0	Irland
Ellingson et al., 2005	702	64	2,8	USA
Ayele et al., 2005	244	*	1,6	Tschechien

* nicht untersucht oder nicht berichtet

Taylor et al. (1981) wiesen MAP in 9 von 26 (35%) Milchproben von klinisch auffälligen Tieren kulturell nach, Sweeney et al. (1992) in 9 von 77 Milchproben subklinisch infizierter Tiere. Streeter et al. (1995) wiesen MAP ebenfalls bei klinisch unauffälligen Tieren in Kolostrum und Milch nach (siehe Kapitel 2.3.1 Übertragungswege). Andere Studien untersuchten molekularbiologisch auf MAP, teilweise erfolgte der Nachweis sowohl kulturell als auch molekularbiologisch.

Die Hitzebehandlung bzw. Pasteurisation leitet ihre Prinzipien von der Arbeit von Louis Pasteur (1822-1885) ab, der diese Methode entwickelte, um abnormale Fermentation in Wein durch das Zerstören der verantwortlichen Bakterien durch Erhitzen auf 60 °C zu verhindern. Die Zeit-Temperatur-Kombination für die Pasteurisation von Rohmilch war ursprünglich auf *Mycobacterium bovis* ausgelegt, den Erreger der Tuberkulose. Es wurde davon ausgegangen, dass MAP dadurch auch getötet würde. Es gibt jedoch zunehmend Beweise, dass MAP in pasteurisierter Milch noch in geringen Konzentrationen vorhanden sein könnte (siehe Tabelle 8, vorherige Seite).

Millar et al. (1996) publizierten über den Nachweis von lebenden MAP in pasteurisierter Milch aus dem Einzelhandel. Dieser Veröffentlichung ging eine andere voran, in der berichtet wurde, dass MAP-Zellen eine Hitzebehandlung von 65 °C für 30 min sowie 72 °C für 15 s in Laboruntersuchungen überleben können (Chiodini und Hermon-Taylor, 1993).

Auch Grant et al. (2002a) fanden lebende MAP-Zellen in 1,8% der untersuchten Proben pasteurisierter Milch aus dem Einzelhandel, Ayele et al. (2005) berichteten von 2%, Ellingson et al. (2005) sogar von 2,8%. Zahlreiche andere Studien wiesen MAP-DNA mittels PCR nach; dabei fanden O'Reilly et al. (2004) 9,8% positive Proben, Gao et al. (2002) 15% und Slana et al. (2009) sogar 28,6%. Die Anwesenheit konnte in diesen Fällen zwar nicht kulturell bestätigt werden; diese Tatsache schließt eine Lebensfähigkeit aber nicht aus (Grant und Rowe, 2004).

Es kann also insgesamt davon ausgegangen werden, dass MAP hohe Temperaturen überleben kann (Grant et al., 2002b). Um dies näher zu untersuchen, führten einige Arbeitsgruppen Pasteurisierungsversuche durch. Diese Inaktivierungsstudien versuchten, die wesentlichen Eigenschaften des Pasteurisierungsprozesses so genau wie möglich zu reproduzieren. Dennoch sind die Ergebnisse kritisch zu betrachten und so gut wie nicht miteinander vergleichbar. Die Gründe dafür sind vielfältig. Den ersten großen Unterschied stellen die verwendeten Pasteurisierungsanlagen dar. Es gab nur wenige Studien, in der kommerzielle

Pasteurisierunganlagen verwendet wurden (McDonald et al., 2005; Grant et al., 2002b). Andere Studien verwendeten entweder Pasteurisierungsanlagen im Pilotmaßstab (Hammer et al., 2002; Grant et al., 2005; Hope et al., 1996; Stabel et al, 1997; Pearce et al., 2001) oder simulierten die Pasteurisierung unter Laborbedingungen und erhitzten Milch in Röhrchen oder Kapillaren (Chiodini und Hermon-Taylor, 1993; Grant et al., 1996; Keswani und Frank, 1998; Sung und Collins, 1998). Weitere Unterschiede zeigten sich bei den verwendeten Stämmen, ob diese in Rohmilch oder pasteurisierte Milch eingemischt wurden, der Verwendung von Reinkulturen (Grant et al., 1996) oder Kontamination mit natürlich infiziertem Kot (Rademaker et al., 2007; Pearce et al., 2001), der Einmischkonzentration, der Anwendung von Maßnahmen zur Reduktion von MAP-Aggregaten sowie der Kultivierungsmethode zum Nachweis überlebender MAP. Verwendet wurden Kultur (Anzuchtmedien variierten je nach Arbeitsgruppe), PCR oder beides. Wurde bei der kulturellen Anzucht neben der Pasteurisierung zusätzlich ein Dekontaminationsverfahren verwendet, so kann dies die Wiederfindung überlebender MAP beeinträchtigen. Mit berücksichtigt werden muss ebenfalls die bereits erwähnte Tendenz von MAP zur Aggregatbildung, die zu einer Unterschätzung der Zahlen um den Faktor 100-1000 führen kann (Klijn et al., 2001). Auch der „Viable But Non Culturable"-Status erschwert eine exakte Quantifizierung mittels kulturellen Methoden (ebd.).

Das Überleben geringer Mengen MAP nach der Pasteurisierung konnte in zahlreichen Studien aus Deutschland (Hammer et al., 2002), Australien (McDonald et al., 2005; Hope et al., 1996), USA (Sung und Collins, 1998; Meylan et al., 1996), Irland (Grant et al., 2005; Grant et al., 1996) und Kanada (Gao et al., 2002) gezeigt werden. Die Homogenisierung von Milch vor der Pasteurisation erhöhte die Letalität von MAP (Grant et al., 2005). Es gibt aber auch Studien, in denen keine überlebenden MAP nachgewiesen wurden (Rademaker et al., 2007; Pearce et al., 2001; Keswani und Frank, 1998; Stabel et al., 1997).

Die Theorie, dass Milch selbst schützende Einflüsse auf das Überleben von MAP ausüben könnte, bestätigte sich nicht (Van Brandt et al., 2011b). Hammer et al. (2002) sehen die Fähigkeit von MAP zum Überleben bei Pasteurisierungstemperaturen in der Aggregatbildung, in deren Inneren einzelne MAP-Zellen überleben können, und der Bildung ruhender Stadien, die mit Flüssigmedien über einige Monate wiederbelebt werden können. Teilweise ist eine Dauer von bis zu einem Jahr zur Anzucht hitzegeschädigter MAP nötig (Hammer et al., 2000). Cerf et al. (2007) setzen der verzögerten Zerstörung im Innern der Aggregate entgegen, dass das Temperaturgleichgewicht in weniger als 0,02 s auftritt (Davey, 1990).

Kritiker der Pasteurisierungsversuche begründen das Überleben von MAP anders. Lund et al. (2002) führen Ausfälle in der Pasteurisierung auf unzureichende Haltezeit, Löcher in den Ventilen oder Platten der Wärmeaustauscher (Cerf et al., 2007; Walenta und Kessler, 1986) oder fehlerhafte Bedienung der Geräte (Rampling, 1998) zurück. Bei Versuchen im Labormaßstab geben Lund et al. (2002) zu bedenken, dass die hydrophobe Natur des Organismus (Grange, 1996) bedingt, dass sich dieser an der Oberfläche von Flüssigkeiten und an der Seite von Röhrchen, Fläschchen und Ampullen ansammelt. Dies unterstützt die Beobachtung, dass Studien, in denen nach der Pasteurisierung überlebende MAP gefunden werden, eher Tubes als Kapillarröhrchen verwenden (Keswani und Frank, 1998). Auch Kreuzkontaminationen im Labor und eine lange Laufzeit der Geräte zwischen den Reinigungen könnten eine Rolle spielen (Cerf et al., 2007).

2.5.2 Säuglingsnahrung

MAP kann über verschiedene Wege in Säuglingsnahrung gelangen. Ist MAP im Ausgangsmaterial für die Herstellung vorhanden und überlebt die Pasteurisation, kann es das aus dieser Milch hergestellte Produkt kontaminieren (Donaghy et al., 2004). Auch Trink- und Flaschenwasser sind mögliche Quellen für MAP in Babynahrung (Papapetropoulou et al., 1997; Falkinham, 2003; Pedley et al., 2004).

Im Hinblick auf die erhöhte Empfänglichkeit von Kälbern für MAP (Windsor und Whittington, 2009) und der noch nicht geklärten Frage des zoonotischen Potentials von MAP, ist die Untersuchung von Säuglingsnahrung von besonderem Interesse.

Hruska et al. (2011) untersuchten 51 Proben Säuglingsnahrung von zehn Firmen aus sieben europäischen Ländern mittels PCR auf die Anwesenheit des MAP-spezifischen Markers *f*57 (Slana et al., 2008a). Dieser konnte in 35% der Proben nachgewiesen werden. In vier der untersuchten Proben befanden sich mehr als 10.000 MAP-Zellen/ g Säuglingsnahrung (7,8%). Pro Packung entspricht das fünf Millionen MAP-Zellen, die von einem Kleinkind, das seine Nahrung aus der Flasche bekommt, innerhalb weniger Tage aufgenommen würden. Frühgeborene und Flaschenkinder werden somit, unabhängig von einem Zusammenhang mit Morbus Crohn, durch die große Anzahl an MAP entzündungsfördernden Auslösern ausgesetzt (Hruska et al., 2011). Zu diesen zählen unter anderem Peptidoglykane und Hitzeschockproteine (El-Zaatari et al., 1995; Chamaillard et al., 2003). Muramyldipeptide, die die mykobakterielle Zellwand ausmachen und von Peptidoglykanen freigesetzt werden, sind

potentielle Immunmodulatoren und bekannt als Auslöser von Entzündungen (Ellouz et al., 1974; Carbone et al., 2005; Maeda et al., 2005; Coulombe et al., 2009). Die Anwesenheit der Zielsequenz IS*900* in 48,9% der Proben wurde in einer früheren Studie gezeigt (Hruska et al., 2005).

Botsaris et al. (2012) wiesen in Zypern MAP in 35 Säuglingsanfangsnahrungen von 11 verschiedenen Herstellern nach. Dabei zeigten sich 21,9% mittels IS*900* PCR positiv, bei 9,4% der Proben konnten sogar in der kulturellen Anzucht lebende MAP-Zellen gefunden werden (Botsaris et al., 2012).

2.5.3 Andere Milchprodukte

MAP verfügt über eine hohe Temperatur- und pH-Wert-Resistenz. Dazu zählen beispielsweise der niedrige pH-Wert im Magen (Pavlik et al., 2000), hohe Temperaturen bei der Pasteurisation (Grant et al., 2002b) als auch Tiefgefriertemperaturen (Van Brandt et al., 2011a). Daher können Milchprodukte wie Käse, Säuglingsnahrung, Sahne und andere Milcherzeugnisse als mögliche Quelle für eine Übertragung von MAP auf den Menschen gesehen werden.

Stephan et al. (2007) haben MAP-Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen in Cheddar-Käse eingemischt. Die minimale Nachweisgrenze lag in diesen Einmischversuchen bei 10^3 MAP-Zellen/25g Cheddar, was 40 MAP-Zellen/g Cheddar entspricht (ebd.). Dies würde, wenn man eine 10fach Konzentration von Milch zu Käsebruch annimmt (Donaghy et al., 2004), 4 MAP-Zellen/ml Milch entsprechen. Spahr und Schafroth (2002) untersuchten das Überleben von MAP in Rohmilchkäse (Emmentaler und Tilsiter) ebenfalls mittels Einmischversuchen über eine Reifeperiode von 120 Tagen. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die MAP-Konzentrationen stetig, aber langsam sanken. Dennoch konnten am Ende der Reifeperiode lebende MAP-Zellen nachgewiesen werden. Eine andere Studie untersuchte das Überleben von MAP bei der Gärung von Sauermilchprodukten (Joghurt, Acidophilus-Milch und Kefir). MAP überlebt pH-Reduktion, längere Zeit unterhalb eines pH-Wertes von 4, wobei sich dies inhibierend auf das Wachstum auswirkte (Klanikova et al., 2012). MAP ist zwar resistenter gegenüber niedrigen pH-Werten als die meisten anderen Bakterien (Sung und Collins, 2003), dennoch führt ein niedriger pH-Wert deutlich zu einer Inaktivierung von MAP (Sung und Collins, 1998; Sung und Collins, 2000; Spahr und

Schafroth, 2002; Donaghy et al., 2004). Tabelle 9 gibt eine Übersicht zu den durchgeführten Untersuchungen von Käseproben.

Tabelle 9: Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Käse

Produkt	Land	Anzahl der Proben	% PCR positiv	% Kultur positiv	Referenz
Bauernkäse	UK	28	*	25	Williams und Withers, 2010
Feta	Griechenland	42	50	4,7	Ikonomopoulos et al., 2005
Schnittkäse	Tschechien	42	12	2,4	Ikonomopoulos et al., 2005
Käsebruch	USA	98	5	0	Clark et al., 2006
Rohmilchkäse	Schweiz	143	4,2	0	Stephan et al., 2007

* nicht untersucht

Die Tabelle zeigt, dass sich die Ergebnisse unterscheiden. MAP-DNA kann häufiger nachgewiesen werden als lebende MAP Zellen. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass MAP durch den Herstellungs- und Reifungsprozess vollständig abgetötet wurde. Es kann aber auch sein, dass die vorhandenen Zellen zahlenmäßig unterhalb der Nachweisgrenze liegen oder sich vorübergehend in einem nicht kultivierbaren Zustand befinden (Mukamulova et al., 2003).

2.5.4 Fleisch und Fleischerzeugnisse

Sowohl Milch- als auch Fleischrinder können an Paratuberkulose erkranken. Demnach kann auch Fleisch ein potentieller Vektor für den Kontakt des Menschen mit MAP sein. Eine Studie der Tierärztlichen Hochschule Hannover zeigte, dass die Prävalenz makroskopisch veränderter, MAP-infizierter Tiere 1,35% in Bezug auf die Gesamtzahl aller visuell und palpatorisch untersuchter Schlachtrinder betrug (Elze, 2009). Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass 28,7% der untersuchten Schlachtrinder trotz fehlender makroskopischer Veränderungen MAP-infiziert waren (ebd.). Die Streuung von MAP kann über Lymphknoten, Blut und Muskulatur erfolgen. Nach Rossiter und Henning (2001) wiesen 34% Milchvieh und 3% Mastrinder von Schlachthöfen in Nord-Ost-USA positive Darmproben (Kot und Ileocaecal-Lymphknoten) auf. Auch die Leber und andere Lymphknoten von 11,1% Milchvieh und 0,7% der Mastrinder erwiesen sich als positiv. An Oberflächentupfern von Rinderschlachtkörpern nach Abhäuten und Herrichten konnte MAP gefunden werden (Meadus et al., 2008). Alonso-Hearn et al. (2009) wiesen MAP in Zwerchfell nach. Auch an

Rindersteak (Mutharia et al., 2010) sowie Rumpf und Vorderviertel vom Schaf (Reddacliff et al., 2010) konnte MAP nachgewiesen werden. Pribylova et al. (2011a) fanden 84,2% der untersuchten Darmproben positiv. Auch in Proben von Zwerchfell und Masseter konnte der Erreger nachgewiesen werden (ebd.).

Es ist somit denkbar, dass MAP bei der Herstellung von Hackfleisch beispielsweise über einen infizierten Lymphknoten über die gesamte Charge Hackfleisch verteilt werden kann – hierzu gibt es aber noch keine Untersuchungen (Grant, 2005). MAP kann also in geringen Zahlen in Fleisch infizierter Tiere vorhanden sein. Neben dieser primären Kontamination ist über infizierten Kot auch eine sekundäre Kontamination denkbar, bei der MAP während des Schlachtprozesses auf den Tierkörper gelangt (Grant, 2005). Es ist aber wahrscheinlich, dass der Erreger inaktiviert wird, sofern das Fleisch durchgebraten wird (Mutharia et al., 2010).

2.5.5 Wasser

Umwelt-Mykobakterien wie *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium gordonae* und *Mycobacterium flavescens* sind in aquatischen Lebensräumen verbreitet und können daher in Trinkwasserverteilungssysteme gelangen, wo sie in Biofilmen persistieren. Sie sind gegenüber Desinfektionsmethoden wie Chloren, Ozonierung oder UV-Bestrahlung widerstandsfähiger als andere Bakterien (Falkinham, 2009; Whiley et al., 2012). Im Vergleich zu *E.coli* sind Mykobakterien 100-330 mal resistenter gegenüber Chlor (Le Dantec et al., 2002). Bei der Untersuchung von Tafelwasser in Griechenland erwiesen sich 15,6% der Proben als positiv auf Umwelt-Mykobakterien (Papapetropoulou et al., 1997).

Die Ausscheidung von MAP mit dem Kot infizierter Tiere (Cocito et al., 1994) und die Überlebensfähigkeit (siehe Kapitel 2.1.2 Vorkommen und Tenazität) in der Umwelt (Whittington et al., 2004) bieten MAP beste Vorraussetzungen, über Niederschläge in den landwirtschaftlichen Abfluss und damit, sofern das Gebiet in einem Wassereinzugsgebiet gelegen ist (Pierce, 2009), in das Oberflächenwasser zu gelangen. Wird dieses als Quelle für Trinkwasser genutzt, so kann MAP unter Umständen auch dort gefunden werden. Andere Subspezies von *Mycobacterium avium* wurden in Biofilmen aus Trinkwasserrohren in den USA nachgewiesen (Dailloux et al., 2003; Falkinham et al., 2001; Torvinen et al., 2007; Williams et al., 2009). Über die Fähigkeit von MAP in Trinkwasser-Biofilmen zu Überleben oder Wachsen ist bisher aber wenig bekannt (Feazel et al., 2009).

MAP wurde in früheren Studien in Großbritannien in Rohwasserquellen nachgewiesen, sowohl mittels Kultur als auch PCR (Pickup et al., 2005; Whan et al., 2005a). Dabei wurde auch eine signifikante Assoziation (1-5%) zwischen Niederschlag und dem Nachweis von MAP gefunden (Pickup et al., 2005). Das Vorhandensein von MAP in Hauswasserzisternen mittels PCR wurde in 1 von 54 Proben gezeigt (Pickup et al., 2006). Eine kürzlich in den USA veröffentlichte Studie berichtet, dass sich über 81% der Leitungswasserproben mit Konzentrationen bis 29000 KbE/l als positiv für MAP in der PCR erwiesen (Beumer et al., 2008).

2.5.6 Lebensmittel pflanzlichen Ursprungs

Über eine Kontamination von Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs mit Mykobakterien ist schon vor Jahrzehnten berichtet worden (Nassal et al., 1974). Diese befanden sich hauptsächlich in den essbaren Teilen in der Nähe des Bodens oder unterhalb des Erdbodens, waren aber auch nach dem Waschen der Früchte noch in geringen Mengen vorhanden. Das Vorhandensein im Innern der Früchte lässt sich durch die Aufnahme über die Wurzel erklären. Mykobakterien, hauptsächlich *Mycobacterium avium*, wurden von Salat, Pilzen und Kopfsalat sowie anderen Gemüsearten, aber auch Apfelsaft isoliert (Argueta et al., 2000).

Bei MAP birgt das Ausbringen von Dung auf Flächen, die der Futtermittelgewinnung dienen, ein Infektionsrisiko. MAP konnte in den oberflächlichen Pflanzenteilen, den Wurzeln und auch im Boden nach experimenteller Exposition mit kontaminiertem Mufflonkot nachgewiesen werden (Pribylova et al., 2011b). Dieses stimmt dabei mit den Ergebnissen anderer Studien überein, bei denen MAP in Gras nachgewiesen werden konnte (Whittington et al., 2004). Andere Untersuchungen zeigen, dass MAP in Stängel, Blättern und Früchten von Tomate, Salat und Radieschen nachgewiesen werden konnte, die mit Rinderdung gedüngt wurden (Pavlik et al., 2002). Selbst bei <6 °C betrug die Überlebensfähigkeit unter diesen Umständen noch mindestens 113 Tage (ebd.).

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Arbeitskonzept

Ziel der Dissertation war die Optimierung von DNA-Extraktionsverfahren zur Erfassung von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in Milch und Säuglingsanfangsnahrung. Die DNA-Extraktion erfolgte vergleichend mit den beiden unterschiedlichen kommerziellen DNA-Extraktionskits *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche, Mannheim) und *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Fa. Qiagen, Hilden) sowie dem automatisierten *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega, Mannheim). Für den molekularbiologischen Nachweis wurde eine spezifische und gleichzeitig sensitive TaqMan® Real Time-PCR eingesetzt. Für jedes der in den Hauptversuchen verwendeten DNA-Extraktionsverfahren wurden zunächst in Vorversuchen verschiedene optimierte Protokolle untersucht. Mittels statistischer Analyse wurde das jeweils vielversprechendste Protokoll zur Verwendung im Hauptversuch ausgewählt. Ziel war es, für jedes Verfahren das Protokoll mit der höchsten Sensitivität zu ermitteln.

In den sich anschließenden Hauptversuchen erfolgte die Aufbereitung der Proben mit dem in den Vorversuchen ausgewählten Protokollen, um MAP vergleichend in unterschiedlichen Matrizes nachzuweisen. Hierfür wurden sowohl Rohmilch als auch Säuglingsanfangsnahrung mit vier unterschiedlichen MAP-Referenzstämmen artifiziell kontaminiert. Die kulturelle Anzucht wurde für die Matrix Rohmilch vergleichend mitgeführt.

Ziel der Versuchsreihe war es, ein Verfahren zur Erfassung von MAP-Zellen zu etablieren, das als Screeningmethode verwendet werden kann.

Im Anschluss an die Hauptversuche wurde ein repräsentatives Spektrum von Säuglingsanfangsnahrung aus dem deutschen Handel auf das Vorkommen von MAP-DNA untersucht.

3.2 Material

3.2.1 Referenz- und Feldstämme

Im Rahmen der Dissertation wurden folgende Stämme von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* verwendet:

- **Referenzstamm**
  Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* ATCC® BAA-968™
  Interne Bezeichnung: **K10**

- **Feldstämme**

  Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* D8168/02

  Interne Bezeichnung: **423**

  Isolat aus Rinderkot, freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch das Landesuntersuchungsamt in Koblenz (Dr. Klaus Dräger)

  Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* Niebüll

  Interne Bezeichnung: **NB**

  Isolat aus Milch, freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch das Max-Rubner-Institut, Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Standort Kiel (Dr. Philipp Hammer)

  Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* DSMZ 44135

  Interne Bezeichnung: **44135**

  Isolat aus Rinderkot, freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch das Institut für Mikrobiologie, Zentrum für Infektionsmedizin in Hannover (Prof. Dr. Ralph Goethe)

3.2.2 Rohmilch

Die für die artifizielle Kontamination verwendete Rohmilch von Vor- und Hauptversuchen stammte von zwei Kühen aus der Klinik für Wiederkäuer und Schweine (KWS) der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die Tiere stammten aus Paratuberkulose-unverdächtigen Betrieben, waren selbst ebenfalls Paratuberkulose-unverdächtig und wurden nicht systemisch behandelt. Für den Einsatz in den Versuchen wurde von jedem der Tiere ein Liter Rohmilch gewonnen und gepoolt. Die jeweiligen Rohmilchproben wurden unter sterilen Bedingungen gewonnen und auf *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* untersucht (siehe Kapitel 3.3.7 Molekularbiologischer Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* und Fließdiagramm 11: Modifiziertes Protokoll zur DNA-Isolierung mit dem *High Pure Template Preparation Kit* im Anhang).

3.2.3 Säuglingsanfangsnahrung

Für die artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung wurde für die erste Versuchsreihe Anfangsmilch „Pre“ verwendet. Bei der sich anschließenden Versuchsreihe wurde Anfangsmilch „One“ verwendet. Beide Matrizes sind milchpulverbasiert. Während bei Anfangsmilch „Pre“ die Kohlenhydratquelle zu 100% aus Laktose besteht, enthält Anfangsmilch „One“ als Kohlenhydratquelle neben Laktose (87%) zusätzlich Stärke (13%).

Die Säuglingsanfangsnahrung wurde unter sterilen Bedingungen nach Herstellerangaben angerührt und vor der artifiziellen Kontamination auf *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* untersucht (siehe Kapitel 3.3.7 Molekularbiologischer Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* und Fließdiagramm 11: Modifiziertes Protokoll zur DNA-Isolierung mit dem *High Pure Template Preparation Kit* im Anhang).

3.2.4 Labormaterialien

Bezeichnung	Firma	Bestellnummer
Adhäsive Verschlussfolie (PCR)	Nerbe plus, Winsen/Luhe	04 095 0050
Becherglas, 600 ml	VWR International, Darmstadt	213-1126
Becherglas, 50 ml	VWR International, Darmstadt	213-1121
Blaudeckelflaschen 1000 ml	VWR International, Darmstadt	215-1595
Comply Indicator Tape	3M Deutschland, Kleinostheim	8221.1
DNA-Away	Roth, Karlsruhe	X 996.1
Drigalski-Spatel	VWR International, Darmstadt	231-0230
Einmalpapiertücher	Tork, Mannheim	
Einmalspritzen, 20 ml	Henryschein, Hamburg	550-7439
Eppendorf Reference, 0,5-10 µl	Eppendorf, Hamburg	4910 000.018
Eppendorf Reference, 10-100 µl	Eppendorf, Hamburg	4910 000.042
Eppendorf Reference, 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg	4910 000.069
Glasbox mit Deckel	VWR International, Darmstadt	-
Handschuhe Nitril Einweg	Hansa-Trading HTH, Hamburg	157112
Impfösen	VWR International, Darmstadt	631-7131
Impfösenhalter	VWR International, Darmstadt	631-0621
Küvetten, 4 ml, 1x1cm, PS	Sarstedt, Nümbrecht	67.741
Messpipette aus Glas, 10 ml	VWR International, Darmstadt	612 1134
Multipette 4780	Eppendorf, Hamburg	
Parafilm® M	VWR International, Darmstadt	291-1212
Pasteurpipetten, gestopft	VWR International, Darmstadt	612-1799
PCR-Platte, PP natur 96x0,2ml	Nerbe plus, Winsen/Luhe	04 083 0540
Petrischalen ohne Entlüftungsnocken, 92x16mm	Nerbe plus, Winsen/Luhe	09-021-0060
Pipettenspitzen, 1250 µl	Sarstedt, Nümbrecht	701.186.210
Pipettenspitzen, 100 µl	Nerbe plus, Winsen/Luhe	07-642-7300
Pipettenspitzen, 1000 µl	Nerbe plus, Winsen/Luhe	07-692-7300
Pipettenspitzen mit Filter, 10 µl	Nerbe plus, Winsen/Luhe	07-602-7300
Pipettierball 2 ml	VWR International, Darmstadt	612-2693
Plastibrand® PD-Tips für Multipette, 5 ml	Brand, Wertheim	702390
Plattenbase Micro Amp® Splash free Support base	Applied Biosystems, Darmstadt	4312063
Probenröhrchen, farblos, 2ml	Biozym Biotech Trading, Wien	710011
Reagenz- und Zentrifugenröhrchen, 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht	62.554.502PP
Reagiergefäß SafeSeal, 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht	72.695.400
Reagiergefäß SafeSeal, 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht	72.706.400
Reaktionsgefäßständer	Roth, Karlsruhe	4563.1
Röhre, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht	62.559.001

Bezeichnung	Firma	Bestellnummer
Schraubverschlüsse, rot, mit Dichtring	Biozym Biotech Trading, Wien	710031
SiLibeads® (Keramikkügelchen)	Lindner, Warmensteinach	9615
Sterilfilter	Whatman®, Dassel	10462200
Timer	Aldi, Mühlheim an der Ruhr	-
Tube-Rack, 24 er	Eppendorf, Hamburg	0030 123.115
Zählkammer (C-Chip Hämocytometer)	Peqlab, Erlangen	84-DHCN-01
Buraton rapid (Flächendesinf)	Schülke und Mayr, Norderstedt	113912
Desmanol industrial (Handdesinf)	Schülke und Mayr, Norderstedt	109424
Esemtam Hautbalsam	Schülke und Mayr, Norderstedt	109602
Esemtam Waschlotion	Schülke und Mayr, Norderstedt	116604

3.2.5 Geräte

Bezeichnung	Typ	Firma
Abzugsschrank	-	Köttermann, Uetze-Häningsen
Autoklav	Varioklav 500E	H+P Labortechnik, Oberschleissheim
Brutschrank 37 °C	BvM50	Memmert, Schwabach
Brutschrank 37 °C	Schüttelinkubator 3033	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Feinwaage Molekularbiologie	Sartorius Basic BA 210S-001	Sartorius, Göttingen
Feinwaage Nährbodenküche	Sartorius BP 4100S	Sartorius, Göttingen
Flüssigkeitsdispenser	Perifill IQ 2000	Zinsser Analytik, Frankfurt
Gefrierschrank (rein)	GS 5D 14A	Bosch Hausgeräte, Münschen
Gefrierschrank (unrein)	GS 5203 Index 10	Liebherr Hausgeräte, Biberach an der Riss
Homogenisator	Precellys® 24	Peqlab, Erlangen
Kühlschrank	FKS 5000 Profiline 200071	Liebherr Hausgeräte, Biberach an der Riss
Kühlschrank für PCR-Proben (rein)	Glass line 511074	Liebherr Hausgeräte, Biberach an der Riss
Kühlschrank für PCR-Proben (unrein)	Privileg Super Energie Sparar	Quelle, Fürth
Kühlzelle	TE 900*2030*60	Viessmann, Allendorf
Labor-Spülautomat	G 7883	Miele Professional, Gütersloh
Lichtmikroskop	Typ KF2	Zeiss, Oberkochen
Maxwell® 16 System	-	Promega, Mannheim
Mobiler Desinfektionsstrahler	UVC 30	Heraeus Sepatech, Hanau
Photometer	Spektrophotometer BioMate3	Thermo Electron Corporation

Bezeichnung	Typ	Firma
Pipettierhilfe	Pipetus®	Hirschmann® Laborgeräte, Eberstadt
Plattenabfüllgerät	Tecnomat 125	Integra Bioscience, Fernwald
Real Time Cycler	ABI PRISM® 7000	Applied Biosystems, Darmstadt
Reverse Osmose Anlage	RO 20 RS	Werner, Leverkusen
Schüttler	Schüttelapparat 3014	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Sicherheitsbrenner	Typ Gasi 3.340102	Schütt Labortechnik, Göttingen
Sicherheitswerkbank	Hera Safe	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischautoklav	Agarklav 10	Integra Bioscience, Fernwald
UV-Kabinett	UVC/T-M-AR	Kisker Biotech, Steinfurt
Vortexer (Reagenzglasschüttler)	VV3-S40	VWR International, Darmstadt
Zentrifuge	Multifuge 1 S-R Heraeus	Kendro Laboratory Products
Zentrifuge	Megafuge 1.0	Thermo Electron LED, Osterode
Zentrifuge für Reagiergefäße	Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge für Mikrotiterplatten	Perfect Spin P	Peqlab, Erlangen

3.2.6 Chemikalien

Bezeichnung	Firma	Bestellnummer
Ethanol	Roth, Karlsruhe	P 076.1
Hexadecylpyridiniumchlorid (HPC)	Merck, Darmstadt	840008
Isopropanol / 2-Propanol	Roth, Karlsruhe	7343.1
Lysozym 10g	Merck, Darmstadt	1.052.810.010
Triton X-100 reinst	Roth, Karlsruhe	3051.2
Tween® 80	Merck, Darmstadt	8.170.612.500
Glycerin	Merck, Darmstadt	1.04091.1000
Mycobactin J	Allied Monitor, Inc., Fayette, Missouri, USA	62-0002
BBL™ Middlebrook OADC	Becton Dickinson, Heidelberg	212240
BBL™ MGIT™ PANTA™	Becton Dickinson, Heidelberg	245114

3.2.7 Nährmedien für die Anzucht und den mikrobiellen Nachweis von MAP

3.2.7.1 Herrold's Egg Yolk-Medium (HEYM)

Herrold-Eigelb-Schrägagar mit Mycobactin J und ANV, Artikelnr. 222233, Becton Dickinson

Das Nährmedium wurde verbrauchsfertig bezogen. Nach Erhalt wurde es bei +2 bis +8 °C im Dunkeln gelagert und innerhalb des Verbrauchsdatums verwendet. Der Schrägagar wurde erst unmittelbar vor Gebrauch geöffnet.

Der Schrägagar wurde mit dem vorbereiteten und dekontaminierten Probenmaterial inokuliert. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation des Schrägagars zunächst bei locker aufgesetztem Deckel in Schrägposition, um die Oberfläche des Mediums trocknen zu lassen. Nach 5-7 Tagen wurde der Deckel zugeschraubt und das Nährmedium aufrecht für insgesamt 12-16 Wochen bei 37 °C bebrütet. Die Proben wurden wöchentlich auf Wachstum und Kontamination geprüft und beurteilt.

3.2.7.2 Middlebrook 7H9-Bouillon

Difco™ Middlebrook 7H9-Bouillon, Artikelnr. 271310 (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg)

Supplemente:

10% iges Tween® 80	40 ml
Glycerin	25 ml
Mycobactin J	2 µg
BBL™ Middlebrook OADC Supplement	100 ml

Middlebrook 7H9-Bouillon wurde hauptsächlich für die Anzucht von Mykobakterien als Reinkultur für Laboruntersuchungen verwendet.
Die Kulturen wurden wöchentlich auf Wachstum überprüft.

Herstellung:

Die Herstellung der modifizierten Middlebrook 7H9-Bouillon (Hughes et al., 2008) erfolgte in der institutseigenen Nährbodenküche. Die Rekonstitution des Mycobactin J erfolgte mit

2 ml absolutem Ethanol (Analysengrad). Das Gefäß wurde bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts sorgfältig geschüttelt.

Es wurden 4,7 g Pulver des Middlebrook 7H9-Mediums mit den zuvor beschriebenen Mengen an Tween® 80, Glycerin und Mycobactin J in 900 ml Aqua dest. eingewogen. Mit Hilfe eines Magnetrührers wurde eine homogene Lösung hergestellt. Diese wurde in kleine Glasgefäße, die jeweils 10-15 SiLibeads® enthalten, zu je 9 ml aliquotiert und anschließend bei 121 °C für 10 min autoklaviert. Die Lagerung der Bouillon erfolgte lichtgeschützt bei +2 bis +8 °C. Die Zugabe von 1 ml OADC Supplement erfolgte unmittelbar vor der Anzucht der Mykobakterien.

3.2.7.3 Middlebrook 7H10-Agar

Difco™ Middlebrook 7H10-Agar, Artikelnr. 262710 (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg)

Supplemente:

Glycerin	5ml
Mycobactin J	2 µg
BBL™ Middlebrook OADC Supplement	100 ml
BBL™ MGIT™ PANTA™ Supplement	21ml

Middlebrook 7H10-Agar wurde für die Anzucht von Mykobakterien als Reinkultur aus der Verdünnungsreihe verwendet.
Die Kulturen wurden nach dem Beimpfen wöchentlich auf Wachstum und Kontamination geprüft und beurteilt.

Herstellung:
Die Herstellung des modifizierten Middlebrook 7H10-Agars unter Zusatz von PANTA™ Supplement und Mycobactin J erfolgte in der institutseigenen Nährbodenküche. Die Rekonstitution des PANTA™ Supplement erfolgte mit 3 ml sterilem Aqua dest., die Rekonstitution von Mycobactin J mit 2 ml absolutem Ethanol (Analysengrad). Beide Gefäße wurden nach der Zugabe bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts sorgfältig geschüttelt.

Es wurden 19 g Pulver des Middlebrook 7H10-Mediums mit 5 ml Glycerin in 900 ml Aqua dest. eingewogen und sorgfältig verrührt. Die Lösung wurde im Tischautoklaven unter

ständigem Rühren bei 121 °C für 10 min autoklaviert. Nach Abkühlung des Mediums auf 50-55 °C wurden unter sterilen Bedingungen die oben genannten Mengen an OADC und PANTA™ Supplemenen sowie Mycobactin J zugegeben. Nach einem erneuten gründlichen Durchrühren wurde der Agar in 35 ml Portionen mit dem Plattenabfüllgerät in Petrischalen ohne Entlüftungsnocken gegossen. Nach dem vollständigen Auskühlen des Agars wurden die Petrischalen bei +2 bis +8 °C dunkel gelagert.

3.2.8 Puffer und Lösungen

3.2.8.1 PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)

PBS Tabletten, Artikelnr. 524650 (Fa. Merck, Darmstadt)

Herstellung

Die Herstellung des PBS erfolgte gemäß Herstellerangaben. Eine Tablette wurde in 1 Liter Aqua dest. gelöst und anschließend steril filtriert. Die Lagerung erfolgte bei +4 bis +8 °C.

3.2.8.2 PBS-T (phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Tween® 20)

PBS-Tween® Tabletten, Artikelnr. 524653 (Fa. Merck, Darmstadt)

Herstellung

Die Herstellung des PBS-Tween® 80 erfolgt ebenfalls gemäß Herstellerangaben. Eine Tablette wurde in 1 Liter Aqua dest. gelöst und anschließend steril filtriert. Die Lagerung erfolgte bei +4 bis +8 °C.

3.2.8.3 TE-Puffer

Herstellung:

Zur Herstellung von 100 ml TE-Stammlösung benötigte man 20 ml aus einer 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) Stammlösung sowie 4 ml aus einer 50 mM EDTA Titriplex III Stammlösung. Die entstandene Lösung wurde dann auf 100 ml mit Aqua dest. aufgefüllt, steril filtriert und autoklaviert. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

3.2.8.4 Lysispuffer zur Vorbehandlung grampositiver Bakterien

Herstellung:

Siehe Kapitel 3.2.8.3 TE-Puffer. Zusätzlich erfolgte die Einwaage von 1,2 g Triton X-100 vor Auffüllung mit Aqua dest. auf 100 ml. Die Zugabe von 20 mg Lysozym/ ml Lysispuffer erfolgte stets unmittelbar vor Einsatz des Puffers. Für die benötigte Menge des Lysispuffers (in Abhängigkeit von der Probenanzahl) wurde die entsprechende Menge des Enzyms abgewogen und mit dem Lysispuffer bis zur vollständigen Auflösung sorgfältig gevortext. Der fertige Lysispuffer mit Lysozym ist nicht länger als ein Tag verwendbar, Reste wurden nach spätenstens 24 Stunden verworfen. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

3.2.8.5 Lysispuffer mit Triton und Zugabe von Lysozym vor Gebrauch

Herstellung:

Siehe Kapitel 3.2.8.3 TE-Puffer. Zusätzlich erfolgte die Einwaage von 7,2 g Triton X-100 vor Auffüllung mit Aqua dest. auf 100 ml. Die Zugabe von 120 mg Lysozym/ ml Lysispuffer erfolgte stets unmittelbar vor Einsatz des Puffers. Für die benötigte Menge des Lysispuffers (in Abhängigkeit von der Probenanzahl) wurde die entsprechende Menge des Enzyms abgewogen und mit dem Lysispuffer bis zur vollständigen Auflösung sorgfältig gevortext. Der fertige Lysispuffer mit Lysozym ist nicht länger als ein Tag verwendbar, Reste wurden nach spätenstens 24 Stunden verworfen. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

3.3 Methoden

3.3.1 Anzucht der Referenzstämme

Alle Stämme wurden zunächst, ausgehend von der Stammsammlung des Institutes, auf Herrold's Egg Yolk-Medium (siehe Kapitel 3.2.7.1 Herrold's Egg Yolk-Medium (HEYM)) für 6-8 Wochen bei 37 °C angezüchtet.

Anschließend wurde von Herrold's Egg Yolk-Medium (siehe Abbildung 4, linkes Bild) mit einer sterilen Impföse eine Einzelkolonie in die Middlebrook 7H9-Bouillon, mit dem Zusatz von 1 ml OADC Supplement, eingerieben. MAP zeigt eine verringerte Zellaggregat-Bildung, wenn es schüttelnd in Flüssigmedien angezüchtet wird (Hughes et al., 2001). Daher enthielt jede Glasflasche 10-15 SiLibeads®. Das Anzuchtmedium wurde im Schüttelinkubator für 4-6 Wochen bebrütet (siehe Abbildung 4, rechtes Bild).

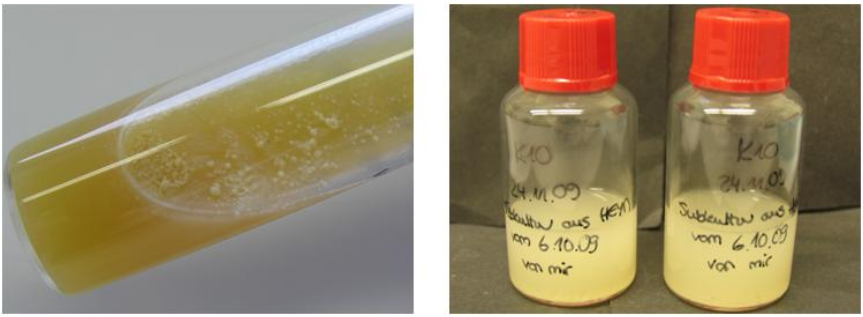


Abbildung 4: Anzucht der *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*-Stämme auf Herrold's Egg Yolk-Medium (links) und in Middlebrook 7H9 (rechts)

3.3.2 Herstellung einer dekadischen Verdünnungsreihe

Zur Herstellung der Bakteriensuspension wurde der jeweilige Prüfstamm nach Anzüchtung im Middlebrook 7H9-Bouillon bei 900 x g für 30 min (Whitlock et al., 1988) bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit einer sterilen Pasteur-Pipette abgenommen und das Bakterien-Pellet in 2 ml Puffer (je nach Matrix PBS-T bzw. Middlebrook 7H9-Bouillon ohne Zusatz von Tween® 80) resuspendiert. Um der für MAP typischen Aggregatbildung entgegen zu wirken, wurde die hergestellte Bakteriensuspension durch Vortexen mit 8-10 sterilen SiLibeads® homogenisiert.

Die Bakteriensuspension wurde mittels Photometer bei einer Wellenlänge von 660 nm auf eine optische Dichte (OD) von 10% Transmission eingestellt. Die Kalibrierung des Gerätes erfolgte gegen unbeimpften Puffer. Die dekadische Verdünnungsreihe wurde mit 3 ml der eingestellten Bakteriensuspension bis zur Verdünnungsstufe 10^{-7} angelegt. Die einzelnen Arbeitsschritte sind in Fließdiagramm 2 im Anhang dargestellt.

3.3.3 Quantitative Bestimmung der Zellzahl aus den Verdünnungsstufen

Ausgehend von den einzelnen Verdünnungsstufen, erfolgte die quantitative Bestimmung der MAP-Zellen mittels Zählkammer und Kultur sowie semiquantitativ mittels PCR. Neben der Kontrolle der MAP-Zellzahl in den Verdünnnungsstufen mittels Zählkammer-Verfahren, ermöglichte die Anzucht auch die Kontrolle der Lebensfähigkeit. Der molekularbiologische Nachweis diente der Kontrolle der dekadischen Verdünnung.

3.3.3.1 Zählkammer

Zur Ermittlung der Zellzahl der MAP-Suspension wurde die Anzahl der eingemischten MAP-Zellen mittels Zählkammer überprüft. Dies erfolgte mittels *Neubauer improved*-Zählkammer. Hierzu wurden 10 µl Bakteriensuspension einer zählbaren Verdünnungsstufe in die Zählkammer pipettiert und bei 40-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop gezählt. Dieses Vorgehen wurde dreimal wiederholt.

Das Zählgitter der *Neubauer improved*-Zählkammer besteht aus neun Großquadraten mit je 1 mm Seitenlänge. Das zentrale Großquadrat wiederum besteht aus 25 Gruppenquadraten mit je 0,2 mm Seitenlänge. Jedes dieser Gruppenquadrate besteht aus 16 Kleinstquadraten mit je 0,05 mm Seitenlänge. Die Kammertiefe beträgt 0,1 mm.

Die Anzahl der MAP-Zellen/ml berechnet sich nach folgender Formel:

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

3.3.3.2 Molekularbiologischer Nachweis

Der molekularbiologische Nachweis erfolgte mittels MAPsureEasy® Real Time-PCR (siehe Kapitel 3.3.7 Molekularbiologischer Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*). Dazu wurde aus jeder Verdünnungsstufe 0,1 ml Bakteriensuspension für die DNA-Extraktion verwendet. Diese wurde mit dem Protokoll für das *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche) durchgeführt. Die einzelnen Arbeitsschritte sind in Fließdiagramm 11 im Anhang dargestellt. Der DNA-Extraktion schloss sich der molekularbiologische Nachweis an.

3.3.3.3 Kultureller Nachweis

Zur kulturellen Bestimmung der MAP-Zellen wurde aus den zählbaren Verdünnungsstufen 0,1 ml im Dreifachansatz auf Middlebrook 7H10-Agar ausgestrichen. Als Positivkontrolle diente 0,1 ml der Bakteriensuspension, als Negativkontrolle 0,1 ml Puffer (je nach Matrix PBS bzw. Middlebrook 7H9-Bouillon ohne Zusatz von Tween® 80). Zum Schutz vor Austrocknung wurden die Platten mit Parafilm umwickelt. Die beimpften Platten wurden 8-12 Wochen bei 37 °C bebrütet und wöchentlich auf Koloniewachstum und Kontamination überprüft. Das Wachstum von MAP zeigt sich in Form von anfänglich runden, glatten, weißen Kolonien, welche die Tendenz hatten, sich leicht anzuheben sowie matt und hellgelb zu werden. Ältere Kolonien zeigen teilweise Furchenbildung auf der Oberfläche (siehe Abbildung 5).

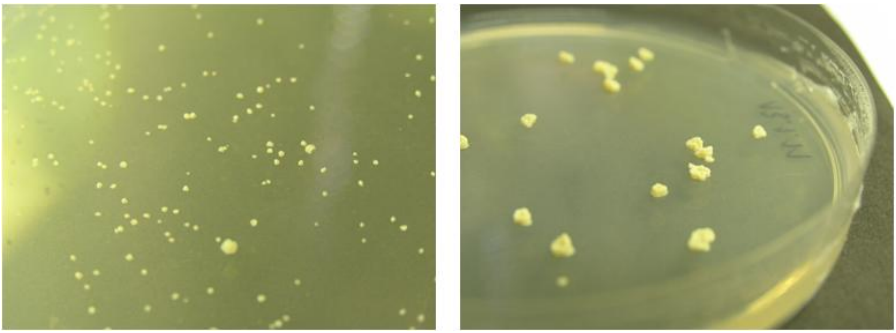


Abbildung 5: Wachstum von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* auf Middlebrook 7H10, Anzucht aus der Verdünnungsreihe, Darstellung der unterschiedichen Koloniemorphologien

Die Anzahl Kolonie-bildender Einheiten pro ml (KbE/ml) wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$c = \frac{\Sigma c}{n_1 * 1 + n_2 * 0{,}1} \cdot d$$

c	gewogener arithmetischer Mittelwert der Koloniezahlen
Σc	Summe der Kolonien aller Platten, die zur Berechnung herangezogen wurden (niedrigste und nächsthöhere auswertbare Verdünnungsstufe)
n_1	Anzahl der Platten der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe
n_2	Anzahl der Platten der nächsthöheren auswertbaren Verdünnungsstufe
d	Verdünnungsfaktor der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe

3.3.4 Artifizielle Kontamination von Rohmilch und Säuglingsanfangsnahrung

Verwendet wurden Rohmilch (siehe Kapitel 3.2.2 Rohmilch) bzw. Säuglingsanfangsnahrung (siehe Kapitel 3.2.3 Säuglingsanfangsnahrung), die am Tag des Einmischversuchs gewonnen und voruntersucht wurden.

Die jeweils negativ auf MAP voruntersuchte Matrix wurde in sterile Zentrifugenröhrchen zu je 9 ml aliquotiert. Rohmilch bzw. Säuglingsanfangsnahrung wurden jeweils mit einem der zuvor aufgeführten Prüfstämmen (siehe Kapitel 3.2.1 Referenz- und Feldstämme) artifiziell kontaminiert. Dazu wurde 1 ml Bakteriensuspension aus jeder Verdünnungsstufe zu jeweils 9 ml vorbereiteter Matrix gegeben. Die Zugabe von 100 µl Triton X-100 (Tasara und Stephan, 2005) soll der Aggregatbildung von MAP entgegenwirken. Die artifiziell kontaminierte Rohmilch bzw. Säuglingsanfangsnahrung wurde 30 Minuten unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde 15 Minuten bei 2500 x g zentrifugiert und das Pellet für die DNA-Extraktion gewonnen. Als Kontrollen wurden unbeimpfte Matrix (Negativkontrolle) sowie unbeimpfter Puffer (Leerwert Aufbereitung) mitgeführt (siehe Kapitel 3.3.6.5 Kontrollen). Die einzelnen Arbeitsschritte sind in Fließdiagramm 3 im Anhang dargestellt.

3.3.5 Extraktion von DNA aus Mykobakterienkulturen

3.3.5.1 Kochen

Zur Extraktion von MAP-DNA wurden mit abgeflammter Impföse 1-2 Kolonien in 150 µl AE Puffer (siehe Kapitel 3.3.6.4 DNeasy® Blood & Tissue Kit) sorgfältig eingerieben. Das Reaktionsgefäß mit der MAP-Suspension wurde für 20 min bei 99 °C inkubiert. Im Anschluss an den thermischen Zellaufschluss wurde für 1 min bei 14000 UpM in der Zentrifuge der Zelldetrius sedimentiert. Der Überstand konnte direkt in die PCR eingesetzt werden.

3.3.5.2 *High Pure PCR Template Preparation Kit*

Die Extraktion von MAP-DNA zur Kontrolle der dekadischen Verdünnungsreihe erfolgt unter Verwendung eines kommerziellen Kits. Die Aufbereitung der DNA erfolgt gemäß dem Fließdiagramm 11 im Anhang.

3.3.6 Extraktion von MAP-DNA aus Rohmilch und Säuglingsanfangsnahrung

3.3.6.1 Precellys® 24

Die Aufbereitung der DNA begann mit einer mechanischen Bearbeitung der Probe durch den Precellys® 24. Dieses System benutzt Hochgeschwindigkeitsbewegungen, die mit Pendelbewegungen im Uhr- und Gegenuhrzeigersinn sowie Auf- und Abbewegungen in der Horizontalen arbeiten. Zum Aufbrechen der Zellwand kommt es durch die in Vibration versetzten Partikel aus Keramik. Die hoch spezialisierte Zellwand schützt MAP vor einer Vielzahl von Stressoren (Brennan und Nikaido, 1995). Zahlreiche Untersuchungen bestätigen die Wirksamkeit einer mechanischen Lyse zur Steigerung der Sensitivität eines Verfahrens (Odumeru et al., 2001; O'Mahony und Hill, 2004). Daher ist dieser Schritt jedem der in dieser Arbeit verwendeten DNA-Extraktionsverfahren vorangestellt.

3.3.6.2 *Maxwell® 16 System*

Maxwell® 16 *Tissue LEV Total RNA Purification Kit*, Artikelnr. AS1220X (Fa. Promega)

Vor jeder Aufbereitung:

- ✓ benötigte Anzahl Kartuschen in den Kartuschenrahmen einsetzen
- ✓ Stößel in Kartuschenvertiefung Nr. 8 einsetzen
- ✓ Elutionsgefäß in vorgesehene Vertiefung einsetzen und 100 µl Nuklease-freies Wasser zugeben
- ✓ Probe in Kartuschenvertiefung Nr. 1 geben

Das automatisierte *Maxwell® 16 System* von Promega ermöglicht laut Hersteller auch aus komplexen Matrizes die Isolation von Nukleinsäuren schnell und vollautomatisch mit hoher Ausbeute und Konzentration. Bis zu 16 Proben lassen sich je nach gewähltem Programm in etwa 30-45 Minuten parallel bearbeiten und je nach verwendetem Kit in einem Endvolumen von 30 bis 100 µl oder 200 bis 400 µl eluieren. Das System besteht aus dem vorprogrammierten Gerät und vorgefüllten Reagenzienkartuschen, die alle erforderlichen Reagenzien und paramagnetische Magnesil-Partikel (PMPs) enthalten. Nachdem die PMPs das Ausgangsmaterial gebunden haben, transferiert ein magnetischer Stößel die Probenkomplexe in die einzelnen Kartuschen zur Lyse und Reinigung. Manuelle Pipettier- und Zentrifugationsschritte entfallen dadurch.

In Vorversuch 1 wurde das Protokoll des Herstellers vergleichend mit verschiedenen modifizierten Protokollen untersucht (siehe Kapitel 3.3.9.1 Vorversuch 1: *Maxwell® 16 System*).

3.3.6.3 *High Pure PCR Template Preparation Kit*

High Pure PCR Template Preparation Kit, Artikelnr. 11796828001 (Fa. Roche, Mannheim)

Vor Einsatz eines neuen Kits:

- ✓ Zugabe von 20 ml abs. Ethanol zum Inhibitor Removal Buffer
- ✓ Zugabe von 80 ml abs. Ethanol zum Wash Buffer
- ✓ Auflösung des Proteinase K-Lyos mit 4,5 ml Nuklease-freiem Wasser, aliquotieren und bei mind. -18 °C lagern (eingefrorene Lsg. 1 Jahr haltbar)

Vor jeder Aufbereitung:

- ✓ **Ansatz der Lysozymlösung:** 120 mg Lysozym/ ml Lysispuffer
- ✓ **Thermomixer vorheizen**
- ✓ **Elution Buffer auf 70 °C vorwärmen** : Es werden Aliquots mit geringen Volumina (für maximal 5 Proben, also ca. 600 µl) vorbereitet, damit der Puffer während einer längeren Verwendung nicht abkühlt.

Bei der Aufbereitung von DNA mit dem *High Pure PCR Template Preparation Kit* werden die Zellen durch Inkubation mit Proteinase K lysiert. Die Gegenwart eines chaotropen Salzes (Guanidin-HCl) führt unmittelbar zur Inaktivierung vorhandener Nukleasen. Die zellulären Nukleinsäuren binden selektiv an spezielle Glasfasern, die sich in den High Pure Filterröhrchen befinden. Die gebundenen Nukleinsäuren werden in einer Reihe schneller Wasch- und Zentrifugationsschritten von Salzen, Proteinen und anderen verunreinigenden zellulären Komponenten gereinigt. Schließlich löst eine salzarme Elution die Nukleinsäuren von den Glasfasern.

In Vorversuch 2 wurde das Protokoll des Herstellers vergleichend mit verschiedenen modifizierten Protokollen untersucht (siehe Kapitel 3.3.9.2 Vorversuch 2*: High Pure PCR Template Preparation Kit*).

3.3.6.4 *DNeasy® Blood & Tissue Kit*

DNeasy® Blood & Tissue Kit, Artikelnr. 69506 (Fa. Qiagen, Hilden)

Vor Einsatz eines neuen Kits:

- ✓ Zugabe von 125 ml abs. Ethanol zu Puffer AW 1
- ✓ Zugabe von 160 ml abs. Ethanol zu Puffer AW 2

Vor jeder Aufbereitung:

- ✓ **Ansatz der Lysozymlösung:** 120 mg Lysozym/ ml Lysispuffer
- ✓ **Thermomixer vorheizen**
- ✓ Stets vor Gebrauch alle **Puffer auf Kristallbildung prüfen** und gegebenenfalls unter warmem fließenden Wasser oder bei 56 °C bis zur vollständigen Auflösung der Kristalle erwärmen.

Die Reinigung von DNA mit dem *DNeasy® Blood & Tissue Kit* basiert auf der Bindung der DNA an eine Silica-Membran. Nach der enzymatischen Lyse mit Proteinase K wird die DNA an das Siliciumdioxid in den DNeasy Mini Spinsäulen gebunden, während Verunreinigungen, Proteine und zweiwertigen Kationen durch Zentrifugation entfernt werden. In zwei Waschschritten wird die an die Säule gebundene DNA von weiteren Verunreinigungen und Enzyminhibitoren entfernt. Durch chaotrope Salze im Puffer AW 1 werden Nukleasen inaktiviert. Zum Schluss wird mit einem salzarmen Puffer eluiert und man erhält das Ausgangsprodukt für die nachfolgende PCR.

In Vorversuch 3 wurde das Protokoll des Herstellers vergleichend mit verschiedenen modifizierten Protokollen untersucht (siehe Kapitel 3.3.9.3 Vorversuch 3: *DNeasy® Blood & Tissue Kit*).

3.3.6.5 Kontrollen

Sowohl bei der Aufbereitung als auch in der PCR wurden Kontrollen mitgeführt, um Kreuzkontaminationen auszuschließen. Die folgende Auflistung gibt einen Überblick, über die Kontrollen, die bei jeder Aufbereitung und bei jedem PCR-Lauf mitgeführt werden.

Kontrollen der Aufbereitung:

- Negativkontrolle: ungespikte Matrix (Milch oder Säuglingsanfangsnahrung)
- Leerwert Aufbereitung: Mitführen der verwendetene Reagenzien aus dem jeweiligen Aufbereitungs-Kit

Kontrollen der PCR:

- Positivkontrolle MAP: DNA des MAP-Stammes K10 (ATCC® BAA-968™)
- Leerwert PCR-Reagenzien: Einsatz des Reagenzien-Mixes in die PCR, anstelle von Proben-DNA wird Nuklease-freies Wasser verwendet

3.3.7 Molekularbiologischer Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*

MAPsureEasy® (MSE) Real Time-PCR-Kit (Fa. TransMIT, Gießen)

Zum Nachweis von MAP in Rohmilch und Säuglingsanfangsnahrung sowie zur Bestätigung von MAP in Flüssig- und Festmedien wurde das MAPsureEasy® Real Time-PCR Kit verwendet. Dieses wurde in Anlehnung an die institutseigene TaqMan® Real Time-PCR nach Schönenbrücher et al. (2008) entwickelt. Der Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* erfolgt über die MAP-spezifische Gensequenz *f*57. Eine Interne Amplifikationskontrolle (IAK) wird mitgeführt.

qPCR-Mastermix

Der doppelt konzentrierte *2x qPCR-Mastermix* enthält die für die PCR benötigte Polymerase, die Nukleotide sowie Puffer. Es handelt sich um das kommerziell erhältliche Produkt *qPCR Mastermix plus without UNG* der Firma Eurogentec.

Oligonukleotid-Mix

Der im Kit enthaltene 25fach konzentrierte *25x MAP Oligonukleotid Mix* enthält das Primer-Paar zum Nachweis der Referenz-Sequenz *f*57 mit der zugehörigen Sonde sowie eine Sonde für die Interne Amplifikationskontrolle.

Die Gestaltung des sequenzspezifischen Oligonukleotid-Primer-Paares basiert auf der MAP-Referenz-Sequenz *f*57 (Zugangsnummer X70277 und AE016958), die im National Center for Biotechnology (NCBI) veröffentlicht wurde. Bei den enthaltenen Sonden handelt es sich um TaqMan®$_{mgb}$-Sonden. Für den Marker *f*57 wurde diese am 5'-Ende mit dem Reporterfarbstoff VIC (522 nm) markiert, für die IAK mit dem Reporterfarbstoff FAM (553 nm).

Eine Übersicht über die Primer und Sonden ist in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Primer und Sonden im Oligonukleotid-Mix des MAPsureEasy® Kits

Nomenklatur	Sequenz (Größe)
*f*57-F Vorwärtsprimer	5' – TAC GAG CAC GCA GGC ATT C – 3' (19-mer)
*f*57-R Rückwärtsprimer	5' – CGG TCC AGT TCG CTG TCA T – 3'(19-mer)
*f*57po-TaqMan® Sonde	VIC-CCT GAC CAC CCT TC-MGB (14-mer)
IAK MSE TaqMan® Sonde	FAM-AGC AAT AAA CCA GCC AGC-MGB (18-mer)

Interne Amplifikationskontrolle

Die Interne Amplifikationskontrolle (IAK) dient dem Erkennen von falsch-negativen Ergebnissen in der PCR. Diese können durch Hemmstoffe in der Probe entstehen.

Die IAK-DNA des MSE-Kits wird aus dem kommerziell erhältlichen Plasmid pUC 19 in einem eigenen PCR-Verfahren passend zu dem Primerpaar für *f*57 hergestellt (Abdulmawjood et al., 2002). Das gewonnene Amplifikat wurde mittels kommerziellem Kit der Firma Qiagen aufgereinigt und bei -18 °C gelagert.

Positivkontrolle MAP

Bei der Positivkontrolle MAP handelt es sich um DNA, die aus dem MAP-Stamm K10 (ATCC® BAA-968™) gewonnen wird.

PCR-Protokoll

Die Lagerung des Oligonukleotid-Mixes sowie des qPCR-Mastermixes erfolgt bei -20 °C, die IAK und die Positivkontrolle MAP lagern gekühlt bei +4 bis +8 °C.

Der Ansatz der PCR erfolgte räumlich getrennt von der DNA-Extraktion unter dem UV-Kabinett. Dabei wurden die einzelnen Bestandteile gekühlt. Der PCR-Ansatz wurde gemäß des Protokolls in Tabelle 11 aus den einzelnen Bestandteilen des MSE Real Time-PCR-Kits pipettiert. Die Angaben in Tabelle 11 gelten für n=1. Bei der Berechnung der Gesamtmenge der Ansätze wurden die Probenzahl sowie mitgeführte Kontrollen (siehe Kapitel 3.3.6.5 Kontrollen) berücksichtigt.

Für jeden Ansatz wurden 20 µl des Reagenzien-Mixes gemäß Tabelle 11 sowie 5 µl der Proben-DNA in die Vertiefung der PCR-Platte pipettiert. Im Anschluss daran wurde die PCR-Platte mit Adhäsionsfolie verschlossen. Nach einer kurzen Zentrifugation der Platte wurde diese in das Real Time-PCR-Gerät eingesetzt.

Tabelle 11: Pipettierprotokoll (25 µl Ansatz) für die MAPsureEasy® Real Time-PCR

Bestandteile und deren Konzentration	Pipettiermenge pro Ansatz (µl)
Nuklease freies Wasser	5,5
2x qPCR Mastermix	12,5
25x MAP Oligonukleotid Mix	1,0
Interne Amplifikationskontrolle (DNA)	1,0
DNA Probe	5,0
Inhalt pro Reaktionsgefäß	25,0

Die PCR wurde mit dem ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System von Applied Biosystems durchgeführt. Die Programmierung des Cyclers ist in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Thermocycler-Programm für die Real Time-PCR

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	1x
Denaturierung	95 °C	15 s	45x
Annealing/Extension	60 °C	1 min	

Auswertung der PCR

Die Auswertung der Real Time-PCR-Läufe erfolgte mit der mitgelieferten Software SDS v1.2 RQ Study Results. Ein Lauf galt als auswertbar, wenn die Kontrollreaktionen die erwarteten Reaktionen zeigten (siehe Tabelle 13). Eine Probe galt als **positiv** für den Nachweis von MAP-DNA, wenn das Detektionssystem VIC eine Amplifikation der Proben-DNA mit einem Ct-Wert < 40 anzeigt. Eine Probe wurde als **negativ** gewertet, wenn das Detektionssystem VIC keine Amplifikation der Proben-DNA anzeigte bzw. der Ct-Wert ≥ 40 war. Die Interne Amplifikationskontrolle (IAK) muss in diesem Fall positiv sein. Zeigen sowohl Proben-DNA als auch IAK kein Signal, enthält die Probe Substanzen, die die PCR inhibieren. In diesem Fall wurde der Test mit einer DNA-Verdünnung von 1:2 in Nuklease-freiem Wasser wiederholt.

Tabelle 13: Interpretation der Ct-Werte der MAPsureEasy® Real Time-PCR

Ct-Werte	MAP (VIC)	IAK (FAM)
MAP-positive Probe	<40	beliebig
MAP-negative Probe	≥40	≤36
Negativkontrolle Matrix	kein Signal*	<36
Leerwert Aufbereitung	kein Signal*	<36
Positivkontrolle MAP	<28	beliebig
Leerwert PCR-Reagenzien	kein Signal*	<36

* keine sigmoide Signalkurve

3.3.8 Kulturelle Anzucht von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* aus Rohmilch und Säuglingsanfangsnahrung

In Anlehnung an Ayele et al. (2005) erfolgte die kulturelle Anzucht auf Herrold's Egg Yolk-Medium mit Zusatz von Mycobactin J, Amphotericin B, Nalidixinsäure und Vancomycin (siehe Kapitel 3.2.7.1 Herrold's Egg Yolk-Medium (HEYM)).

Im Vorfeld erfolgte die Dekontamination der Proben mit 10 ml 0,75% HPC für 5 Stunden (Dundee et al., 2001). Dazu wurde unter Berücksichtigung der Probenzahl und Kontrollen 0,075 g HPC/10 ml für die entsprechende Menge steriles Aqua dest. eingewogen und aufgelöst. Die Lösung mit dem HPC wurde auf die zu dekontaminierende Probe gegeben und gründlich gevortext. Die Inkubation erfolgte lichtgeschützt bei Raumtemperatur für 5 Stunden. Im Anschluss wurden die Proben für 15 Minuten bei 2500 x g zentrifugiert. Das verbleibende Pellet wurde in 200 µl PBS resuspendiert und auf Herrold's Egg Yolk-Medium ausgestrichen. Die Anzucht erfolgte für 12-16 Wochen bei 37 °C und wurde wöchentlich dokumentiert. Die einzelnen Arbeitsschritte sind in Fließdiagramm 4 im Anhang dargestellt.

Das Wachstum von MAP zeigte sich in Form von anfänglich runden, glatten, weißen Kolonien, welche die Tendenz hatten, sich leicht anzuheben sowie matt und hellgelb zu werden. Ältere Kolonien zeigten teilweise Furchenbildung auf der Oberfläche (siehe auch Kapitel 2.2.3 Kultureller Nachweis). Eine repräsentative Anzahl an typischen Kolonien wurde mittels MAP-spezifischer Real Time-PCR bestätigt. Die DNA wurde durch Kochen gewonnen (siehe Kapitel 3.3.5 Extraktion von DNA aus Mykobakterienkulturen) und im Anschluss molekularbiologisch bestätigt (siehe Kapitel 3.3.7 Molekularbiologischer Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*).

Die Bestätigung verdächtiger Kolonien erfolgte auf die gleiche Weise. Waren keine verdächtigen Kolonien sichtbar oder nicht eindeutig identifizierbar, so wurde eine Spülprobe von dem Kulturmedium gewonnen (AVID-Methodensammlung, 2007). Dazu wurde 1 ml steriler PBS-Puffer auf das Herrold's Egg Yolk-Medium gegeben und der Schrägagar für 5 min geschwenkt. Mit einer sterilen Pasteurpipette wurde der Puffer zurückgewonnen und nach dem gleichen Verfahren wie verdächtige Einzelkolonien molekularbiologisch untersucht.

3.3.9 Vorversuche

In den Vorversuchen wurden an den kommerziell erhältlichen Kits verschiedene Modifikationen getestet, die auf die Besonderheiten des Erregers *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* abgestimmt waren.

Als Referenzstamm diente für die Vorversuche der Stamm K10. In Abbildung 6 ist der Aufbau dieser Einmischversuche wiedergegeben. Dieses Vorgehen ist in den Kapiteln 3.3.1 bis 3.3.4 detailliert beschrieben.

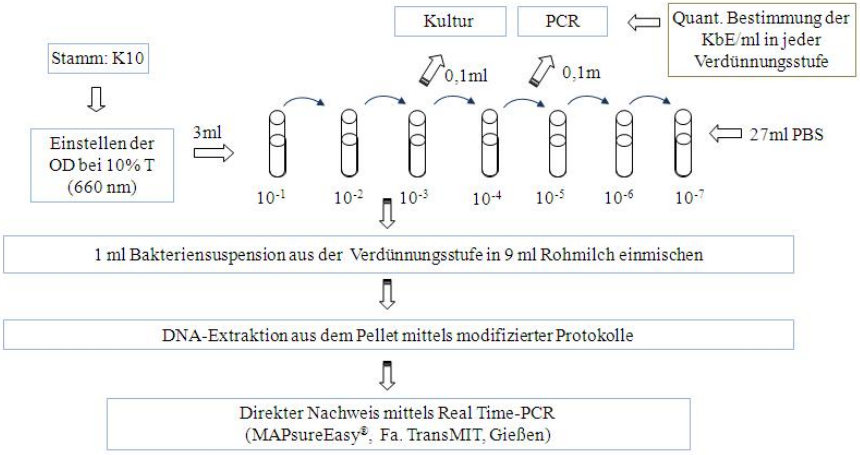


Abbildung 6: Aufbau der Vorversuche zum Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Milch

Die mittels Zählkammer und kultureller Anzucht aus der Verdünnungsreihe ermittelten Keimzahlen von MAP sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Ermittelte Zellzahlen für *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in den Vorversuchen 1 bis 3 mittels Zählkammer und kultureller Anzucht

Vorversuch	Verwendetes Kit	Zellzahl MAP-Suspension (KbE/ml)	
		Zählkammer	Kultur
1	Tissue LEV Total RNA Purification	$1{,}3 \times 10^8$	$1{,}4 \times 10^7$
2	High Pure PCR Template Preparation	$2{,}2 \times 10^8$	$5{,}8 \times 10^7$
3	DNeasy® Blood & Tissue	$3{,}3 \times 10^8$	$1{,}9 \times 10^7$

Die Beschreibung der verwendeten Protokolle für die einzelnen Kits der drei unterschiedlichen Hersteller erfolgt in den folgenden Kapiteln.

Für die Isolierung der DNA wurden mit jedem Protokoll die Verdünnungsstufen 10^{-4} bis 10^{-7} im Dreifachansatz aufbereitet und in drei unabhängigen Läufen mittels PCR untersucht. Dies ergab 12 Aufbereitungen sowie 36 PCR-Ergebnisse je Protokoll. Es wurden bei jedem Vorversuch die Reagenzien verwendet, die im jeweiligen Kit enthalten waren oder in Kapitel 3.2.8 beschrieben wurden. Im Anschluss an die Durchführung der modifizierten Protokolle erfolgte der molekularbiologische Nachweis wie in Kapitel 3.3.7 beschrieben. Die statistische Auswertung erfolgte wie in Kapitel 3.3.12 beschrieben.

3.3.9.1 Vorversuch 1: *Maxwell® 16 System*

Geräteeinstellungen

Für die vorliegende Fragestellung wurde von der Firma Promega das *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* empfohlen. LEV steht für Low Elution Volume (30-100 µl) und ermöglicht mit einem Elutionsvolumen von 100 µl, das dem der beiden anderen DNA-Extraktionsverfahren entspricht, eine Vergleichbarkeit mit den anderen Aufbereitungsverfahren. Alternativ dazu kam auch das *LEV Blood DNA Kit* in Frage. Nach der Durchführung einiger Probeläufe (unveröffentlichte Ergebnisse) wurde das *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

Die unterschiedlichen Protokolle des Gerätes unterscheiden sich in Dauer und Anzahl der Lysis- und Reinigungsschritte, um je nach Probenmatrix eine effektive Reinigung bei hoher Ausbeute erzielen zu können. Zur Bearbeitung von Rohmilch und Säuglingsanfangsnahrung wurde vor dem Hintergrund der im Programm verwendeten Lysis- und Reinigungsschritte das Protokoll *Gesamte virale Nukleinsäure* mit einer Gesamtlaufzeit von 45 min ausgewählt. Dieses Programm erschien aufgrund verlängerter Lysis und vermehrter Waschschritte am erfolgversprechendsten.

DNA-Isolierung

Unter Berücksichtigung der institutseigenen wissenschaftlichen Erfahrungen im Hinblick auf die Isolation von MAP-DNA sowie den in der Fachliteratur beschriebenen Verfahren (Odumeru et al., 2001; O'Mahony et al., 2004; Tasara und Stephan, 2005) wurden in Rücksprache mit dem Hersteller verschiedene Protokolle entworfen. Diese wurden auf ihre Wirksamkeit für eine optimierte Extraktion der MAP-DNA zur Verwendung in der Real Time-PCR untersucht.

Eine Übersicht der Modifikationen findet sich in Tabelle 15.

Tabelle 15: Übersicht der Modifikationen für das *Maxwell® 16 System* in Vorversuch 1

	Precellys® 24[1)]	Proteinase K[2)]	Lysozym[2)]
Protokoll 1		nach Herstellerangaben[3)]	
Protokoll 2	x		
Protokoll 3	x	x	x
Protokoll 4	x	x	
Protokoll 5	x		x

[1)] nach Odumeru et al. (2001)
[2)] in Rücksprache mit dem Hersteller
[3)] Probenmaterial wird direkt in die Kartusche gegeben

Protokoll 1 entspricht den Herstellerangaben. Dieser gibt an, dass das zu untersuchende Material ohne weitere Vorbehandlung direkt in die Kartusche gegeben werden kann. Das Pellet der vorbereiteten Probe wurde direkt in dem im Lieferumfang des Kits enthaltenen Lysis Puffer resuspendiert und in die Kartusche des *Maxwell® 16 System* eingesetzt.

Protokoll 2 beinhaltet als zusätzlichen Schritt eine mechanische Homogenisierung mittels Precellys® 24 (siehe Kapitel 3.3.6.1 Precellys® 24). Diese wurde für 2x20 s bei 5.500 UpM mit 60 s Pause durchgeführt.

Protokoll 3 sieht neben der mechanischen Homogenisierung als weitere Vorbehandlungen die Inkubation mit Lysozym für zwei Stunden bei 37 °C und Proteinase K für 20 min bei 56 °C vor. Für die Resuspension des Probenpellets wurde daher anstelle des Lysis Puffers ein TE-Puffer verwendet, da durch das im Lysis Puffer enthaltene Guanidinthiocyanat die Proteinase K deaktiviert worden wäre. Die Zugabe des Lysis-Puffers erfolgte daher erst im Anschluss an diese beiden Inkubationsschritte.

Protokoll 4 entspricht mit Ausnahme der Inkubation mit Lysozym Protokoll 3.

Protokoll 5 entspricht mit Ausnahme der Inkubation mit Proteinase K ebenfalls Protokoll 3.

Im Anschluss daran erfolgte die Aufbereitung mit dem Programm *Gesamte virale Nukleinsäure* im *Maxwell® 16 System*. Das Eluat konnte direkt in die PCR eingesetzt werden. Die Lagerung erfolgte bei +4 bis +8 °C, eine längerfristige Aufbewahrung bei –25 °C.

Die einzelnen Arbeitsschritte der Protokolle sind in Fließdiagramm 5: Modifizierte Protokolle für den Vorversuch mit dem *Maxwell® 16 System*im Anhang dargestellt.

3.3.9.2 Vorversuch 2: *High Pure PCR Template Preparation Kit*

Für den Vorversuch 2 wurden zwei unterschiedliche Protokolle verwendet.

Protokoll 1 entspricht den Herstellerangaben, die im Handbuch des Kits zur *Aufbereitung von Bakterien oder Hefezellen* aufgeführt sind. Dazu wurde das Probenpellet in 200 µl PBS resuspendiert. Es erfolgte eine Inkubation mit 5µl Lysozymlösung für 15 min bei 37 °C. Im nächsten Schritt wurden gleichzeitig 40 µl Proteinase K sowie 200 µl Binding Puffer zugegeben, die für 10 min bei 70 °C inkubiert wurden. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 100 µl Isopropanol.

Im weiteren Verlauf wurde die Probe über das High Pure Filter Tube gegeben und es folgten mehrere Waschschritte, bei denen der zugegebene Puffer jeweils für 1 min mit 8.000 x g durch die zwei Schichten Glasfaservlies des Filterröhrchens gedrückt wurde. Der Durchfluss wurde verworfen und das Filterröhrchen in ein neues Sammelgefäß gesetzt. Zunächst wurden 500 µl Inhibitor Removal Puffer auf die Probe gegeben, es folgten zwei Zentrifugationsschritte mit Waschpuffer. Vor Zugabe des Elutionspuffers wurde das Filterröhrchen für 1 min bei 13 000 x g zentrifugiert, um letzte Alkohol- und Pufferreste zu entfernen und den Filter weitgehend zu trocknen. Für den nächsten Schritt wurde das Filterröhrchen in ein vorbeschriftetes Reagiergefäß gesetzt. Die Elution wurde mit 100 µl des vorgewärmten Puffers durchgeführt. Das Eluat enthielt die gereinigte DNA und konnte direkt in die PCR eingesetzt werden. Die Lagerung erfolgte bei +4 bis +8 °C, eine längerfristige Aufbewahrung bei –25 °C.

Protokoll 2 ist ein bereits im IFTN vorhandenes Protokoll, das unter Berücksichtigung der Erfahrungen mit MAP sowie den in der Fachliteratur beschriebenen Ergebnissen (Odumeru et al., 2001; O'Mahony et al., 2004; Tasara und Stephan, 2005) erstellt wurde. Dieses modifizierte DNA-Aufbereitungsprotokoll beinhaltet einen Schritt der mechanischen

Homogenisierung mittels Precellys® 24 (siehe Kapitel 3.3.6.1 Precellys® 24) und verwendet für die Verdauschritte vor der Säulenextraktion anstelle des PBS-Puffers einen Lysispuffer mit Triton X-100 und Lysozym (siehe Kapitel 3.2.8.4 Lysispuffer zur Vorbehandlung grampositiver Bakterien). Im Zuge dieser Modifikation wurde die zur Resuspension verwendete Menge an Puffer auf 300 µl erhöht, damit die Lysingtubes (Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel (2 ml) und sterilen SiLibeads®) ausreichend Probenmatrix zur Verfügung haben, um optimal arbeiten zu können. Die Homogenisierung erfolgte für 2x20 s bei 5.500 UpM mit 60 s Pause. Da Triton ein nichtionisches Tensid ist, würde es aufgrund seines amphiphilen Charakters in Kombination mit den SiLibeads® bei der mechanischen Homogenisation schäumen. Daher wurde der Einsatz des Puffers modifiziert. Zur Resuspension der Probe wurde der Puffer ohne Zugabe von Triton und Lysozym verwendet (siehe Kapitel 3.2.8.3 TE-Puffer). Triton und Lysozym kamen nach der mechanischen Homogenisierung der Probe in Form eines Puffers mit erhöhter Konzentration an Triton und Lysozym zum Einsatz (siehe Kapitel 3.2.8.5 Lysispuffer mit Triton und Zugabe von Lysozym vor Gebrauch), so dass die Gesamtkonzentration am Ende wieder der Zusammensetzung des ursprünglichen Puffers (siehe Kapitel 3.2.8.4 Lysispuffer zur Vorbehandlung grampositiver Bakterien) entsprach. Es folgte eine verlängerte Inkubation bei niedrigerer Temperatur mit Proteinase K für 1 Stunde bei 65 °C (Tasara und Stephan, 2005; Bates et al., 1974). Das weitere Protokoll entspricht dem vorherigen, mit dem Unterschied, dass die Mengen der vom Hersteller vorgegebenen Puffer (Binding Buffer und Isopropanol) verdoppelt wurden, um die Verhältnisse zu wahren. Aufgrund des großen Probenvolumens wurde das Überführen auf das Filterröhrchen in zwei Schritten durchgeführt, zwischendurch wurde 1 min bei 8.000 x g zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und das Filterröhrchen in ein neues Sammelgefäß gesetzt. Alle übrigen Schritte sind identisch mit dem vorangegangenen Protokoll.

Die einzelnen Arbeitsschritte der Protokolle sind in Fließdiagramm 6 und Fließdiagramm 7 im Anhang dargestellt.

3.3.9.3 Vorversuch 3: *DNeasy® Blood & Tissue Kit*

Wie bei den vorangegangenen Vorversuchen wurde unter Berücksichtigung der institutseigenen wissenschaftlichen Erfahrungen sowie den in der Fachliteratur beschriebenen Verfahren (Odumeru et al., 2001; O'Mahony et al., 2004; Tasara und Stephan, 2005) verschieden Protokolle entworfen. Diese wurden auf ihre Wirksamkeit für eine optimierte Extraktion der MAP-DNA zur Verwendung in der Real Time-PCR untersucht.

Eine Übersicht der Modifikationen findet sich in Tabelle 16.

Tabelle 16:Übersicht der Modifikationen für das *DNeasy® Blood & Tissue Kit* in Vorversuch 3

	Besonderheit
Protokoll 1	nach Herstellerangaben
Protokoll 2	mit Precellys® 24
Protokoll 3	verlängerte Inkubation von Proteinase K und Lysozym

Protokoll 1 entspricht den Herstellerangaben, die im Handbuch des Kits zur *Aufbereitung von gram-positiven Bakterien* aufgeführt sind. Dazu wurde das Probenpellet in 180 µl Lysispuffer mit Triton und Lysozym (siehe Kapitel 3.2.8.4 Lysispuffer zur Vorbehandlung grampositiver Bakterien) resuspendiert und für 30 min bei 37 °C im Thermomixer schüttelnd inkubiert. Im Anschluss wurden 25 µl Proteinase K und 200 µl Puffer AL zugegeben und für 30 min bei 56 °C schüttelnd inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur sowie gründlichem vortexen der Probe erfolgte die Zugabe von 200 µl absolutem Ethanol.

Im weiteren Verlauf wurde die Probe über die DNeasy® Mini Spin Column gegeben und es folgten mehrere Waschschritte, bei denen der zugegebene Puffer jeweils für 1 min mit ≥ 6.000 x g durch die Silica Membran des Filterröhrchens gedrückt wird. Der Durchfluss wurde verworfen und das Filterröhrchen in ein neues Sammelgefäß gesetzt. Es folgten zwei Waschschritte mit den im *DNeasy® Blood & Tissue Kit* enthaltenen Puffern AW 1 und AW 2, jeweils mit 500 µl. Nach der Zugabe von Puffer AW 1 wurde die Probe für 1 min mit ≥ 6.000 x g zentrifugiert, nach der Zugabe von Puffer AW 2 wurde für 3 min bei 20 000 x g zentrifugiert. Vor Zugabe des Puffers AE wurde das Filterröhrchen für 1 min bei 20 000 x g zentrifugiert, um letzte Alkohol- und Pufferreste zu entfernen und den Filter weitgehend zu trocknen. Für den nächsten Schritt wurde das Filterröhrchen in ein vorbeschriftetes Reagiergefäß gesetzt. Die Elution wurde mit 100 µl des Puffers AE durchgeführt. Dieser wurde direkt auf den Filter gegeben und 1 min bei Raumtemperatur einwirken gelassen. Es

wurde erneut für 1 min bei ≥ 6.000 x g zentrifugiert. Das Eluat enthielt die gereinigte DNA und konnte direkt in die PCR eingesetzt werden. Die Lagerung erfolgte bei +4 bis +8 °C, eine längerfristige Aufbewahrung bei –25 °C.

Protokoll 2 beinhaltet als zusätzlichen Schritt eine mechanische Homogenisierung mittels Precellys® 24 (siehe Kapitel 3.3.6.1 Precellys® 24). Im Zuge dieser Modifikation kam es zu zwei Änderungen im Protokoll. Die Resuspension der Probe benötigte aufgrund der mechanischen Homogenisation die doppelte Menge des Lysispuffers. Außerdem kam der Lysispuffer mit Triton und Lysozym (siehe Kapitel 3.2.8.4 Lysispuffer zur Vorbehandlung grampositiver Bakterien) modifiziert zum Einsatz, da das Schäumen des Tritons die mechanische Homogenisation gestört hätte. Zur Resuspension der Probe wurde der Puffer ohne Zugabe von Triton und Lysozym verwendet (siehe Kapitel 3.2.8.3 TE-Puffer). Triton und Lysozym kamen nach der mechanischen Homogenisierung der Probe in Form eines Puffers mit erhöhter Konzentration an Triton und Lysozym zum Einsatz (siehe Kapitel 3.2.8.5 Lysispuffer mit Triton und Zugabe von Lysozym vor Gebrauch), so dass die Gesamtkonzentration am Ende wieder dem ursprünglichen Rezept (siehe Kapitel 3.2.8.4 Lysispuffer zur Vorbehandlung grampositiver Bakterien) entsprach. Die Inkubation der Probe erfolgte wie in Protokoll 1, ebenso wie die weiteren Schritte des Protokolls. Die Menge des absoluten Ethanols wurde äquivalent zur Verdopplung des Lysispuffers zu Beginn des Protokolls auf 400 µl verdoppelt.

Protokoll 3 entspricht mit Ausnahme der Inkubationszeiten Protokoll 2. Diese wurden sowohl für den Lysispuffer mit Triton und Lysozym als auch für Proteinase K und den Puffer AL auf 90 min verlängert. Die Inkubationstemperaturen blieben unverändert, ebenso wie die restlichen Arbeitsschritte.

Die einzelnen Arbeitsschritte der Protokolle sind in Fließdiagramm 8 und Fließdiagramm 9 im Anhang dargestellt.

3.3.10 Hauptversuche

3.3.10.1 Hauptversuch1: Rohmilch

In Hauptversuch 1 wurde mit der Matrix Rohmilch gearbeitet. Diese wurde mit den drei aus den Vorversuchen bekannten Systemen aufbereitet. Die DNA-Extraktion erfolgte dabei vergleichend mit den beiden Extraktionskits *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche, Mannheim) und *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Fa. Qiagen, Hilden) sowie dem automatisierten *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega, Mannheim). Basierend auf den Ergebnissen der Vorversuche wurde jeweils das vielversprechendste modifizierte Protokoll ausgewählt und für die Aufbereitung der DNA in den Hauptversuchen verwendet.

Als Referenzstämme dienten für den Hauptversuch 1 die Stämme K10, 423, 44135 und NB (siehe Kapitel 3.2.1 Referenz- und Feldstämme). Die für den Hauptversuch 1 durchgeführten Einmischversuche wurden, wie in Abbildung 7 dargestellt, durchgeführt. Das Vorgehen von der Anzucht der Referenzstämme über die Herstellung der Verdünnungsreihe und die quantitative Bestimmung der Zellzahl aus den Verdünnungsstufen bis hin zur artifiziellen Kontamination der Rohmilch ist in den Kapiteln 3.3.1 bis 3.3.4 detailiert beschrieben.

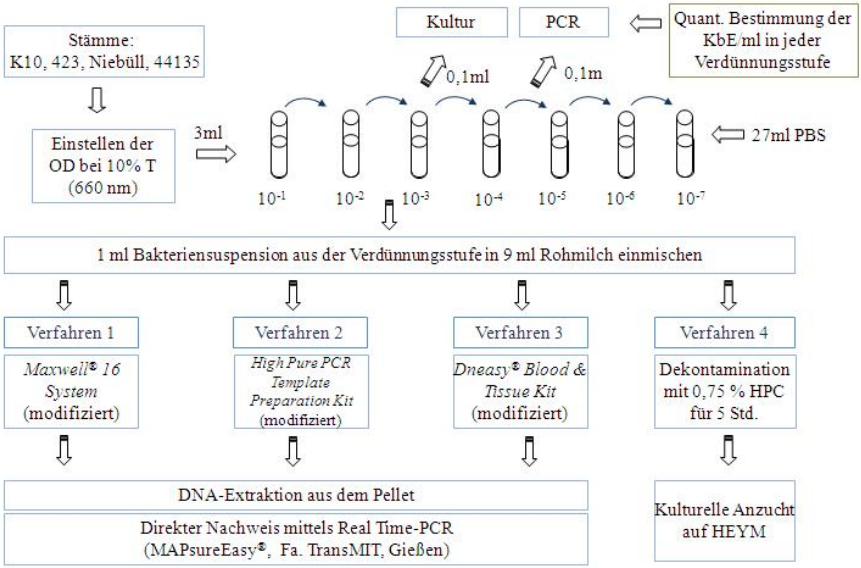


Abbildung 7: Versuchsaufbau zum Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Milch

Die mittels Zählkammer und kultureller Anzucht aus der Verdünnungsreihe ermittelten Zellzahlen von MAP sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Ermittelte Zellzahlen für *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in Hauptversuch 1 mittels Zählkammer und kultureller Anzucht

Verwendeter Stamm	Zellzahl MAP-Suspension (KbE/ml)	
	Zählkammer	Kultur
K10	$1{,}2 \times 10^8$	$7{,}8 \times 10^6$
423	$2{,}0 \times 10^8$	$1{,}7 \times 10^8$
44135	$2{,}0 \times 10^8$	$3{,}7 \times 10^7$
Niebüll	$1{,}5 \times 10^8$	$1{,}3 \times 10^7$

Abbildung 8 zeigt beispielhaft für den Hauptversuch 1 die Amplifikationssignale des Markers *f*57 der Verdünnungsreihe des Stammes Niebüll vor der artifiziellen Kontamination der Rohmilch. Die Ausgangskonzentration des unverdünnten Stammes, dessen optische Dichte (OD) mittels Photometer bei 10,2% Transmission eingestellt wurde, betrug $1{,}5 \times 10^8$ KbE/ml (siehe Tabelle 17). Zur Überprüfung der dekadischen Verdünnung wurde die DNA direkt aus den Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-7} isoliert. Eine Verdünnungsreihe erwies sich als geeignet für die artifizielle Kontamination von Rohmilch, wenn die Abstände zwischen den Ct-Werten der einzelnen Verdünnungsstufen gleichmäßig waren.

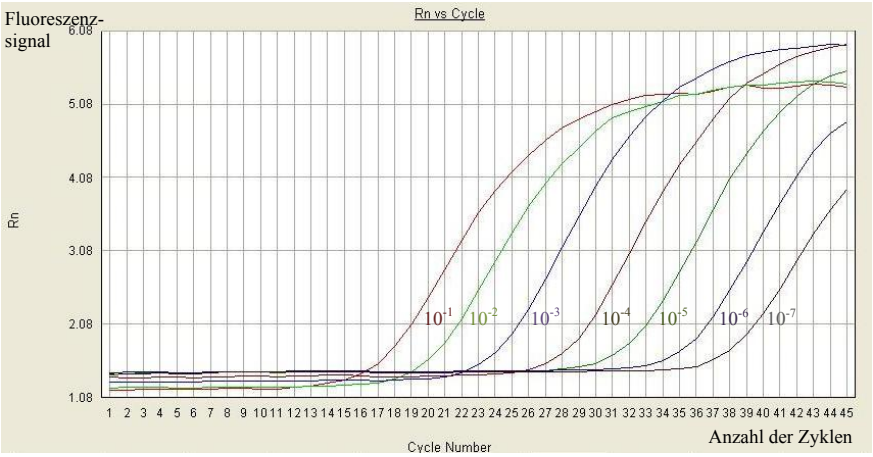


Abbildung 8: Darstellung des Amplifikationsplots am Beispiel von MAP-Stamm Niebüll

Abbildung 9 zeigt die Standardkurve der dekadischen Verdünnungsreihe des Stammes Niebüll zu dem in Abbildung 8 gezeigten Amplifikationsplot. Diese zeigt die lineare, umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der Konzentration der eingesetzten DNA und dem Ct-Wert.

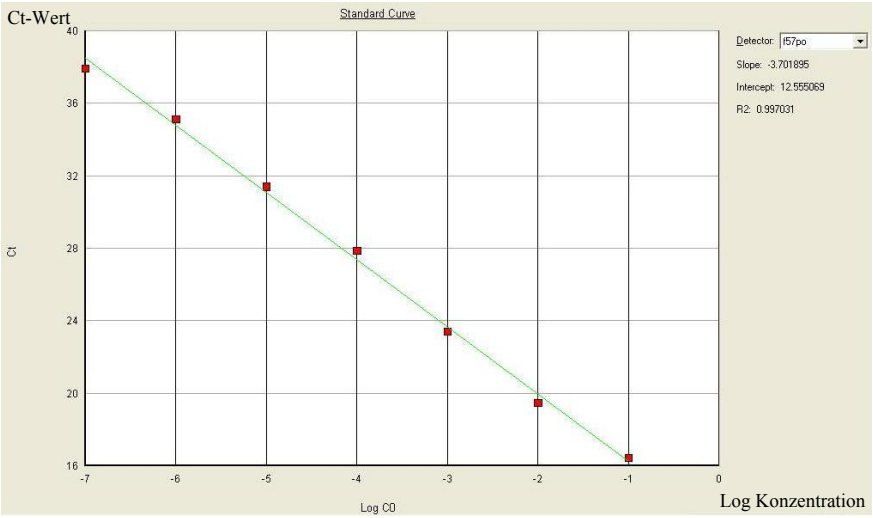


Abbildung 9: Darstellung der Standardkurve der dekadischen Verdünnungsreihe am Beispiel von MAP-Stamm Niebüll

DNA-Isolierung

Für jeden Stamm wurde ein eigener Einmischversuch durchgeführt. Die Isolierung der DNA von MAP aus artifiziell kontaminierter Rohmilch erfolgte mit den zuvor genannten drei unterschiedlichen DNA-Extraktionsverfahren. Für jedes Kit wurde ein modifiziertes Protokoll verwendet, das unter Berücksichtigung der institutseigenen wissenschaftlichen Erfahrungen im Hinblick auf die Isolation von MAP-DNA sowie den in der Fachliteratur beschriebenen Verfahren konzipiert worden war. Die Wirksamkeit im Hinblick auf eine optimierte Extraktion von MAP-DNA zur Verwendung in der Real Time-PCR konnte in den Vorversuchen gezeigt werden (siehe Kapitel 3.3.9 Vorversuche).

Die Aufbereitung erfolgte mit jedem Protokoll (n=3) für die Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-7} sowie die native Rohmilch (n=8) im Dreifachansatz und wurde in drei unabhängigen Läufen mittels PCR untersucht. Dies ergab 24 Aufbereitungen sowie 72 PCR-Ergebnisse je Protokoll und Stamm. Unter Berücksichtigung aller Verfahren (n=3) und Stämme (n=4) standen für die statistische Auswertung insgesamt 864 PCR-Ergebnisse zur Verfügung. Eine Übersicht zu den im Hauptversuch 1 durchgeführten DNA-Aufbereitungen sowie den erhaltenen PCR-Ergebnissen zeigen Tabelle 18 und Tabelle 19.

Tabelle 18: DNA-Aufbereitungen im Hauptversuch 1 unter Berücksichtigung aller Stämme (n=4) und Verfahren (n=3)

Protokoll* / Verd.-stufe	Stamm K10			Stamm 423			Stamm 44135			Stamm NB			Σ
	M	R	Q	M	R	Q	M	R	Q	M	R	Q	
10^{-1}	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	36
10^{-2}	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	36
10^{-3}	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	36
10^{-4}	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	36
10^{-5}	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	36
10^{-6}	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	36
10^{-7}	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	36
nativ	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	36
∑	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	**288**

*modifizierte Protokolle:

M *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
R *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)
Q *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Fa. Qiagen)

Tabelle 19: PCR-Ergebnisse im Hauptversuch 1 unter Berücksichtigung aller Stämme (n=4), Verfahren (n=3) und Aufbereitungen (n=3)

Protokoll* / Verd.-stufe	Stamm K10			Stamm 423			Stamm 44135			Stamm NB			Σ
	M	R	Q	M	R	Q	M	R	Q	M	R	Q	
10^{-1}	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	108
10^{-2}	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	108
10^{-3}	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	108
10^{-4}	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	108
10^{-5}	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	108
10^{-6}	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	108
10^{-7}	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	108
nativ	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	108
∑	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	**864**

* modifizierte Protokolle:

M *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
R *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)
Q *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Fa. Qiagen),

Die einzelnen Arbeitsschritte der drei Protokolle sind in Fließdiagramm 10, Fließdiagramm 11 und Fließdiagramm 12 im Anhang dargestellt. Es wurden bei dem Hauptversuch die Reagenzien verwendet, die im jeweiligen Kit enthalten waren oder in Kapitel 3.2.8 beschrieben wurden. Im Anschluss an die Durchführung des modifizierten Protokolls für jedes Kit erfolgte der molekularbiologische Nachweis wie in Kapitel 3.3.7 beschrieben. Die statistische Auswertung erfolgte wie in Kapitel 3.3.12 beschrieben.

Kulturelle Anzucht von MAP aus Rohmilch

Die kulturelle Anzucht von MAP aus Rohmilch erfolgte parallel zum molekularbiologischen Nachweis. Das Vorgehen richtete sich nach der Beschreibung in Kapitel 3.3.8. In Anlehnung an die molekularbiologischen Untersuchungen erfolgte auch die Anzucht von MAP aus Rohmilch im Dreifachansatz. Angelegt wurden, nach der vorangegangenen Dekontamination von 5 Stunden mit 0,75% HPC, die Verdünnungsstufen 10^{-3} bis 10^{-6} sowie Positiv- und Negativkontrollen.

Der Schrägagar wurde zunächst bei locker aufgesetztem Deckel in Schrägposition inkubiert, um die Oberfläche des Mediums trocknen zu lassen. Nach 5-7 Tagen wurde der Deckel zugeschraubt und das Nährmedium aufrecht für insgesamt 12-16 Wochen bei 37 °C bebrütet. Die Proben wurden wöchentlich auf Wachstum und Kontamination geprüft und beurteilt.

3.3.10.2 Hauptversuch 2: Säuglingsanfangsnahrung „Pre“

In Hauptversuch 2 wurde als Matrix Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ verwendet. Die Aufbereitung der DNA erfolgte mit dem *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega) und dem *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche). Basierend auf den Ergebnissen von Hauptversuch 1 haben sich diese beiden Kits als vielversprechend im Hinblick auf die Gewinnung von MAP-DNA erwiesen. Dementsprechend wurde auf den Einsatz eines zweiten filterbasierten Säulensystems, dem *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Fa. Qiagen), verzichtet.

Als Referenzstämme dienten für den Hauptversuch 2 wieder die Stämme K10, 423, 44135 und NB (siehe Kapitel 3.2.1 Referenz- und Feldstämme). Die für den Hauptversuch 2 durchgeführten Einmischversuche wurden, wie in Abbildung 10 dargestellt, durchgeführt.

Das Vorgehen von der Anzucht der Referenzstämme über die Herstellung der dekadischen Verdünnungsreihe und die quantitative Bestimmung der Zellzahl aus den Verdünnungsstufen bis hin zur artifiziellen Kontamination der Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ ist in den Kapiteln 3.3.1 bis 3.3.4 detailiert beschrieben. Die Anzucht der Referenzstämme in Middlebrook 7H9-Bouillon erfolgte ohne den Zusatz von Tween® 80, dieses Medium wurde auch zur Einstellung der optischen Dichte verwendet sowie der Herstellung der dekadischen Verdünnungsreihe. Dies ermöglichte, ausgehend von derselben Verdünnungsreihe, die parallele Untersuchung der artifiziell kontaminierten Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ mit dem *FASTPlaque*TB™-Assay, der durch Tween® 80 gehemmt werden würde. Diese Untersuchung sowie der kulturelle Nachweis wurden von Frau Weirich im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführt. Das weitere Vorgehen der eigenen Untersuchungen blieb unberührt.

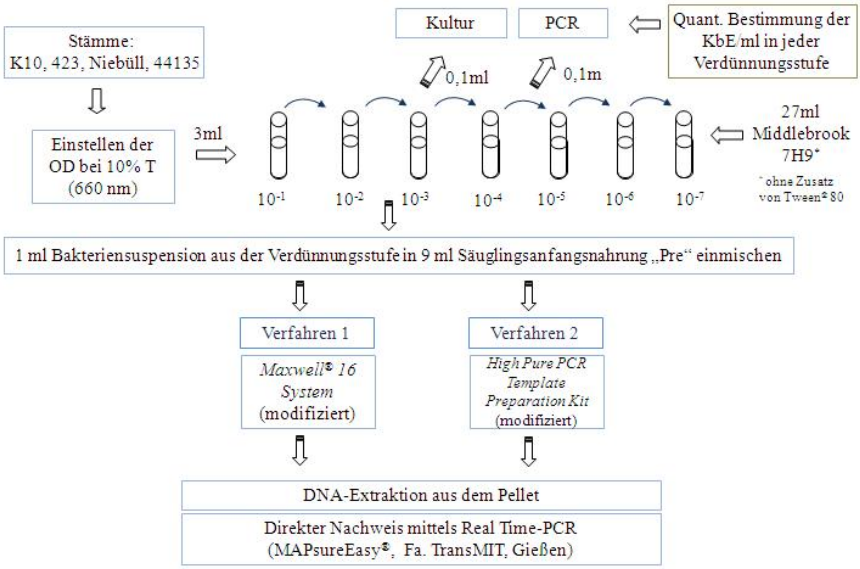


Abbildung 10: Versuchsaufbau zum Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Säuglingsanfangsnahrung „Pre“

Die mittels Zählkammer und kultureller Anzucht aus der Verdünnungsreihe ermittelten Zellzahlen von MAP sind in Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20: Ermittelte Zellzahlen für *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in Hauptversuch 2 mittels Zählkammer und kultureller Anzucht

Verwendeter Stamm	Zellzahl MAP-Suspension (KbE/ml)	
	Zählkammer	Kultur
K10	$7{,}4 \times 10^7$	$1{,}4 \times 10^7$
44135	$9{,}4 \times 10^7$	$1{,}3 \times 10^8$
423	$9{,}3 \times 10^7$	$1{,}2 \times 10^7$
Niebüll	$7{,}0 \times 10^7$	$1{,}7 \times 10^7$

Abbildung 11 zeigt beispielhaft für den Hauptversuch 2 die Amplifikationssignale des Markers *f*57 der Verdünnungsreihe des Stammes 44135 vor der artifiziellen Kontamination der Säuglingsanfangsnahrung „Pre“. Die Ausgangskonzentration des unverdünnten Stammes, dessen optische Dichte (OD) mittels Photometer bei 10,3% Transmission eingestellt wurde, betrug $9{,}4 \times 10^7$ KbE/ml (siehe Tabelle 20). Zur Überprüfung der dekadischen Verdünnung wurde die DNA direkt aus den Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-7} isoliert. Eine Verdünnungsreihe erwies sich als geeignet für die artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung, wenn die Abstände zwischen den Ct-Werten der einzelnen Verdünnungsstufen gleichmäßig waren.

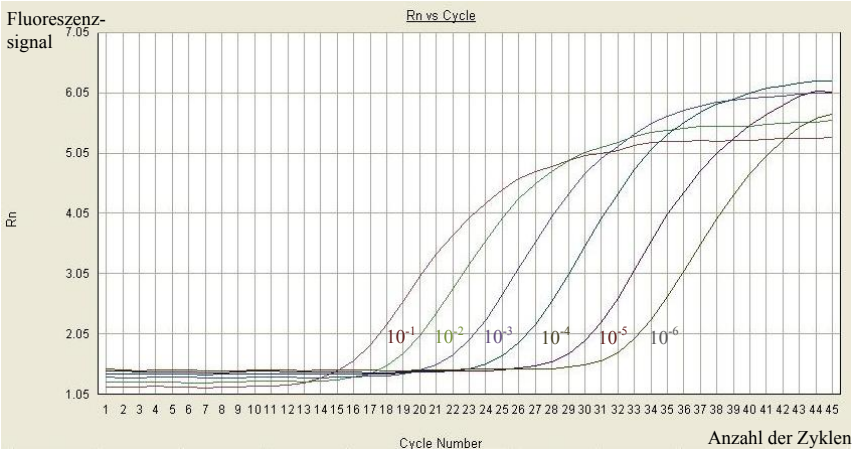


Abbildung 11: Darstellung des Amplifikationsplots am Beispiel von MAP-Stamm 44135

Abbildung 12 zeigt die Standardkurve des Stammes 44135 zu dem in Abbildung 11 gezeigten Amplifikationsplot.

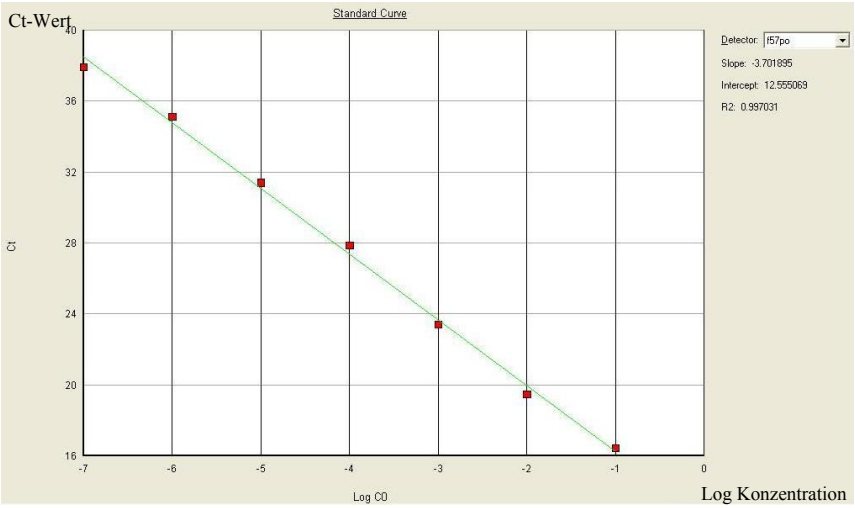


Abbildung 12: Darstellung der Standardkurve der dekadischen Verdünnungsreihe am Beispiel von MAP-Stamm 44135

DNA-Isolierung

Für jeden Stamm wurde ein eigener Einmischversuch durchgeführt. Die Isolierung der DNA von MAP aus artifiziell kontaminierter Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ erfolgte mit den modifizierten Protokollen für die beiden DNA-Extraktionskits, einerseits dem *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega) sowie dem *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche).

Die Aufbereitung erfolgte mit jedem Protokoll (n=2) für die Verdünnungsstufen 10^{-3} bis 10^{-7} sowie die native Matrix (n=6) im Dreifachansatz und wurde in drei unabhängigen Läufen mittels PCR untersucht. Dies ergab 18 Aufbereitungen sowie 54 PCR-Ergebnisse je Protokoll und Stamm. Unter Berücksichtigung aller Verfahren (n=2) und Stämme (n=4) standen für die statistische Auswertung insgesamt 432 PCR-Ergebnisse zur Verfügung. Eine Übersicht zu den im Hauptversuch 2 durchgeführten DNA-Aufbereitungen sowie den erhaltenen PCR-Ergebnissen zeigen Tabelle 21 und Tabelle 22.

Tabelle 21: DNA-Aufbereitungen im Hauptversuch 2 unter Berücksichtigung aller Stämme (n=4) und Verfahren (n=2)

Protokoll* / Verd.-stufe	Stamm K10		Stamm 423		Stamm 44135		Stamm NB		∑
	M	R	M	R	M	R	M	R	
10^{-3}	3	3	3	3	3	3	3	3	24
10^{-4}	3	3	3	3	3	3	3	3	24
10^{-5}	3	3	3	3	3	3	3	3	24
10^{-6}	3	3	3	3	3	3	3	3	24
10^{-7}	3	3	3	3	3	3	3	3	24
nativ	3	3	3	3	3	3	3	3	24
∑	18	18	18	18	18	18	18	18	**144**

* modifizierte Protokolle:
M *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
R *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)

Tabelle 22: PCR-Ergebnisse im Hauptversuch 2 unter Berücksichtigung aller Stämme (n=4), Verfahren (n=2) und Aufbereitungen (n=3)

Protokoll* / Verd.-stufe	Stamm K10		Stamm 423		Stamm 44135		Stamm NB		∑
	M	R	M	R	M	R	M	R	
10^{-3}	9	9	9	9	9	9	9	9	72
10^{-4}	9	9	9	9	9	9	9	9	72
10^{-5}	9	9	9	9	9	9	9	9	72
10^{-6}	9	9	9	9	9	9	9	9	72
10^{-7}	9	9	9	9	9	9	9	9	72
nativ	9	9	9	9	9	9	9	9	72
∑	54	54	54	54	54	54	54	54	**432**

* modifizierte Protokolle:
M *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
R *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)

Die einzelnen Arbeitsschritte der beiden modifizierten Protokolle sind in Fließdiagramm 10 und Fließdiagramm 11 im Anhang dargestellt. Es wurden bei dem Hauptversuch die Reagenzien verwendet, die im jeweiligen Kit enthalten waren oder in Kapitel 3.2.8 beschrieben wurden. Im Anschluss an die Durchführung des modifizierten Protokolls für jedes Kit erfolgte der molekularbiologische Nachweis wie in Kapitel 3.3.7 beschrieben. Die statistische Auswertung erfolgte wie in Kapitel 3.3.12 beschrieben.

3.3.10.3 Hauptversuch 3: Säuglingsanfangsnahrung „One“

In Hauptversuch 3 wurde als Matrix Säuglingsanfangsnahrung „One“ verwendet. Diese enthält neben Laktose zusätzlich Stärke als Kohlenhydratquelle.

Stärke setzt sich aus 20-30% Amylose sowie 70-80% Amylopektin zusammen. Amylose besteht aus 1,4-α-glycosidisch verbundenen Glucosemolekülen, was zur Bildung schraubenförmig gewundener langer Ketten führt. Das Amylopektin hingegen ist ein verzweigtes Polysaccharid, in dem 2.000 bis 200.000 Glukosemoleküle 1,4- und 1-6-α-glycosidisch verbunden sind. Die 1-6-Bindung erzeugt Seitenketten und damit die komplexe Verzweigung des Moleküls. Die Stärkegranula werden in ihrem Inneren durch Wasserstoffbrücken stabil zusammengehalten. Die verzweigten Molekülketten des Amylopektin können in diesen Granula gemeinsam mit den unverzweigten Amylosemolekülen semikristaline bis kristaline Bereiche bilden. Diese fest organisierte Struktur ist wasserunlöslich und in der nativen, unzerkleinerten Form gegenüber einem enzymatischen Abbau widerstandsfähig (Kleine Klausing, 2003).

Dieses biochemische Verhalten führte zu einer Problematik hinsichtlich der Aufbereitung mit den säulenbasierten Filtersystemen. Das Volumen der Pellets von Säuglingsanfangsnahrung „One“ war durch die Stärke bedeutend größer als das bei Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ und Rohmilch. Weiterhin wurde durch die Stärke der Filter sehr schnell verstopft, was die Verwendung dieser Systeme unmöglich machte. In Hauptversuch 3 wurde für die Aufbereitung der Proben daher lediglich das *Maxwell® 16 System* verwendet.

Als Referenzstamm diente für den Hauptversuch 3 der Stamm 423 (siehe Kapitel 3.2.1 Referenz- und Feldstämme). Der für den Hauptversuch 3 durchgeführte Einmischversuch wurde, wie in Abbildung 13 dargestellt, durchgeführt. Das Vorgehen von der Anzucht der Referenzstämme über die Herstellung der dekadischen Verdünnungsreihe und die quantitative Bestimmung der Zellzahl aus den Verdünnungsstufen bis hin zur artifiziellen Kontamination der Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ ist in den Kapiteln 3.3.1 bis 3.3.4 detailiert beschrieben.

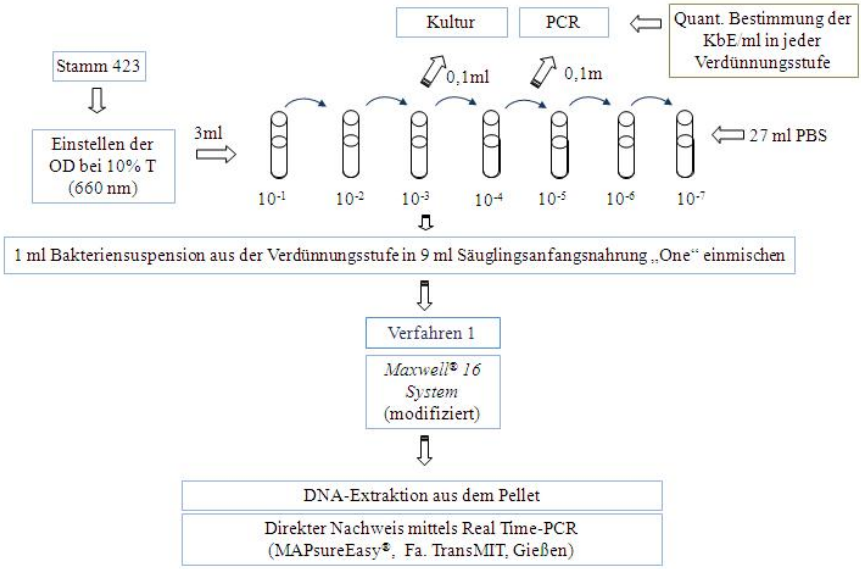


Abbildung 13: Versuchsaufbau zum Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Säuglingsanfangsnahrung „One“

Die mittels Zählkammer und kultureller Anzucht aus den Verdünnungsreihen ermittelten Zellzahlen von MAP sind in Tabelle 23 dargestellt.

Tabelle 23: Ermittelte Zellzahlen für *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in Hauptversuch 3 mittels Zählkammer und kultureller Anzucht

Verwendeter Stamm	Zellzahl MAP-Suspension (KbE/ml)	
	Zählkammer	Kultur
423	$1{,}8 \times 10^8$	$5{,}0 \times 10^7$

Abbildung 14 zeigt beispielhaft für den Hauptversuch 3 die Amplifikationssignale des Markers *f*57 der Verdünnungsreihe des Stammes 423 vor der artifiziellen Kontamination der Säuglingsanfangsnahrung „One“. Die Ausgangskonzentration des unverdünnten Stammes, dessen optische Dichte (OD) mittels Photometer bei 10,2% Transmission eingestellt wurde, betrug 1,8 x 10^8 KbE/ml (siehe Tabelle 23). Zur Überprüfung der dekadischen Verdünnung wurde die DNA direkt aus den Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-7} isoliert. Eine Verdünnungsreihe erwies sich als geeignet für die artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung, wenn die Abstände zwischen den Ct-Werten der einzelnen Verdünnungsstufen gleichmäßig waren.

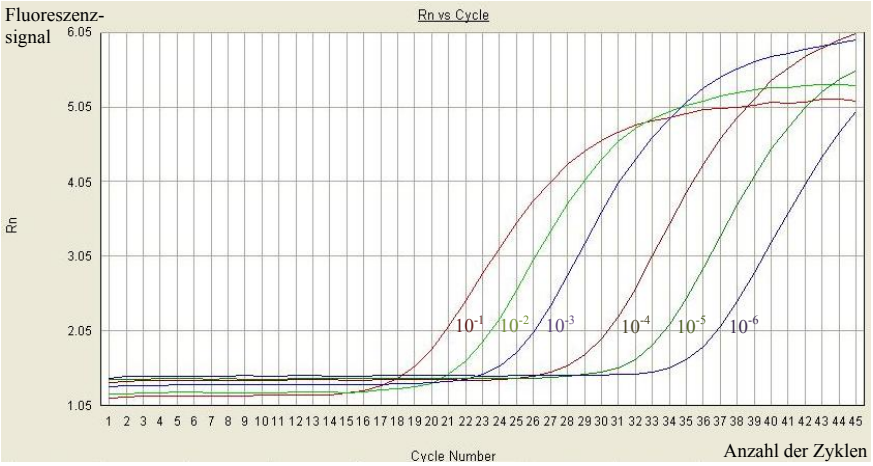


Abbildung 14: Darstellung des Amplifikationsplots am Beispiel von MAP-Stamm 423

Abbildung 15 zeigt die Standardkurve des Stammes 423 zu dem in Abbildung 14 gezeigten Amplifikationsplot.

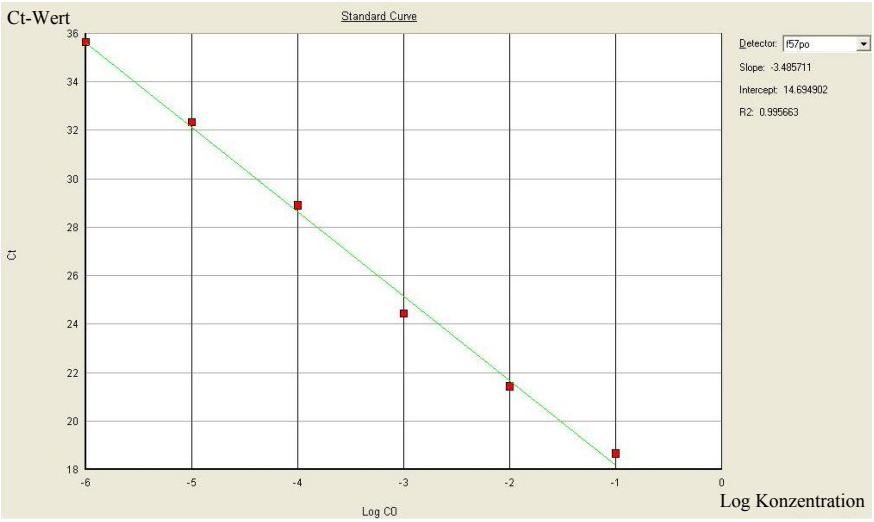


Abbildung 15: Darstellung der Standardkurve der dekadischen Verdünnungsreihe am Beispiel von MAP-Stamm 423

DNA-Isolierung

Für diesen Hauptversuch wurde nur ein Einmischversuch mit Stamm 423 durchgeführt. Die Aufbereitung erfolgte im Dreifachansatz mit dem modifizierten Protokoll für das Maxwell® 16 *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für die Verdünnungsstufen 10^{-3} bis 10^{-7} sowie die native Matrix (n=6) im Dreifachansatz und wurde in drei unabhängigen Läufen mittels PCR untersucht. Dies ergab 18 Aufbereitungen sowie 54 PCR-Ergebnisse, die für die statistische Auswertung zur Verfügung standen. Eine Übersicht zu den im Hauptversuch 3 durchgeführten DNA-Aufbereitungen sowie den erhaltenen PCR-Ergebnissen zeigen Tabelle 24 und Tabelle 25.

Tabelle 24: DNA-Aufbereitungen im Hauptversuch 3 unter Berücksichtigung aller Stämme (n=1) und Verfahren (n=1)

Protokoll* / Verd.-stufe	Stamm 423	∑
	M	
10^{-3}	3	3
10^{-4}	3	3
10^{-5}	3	3
10^{-6}	3	3
10^{-7}	3	3
nativ	3	3
∑	18	**18**

* modifiziertes Protokoll:
M *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)

Tabelle 25: PCR-Ergebnisse im Hauptversuch 3 unter Berücksichtigung aller Stämme (n=1), Verfahren (n=1) und Aufbereitungen (n=3)

Protokoll* / Verd.-stufe	Stamm 423	∑
	M	
10^{-3}	9	9
10^{-4}	9	9
10^{-5}	9	9
10^{-6}	9	9
10^{-7}	9	9
nativ	9	9
∑	54	**54**

* modifiziertes Protokoll:
M *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)

Die einzelnen Arbeitsschritte des Protokolls sind Fließdiagramm 10 im Anhang dargestellt. Es wurden bei dem Hauptversuch die Reagenzien verwendet, die im Kit enthalten waren. Im Anschluss an die Durchführung des modifizierten Protokolls erfolgte der molekularbiologische Nachweis wie in Kapitel 3.3.7 beschrieben. Die statistische Auswertung erfolgte wie in Kapitel 3.3.12 beschrieben.

3.3.11 Säuglingsanfangsnahrung aus dem Handel

Im Anschluss an die Etablierung der optimierten DNA-Extraktionsprotokolle wurde ein repräsentatives Spektrum (n=24) von Säuglingsanfangsnahrung aus dem Handel untersucht. Dieses umfasste Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ (n=9), „Pre HA“ (n=7) und „One“ (n=8). Die Ergebnisse der Untersuchung werden anonymisiert dargestellt.

3.3.11.1 Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ und „Pre HA“

Für die Untersuchung von Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ und „Pre HA“ wurde ein repräsentatives Spektrum (n=16) ausgewählt und im Einzelhandel erworben. Die Untersuchung dieser Produkte erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Weirich. Die eigenen Untersuchungen von Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ und „Pre HA“ erfolgten wie in Hauptversuch 2 mittels MAPsureEasy® Real Time-PCR (siehe Kapitel 3.3.7 Molekularbiologischer Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*), basierend auf dem MAP-spezifischen Marker *f*57 und unter Verwendung einer Internen Amplifikationskontrolle. Die Probenaufbereitung wurde im Doppelansatz (n=32) mit den modifizierten Protokollen für das *Maxwell® 16 System* (siehe Fließdiagramm 10 im Anhang) und das *High Pure PCR Template Preparation Kit* (siehe Fließdiagramm 11 im Anhang), die im Rahmen des Hauptversuchs 2 (siehe Kapitel 3.3.10.2) etabliert wurden, durchgeführt.

Parallel zu den eigenen Untersuchungen erfolgte im Rahmen der Dissertation von Frau Weirich die Untersuchung mittels *FASTPlaque*TB™-Assay und kultureller Anzucht.

3.3.11.2 Säuglingsanfangsnahrung „One“

Auch für die Untersuchung von Säuglingsanfangsnahrung „One“ wurde ein repräsentatives Spektrum (n=8) ausgewählt und im Einzelhandel erworben. Die Untersuchung der Säuglingsanfangsnahrung „One“ erfolgte ebenfalls mittels MAPsureEasy® Real Time-PCR (siehe Kapitel 3.3.7 Molekularbiologischer Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*). Die Probenaufbereitung wurde im Doppelansatz (n=16) entsprechend der Untersuchungen in Hauptversuch 3 (siehe Kapitel 3.3.10.3) mit dem modifizierten Protokoll für das *Maxwell® 16 System* (siehe Fließdiagramm 10 im Anhang) durchgeführt.

Zusätzlich erfolgte die kulturelle Anzucht auf Herrold's Egg Yolk-Medium im Doppelansatz (siehe Kapitel 3.3.8 Kulturelle Anzucht von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* aus Rohmilch und Säuglingsanfangsnahrung).

3.3.12 Statistische Auswertung

Die Datenhaltung und -auswertung erfolgte auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die statistischen Auswertungen wurden unter Verwendung des Statistikprogrammpakets BMDP/Dynamic, Release 8.1, (Dixon, 1993) durchgeführt. Zur Beschreibung der Daten wurden bei quantitativen, annähernd normalverteilten Merkmalen arithmetische Mittelwerte ($\bar{x}$) und Standardabweichungen (s) berechnet und tabellarisch wiedergegeben.

Zur statistischen Prüfung des Gruppeneinflusses auf Signifikanz wurde mit dem Programm BMDP2V bei den angenähert normalverteilten Merkmalen eine einfaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen bzgl. der Methode durchgeführt. Die Untersuchung der Zusammenhänge erfolgte bei den quantitativen Merkmalen mit Hilfe von Regressionsanalysen mit dem Programm BMDP6D unter Angabe der Regressionsgeraden ($y = m * x+b$). Mit dem Programm BMDP8V erfolgte die Streuungszerlegung über die hierarchische Varianzanalyse mit zufälligen Effekten.

Für den Fall, dass gleichzeitig qualitative und quantitative Einflussfaktoren zu berücksichtigen waren, wurde die einfaktorielle Kovarianzanalyse mit dem Programm BMDP1V durchgeführt.

Bei der Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ zugrunde gelegt, d.h. Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Vorversuch 1: *Maxwell® 16 System*

Im Folgenden sind die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen tabellarisch dargestellt. Angegeben sind die Ct-Werte der Real Time-PCR, bei der das Fluoreszenzsignal für den Marker *f*57 detektiert wurde.

Bei jeder Aufbereitung wurde die native Rohmilch mituntersucht. In keiner der nativen Rohmilchproben wurde DNA von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* detektiert, daher wurde auf die Darstellung in der Tabelle verzichtet.

Für den Stamm K10 zeigt die Tabelle 26 die Mittelwerte der 3 Läufe für jede Aufbereitung und die entsprechenden Standardabweichungen. Konnte in einer Probe keine MAP-DNA nachgewiesen werden, so wurde diese mit *nicht nachweisbar* (n.n.) gekennzeichnet. Bei der Berechnung der Mittelwerte wurde für solche Proben der Ct-Wert = 40 gesetzt, dies entspricht dem Cut-off.

Tabelle 26: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit dem MAP-Stamm K10 und Aufbereitung mit dem *Maxwell® 16 System* – Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s) der PCR-Läufe jeder Aufbereitung (Ct-Werte) mit unterschiedlichen Protokollen

[1]	Real Time-PCR	Modifikationsversuch Maxwell[2] (K10)									
		Protokoll 1		Protokoll 2		Protokoll 3		Protokoll 4		Protokoll 5	
		$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
1,3 x 10^4	1. Aufb.	38,72	2,22	31,16	0,23	31,80	0,31	32,58	0,19	33,76	0,86
	2. Aufb.	36,78	0,19	30,93	0,31	31,36	0,16	30,35	0,43	33,54	0,34
	3. Aufb.	38,95	1,82	32,25	0,46	31,88	0,19	33,91	0,61	32,47	0,36
1,3 x 10^3	1. Aufb.	n.n.	n.n.	34,67	1,12	35,06	0,37	33,86	0,25	37,89	2,04
	2. Aufb.	n.n.	n.n.	33,74	0,12	35,20	0,69	38,32	1,47	37,82	2,09
	3. Aufb.	n.n.	n.n.	35,23	0,86	36,10	0,91	34,29	0,51	35,46	0,83
1,3 x 10^2	1. Aufb.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	39,26	1,28	39,06	1,63	38,58	1,23
	2. Aufb.	n.n.	n.n.	38,42	1,37	37,62	2,06	n.n.	n.n.	39,22	1,35
	3. Aufb.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	39,33	1,15	38,03	1,70
1,3 x 10^1	1. Aufb.	n.n.	n.n.	39,18	1,43	39,59	0,71	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	2. Aufb.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	3. Aufb.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	39,42	1,00	n.n.	n.n.

[1] MAP-Zellen/10 ml Rohmilch

[2] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)

n.n. = nicht nachweisbar

Tabelle 26 zeigt den deutlichen Unterschied zwischen Protokoll 1 und den übrigen Protokollen. Mit diesem Protokoll war der Nachweis von MAP-DNA in einem Bereich von weniger als 1,3 x 10^4 MAP-Zellen/10 ml Rohmilch nicht mehr möglich. Dagegen lagen bei den übrigen vier Protokollen die Ct-Werte aller Verdünnungsstufen in ähnlichen Bereichen. Proben mit geringer Einmischkonzentration zeigten zwar nicht in jeder Aufbereitung positive Signale; wurde MAP-DNA detektiert, lagen die Ct-Werte jedoch ebenfalls in vergleichbaren Bereichen.

Mit dem Programm BMDP1V wurde die einfaktorielle Kovarianzanalyse mit schrittweiser Elimination der Protokolle durchgeführt. Dies bedeutet, dass zunächst alle Protokolle auf signifikante Unterschiede geprüft wurden. Dies erfolgte zum einen als globaler Vergleich, d.h. alle Protokolle wurden nebeneinander betrachtet und der ermittelte p-Wert zeigte an, ob signifikante Unterschiede bestanden. Zum anderen erfolgt der Vergleich explorativ, d.h. jedes Protokoll wurde einzeln mit den verbleibenden Protokollen verglichen. Dieses letzte Vorgehen ist empfindlicher. Hat sich zuvor ein signifikanter Unterschied beim globalen Vergleich gezeigt, so konnte mit dieser Analyse anhand der ausgegebenen p-Werte ermittelt werden, welches der Protokolle die Ursache dafür war. Zeigte sich bei einem dieser Vorgehen eines der Protokolle unterlegen, so wurde erneut eine einfaktorielle Kovarianzanalyse durchgeführt, allerdings ohne dieses Protokoll.

Der bereits bei der Betrachtung der deskriptiven Kennwerte auffallende Unterschied der Protokolle zeigte sich bei der einfaktoriellen Kovarianzanalyse mit einem p-Wert von $p< 0,001$. Bei der Betrachtung der p-Werte der einzelnen Protokolle bestätigte sich Protokoll 1 ($p< 0,001$) als Ursache dafür. Die sich anschließende Analyse ohne Protokoll 1 wies beim globalen Vergleich nicht auf einen signifikanten Unterschied hin ($p= 0,240$), dennoch zeigt Protokoll 5 beim Vergleich der einzelnen Protokolle mit den jeweils übrigen einen signifikanten Unterschied ($p= 0,050$). Eine weitere Analyse mit den verbleibenden Protokolle 2, 3 und 4 zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p= 0,795$). Auch die p-Werte aus der Analyse der einzelnen Protokolle mit den übrigen lagen oberhalb des Signifikanzniveaus ($p> 0,05$).

Aufgrund der einfaktoriellen Kovarianzanalyse wurden die Protokolle 1 und 5 aussortiert. Die Wahl des Protokolls für die Hauptversuche wurde zwischen Protokoll 2, 3 und 4 getroffen. Die Entscheidung fiel zugunsten von **Protokoll 2** aus. Grund dafür war einerseits die Zeit- und Kostenersparnis, andererseits aber auch die Tatsache, dass dies das Protokoll mit den wenigsten manuellen Schritten war. Das Kontaminationsrisiko wurde somit gering gehalten.

4.2 Vorversuch 2: *High Pure PCR Template Preparation Kit*

Im Folgenden sind die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen tabellarisch dargestellt. Angegeben sind die Ct-Werte der Real Time-PCR, bei der das Fluoreszenzsignal für den Marker *f*57 detektiert wurde.

Auch bei Vorversuch 2 wurde in keiner der nativen Rohmilchproben *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* detektiert, daher wurde auch hier auf die Darstellung in der Tabelle verzichtet.

Für den Stamm K10 zeigt die Tabelle 27 die Mittelwerte der 3 Läufe für jede Aufbereitung und die entsprechende Standardabweichung. Konnte in einer Probe keine MAP-DNA nachgewiesen werden, so wurde diese mit *nicht nachweisbar* (n.n.) gekennzeichnet. Bei der Berechnung der Mittelwerte wurde für solche Proben der Ct-Wert = 40 gesetzt, dies entspricht dem Cut-off.

Tabelle 27: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit dem MAP-Stamm K10 und Aufbereitung mit dem *High Pure PCR Template Preparation* Kit – Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s) der PCR-Läufe jeder Aufbereitung (Ct-Werte) mit unterschiedlichen Protokollen

MAP-Zellen pro 10 ml Rohmilch	Real Time-PCR	Modifikationsversuch Roche[1)] (K10)			
		Protokoll 1		Protokoll 2	
		$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
$2{,}2 \times 10^4$	1. Aufber.	38,59	1,22	31,44	0,21
	2. Aufber.	37,40	0,63	31,24	0,15
	3. Aufber.	36,55	0,60	30,93	0,41
$2{,}2 \times 10^3$	1. Aufber.	38,74	2,19	35,59	0,56
	2. Aufber.	39,10	1,55	34,20	0,43
	3. Aufber.	39,31	1,20	34,16	0,66
$2{,}2 \times 10^2$	1. Aufber.	36,62	0,72	37,07	1,22
	2. Aufber.	38,50	1,35	35,22	0,34
	3. Aufber.	n.n.	n.n.	36,68	2,89
$2{,}2 \times 10^1$	1. Aufber.	37,83	1,90	39,16	1,45
	2. Aufber.	38,45	1,35	35,54	0,89
	3. Aufber.	n.n.	n.n.	37,72	1,98

[1)] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)
n.n. = nicht nachweisbar

Die Betrachtung der in Tabelle 27 dargestellten deskriptiven Kennwerte zeigt, dass es mit Protokoll 2 bei gleicher Einmischkonzentration an MAP-Zellen möglich war, mehr MAP-DNA daraus zu isolieren. Bei einer Einmischkonzentration von $2{,}2 \times 10^4$ lag der Ct-Wert von Protokoll 2 durchschnittlich sechs Zyklen niedriger als bei Protokoll 1.

Mit dem Programm BMDP1V wurde die einfaktorielle Kovarianzanalyse durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass sich Protokoll 1 signifikant von Protokoll 2 unterschied ($p= 0{,}001$).

Basierend auf dem Ergebnis der einfaktorielle Kovarianzanalyse fiel die Entscheidung bei der Wahl des Protokolls für die Hauptversuche auf **Protokoll 2**.

4.3 Vorversuch 3: *DNeasy® Blood & Tissue Kit*

Im Folgenden sind die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen tabellarisch dargestellt. Angegeben sind die Ct-Werte der Real Time-PCR, bei der das Fluoreszenzsignal für den Marker *f*57 detektiert wurde.

Auch bei Vorversuch 3 wurde in keiner der nativen Rohmilchproben *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* detektiert, daher wurde auch hier auf die Darstellung in der Tabelle verzichtet.

Für den Stamm K10 zeigt die Tabelle 28 die Mittelwerte der 3 Läufe für jede Aufbereitung und die entsprechende Standardabweichung. Konnte in einer Probe keine MAP-DNA nachgewiesen werden, so wurde diese mit *nicht nachweisbar* (n.n.) gekennzeichnet. Bei der Berechnung der Mittelwerte wurde für solche Proben der Ct-Wert = 40 gesetzt, dies entspricht dem Cut-off.

Tabelle 28: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit dem MAP-Stamm K10 und Aufbereitung mit dem *DNeasy® Blood & Tissue Kit* – Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s) der PCR-Läufe jeder Aufbereitung (Ct-Werte) mit unterschiedlichen Protokollen

MAP-Zellen pro 10 ml Rohmilch	Real Time-PCR	Modifikationsversuch Qiagen[1)] (K10)					
		Protokoll 1		Protokoll 2		Protokoll 3	
		$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
$3{,}3 \times 10^4$	1. Aufber.	36,70	0,70	33,06	0,37	30,58	0,30
	2. Aufber.	36,67	0,58	30,86	0,35	30,67	0,23
	3. Aufber.	36,50	1,27	30,71	0,31	30,47	0,21
$3{,}3 \times 10^3$	1. Aufber.	39,11	1,55	34,10	0,06	33,99	0,38
	2. Aufber.	n.n.	n.n.	34,64	0,22	33,22	0,53
	3. Aufber.	n.n.	n.n.	35,77	0,73	34,56	0,46
$3{,}3 \times 10^2$	1. Aufber.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	38,38	1,41
	2. Aufber.	n.n.	n.n.	38,11	1,66	38,45	1,66
	3. Aufber.	n.n.	n.n.	39,24	1,32	n.n.	n.n.
$3{,}3 \times 10^1$	1. Aufber.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	2. Aufber.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	3. Aufber.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	39,23	1,33

[1)] *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Fa. Qiagen)
n.n. = nicht nachweisbar

Bereits bei der Betrachtung der deskriptiven Kennwerte zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Protokollen. Am deutlichsten unterschied sich Protokoll 1 von den übrigen Protokollen. Mit diesem Protokoll ist der Nachweis von MAP-DNA in einem Bereich von 3,3 x 10^2 MAP-Zellen/10 ml Rohmilch nicht mehr möglich. Auch zeigte sich, dass bei den Protokollen 2 und 3 bei gleicher Einmischkonzentration an MAP-Zellen möglich ist, mehr MAP-DNA zu isolieren. Bei einer Einmischkonzentration von 3,3 x 10^4 lagen die Ct-Werte von Protokoll 2 und 3 durchschnittlich 5-6 Zyklen niedriger als bei Protokoll 1.

Mit dem Programm BMDP1V wurde die einfaktorielle Kovarianzanalyse mit schrittweiser Elimination der Protokolle durchgeführt (siehe auch Kapitel 4.1 Vorversuch 1: *Maxwell® 16 System*).

Der bereits bei der Betrachtung der deskriptiven Daten auffallende Unterschied der Protokolle zeigte sich bei der einfaktoriellen Kovarianzanalyse mit einem p-Wert von $p< 0{,}001$. Bei der Betrachtung der p-Werte der einzelnen Protokolle bestätigt sich Protokoll 1 ($p< 0{,}001$) als Ursache dafür. Die sich anschließende Analyse ohne Protokoll 1 zeigte für Protokoll 2 und 3 keinen weiteren signifikanten Unterschied ($p= 0{,}453$).

Aufgrund der Ergebnisse der einfaktoriellen Kovarianzanalyse ist Protokoll 1 weggefallen. Die Wahl des Protokolls für die Hauptversuche wurde zwischen Protokoll 2 und 3 getroffen. Die Entscheidung fiel zugunsten von **Protokoll 2** aus. Grund dafür war die Zeitersparnis von insgesamt zwei Stunden.

4.4 Hauptversuch1: Rohmilch

4.4.1 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen

Im Folgenden sind die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen tabellarisch dargestellt. Angegeben sind die Ct-Werte der Real Time-PCR, bei der das Fluoreszenzsignal für den Marker *f*57 detektiert wurde. Mit jedem Aufbereitungsverfahren wurden aus jeder Verdünnungsstufe der gespikten Rohmilch die DNA von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* isoliert. Die Aufbereitung mit jedem Kit wurde für jeden Stamm auf jeder Stufe insgesamt dreimal durchgeführt. Das Eluat jeder Aufbereitung wurde in drei voneinander unabhängigen Läufen mittels Real Time-PCR untersucht. Dies verringert die Messunsicherheit und ermöglicht bei der Auswertung der statistischen Untersuchung Aussagen über die Standardabweichung zwischen den Läufe innerhalb einer Aufbereitung.

Bei jeder Aufbereitung mit jedem Verfahren wurden die Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-7} sowie die native Rohmilch untersucht. In keiner der nativen Rohmilchproben wurde *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* detektiert, daher wurde die Darstellung in der Tabelle vernachlässigt.

Konnte in einer Probe keine MAP-DNA nachgewiesen werden, so wurde diese mit *nicht nachweisbar* (n.n.) gekennzeichnet. Bei der Berechnung der Mittelwerte wurde für solche Proben der Ct-Wert = 40 gesetzt, dies entspricht dem Cut-off.

Für den **Stamm K10** hat sich gezeigt, dass der Nachweis von MAP-DNA für alle Extraktionsverfahren bis einschließlich 1,2 x 10^3 MAP-Zellen/10 ml in allen Aufbereitungen positive PCR-Ergebnisse brachte. Auch auf der Stufe mit eingemischten 1,2 x 10^2 MAP-Zellen/10 ml lieferten einzelne Aufbereitungen noch positive Fluoreszenzsignale, teilweise jedoch nicht bei allen drei Läufen pro Aufbereitung.
Für den Stamm K10 zeigt Tabelle 29 die Mittelwerte der 3 Läufe für jede Aufbereitung und die entsprechende Standardabweichung. Im Anhang finden sich in Tabelle 67 die einzelnen Ct-Werte von jedem Lauf der 3 Aufbereitungen, aus denen sich die Mittelwerte in Tabelle 29 zusammensetzen.

Tabelle 29: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit dem MAP-Stamm K10 – Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s) der PCR-Läufe jeder Aufbereitung (Ct-Werte) mit unterschiedlichen Verfahren

MAP-Zellen pro 10 ml Rohmilch	Real Time-PCR	Einmischversuch K10					
		Maxwell[1)]		Roche[2)]		Qiagen[3)]	
		$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
$1{,}2 \times 10^7$	1. Aufber.	19,56	0,09	19,49	0,12	18,70	0,04
	2. Aufber.	19,61	0,09	19,59	0,02	18,94	0,04
	3. Aufber.	24,24	0,17	20,45	0,15	19,02	0,25
$1{,}2 \times 10^6$	1. Aufber.	23,97	0,16	22,59	0,15	23,89	0,07
	2. Aufber.	24,15	0,04	22,71	0,10	23,63	0,07
	3. Aufber.	28,02	0,22	24,37	0,18	23,71	0,19
$1{,}2 \times 10^5$	1. Aufber.	27,91	0,09	27,23	0,20	28,02	0,11
	2. Aufber.	28,46	0,03	28,02	0,04	27,38	0,04
	3. Aufber.	32,98	0,73	28,44	0,30	28,33	0,17
$1{,}2 \times 10^4$	1. Aufber.	31,94	0,24	30,93	0,18	30,66	0,26
	2. Aufber.	32,18	0,04	31,85	0,16	32,52	0,23
	3. Aufber.	35,39	0,51	32,39	0,31	32,46	0,07
$1{,}2 \times 10^3$	1. Aufber.	35,74	0,29	35,40	0,62	35,78	0,37
	2. Aufber.	35,24	0,28	35,51	0,48	36,25	0,79
	3. Aufber.	39,32	1,17	36,08	0,90	35,26	0,43
$1{,}2 \times 10^2$	1. Aufber.	38,13	0,23	n.n.	n.n.	39,29	1,24
	2. Aufber.	39,33	1,15	38,19	1,64	n.n.	n.n.
	3. Aufber.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
$1{,}2 \times 10^1$	1. Aufber.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	2. Aufber.	37,86	0,80	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	3. Aufber.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

[1)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[2)] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)
[3)] *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Fa. Qiagen)
n.n. = nicht nachweisbar

Tabelle 30 zeigt die Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale in der Real Time-PCR unter Berücksichtigung der 3 Läufe jeder Aufbereitung.

Tabelle 30: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit dem MAP-Stamm K10 – Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale in der Real Time-PCR unter Berücksichtigung der Läufe der einzelnen Aufbereitungen (n=3)

MAP-Zellen pro 10 ml Rohmilch	Einmischversuch K10								
	Maxwell[1)]			Roche[2)]			Qiagen[3)]		
	1. Aufb.	2. Aufb.	3. Aufb.	1. Aufb.	2. Aufb.	3. Aufb.	1. Aufb.	2. Aufb.	3. Aufb.
$1{,}2 \times 10^7$	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
$1{,}2 \times 10^6$	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
$1{,}2 \times 10^5$	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
$1{,}2 \times 10^4$	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
$1{,}2 \times 10^3$	**3**	**3**	1	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
$1{,}2 \times 10^2$	**3**	1	0	0	2	0	1	0	0
$1{,}2 \times 10^1$	0	**3**	0	0	0	0	0	0	0

[1)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[2)] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)
[3)] *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Fa. Qiagen)

Für den **Stamm 423** hat sich gezeigt, dass der Nachweis von MAP-DNA für alle Extraktionsverfahren bis einschließlich $2{,}0 \times 10^3$ MAP-Zellen/10 ml in allen Aufbereitungen positive PCR-Ergebnisse brachte. Auf dieser Stufe wurden auch alle Läufe einer Aufbereitung positiv auf das Vorhandensein von MAP-DNA detektiert. Auf der Stufe mit eingemischten $2{,}0 \times 10^2$ MAP-Zellen/10 ml lieferten einzelne Aufbereitungen noch positive Fluoreszenzsignale, teilweise jedoch nicht bei allen drei Läufen pro Aufbereitung. Das gleiche gilt für die Proben, in denen $2{,}0 \times 10^1$ MAP-Zellen/10 ml Rohmilch eingemischt worden sind. Für den Stamm 423 zeigt Tabelle 31 die Mittelwerte der 3 Läufe für jede Aufbereitung und die entsprechende Standardabweichung. Im Anhang finden sich in Tabelle 68 die einzelnen Ct-Werte von jedem Lauf der 3 Aufbereitungen, aus denen sich die Mittelwerte in Tabelle 31 zusammensetzen.

Tabelle 31: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit dem MAP-Stamm 423 – Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s) der PCR-Läufe jeder Aufbereitung (Ct-Werte) mit unterschiedlichen Verfahren

MAP-Zellen pro 10 ml Rohmilch	Real Time-PCR	Einmischversuch 423					
		Maxwell[1)]		Roche[2)]		Qiagen[3)]	
		$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
$2{,}0 \times 10^7$	1. Aufber.	20,92	0,17	19,39	0,06	20,61	0,35
	2. Aufber.	20,39	0,26	21,38	0,09	20,99	0,40
	3. Aufber.	20,67	0,32	18,72	0,34	20,77	0,42
$2{,}0 \times 10^6$	1. Aufber.	24,48	0,14	23,32	0,13	26,10	0,13
	2. Aufber.	24,44	0,19	24,32	0,20	23,92	0,22
	3. Aufber.	24,53	0,31	24,82	0,38	22,23	0,37
$2{,}0 \times 10^5$	1. Aufber.	29,05	0,05	26,46	0,06	30,26	0,13
	2. Aufber.	28,65	0,27	28,30	0,24	28,50	0,19
	3. Aufber.	28,68	0,38	27,15	0,26	27,53	0,23
$2{,}0 \times 10^4$	1. Aufber.	32,59	0,07	30,63	0,14	34,28	0,28
	2. Aufber.	32,08	0,25	32,44	0,38	32,44	0,18
	3. Aufber.	32,32	0,46	31,66	0,07	32,71	0,40
$2{,}0 \times 10^3$	1. Aufber.	36,44	0,41	34,35	0,51	36,98	0,68
	2. Aufber.	35,55	0,82	36,85	0,55	36,25	0,42
	3. Aufber.	36,33	0,66	36,73	1,16	35,29	0,66
$2{,}0 \times 10^2$	1. Aufber.	n.n.	n.n.	38,64	1,18	n.n.	n.n.
	2. Aufber.	39,05	1,64	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	3. Aufber.	39,00	1,73	37,52	0,50	39,19	1,41
$2{,}0 \times 10^1$	1. Aufber.	n.n.	n.n.	39,62	0,66	n.n.	n.n.
	2. Aufber.	n.n.	n.n.	39,67	0,58	39,32	1,17
	3. Aufber.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

[1)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[2)] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)
[3)] *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Fa. Qiagen)
n.n. = nicht nachweisbar

Tabelle 32 zeigt die Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale in der Real Time-PCR unter Berücksichtigung der 3 Läufe jeder Aufbereitungen.

Tabelle 32: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit dem MAP-Stamm 423 – Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale in der Real Time-PCR unter Berücksichtigung der Läufe der einzelnen Aufbereitungen (n=3)

MAP-Zellen pro 10 ml Rohmilch	Einmischversuch 423								
	Maxwell[1)]			Roche[2)]			Qiagen[3)]		
	1. Aufb.	2. Aufb.	3. Aufb.	1. Aufb.	2. Aufb.	3. Aufb.	1. Aufb.	2. Aufb.	3. Aufb.
2,0 x 10^7	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
2,0 x 10^6	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
2,0 x 10^5	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
2,0 x 10^4	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
2,0 x 10^3	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
2,0 x 10^2	0	1	1	2	0	**3**	0	0	1
2,0 x 10^1	0	0	0	1	1	0	0	1	0

[1)] Tissue LEV Total RNA Purification Kit für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[2)] High Pure PCR Template Preparation Kit (Fa. Roche)
[3)] *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Fa. Qiagen)

Für den **Stamm 44135** hat sich gezeigt, dass der Nachweis von MAP-DNA bei einer Einmischkonzentration von 2,0 x 10^3 MAP-Zellen/10 ml bei allen Extraktionsverfahren positive Ergebnisse in allen Läufen ermöglichte. Auf der Stufe mit eingemischten 2,0 x 10^2 MAP-Zellen/10 ml lieferten einzelne Aufbereitungen noch positive Fluoreszenzsignale, teilweise jedoch nicht bei allen drei Läufen pro Aufbereitung. Für eingemischte 2,0 x 10^1 MAP-Zellen/10 ml Rohmilch konnten bei diesem Stamm in keiner Aufbereitung mit keinem Verfahren MAP-DNA detektiert werden.

Für den Stamm 44135 zeigt Tabelle 33 die Mittelwerte der 3 Läufe für jede Aufbereitung und die entsprechende Standardabweichung. Im Anhang finden sich in Tabelle 69 die einzelnen Ct-Werte von jedem Lauf der 3 Aufbereitungen, aus denen sich die Mittelwerte in Tabelle 33 zusammensetzen.

Tabelle 33: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit dem MAP-Stamm 44135 – Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s) der PCR-Läufe jeder Aufbereitung (Ct-Werte) mit unterschiedlichen Verfahren

MAP-Zellen pro 10 ml Rohmilch	Real Time-PCR	Einmischversuch 44135					
		Maxwell[1)]		Roche[2)]		Qiagen[3)]	
		$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
$2{,}0 \times 10^7$	1. Aufber.	20,89	0,14	19,48	0,07	19,46	0,16
	2. Aufber.	19,98	0,14	19,28	0,17	19,61	0,19
	3. Aufber.	20,66	0,07	19,17	0,27	18,91	0,08
$2{,}0 \times 10^6$	1. Aufber.	25,28	0,08	23,43	0,10	24,81	0,06
	2. Aufber.	25,44	0,11	24,48	0,13	24,52	0,12
	3. Aufber.	24,96	0,22	24,09	0,23	23,21	0,17
$2{,}0 \times 10^5$	1. Aufber.	30,67	0,33	28,16	0,02	29,24	0,09
	2. Aufber.	29,34	0,10	29,10	0,22	28,26	0,14
	3. Aufber.	29,96	0,21	28,33	0,25	29,12	0,23
$2{,}0 \times 10^4$	1. Aufber.	33,95	0,70	32,75	0,11	33,02	0,22
	2. Aufber.	34,12	0,15	33,22	0,45	32,78	0,32
	3. Aufber.	35,69	0,48	33,12	0,44	32,75	0,44
$2{,}0 \times 10^3$	1. Aufber.	38,96	1,80	37,28	2,38	38,99	1,03
	2. Aufber.	36,99	0,84	35,92	1,28	39,45	0,95
	3. Aufber.	38,70	1,14	38,39	1,52	34,96	0,56
$2{,}0 \times 10^2$	1. Aufber.	n.n.	n.n.	39,33	1,15	n.n.	n.n.
	2. Aufber.	39,38	1,07	n.n.	n.n.	39,30	1,21
	3. Aufber.	39,05	1,64	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
$2{,}0 \times 10^1$	1. Aufber.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	2. Aufber.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	3. Aufber.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

[1)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[2)] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)
[3)] *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Fa. Qiagen)
n.n. = nicht nachweisbar

Tabelle 34 zeigt die Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale in der Real Time-PCR unter Berücksichtigung der 3 Läufe jeder Aufbereitungen.

Tabelle 34: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit dem MAP-Stamm 44135 – Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale in der Real Time-PCR unter Berücksichtigung der Läufe der einzelnen Aufbereitungen (n=3)

MAP-Zellen pro 10 ml Rohmilch	Einmischversuch 44135								
	Maxwell[1)]			Roche[2)]			Qiagen[3)]		
	1. Aufb.	2. Aufb.	3. Aufb.	1. Aufb.	2. Aufb.	3. Aufb.	1. Aufb.	2. Aufb.	3. Aufb.
$2{,}0 \times 10^7$	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
$2{,}0 \times 10^6$	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
$2{,}0 \times 10^5$	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
$2{,}0 \times 10^4$	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
$2{,}0 \times 10^3$	1	**3**	2	2	**3**	2	2	1	**3**
$2{,}0 \times 10^2$	0	1	1	1	0	0	0	1	0
$2{,}0 \times 10^1$	0	0	0	0	0	0	0	0	0

[1)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[2)] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)
[3)] *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Fa. Qiagen)

Für den **Stamm NB** hat sich gezeigt, dass der Nachweis von MAP-DNA für alle Extraktionsverfahren bis einschließlich $1{,}5 \times 10^3$ MAP-Zellen/10 ml in allen Aufbereitungen, bis auf eine mit dem Kit der Firma Roche, positive PCR-Ergebnisse brachte. Für durchweg positive Ergebnisse in allen Läufen war eine Einmischkonzentration von $1{,}5 \times 10^4$ MAP-Zellen/10 ml nötig. Auf der Stufe mit eingemischten $1{,}5 \times 10^2$ MAP-Zellen/10 ml lieferten einzelne Aufbereitungen noch positive Fluoreszenzsignale, teilweise jedoch nicht bei allen drei Läufen pro Aufbereitung. Für eingemischte $1{,}5 \times 10^1$ MAP-Zellen/10 ml Rohmilch konnte bei diesem Stamm in keiner Aufbereitung mit keinem Verfahren MAP-DNA detektiert werden.

Für den Stamm NB zeigt Tabelle 35 die Mittelwerte der 3 Läufe für jede Aufbereitung und die entsprechende Standardabweichung. Im Anhang finden sich in Tabelle 70 die einzelnen Ct-Werte von jedem Lauf der 3 Aufbereitungen, aus denen sich die Mittelwerte in Tabelle 35 zusammensetzen.

Tabelle 35: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit dem MAP-Stamm NB – Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s) der PCR-Läufe jeder Aufbereitung (Ct-Werte) mit unterschiedlichen Verfahren

MAP-Zellen pro 10 ml Rohmilch	Real Time-PCR	Einmischversuch NB					
		Maxwell[1)]		Roche[2)]		Qiagen[3)]	
		$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
$1{,}5 \times 10^7$	1. Aufber.	23,34	0,16	22,99	0,08	22,61	0,22
	2. Aufber.	23,01	0,20	21,77	0,24	21,60	0,22
	3. Aufber.	22,71	0,08	22,27	0,20	22,18	0,08
$1{,}5 \times 10^6$	1. Aufber.	27,15	0,07	25,64	0,13	26,23	0,13
	2. Aufber.	26,88	0,24	26,68	0,21	25,24	0,08
	3. Aufber.	26,21	0,04	27,12	0,68	27,13	0,04
$1{,}5 \times 10^5$	1. Aufber.	30,64	0,21	30,44	0,08	30,29	0,09
	2. Aufber.	31,00	0,13	30,33	0,29	29,61	0,34
	3. Aufber.	30,94	0,18	31,14	0,30	31,42	0,08
$1{,}5 \times 10^4$	1. Aufber.	34,95	0,41	34,88	0,21	33,32	0,25
	2. Aufber.	35,03	0,67	33,79	0,73	33,53	0,11
	3. Aufber.	33,01	0,27	34,84	0,31	34,49	0,32
$1{,}5 \times 10^3$	1. Aufber.	36,55	0,36	37,10	0,50	37,29	0,78
	2. Aufber.	37,22	1,01	37,75	2,39	38,90	1,91
	3. Aufber.	38,09	0,37	n.n.	n.n.	39,34	1,15
$1{,}5 \times 10^2$	1. Aufber.	39,33	1,15	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	2. Aufber.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	39,33	1,15
	3. Aufber.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
$1{,}5 \times 10^1$	1. Aufber.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	2. Aufber.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	3. Aufber.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

[1)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[2)] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)
[3)] *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Fa. Qiagen)
n.n. = nicht nachweisbar

Tabelle 36 zeigt die Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale in der Real Time-PCR unter Berücksichtigung der 3 Läufe jeder Aufbereitungen.

Tabelle 36: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit dem MAP-Stamm NB – Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale in der Real Time-PCR unter Berücksichtigung der Läufe der einzelnen Aufbereitungen (n=3)

MAP-Zellen pro 10 ml Rohmilch	Einmischversuch NB								
	Maxwell[1)]			Roche[2)]			Qiagen[3)]		
	1. Aufb.	2. Aufb.	3. Aufb.	1. Aufb.	2. Aufb.	3. Aufb.	1. Aufb.	2. Aufb.	3. Aufb.
$1{,}5 \times 10^7$	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
$1{,}5 \times 10^6$	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
$1{,}5 \times 10^5$	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
$1{,}5 \times 10^4$	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
$1{,}5 \times 10^3$	**3**	**3**	2	**3**	2	0	**3**	1	1
$1{,}5 \times 10^2$	1	0	0	0	0	0	0	1	0
$1{,}5 \times 10^1$	0	0	0	0	0	0	0	0	0

[1)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[2)] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)
[3)] *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Fa. Qiagen)

4.4.2 Zusammenfassung der molekularbiologischen Ergebnisse

Die folgenden Tabellen zeigen eine Zusammenfassung der Ergebnisse aller vier Einmischversuche mit Rohmilch. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Tabellen, in denen getrennt nach Stämmen und Verfahren dargestellt wurde, findet sich hier eine Darstellung getrennt nach Verfahren, aber über alle Stämme gemittelt. In Tabelle 37 ist für jedes der drei verwendeten Verfahren der Mittelwert der Ct-Werte aus allen Aufbereitungen für jede Verdünnungsstufe angegeben. Der Mittelwert eines jeden Verfahrens besteht auf jeder Verdünnungsstufe demnach aus 36 Einzelmessungen. Konnte in einer Probe keine MAP-DNA nachgewiesen werden, so wurde diese mit *nicht nachweisbar* (n.n.) gekennzeichnet. Bei der Berechnung der Mittelwerte wurde für solche Proben der Ct-Wert = 40 gesetzt, dies entspricht dem Cut-off. Die gemittelten Ct-Werte der einzelnen DNA-Extraktionsverfahren lagen in ähnlichen Bereichen, die Unterschiede betrugen etwa einen PCR-Zyklus Unterschied. Insbesondere bei geringen Einmischkonzentrationen im Bereich von 10^1 – 10^2 MAP-Zellen/10 ml Rohmilch jedoch waren die gemittelten Ct-Werte der Verfahren fast identisch.

Tabelle 37: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit verschiedenen MAP-Stämmen (n=4) - Mittelwerte der Ct-Werte aller Aufbereitungen (n=3) und Läufe (n=3) für die einzelnen Verdünnungsstufen

[1]	Maxwell[2]	Roche[3]	Qiagen[4]
$1{,}7 \times 10^7$	21,33	20,33	20,28
$1{,}7 \times 10^6$	25,46	24,46	24,55
$1{,}7 \times 10^5$	29,86	28,59	29,00
$1{,}7 \times 10^4$	33,60	32,71	32,91
$1{,}7 \times 10^3$	37,09	36,78	37,06
$1{,}7 \times 10^2$	39,44	39,47	39,76
$1{,}7 \times 10^1$	39,82	39,94	39,94

[1] Mittelwert aus $1{,}2 \times 10^x$, $2{,}0 \times 10^x$, $2{,}0 \times 10^x$ und $1{,}5 \times 10^x$ MAP-Zellen pro 10 ml Rohmilch
[2] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[3] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)
[4] *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Fa. Qiagen)

Im vorangegangenen Kapitel wurde neben den Mittelwerten die Standardabweichung für die Läufe einer Aufbereitung dargestellt. Dies war in diesem Fall sinnvoll, da die Vielzahl der Läufe zu einer Erhöhung der Messgenauigkeit führte. Alle Pellets eines Einmischversuches enthielten in diesem Fall den gleichen Stamm, die gleiche Milch und stammten aus der gleichen Aufbereitung. Die Mittelwerte in Tabelle 37 dagegen bestehen aus den Mittelwerten der einzelnen Aufbereitungen aller Einmischversuche. Es treffen also mehrere Einflussgrößen aufeinander (z.B. Milch unterschiedlicher Chargen, Stammunterschiede, Aufbereitung, usw.), die die Standardabweichung beeinflussen. Welcher dieser Einflussfaktoren letztlich zu einer Veränderung dieser führt, ließe sich daraus aber nicht ablesen. Daher wurde auf die Darstellung einer Standardabweichung bewusst verzichtet. Ziel der Untersuchung war es, eine Aussage über die verwendete Methode zu treffen.

Unter Berücksichtigung der einzelnen Ct-Werte erfolgt in Tabelle 38 die Darstellung der Anzahl positiver Fluoreszenzsignale in der PCR für jedes Verfahren, auch hier wieder über alle Stämme hinweg. Für die Aufbereitungen mit den DNA-Extraktionskits von Roche und Promega zeigten sich ähnliche Nachweisraten, im Vergleich zu den Nachweisraten mit dem DNA-Extraktionskit von Qiagen zeigten diese jedoch insbesondere bei niedrigen Einmischkonzentrationen von 10^1 – 10^2 MAP-Zellen/10 ml Rohmilch zwei- bis dreimal häufiger in der PCR ein positives Signal.

Tabelle 38: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit verschiedenen MAP-Stämmen (n=4) - Nachweisrate und Anzahl positiver Signale für die einzelnen Verfahren unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufen

[1)]	Maxwell[2)]		Roche[3)]		Qiagen[4)]	
$1{,}7 \times 10^7$	100%	36/36	100%	36/36	100%	36/36
$1{,}7 \times 10^6$	100%	36/36	100%	36/36	100%	36/36
$1{,}7 \times 10^5$	100%	36/36	100%	36/36	100%	36/36
$1{,}7 \times 10^4$	100%	36/36	100%	36/36	100%	36/36
$1{,}7 \times 10^3$	61 %	22/36	83 %	30/36	80 %	29/36
$1{,}7 \times 10^2$	25 %	9/36	22 %	8/36	11 %	4/36
$1{,}7 \times 10^1$	8 %	3/36	6 %	2/36	3 %	1/36

1) Mittelwert aus $1{,}2 \times 10^x$, $2{,}0 \times 10^x$, $2{,}0 \times 10^x$ und $1{,}5 \times 10^x$ MAP-Zellen pro 10 ml Rohmilch
2) *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
3) *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)
4) *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Fa. Qiagen)

4.4.3 Ergebnisse der kulturellen Untersuchungen

Neben den molekularbiologischen Untersuchungen mittels PCR erfolgte parallel auch die kulturelle Anzucht der Proben. Die verwendete Probenmatrix sowie die lange Inkubationszeit von MAP machten eine Dekontamination unausweichlich. Ohne diesen Zwischenschritt wären die Proben innerhalb weniger Tage von schnellwachsender Begleitflora überwuchert.

Das Wachstum von MAP auf Herrold's Egg Yolk-Medium (HEYM) zeigte sich in von anfänglich runden, glatten, weißen Kolonien, welche die Tendenz hatten, sich leicht anzuheben sowie matt und hellgelb zu werden. Ältere Kolonien zeigten teilweise Furchenbildung auf der Oberfläche (siehe Abbildung 16).

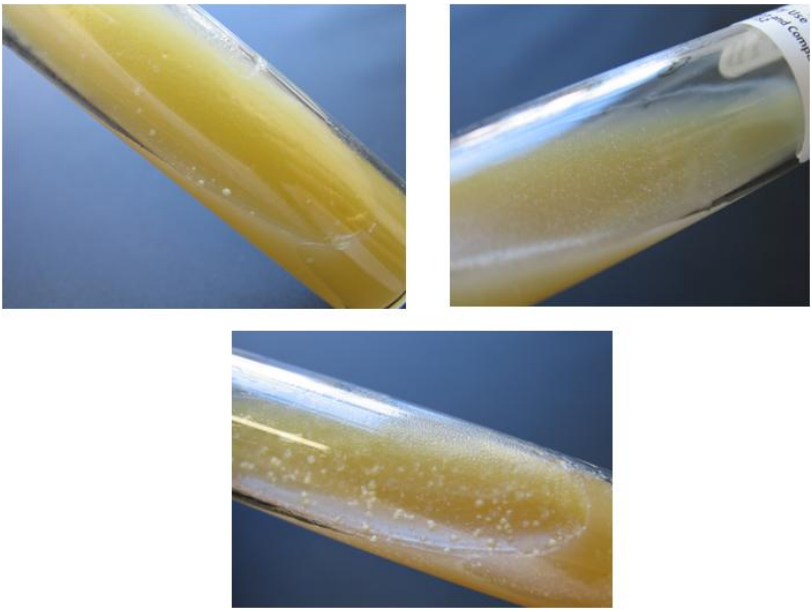


Abbildung 16: Wachstum von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) auf HEYM, hier MAP-Stamm K10, Anzucht aus Rohmilch

Die Dauer bis zum Wachstum eindeutig identifizierbarer Kolonien variierte je nach Anzahl eingemischter MAP-Zellen. Während bei der Positivkontrolle bereits nach 3-5 Wochen Koloniewachstum erkennbar war, dauerte das Wachstum bei den höheren Verdünnungsstufen im Schnitt 4-8 Wochen, mitunter auch bis zu 11 Wochen. Die gewachsenen Kolonien wurden stichprobenartig mittels PCR untersucht und das Vorhandensein von MAP-DNA wurde in den untersuchten Fällen bestätigt. Ebenfalls untersucht wurden fragliche Kolonien, die in der PCR als positiv bestätigt werden konnten.

Eine Übersicht der Ergebnisse der kulturellen Anzucht gibt Tabelle 39. Als Einmischkonzentration wurden die Ergebnisse der kulturellen Anzucht aus der Verdünnungsreihe zugrunde gelegt. Für den Stamm K10 konnte bei einer eingemischten Konzentration von 7,8 x 10^1 KbE/10 ml Rohmilch bei einem von drei Ansätzen Koloniewachstum nachgewiesen werden. Für den Stamm 423 gelang dies bei zwei von drei Ansätzen mit einer Einmischkonzentration von 1,7 x 10^2 KbE/10 ml Rohmilch. Bei Stamm 44135 war dieser Bereich ähnlich, hier wurde auf allen drei Ansätzen mit einer Einmischkonzentration von 3,7 x 10^2 KbE/10 ml Rohmilch Koloniewachstum nachgewiesen.

Für Stamm NB wurde ebenfalls die kulturelle Anzucht aus Rohmilch durchgeführt, hier konnte aber überraschenderweise auf keinem HEYM-Agar Koloniewachstum beobachtet werden. Eine durchgeführte stichprobenartige Abschwemmung des Schrägagars führte in der PCR erwartungsgemäß zu einem deutlichen Signal, was die Anwesenheit von MAP-DNA beweist. Der Nachweis lebender MAP durch Koloniewachstum war bei diesem Stamm jedoch nicht möglich.

Tabelle 39: Kultureller Nachweis verschiedener MAP-Stämme nach Dekontamination auf HEYM

Verdünnungs-stufe[1)]	Ansatz	K10		423		44135	
10^{-3}	A	+	+	+	+	+	Kont.
	B	+	+	+	Kont.	+	Kont.
	C	+	Kont.[2)]	Kont.	Kont.	Kont.	+
10^{-4}	A	+	Ø	+	Kont.	+	+
	B	+	+	Kont.	+	+	+
	C	Ø	Kont.	+	Ø	Kont.	+
10^{-5}	A	Ø	+	Ø	Ø	+	+
	B	Ø	Ø	Kont.	+	Ø	+
	C	Ø	Ø	+	Ø	+	Ø
10^{-6}	A	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	B	Ø	Ø	Kont.	+	Ø	Ø
	C	Ø	Ø	+	Ø	Ø	Ø

[1)] Ausgangskonzentration der MAP-Suspension in KbE/ml
K10: 7,8 x 10^6
423: 1,7 x 10^8
44135: 3,7 x 10^7

[2)] Kontamination
\+ = Koloniewachstum
Ø = kein Koloniewachstum

Die Tatsache, dass im Rahmen der kulturellen Anzucht ein Dekontaminationsschritt nötig war, schränkte die Wahl des Festmediums auf das Herrold's Egg Yolk-Medium ein, da das enthaltene Eigelb die bakteriostatische Wirkung der Dekontamination neutralisiert (Akineden et al., 2011). Nachteil dieses Schrägagars war, dass die Bestimmung von Kolonie-bildenden Einheiten (KbE) problematisch war. Die Ursachen hierfür waren vielfältig. Einerseits erfolgte das Wachstum nicht zwangsläufig in Form von zählbaren Einzelkolonien, sondern mitunter flächig im unteren Bereich des Nährmediums. Andererseits war das Zählen von Einzelkolonien – sofern welche vorhanden waren – unter Umständen erschwert durch Bildung von Kondenswasser an der Innenseite des Glases sowie Reste der Probenmatrix, die

in dichteren Bereichen das Differenzieren von MAP-Kolonien erschwerten. Auch ist es vorgekommen, dass der Agar Unebenheiten aufwies und somit das Wachsen von MAP in einem „kavernösen“ Bereich (siehe Abbildung 16, zwei Seiten zuvor, unteres Bild) ermöglichte. Dies wiederum machte eine exakte quantitative Bestimmung von MAP unmöglich. In seltenen Fällen kam es durch die lange Anzuchtdauer zu einer Eintrocknung des Agars (siehe Abbildung 17). Whittington et al. (2011) empfehlen für die Anzucht einen modifizierten Middlebrook 7H10-Agar, der Eigelb enthält. Dieser stellt möglicherweise eine Alternative zu den kommerziell erworbenen HEYM-Röhrchen dar.

Trotz des Dekontaminationsschrittes konnten einige HEYM aufgrund einer Überwucherung mit Begleitflora der Rohmilch nicht ausgewertet werden (siehe Tabelle 39, vorherige Seite). Diese Überwucherung trat auf, bevor MAP-Kolonien erkennbar waren (siehe Abbildung 17). Insgesamt wurden für die kulturelle Anzucht der vier Stämme aus den artifiziell kontaminierten Rohmilchproben 90 HEYM beimpft, die Kontaminationsrate betrug 14,4% (n=13).

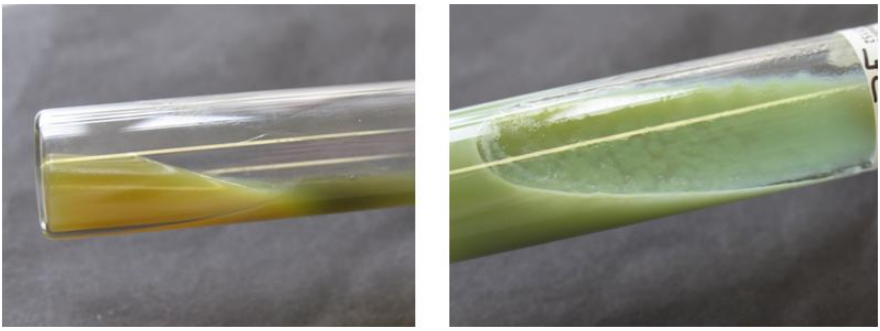


Abbildung 17: Eintrocknung des Agars im HEYM-Röhrchen (links) und Kontamination mit Begleitflora (rechts), hier MAP-Stamm 44135, Anzucht aus Rohmilch

Die Anzucht auf Middlebrook 7H10 erfolgte zur Bestimmung der Kolonie-bildenden Einheiten von MAP aus der Verdünnungsreihe. Da es sich bei den Stämmen für die artifizielle Kontamination um eine Reinkultur handelte, war kein zusätzlicher Schritt der Dekontamination nötig. Dies erleichterte die Auszählung der MAP-Kolonien und damit die Bestimmung der KbE/ml. Doch auch bei den Middlebrook 7H10-Platten kam es im Rahmen der langen Anzucht zu diversen Schwierigkeiten. Um ein Austrocknen des Agars in dieser Zeit zu verhindern, wurden Petrischalen ohne Entlüftungsnocken verwendet und der Agar

dicker gegossen. Ebenfalls wurden die beimpften Platten mit Petrifilm umwickelt und durch eine Plastiktüte im Brutschrank zusätzlich gegen das Austrocknen geschützt. Eine Kondenswasserbildung konnte auch hier das Zählen der Kolonien erschweren bzw. zu einer Benetzung des Agars führen.

Die Dauer bis zum Wachstum von MAP-Kolonien variierte je nach eingemischter Zellzahl. Während sich bei der Positivkontrolle teilweise bereits nach zwei Wochen erste Kolonien zeigten, dauerte das Wachstum bei den höheren Verdünnungsstufen im Schnitt 5-7 Wochen.

Durch die lange Anzucht kam es auch bei den Middlebrook 7H10 Platten teilweise zu einer Kontamination. Anders als bei der kulturellen Anzucht aus Milch handelte es sich hierbei nicht um Begleitflora, sondern um Schimmelpilze. Diese traten meist zwischen der 7. bis 9. Woche auf, wenn sich an der Zahl der gewachsenen Kolonien meist nichts mehr veränderte. Trotz der Kontamination standen jedoch für die Berechnung der Kolonie-bildenden Einheiten genügend auswertbare Platten zur Verfügung, da mit Dreifachansatz gearbeitet wurde bzw. die Zahl der Kolonien sich in den Wochen davor schon nicht mehr verändert hat. Insgesamt wurden für die kulturelle Anzucht der vier Stämme für die artifizielle Kontamination der Rohmilchproben 62 Middlebrook 7H10 Platten beimpft, die Kontaminationsrate betrug 46,8% (n=29).

4.5 Hauptversuch 2: Säuglingsanfangsnahrung „Pre“

4.5.1 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen

Im Folgenden sind die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen tabellarisch dargestellt. Angegeben sind die Ct-Werte der Real Time-PCR, bei der das Fluoreszenzsignal für den Marker *f*57 detektiert wurde. Mit jedem Aufbereitungsverfahren wurden aus jeder Verdünnungsstufe der gespikten Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ die DNA von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* isoliert. Die Aufbereitung mit jedem Kit wurde für jeden Stamm auf jeder Stufe insgesamt dreimal durchgeführt. Das Eluat jeder Aufbereitung wurde in drei voneinander unabhängigen Läufen mittels Real Time-PCR untersucht. Dies verringert die Messunsicherheit und ermöglicht bei der Auswertung der statistischen Untersuchung Aussagen über die Standardabweichung zwischen den Läufen innerhalb einer Aufbereitung.

Bei jeder Aufbereitung mit jedem Verfahren wurden die Verdünnungsstufen 10^{-3} bis 10^{-7} sowie die native Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ untersucht. In keiner der nativen Proben wurde *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* detektiert, daher wurde die Darstellung in der Tabelle vernachlässigt.

Konnte in einer Probe keine MAP-DNA nachgewiesen werden, so wurde diese mit *nicht nachweisbar* (n.n.) gekennzeichnet. Bei der Berechnung der Mittelwerte wurde für solche Proben der Ct-Wert = 40 gesetzt, dies entspricht dem Cut-off.

Für den **Stamm K10** hat sich gezeigt, dass der Nachweis von MAP-DNA für beide Extraktionsverfahren bis einschließlich 7,4 x 10^0 MAP-Zellen/10 ml in allen Aufbereitungen positive PCR-Ergebnisse ergab.
Für den Stamm K10 zeigt Tabelle 40 die Mittelwerte der 3 Läufe für jede Aufbereitung und die entsprechende Standardabweichung. Im Anhang finden sich in Tabelle 71 die einzelnen Ct-Werte von jedem Lauf der 3 Aufbereitungen, aus denen sich die Mittelwerte in Tabelle 40 zusammensetzen.

Tabelle 40: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „Pre“ mit dem MAP-Stamm K10 – Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s) der PCR-Läufe jeder Aufbereitung (Ct-Werte) mit unterschiedlichen Verfahren

MAP-Zellen pro 10 ml SAN „Pre“	Real Time-PCR	Einmischversuch K10			
		Maxwell[1)]		Roche[2)]	
		$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
$7{,}4 \times 10^4$	1. Aufber.	23,35	0,20	21,90	0,26
	2. Aufber.	23,37	0,20	21,51	0,24
	3. Aufber.	23,78	0,31	21,38	0,26
$7{,}4 \times 10^3$	1. Aufber.	26,88	0,22	25,42	0,28
	2. Aufber.	26,78	0,12	24,72	0,22
	3. Aufber.	26,74	0,23	24,74	0,16
$7{,}4 \times 10^2$	1. Aufber.	29,94	0,23	29,35	0,14
	2. Aufber.	28,81	0,28	28,67	0,16
	3. Aufber.	30,48	0,18	27,17	0,15
$7{,}4 \times 10^1$	1. Aufber.	33,54	0,44	32,66	0,27
	2. Aufber.	33,57	0,19	31,51	0,09
	3. Aufber.	33,71	0,40	31,67	0,22
$7{,}4 \times 10^0$	1. Aufber.	37,84	1,89	34,77	0,46
	2. Aufber.	37,37	1,21	35,84	0,47
	3. Aufber.	37,57	1,02	35,30	0,49

[1)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[2)] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)

Tabelle 41 zeigt die Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale in der Real Time-PCR unter Berücksichtigung der 3 Läufe jeder Aufbereitungen.

Tabelle 41: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „Pre“ mit dem MAP-Stamm K10 – Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale in der Real Time-PCR unter Berücksichtigung der Läufe der einzelnen Aufbereitungen (n=3)

MAP-Zellen pro 10 ml SAN „Pre“	Einmischversuch K10					
	Maxwell[1)]			Roche[2)]		
	1. Aufb.	2. Aufb.	3. Aufb.	1. Aufb.	2. Aufb.	3. Aufb.
$7{,}4 \times 10^4$	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
$7{,}4 \times 10^3$	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
$7{,}4 \times 10^2$	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
$7{,}4 \times 10^1$	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
$7{,}4 \times 10^0$	2	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**

[1)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[2)] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)

Für den **Stamm 44135** hat sich gezeigt, dass der Nachweis von MAP-DNA für beide Extraktionsverfahren bis einschließlich 9,4 x 10^0 MAP-Zellen/10 ml in allen Aufbereitungen positive PCR-Ergebnisse brachte. Für durchweg positive Ergebnisse in allen Läufen war eine Einmischkonzentration von 9,4 x 10^1 MAP-Zellen/10 ml nötig.

Für den Stamm 44135 zeigt Tabelle 42 die Mittelwerte der 3 Läufe für jede Aufbereitung und die entsprechende Standardabweichung. Im Anhang finden sich in Tabelle 72 die einzelnen Ct-Werte von jedem Lauf der 3 Aufbereitungen, aus denen sich die Mittelwerte in Tabelle 42 zusammensetzen.

Tabelle 42: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „Pre“ mit dem MAP-Stamm 44135 – Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s) der PCR-Läufe jeder Aufbereitung (Ct-Werte) mit unterschiedlichen Verfahren

MAP-Zellen pro 10 ml SAN „Pre“	Real Time-PCR	Einmischversuch 44135			
		Maxwell[1)]		Roche[2)]	
		$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
9,4 x 10^4	1. Aufber.	22,19	0,06	21,24	0,01
	2. Aufber.	22,50	0,18	20,31	0,06
	3. Aufber.	22,77	0,24	20,79	0,23
9,4 x 10^3	1. Aufber.	25,31	0,15	24,53	0,25
	2. Aufber.	26,13	0,09	23,91	0,04
	3. Aufber.	26,12	0,15	24,48	0,04
9,4 x 10^2	1. Aufber.	28,60	0,10	28,59	0,09
	2. Aufber.	28,33	0,09	27,87	0,19
	3. Aufber.	29,22	0,07	27,15	0,08
9,4x 10^1	1. Aufber.	33,12	0,44	31,76	0,05
	2. Aufber.	35,22	0,09	31,59	0,31
	3. Aufber.	32,51	0,42	31,28	0,15
9,4 x 10^0	1. Aufber.	38,67	1,29	37,76	2,01
	2. Aufber.	37,38	1,01	35,64	0,63
	3. Aufber.	38,21	1,59	35,96	0,73

[1)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[2)] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)

Tabelle 43 zeigt die Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale in der Real Time-PCR unter Berücksichtigung der 3 Läufe jeder Aufbereitungen.

Tabelle 43: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „Pre“ mit dem MAP-Stamm 44135 – Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale in der Real Time-PCR unter Berücksichtigung der Läufe der einzelnen Aufbereitungen (n=3)

MAP-Zellen pro 10 ml SAN „Pre“	Einmischversuch 44135					
	Maxwell[1)]			Roche[2)]		
	1. Aufb.	2. Aufb.	3. Aufb.	1. Aufb.	2. Aufb.	3. Aufb.
$9{,}4 \times 10^4$	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
$9{,}4 \times 10^3$	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
$9{,}4 \times 10^2$	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
$9{,}4 \times 10^1$	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
$9{,}4 \times 10^0$	2	**3**	2	2	**3**	**3**

[1)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[2)] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)

Für den **Stamm 423** hat sich gezeigt, dass der Nachweis von MAP-DNA für beide Extraktionsverfahren bis einschließlich $9{,}3 \times 10^0$ MAP-Zellen/10 ml in allen Aufbereitungen positive PCR-Ergebnisse brachte. Für durchweg positive Ergebnisse in allen Läufen war auch hier eine Einmischkonzentration von $9{,}3 \times 10^1$ MAP-Zellen/10 ml nötig.

Für den Stamm 423 zeigt Tabelle 44 die Mittelwerte der 3 Läufe für jede Aufbereitung und die entsprechende Standardabweichung. Im Anhang finden sich in Tabelle 73 die einzelnen Ct-Werte von jedem Lauf der 3 Aufbereitungen, aus denen sich die Mittelwerte in Tabelle 44 zusammensetzen.

Tabelle 44: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „Pre“ mit dem MAP-Stamm 423 – Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s) der PCR-Läufe jeder Aufbereitung (Ct-Werte) mit unterschiedlichen Verfahren

MAP-Zellen pro 10 ml SAN „Pre“	Real Time-PCR	Einmischversuch 423			
		Maxwell[1)]		Roche[2)]	
		$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
$9{,}3 \times 10^4$	1. Aufber.	23,91	0,16	22,79	0,10
	2. Aufber.	24,05	0,22	23,20	0,17
	3. Aufber.	24,06	0,18	22,59	0,23
$9{,}3 \times 10^3$	1. Aufber.	27,31	0,11	26,94	0,17
	2. Aufber.	27,37	0,17	26,23	0,16
	3. Aufber.	27,59	0,21	27,25	0,11
$9{,}3 \times 10^2$	1. Aufber.	30,80	0,16	29,10	0,23
	2. Aufber.	29,34	0,15	29,96	0,23
	3. Aufber.	31,73	0,26	30,04	0,14
$9{,}3 \times 10^1$	1. Aufber.	34,67	0,53	33,71	0,43
	2. Aufber.	31,30	0,01	32,35	0,09
	3. Aufber.	34,11	0,38	34,11	0,15
$9{,}3 \times 10^0$	1. Aufber.	37,95	1,09	39,40	1,05
	2. Aufber.	37,46	0,50	38,39	1,49
	3. Aufber.	39,31	1,20	39,45	0,96

[1)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[2)] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)

Tabelle 45 zeigt die Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale in der Real Time-PCR unter Berücksichtigung der 3 Läufe jeder Aufbereitungen.

Tabelle 45: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „Pre“ mit dem MAP-Stamm 423 – Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale in der Real Time-PCR unter Berücksichtigung der Läufe der einzelnen Aufbereitungen (n=3)

MAP-Zellen pro 10 ml SAN „Pre“	Einmischversuch 423					
	Maxwell[1)]			Roche[2)]		
	1. Aufb.	2. Aufb.	3. Aufb.	1. Aufb.	2. Aufb.	3. Aufb.
$9{,}3 \times 10^4$	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
$9{,}3 \times 10^3$	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
$9{,}3 \times 10^2$	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
$9{,}3 \times 10^1$	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
$9{,}3 \times 10^0$	**3**	**3**	1	1	2	1

[1)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[2)] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)

Für den **Stamm NB** hat sich gezeigt, dass der Nachweis von MAP-DNA für beide Extraktionsverfahren bis einschließlich 7,0 x 10^0 MAP-Zellen/10 ml in allen Aufbereitungen positive PCR-Ergebnisse brachte. Für durchweg positive Ergebnisse in allen Läufen war jedoch eine Einmischkonzentration von 7,0 x 10^1 MAP-Zellen/10 ml nötig.

Für den Stamm NB zeigt Tabelle 46 die Mittelwerte der 3 Läufe für jede Aufbereitung und die entsprechende Standardabweichung. Im Anhang finden sich in Tabelle 74 die einzelnen Ct-Werte von jedem Lauf der 3 Aufbereitungen, aus denen sich die Mittelwerte in Tabelle 46 zusammensetzen.

Tabelle 46: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „Pre“ mit dem MAP-Stamm NB – Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s) der PCR-Läufe jeder Aufbereitung (Ct-Werte) mit unterschiedlichen Verfahren

MAP-Zellen pro 10 ml SAN „Pre“	Real Time-PCR	Einmischversuch NB			
		Maxwell[1)]		Roche[2)]	
		$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
7,0 x 10^4	1. Aufber.	23,99	0,23	23,95	0,20
	2. Aufber.	24,33	0,20	23,33	0,10
	3. Aufber.	24,53	0,33	23,71	0,21
7,0 x 10^3	1. Aufber.	27,93	0,30	27,38	0,17
	2. Aufber.	27,62	0,33	26,48	0,17
	3. Aufber.	28,11	0,20	26,76	0,20
7,0 x 10^2	1. Aufber.	31,19	0,10	31,19	0,26
	2. Aufber.	31,36	0,32	30,33	0,21
	3. Aufber.	31,32	0,17	30,74	0,09
7,0 x 10^1	1. Aufber.	34,83	0,11	35,58	0,69
	2. Aufber.	34,93	0,32	34,46	0,19
	3. Aufber.	34,32	0,78	34,54	0,06
7,0 x 10^0	1. Aufber.	38,39	1,40	37,84	1,91
	2. Aufber.	37,72	2,03	37,94	1,85
	3. Aufber.	38,86	1,11	38,19	1,65

[1)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[2)] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)

Tabelle 47 zeigt die Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale in der Real Time-PCR unter Berücksichtigung der 3 Läufe jeder Aufbereitungen.

Tabelle 47: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „Pre“ mit dem MAP-Stamm NB – Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale in der Real Time-PCR unter Berücksichtigung der Läufe der einzelnen Aufbereitungen (n=3)

MAP-Zellen pro 10 ml SAN „Pre“	Einmischversuch NB					
	Maxwell[1)]			Roche[2)]		
	1. Aufb.	2. Aufb.	3. Aufb.	1. Aufb.	2. Aufb.	3. Aufb.
$7{,}0 \times 10^4$	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
$7{,}0 \times 10^3$	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
$7{,}0 \times 10^2$	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
$7{,}0 \times 10^1$	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
$7{,}0 \times 10^0$	2	2	2	2	2	2

[1)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[2)] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)

4.5.2 Zusammenfassung der molekularbiologischen Ergebnisse

Die folgenden Tabellen zeigen eine Zusammenfassung der Ergebnisse aller vier Einmischversuche mit Säuglingsanfangsnahrung „Pre“. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Tabellen, in denen getrennt nach Stämmen und Verfahren dargestellt wurde, findet sich hier eine Darstellung getrennt nach Verfahren, aber über alle Stämme gemittelt. In Tabelle 48 ist für jedes der beiden verwendeten Verfahren der Mittelwert der Ct-Werte aus allen Aufbereitungen für jede Verdünnungsstufe angegeben. Der Mittelwert eines jeden Verfahrens besteht auf jeder Verdünnungsstufe demnach aus 36 Einzelmessungen. Konnte in einer Probe keine MAP-DNA nachgewiesen werden, so wurde diese mit *nicht nachweisbar* (n.n.) gekennzeichnet. Bei der Berechnung der Mittelwerte wurde für solche Proben der Ct-Wert = 40 gesetzt, dies entspricht dem Cut-off. Die gemittelten Ct-Werte der beiden verwendeten DNA-Extraktionsverfahren liegen, wie schon bei der Matrix Rohmilch, in ähnlichen Bereichen mit einem Unterschied von nur einem PCR-Zyklus.

Tabelle 48: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „Pre“ mit verschiedenen MAP-Stämmen (n=4) - Mittelwerte der Ct-Werte aller Aufbereitungen (n=3) und Läufe (n=3) für die einzelnen Verdünnungsstufen

[1)]	Maxwell[2)]	Roche[3)]
$8{,}3 \times 10^4$	23,57	22,23
$8{,}3 \times 10^3$	26,99	25,74
$8{,}3 \times 10^2$	30,09	29,18
$8{,}3 \times 10^1$	33,82	32,94
$8{,}3 \times 10^0$	38,06	37,21

[1)] Mittelwert aus $7{,}4 \times 10^x$, $9{,}4 \times 10^x$, $9{,}3 \times 10^x$ und $7{,}0 \times 10^x$ MAP-Zellen/10 ml SAN „Pre“
[2)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[3)] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)

Auf die Darstellung einer Standardabweichung wurde erneut bewusst verzichtet (siehe *Hauptversuch 1: Rohmilch* Kapitel 4.4.2).

Unter Berücksichtigung der einzelnen Ct-Werte erfolgt in Tabelle 49 die Darstellung der Anzahl positiver Fluoreszenzsignale in der PCR für jedes Verfahren, auch hier wieder über alle Stämme hinweg. Für die Aufbereitungen mit den DNA-Extraktionskits von Roche und Promega zeigten sich bis einschließlich einer Einmischkonzentration von 10^1 MAP-Zellen/10 ml Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ identische Nachweisraten von 100%. Auf der Stufe der niedrigsten Einmischkonzentration von 10^0 MAP-Zellen/10 ml Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ hatte das Extraktionskit des *Maxwell® 16 Systems* etwas bessere Nachweisraten.

Tabelle 49: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „Pre“ mit verschiedenen MAP-Stämmen (n=4) - Nachweisrate und Anzahl positiver Signale für die einzelnen Verfahren unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufen

[1)]	Maxwell[2)]		Roche[3)]	
$8{,}3 \times 10^4$	100 %	36/36	100 %	36/36
$8{,}3 \times 10^3$	100 %	36/36	100 %	36/36
$8{,}3 \times 10^2$	100 %	36/36	100 %	36/36
$8{,}3 \times 10^1$	100 %	36/36	100 %	36/36
$8{,}3 \times 10^0$	78 %	28/36	67 %	24/36

[1)] Mittelwert aus $7{,}4 \times 10^x$, $9{,}4 \times 10^x$, $9{,}3 \times 10^x$ und $7{,}0 \times 10^x$ MAP-Zellen/10 ml SAN „Pre“
[2)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[3)] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)

4.6 Hauptversuch 3: Säuglingsanfangsnahrung „One“

4.6.1 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen

Im Folgenden sind die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen tabellarisch dargestellt. Angegeben sind die Ct-Werte der Real Time-PCR, bei der das Fluoreszenzsignal für den Marker *f*57 detektiert wurde. Mit dem *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* wurde aus jeder Verdünnungsstufe der gespikten Säuglingsanfangsnahrung „One“ die DNA von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* isoliert. Die Aufbereitung mit dem Kit wurde für den Stamm 423 auf jeder Stufe insgesamt dreimal durchgeführt. Das Eluat jeder Aufbereitung wurde wieder in drei voneinander unabhängigen Läufen mittels Real Time-PCR untersucht.

Jede Aufbereitung mit dem *Maxwell® 16 System* wurde für die Verdünnungsstufen 10^{-3} bis 10^{-7} sowie die native Säuglingsanfangsnahrung „One“ durchgeführt. In keiner der nativen Proben wurde *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* detektiert, daher wurde die Darstellung in der Tabelle vernachlässigt.

Konnte in einer Probe keine MAP-DNA nachgewiesen werden, so wurde diese mit *nicht nachweisbar* (n.n.) gekennzeichnet. Bei der Berechnung der Mittelwerte wurde für solche Proben der Ct-Wert = 40 gesetzt, dies entspricht dem Cut-off.

Für den **Stamm 423** hat sich gezeigt, dass der Nachweis von MAP-DNA mit dem verwendeten Extraktionsverfahren von Promega bis einschließlich 1,8 x 10^2 MAP-Zellen/10 ml Säuglingsanfangsnahrung „One“ in allen Aufbereitungen positive PCR-Ergebnisse brachte. Auch auf der Stufe mit eingemischten 1,8 x 10^1 MAP-Zellen/10 ml zeigten einzelne Aufbereitungen noch positive Fluoreszenzsignale, teilweise jedoch nicht bei allen drei Läufen.
Für den Stamm 423 zeigt Tabelle 50 die Mittelwerte der 3 Läufe für jede Aufbereitung und die entsprechende Standardabweichung. Im Anhang finden sich in Tabelle 75 die einzelnen Ct-Werte von jedem Lauf der 3 Aufbereitungen, aus denen sich die Mittelwerte in Tabelle 50 zusammensetzen.

Tabelle 51 zeigt die Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale in der Real Time-PCR unter Berücksichtigung der 3 Läufe jeder Aufbereitung.

Tabelle 50: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „One“ mit dem MAP-Stamm 423 – Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s) der PCR-Läufe jeder Aufbereitung (Ct-Werte) mit unterschiedlichen Verfahren

MAP-Zellen pro 10 ml SAN „One“	Real Time-PCR	Einmischversuch 423 Maxwell[1)]	
		$\bar{x}$	s
$1{,}8 \times 10^5$	1. Aufber.	31,39	0,27
	2. Aufber.	30,98	0,15
	3. Aufber.	29,29	0,29
$1{,}8 \times 10^4$	1. Aufber.	33,17	0,26
	2. Aufber.	30,60	0,36
	3. Aufber.	32,17	0,23
$1{,}8 \times 10^3$	1. Aufber.	32,74	0,46
	2. Aufber.	35,73	0,18
	3. Aufber.	35,20	0,27
$1{,}8 \times 10^2$	1. Aufber.	36,52	0,72
	2. Aufber.	36,08	0,62
	3. Aufber.	38,27	1,52
$1{,}8 \times 10^1$	1. Aufber.	39,51	0,85
	2. Aufber.	n.n.	n.n.
	3. Aufber.	39,33	1,15

[1)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
n.n. = nicht nachweisbar

Tabelle 51: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „One“ mit dem MAP-Stamm 423 – Anzahl der positiven Fluoreszenzsignale in der Real Time-PCR unter Berücksichtigung der Läufe der einzelnen Aufbereitungen (n=3)

MAP-Zellen pro 10 ml SAN „One“	Einmischversuch 423 Maxwell[1)]		
	1. Aufb.	2. Aufb.	3. Aufb.
$1{,}8 \times 10^5$	**3**	**3**	**3**
$1{,}8 \times 10^4$	**3**	**3**	**3**
$1{,}8 \times 10^3$	**3**	**3**	**3**
$1{,}8 \times 10^2$	**3**	**3**	2
$1{,}8 \times 10^1$	1	0	1

[1)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)

4.6.2 Zusammenfassung der molekularbiologischen Ergebnisse

Die folgenden Tabellen zeigen eine Zusammenfassung der Ergebnisse des Einmischversuchs mit Säuglingsanfangsnahrung „One“. In Tabelle 52 ist für das verwendete Verfahren der Mittelwert der Ct-Werte aus allen Aufbereitungen für jede Verdünnungsstufe angegeben. Der Mittelwert besteht auf jeder Verdünnungsstufe aus neun Einzelmessungen, da nur ein MAP-Stamm verwendet wurde. Konnte in einer Probe keine MAP-DNA nachgewiesen werden, so wurde diese mit *nicht nachweisbar* (n.n.) gekennzeichnet. Bei der Berechnung der Mittelwerte wurde für solche Proben der Ct-Wert = 40 gesetzt, dies entspricht dem Cut-off. Die Darstellung der Ergebnisse in den Tabelle 52 und Tabelle 53 entspricht der Darstellung in den zuvor durchgeführten Hauptversuchen, aufgrund des einzelnen durchgeführten Extraktionsverfahrens ist ein Vergleich hier nicht möglich.

Auf die Darstellung einer Standardabweichung wurde erneut bewusst verzichtet (siehe *Hauptversuch 1: Rohmilch* Kapitel 4.4.2). Zwar enthielten alle Pellets dieses Einmischversuches den gleichen Stamm und die gleiche Milch. Dennoch wurden drei voneinander unabhängige Aufbereitungen durchgeführt, die als zusätzliche Einflussgröße für die Standardabweichung betrachtet werden müssen.

Tabelle 52: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „One“ mit einem MAP-Stamm - Mittelwert der Ct-Werte aller Aufbereitungen (n=3) und Läufe (n=3) für die einzelnen Verdünnungsstufen

[1)]	Maxwell[2)]
$1{,}8 \times 10^5$	30,55
$1{,}8 \times 10^4$	31,98
$1{,}8 \times 10^3$	34,56
$1{,}8 \times 10^2$	36,96
$1{,}8 \times 10^1$	39,61

[1)] MAP-Zellen pro 10 ml SAN „One“
[2)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)

Unter Berücksichtigung der einzelnen Ct-Werte erfolgt in Tabelle 53 die Darstellung der Anzahl positiver Fluoreszenzsignale in der PCR.

Tabelle 53: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „One“ mit einem MAP-Stamm - Nachweisrate und Anzahl positiver Signale für das verwendete Verfahren unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufen

[1)]	Maxwell[2)]	
1,8 x 10^5	100 %	9/9
1,8 x 10^4	100 %	9/9
1,8 x 10^3	100 %	9/9
1,8 x 10^2	89 %	8/9
1,8 x 10^1	22 %	2/9

[1)] MAP-Zellen pro 10 ml SAN „One“
[2)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)

4.7 Säuglingsanfangsnahrung aus dem Handel

4.7.1 Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ und „Pre HA“

Bei der molekularbiologischen Untersuchung der Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ und „Pre HA“ erwiesen sich alle 16 Produkte als negativ auf MAP-DNA. Mitgeführte Aufbereitungskontrollen sowie Positiv- und Negativkontrollen der PCR reagierten wie erwartet. Auch mit der von Frau Weirich im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführten kulturellen Anzucht und dem *FASTPlaque*TB™-Assay konnten keine MAP-Zellen nachgewiesen werden (Weirich et al., 2011; Weirich, 2012).

4.7.2 Säuglingsanfangsnahrung „One“

Auch bei der molekularbiologischen Untersuchung der Säuglingsanfangsnahrung „One“ erwiesen sich alle acht Produkte als negativ auf MAP-DNA. Mitgeführte Aufbereitungskontrollen sowie Positiv- und Negativkontrollen der PCR reagierten auch hier wie erwartet. Mit der kulturellen Anzucht konnten keine lebenden MAP-Zellen nachgewiesen werden.

5 Statistische Auswertung

5.1 Regressionsanalyse

Wie bereits bei Hauptversuch 1 für die Matrix **Rohmilch** beschrieben, wurde für jeden MAP-Stamm ein eigener Einmischversuch durchgeführt. Die Isolierung der DNA erfolgte mit jedem Protokoll (n=3) für die Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-7} sowie die native Rohmilch (n=8) im Dreifachansatz und wurde in drei unabhängigen Läufen mittels PCR untersucht. Dies ergab 24 Aufbereitungen sowie 72 PCR-Ergebnisse je Protokoll und Stamm. Für jeden Einmischversuch lagen am Ende aller Aufbereitungen und PCR-Läufe 216 PCR-Ergebnisse vor. Unter Berücksichtigung aller Stämme (n=4) standen für die statistische Auswertung insgesamt 864 PCR-Ergebnisse zur Verfügung.

In Hauptversuch 2 wurde die Matrix **Säuglingsanfangsnahrung „Pre“** ähnlich dem Vorgehen in Hauptversuch 1 untersucht. Verwendet wurden hier 2 Verdünnungsstufen weniger und die Aufbereitung erfolgte mit zwei unterschiedlichen Protokollen. Dies ergab 18 Aufbereitungen sowie 54 PCR-Ergebnisse je Protokoll und Stamm. Für jeden Einmischversuch lagen am Ende aller Aufbereitungen und PCR-Läufe 108 PCR-Ergebnisse vor. Unter Berücksichtigung aller Stämme (n=4) standen für die statistische Auswertung insgesamt 432 PCR-Ergebnisse zur Verfügung.

In Hauptversuch 3 wurde die **Säuglingsanfangsnahrung „One“** untersucht. Im Unterschied zu den beiden anderen Hauptversuchen wurde hier nur ein Stamm und ein Protokoll verwendet, so dass 18 Aufbereitungen sowie 54 PCR-Ergebnisse für die statistische Auswertung zur Verfügung standen.

Tabelle 54 zeigt die im Rahmen der Einmischversuche durchgeführten Untersuchungen.

Tabelle 54: Übersicht der durchgeführten Untersuchungen im Rahmen der Einmischversuche

Matrix	Rohmilch	Säuglingsanfangsnahrung	
		„Pre“	„One“
Anzahl der verw. Stämme	4	4	1
Anzahl der Verdünnungsstufen	7	5	5
Anzahl der verw. Extraktionsverfahren	3	2	1
Ergebnisse für die statistische Analyse	864	432	54

Basierend auf den Daten der molekularbiologischen Untersuchungen wurde mit dem Programm BMDP6D für jedes Verfahren mit jeder Matrix eine Regressionsanalyse durchgeführt. Die ermittelten Regressionsgeraden zeigt Tabelle 55.

Tabelle 55: Regressionsgeraden der unterschiedlichen Verfahren für Milch und Säuglingsanfangsnahrung

Verfahren	Rohmilch	Säuglingsanfangsnahrung	
		„Pre“	„One“
Maxwell[1)]	y = -3,69 * x + 48,50	y = -3,58 * x + 40,95	y = -2,31 * x + 42,25
Roche[2)]	y = -3,90 * x + 48,77	y = -3,72 * x + 40,30	n.d.
Qiagen[3)]	y = -3,95 * x + 49,21	n.d.	n.d.

[1)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[2)] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)
[3)] *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Fa. Qiagen)
n.d. = nicht durchgeführt

Die ermittelten Regressionsgeraden der verwendeten Verfahren zeigen, dass der y-Achsenabschnitte (x=0) für die Matrix Rohmilch im fiktiven Ct-Bereich von 49 liegt. Für Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ wird die y-Achse bereits bei einem Ct-Wert von knapp 41 geschnitten und liegt damit deutlich niedriger als bei Rohmilch. Dies gilt auch für Säuglingsanfangsnahrung „One“. Mit einem y-Achsenabschnitt von ca. 42 ist dieser vergleichbar mit Säuglingsanfangsnahrung „Pre“.

Die Steigung der Regressionsgerade für Rohmilch und Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ dagegen liegt mit -3,5 bis -4,0 in einem ähnlichen Bereich. Die Steigung für Säuglingsanfangsnahrung „One“ ist hier mit -2,3 deutlich geringer als für die anderen beiden Matrizes.

Abbildung 18 und Abbildung 19 zeigen die grafische Darstellung der Regressionsgeraden. Zugunsten der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Einzeldaten verzichtet. Die Ähnlichkeit der Regressionsgeraden innerhalb der gleichen Matrix zeigt sich im Vergleich deutlich.

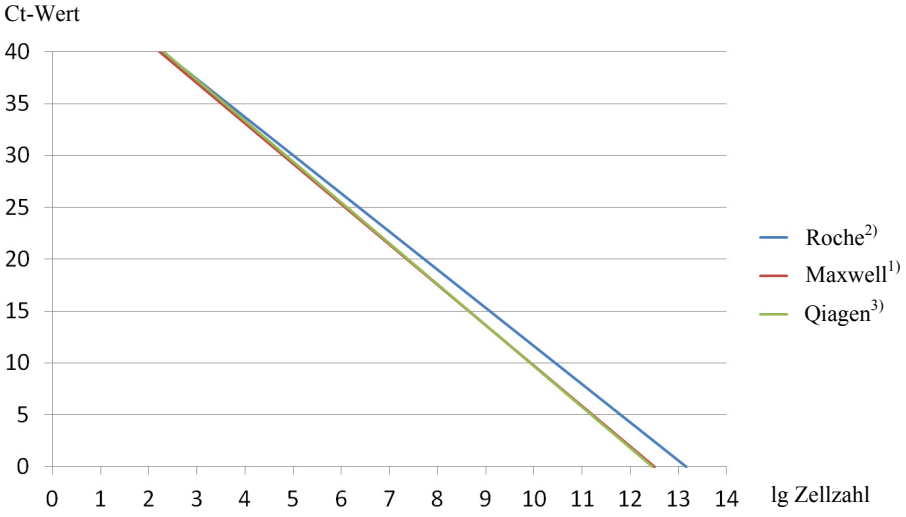


Abbildung 18: Grafische Darstellung der Regressionsgeraden der eingesetzten Verfahren in Rohmilch

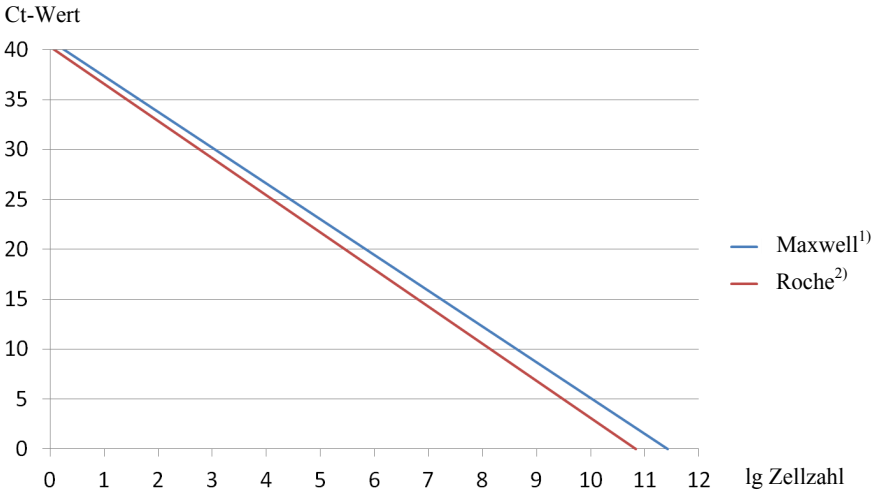


Abbildung 19: Grafische Darstellung der Regressionsgeraden der eingesetzten Verfahren in Säuglingsanfangsnahrung „Pre“

[1)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[2)] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)
[3)] *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Fa. Qiagen)

5.2 Nachweisgrenzen

Basierend auf den Daten der Regressionsanalyse (siehe Kapitel 5.1) wurde die Nachweisgrenze der unterschiedlichen Extraktionsverfahren für die verwendeten Matrizes Rohmilch sowie Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ und „One“ ermittelt. Hierbei handelt es sich um einen Schätzwert. Dieser gibt die Zellzahl an, die mit 95%iger Wahrscheinlichkeit vom Ct-Wert 40 abgegrenzt werden kann. Einfluss hat bei der Berechnung neben der Regressionsgeraden auch die Standardabweichung des jeweiligen Verfahrens. Die Darstellung der Nachweisgrenzen für die unterschiedlichen Extraktionsverfahren und Matrizes zeigt Tabelle 56.

Tabelle 56: Ermittlung der Nachweisgrenzen der unterschiedlichen Verfahren in unterschiedlichen Matrizes basierend auf den Regressionsanalysen (Ermittlung der Zellzahl, die mit 95%iger Wahrscheinlichkeit vom Ct-Wert 40 abgegrenzt werden kann)

Verfahren	MAP-Zellen/10 ml Rohmilch	MAP-Zellen/10 ml Säuglingsanfangsnahrung	
		„Pre“	„One“
Maxwell[1)]	$6{,}14 \times 10^2$	$4{,}10 \times 10^0$	$6{,}46 \times 10^1$
Roche[2)]	$6{,}28 \times 10^2$	$4{,}74 \times 10^0$	n.d.
Qiagen[3)]	$7{,}13 \times 10^2$	n.d.	n.d.

[1)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[2)] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)
[3)] *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Fa. Qiagen)
n.d. = nicht durchgeführt

Die Nachweisgrenzen in Rohmilch liegen für die drei eingesetzten DNA-Extraktionsverfahren rechnerisch in einem Bereich von 614 – 713 MAP-Zellen/10 ml Rohmilch. Für Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ liegt die errechnete Nachweisgrenze mit 4,1 bis 4,7 MAP-Zellen/10 ml um zwei Zehnerpotenzen niedriger. Die ermittelte Nachweisgrenze für Säuglingsanfangsnahrung „One“ liegt mit 65 MAP-Zellen/10 ml im Bereich zwischen Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ und Rohmilch.

5.3 Analyse der Aufbereitungen und Läufe

Bei den durchgeführten molekularbiologischen Untersuchungen wurden in Rohmilch sowie in Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ und „One“ verschiedene MAP-Stämmen eingemischt. Die Aufbereitung wurde bei Rohmilch mit drei unterschiedlichen DNA-Extraktionskits durchgeführt, bei Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ mit zwei und bei „One“ mit einem (siehe Kapitel 3.3.10.1 Hauptversuch1: Rohmilch, Kapitel 3.3.10.2 Hauptversuch 2: Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ und Kapitel 3.3.10.3 Hauptversuch 3: Säuglingsanfangsnahrung „One“). Die Aufbereitung jeder Verdünnungsstufe jeden Stammes und jeder Matrix wurde jeweils dreimal durchgeführt. Jede dieser Aufbereitungen brachte 100 µl Eluat. Dieses Eluat wurde im Dreifachansatz in der PCR untersucht. Hierfür wurden je 5 µl eingesetzt.

Wie zu erwarten, war das Ergebnis bei 3 Läufen nicht immer einheitlich. Bei der Matrix Rohmilch waren die Ergebnisse der drei Läufe bis einschließlich einem Bereich von 10^4 MAP-Zellen/10 ml einheitlich, bei Säuglingsanfangsnahrung „One“ bis 10^3 MAP-Zellen/10 ml sowie „Pre“ sogar bis 10^2 MAP-Zellen/10 ml. Tabelle 57 gibt einen Überblick über die Aufbereitungen, in denen sich die Ergebnisse innerhalb der Läufe unterscheiden.

Tabelle 57: Übersicht über die Aufbereitungen, deren Läufe unterschiedliche Ergebnisse lieferten

Matrix	Rohmilch	Säuglingsanfangsnahrung	
		„Pre“	„One“
Einmischbereich an MAP-Zellen, bei dem unterschiedliche Ergebnisse innerhalb der Läufe auftreten	10^1 - 10^3	10^1	10^1 - 10^2
Anzahl der Aufbereitungen innerhalb dieser Stufen	108	24	6
Anteil der Aufbereitunge, in denen unterschiedliche Ergebnisse innerhalb der Läufe auftreten	27	14	3
Angabe in %	25%	58%	50%

Bei der Matrix Rohmilch wiesen 25% der Aufbereitungen Läufe mit unterschiedlichen Ergebnissen auf. Der Anteil dieser liegt für Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ und „One“ bei 58% und 50%. Diese Anteile erscheinen auf den ersten Blick hoch, relativieren sich aber in

Hinblick auf die Tatsache, dass durch die positiven Ergebnisse in einem Bereich von bis zu 10^1 MAP-Zellen/10 ml wenig Ergebnisse erzielt wurden, die in allen drei Läufen ein negatives Ergebnis aufwiesen. Diese nahmen bei Rohmilch immerhin 50% ein, traten in den untersuchten Stufen bei Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ und „One“ gar nicht auf.

In den folgenden Betrachtungen wurden bei den Berechnungen der Anteile die Aufbereitungen, die entweder in allen Läufen ein positives oder negatives Ergebnis lieferten, nicht mit einbezogen. Die Verteilung der Ergebnisse in Bezug auf die verschiedenen Extraktionsverfahren war gleichmäßig, wie die Darstellung in Tabelle 58 zeigt. Basierend darauf wurde im weiteren Verlauf eine verfahrensübergreifende Berechnung gewählt und nicht weiter differenziert.

Tabelle 58: Verteilung der Aufbereitungen mit unterschiedlichen Ergebnissen innerhalb der Läufe unter Berücksichtigung der verwendeten Extraktionsverfahren

Matrix	Rohmilch	Säuglingsanfangsnahrung	
		„Pre“	„One“
Maxwell[1)]	37%	50%	100%
Roche[2)]	30%	50%	n.d.
Qiagen[3)]	33%	n.d.	n.d.

[1)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[2)] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)
[3)] *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Fa. Qiagen)
n.d. = nicht durchgeführt

Die folgende Tabelle 59 gibt Aufschluss darüber, wie die Verteilung der unterschiedlichen Ergebnisse aussah. Matrixübergreifend betrachtet zeigt sich, dass bei den vorliegenden Untersuchungen nur 46% (n=20) der Proben, in denen MAP-Zellen eingemischt waren, mit einer Aufbereitung im ersten Lauf erkannt worden wären. 14% (n=6) davon wären jedoch in einem weiteren Lauf als positiv detektiert worden. 54% (n=24) der Proben wären also unerkannt geblieben, wenn eine Aufbereitung nur einmal in der PCR untersucht worden wäre. Das zweimalige Untersuchen mittels PCR dagegen hätte in 82% (n=36) der Fälle zu mindestens einem positiven Ergebnis bei einem der Läufe geführt, in 17% (n=6) der Fälle davon wären sogar beide Läufe positiv detektiert worden. Mit einem dritten Lauf erneut positiv bestätigt worden wären 39% (n=14), die restlichen 61% (n=22) hätten in einem dritten Lauf wieder ein negatives Ergebnis gebracht.

Werden alle drei durchgeführten Läufe pro Aufbereitung in die Betrachtung einbezogen, so zeigt sich, dass in 53% (n=24) der Fälle ein positives Ergebnis vorlag. In 18% (n=8) der Proben wurde dieses erst beim dritten Lauf erzielt. Dagegen lieferten 45% (n=20) der Aufbereitungen in drei Läufen zwei positive Ergebnisse.

Die Unterschiede bei differenzierter Betrachtung getrennt nach Rohmilch und Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ zeigten sich vor allem bei genauerer Betrachtung der ersten zwei Läufe. Bei Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ konnten mit 69% (n=9) deutlich mehr Proben im dritten PCR-Lauf bestätigt werden als bei Rohmilch. Dort gelang dies nur in 23% der Fälle (n=5).

Tabelle 59: Detaillierte Darstellung verschiedener Kombinationen bei Aufbereitungen mit unterschiedlichen Ergebnissen innerhalb der Läufe

	Rohmilch	Säuglingsanfangs-nahrung „Pre“	Matrix-übergreifend*
positives Ergebnis beim ersten Lauf	41%	57%	46%
davon Bestätigung beim Wiederholungslauf	11%	14%	14%
unerkannt beim ersten Lauf	59%	43%	54%
positives Ergebnis innerhalb von zwei Läufen	81%	93%	82%
davon bestätigt im dritten Lauf	23%	69%	39%
davon unbestätigt im dritten Lauf	77%	31%	61%
ein positives Ergebnis innerhalb der drei Läufe	70%	21%	55%
zwei positive Ergebnisse innerhalb der drei Läufe	30%	79%	45%
positives Ergebnis erst beim dritten Lauf	36%	7%	18%

* inklusive Säuglingsanfangsnahrung „One“

Extreme Fälle traten insgesamt selten auf. Ein Beispiel dafür ist der Fall, bei dem der erste Lauf einer Aufbereitung positiv war, gefolgt von zwei negativen Ergebnissen, sowie sich die beiden folgenden Aufbereitungen in allen Läufen als negativ auf den Nachweis von MAP-DNA erwiesen. Ein weiteres Beispiel für ein extremes Ergebnis war das Auftreten von drei negativen Läufen in zwei Aufbereitungen und drei positiven Ergebnissen in der dritten Aufbereitung. Beide Varianten traten aber jeweils nur einmal auf.

Betrachtet man hingegen von jeder Aufbereitung nur den ersten Lauf in der PCR und vernachlässigt die beiden folgenden, so simuliert dies den Fall, dass man dem ersten Lauf der PCR vertraut. Das Ergebnis der zweiten Aufbereitung stellt somit die Wiederholung der Aufbereitung dar, die anstelle einer Wiederholung des Laufes durchgeführt wurde.
Betrachtet werden im Folgenden die Proben, bei denen sich innerhalb der durchgeführten drei Aufbereitungen die Ergebnisse des jeweils ersten Laufes unterscheiden. Tabelle 60 gibt einen Überblick über diese Proben.

Tabelle 60: Übersicht über die Proben, die bei Betrachtung des ersten Laufes jeder Aufbereitung unterschiedliche Ergebnisse lieferten

Matrix	Rohmilch	Säuglingsanfangsnahrung	
		„Pre“	„One“
Einmischbereich an MAP-Zellen, bei dem unterschiedliche Ergebnisse innerhalb des ersten Laufes der drei Aufbereitungen auftraten	10^1 - 10^3	10^1	-
Anzahl der Proben innerhalb dieses Einmischbereiches	36	8	-
Anteil der Proben, bei denen unterschiedliche Ergebnisse innerhalb des ersten Laufes der drei Aufbereitungen auftraten	14	3	-
Angabe in %	39%	38%	0%

Bei der Matrix Rohmilch wiesen insgesamt 39% der Proben (n=14) bei der Betrachtung des ersten Laufes jeder der drei Aufbereitungen unterschiedliche Ergebnisse auf. Der Anteil dieser liegt für Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ bei 38% (n=3). Für Säuglingsanfangsnahrung „One“ traten bei dieser Art der Betrachtung der Ergebnisse keine unterschiedlichen Ergebnisse auf. Aufgrund der geringen Anzahl zu berücksichtigender Proben für Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ und „One“ werden diese in der weiteren Darstellung nicht berücksichtig.

Die folgende Tabelle 61 gibt Aufschluss darüber, wie die Verteilung dieser Ergebnisse aussah. Bei der Betrachtung der Ergebnisse für Rohmilch zeigte sich, dass bei den vorliegenden Untersuchungen nur 57% (n=8) der Proben, in denen MAP-Zellen eingemischt waren, mit einer Aufbereitung erkannt worden wären. 38% (n=3) davon wären jedoch mit einer weiteren Aufbereitung als positiv detektiert worden. 36% (n=5) der Proben wären also unerkannt geblieben, wenn nur eine Aufbereitung in der PCR untersucht worden wäre. Das Untersuchen einer Probe im Doppelansatz, also mit zwei Aufbereitungen, dagegen hätte in 45% (n=9) der Fälle zu mindestens einem positiven Ergebnis bei einer der Aufbereitungen geführt.

Tabelle 61: Darstellung verschiedener Ergebniskombinationen bei Betrachtung des ersten Laufes jeder Aufbereitung (berücksichtigt wurden Aufbereitungen mit unterschiedlichen Ergebnissen im ersten Lauf)

	Rohmilch	Matrix-übergreifend*
positives Ergebnis bei der ersten Aufbereitung	57%	53%
davon Bestätigung durch zweite Aufbereitung	38%	33%
unerkannt bei nur einer Aufbereitung	43%	47%
positives Ergebnis innerhalb von zwei Aufbereitungen	45%	59%
positives Ergebnis erst beim dritten Lauf	0%	18%

* inklusive Säuglingsanfangsnahrung „Pre“

Der Einfluss auf die unterschiedliche Anzahl von Aufbereitungen der Proben für die PCR und die Anzahl der Läufe einer aufbereiteten Probe in der PCR wird auch bei der statistischen Analyse deutlich. Mit dem Programm BMDP8V wurde eine Streuungsanalyse über die hierarchische Varianz durchgeführt. Tabelle 62 zeigt die dabei ermittelten Standardabweichungen, gegliedert nach den verwendeten Verfahren und Matrizes.

Tabelle 62: Standardabweichungen zwischen den Aufbereitungen und zwischen den Läufen innerhalb einer Aufbereitung für unterschiedliche Extraktionsverfahren in Milch und Säuglingsanfangsnahrung

Verfahren	Standard-abweichung	Rohmilch	Säuglingsanfangsnahrung	
			„Pre“	„One“
Maxwell[1)]	zwischen den Aufbereitung	1,17	0,60	1,12
	zwischen den Läufen	0,62	0,64	0,63
Roche[2)]	zwischen den Aufbereitung	0,77	0,49	n.d.
	zwischen den Läufen	0,62	0,60	
Qiagen[3)]	zwischen den Aufbereitung	0,88	n.d.	n.d.
	zwischen den Läufen	0,51		

[1)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[2)] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)
[3)] *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Fa. Qiagen)
n.d. = nicht durchgeführt

Ausgehend von den Standardabweichungen zwischen den Aufbereitungen und zwischen den Läufen innerhalb der Aufbereitung lassen sich für das jeweilige Verfahren die Standardabweichungen für unterschiedliche Anzahlen an Aufbereitungen und Läufen schätzen. Diese Berechnung wurde für ein bis drei Aufbereitungen sowie ein bis drei Läufe durchgeführt. Die ermittelten Standardabweichungen, gegliedert nach den verwendeten Verfahren und Matrizes, zeigt Tabelle 63. Aus Gründen der Übersichtlichkeit stellen die angegebenen Standardabweichungen den Mittelwert aus den ermittelten Standardabweichungen für 1 bis 3 Läufe dar. Es hat sich gezeigt, dass sich die

Standardabweichung bei gleicher Anzahl der Aufbereitungen, aber steigender Anzahl an Läufen, um maximal 0,1 in der ersten Nachkommastelle verbessert. Größere Auswirkung und damit eine Verringerung der Standardabweichung bringt dagegen eine größere Anzahl an Aufbereitungen. Bei Aufbereitung der Proben im Doppel- statt Einfachansatz verringert die Standardabweichung im Schnitt um 0,2 bis 0,4 Zyklen in der PCR, je nach verwendetem Verfahren und verwendeter Probenmatrix. Eine Aufbereitung der Proben im Dreifach- statt Doppelansatz hingegen senkt die Standardabweichung nur um weitere 0,1 bis 0,2 Zyklen in der PCR.

Tabelle 63: Standardabweichungen für unterschiedliche Anzahlen von Aufbereitungen mit unterschiedlichen Extraktionsverfahren in Milch und Säuglingsanfangsnahrung

Verfahren	Anzahl der Aufbereitungen	Rohmilch	Säuglingsanfangsnahrung	
			„Pre“	„One“
Maxwell[1)]	1	1,27	0,78	1,22
	2	0,90	0,55	0,87
	3	0,73	0,45	0,71
Roche[2)]	1	0,91	0,67	n.d.
	2	0,64	0,48	
	3	0,52	0,39	
Qiagen[3)]	1	0,96	n.d.	n.d.
	2	0,68		
	3	0,56		

[1)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[2)] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)
[3)] *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Fa. Qiagen)
n.d. = nicht durchgeführt

5.4 Einfaktorielle Kovarianzanalyse

Mit dem Programm BMDP1V wurde die einfaktorielle Kovarianzanalyse durchgeführt. Die Auswertung der Analyse für die Matrix Rohmilch zeigte, dass die einzelnen verwendeten Stämme keinen signifikanten Unterschied ($p>0,05$) bezüglich der unterschiedlichen verwendeten DNA-Extraktionsverfahren zeigen.

Für die Matrix Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ zeigten die einzelnen Stämme in der einfaktoriellen Kovarianzanalyse keinen signifikanten Unterschied ($p>0,05$) bezüglich der beiden verwendeten Verfahren.

Die einfaktorielle Varianzanalyse wurde zum Vergleich der Verfahren über alle Stämme hinweg mit dem Programm BMDP2V durchgeführt. Im Vergleich der Methoden untereinander (siehe Kapitel 5.1, Abbildung 18) wurde ein signifikanter Unterschied für die Reaktion der Methoden auf die verschiedenen Verdünnungsstufen ($p=0,0072$) für die Matrix Rohmilch festgestellt.

Für die Matrix Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ war auch im Vergleich der Methoden untereinander (siehe Kapitel 5.1, Abbildung 19) mittels Varianzanalyse kein signifikanter Unterschied nachweisbar ($p>0,05$).

Für die Matrix Säuglingsanfangsnahrung „One“ konnten die beiden genannten Analysen nicht durchgeführt werden, da nur ein Stamm mit einem Extraktionsverfahren untersucht wurde.

6 Diskussion

6.1 Analyse der Vorversuche

In den Vorversuchen wurden kommerziell erhältliche DNA-Extraktionskits modifiziert, um Besonderheiten des Erregers *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* zu berücksichtigen. Eine Modifikation, die bei allen diesen Systemen zu einer signifikanten Verbesserung der Ergebnisse führte, war die mechanische Homogenisierung mittels Precellys® 24. Zahlreiche Untersuchungen bestätigen die Wirksamkeit einer mechanischen Lyse zur Steigerung der Sensitivität eines Verfahrens (Odumeru et al., 2001; O'Mahony und Hill, 2004).

Das in **Vorversuch 1** verwendete *Maxwell® 16 System* zeigte in Kombination mit dem *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* (Fa. Promega), dass die Anwendung von Proteinase K im Vergleich zum Lysozym einen größeren Effekt auf die Extraktion von MAP-DNA aus Milch hat. Die gleichzeitige Verwendung beider Enzyme führte zu keiner Erhöhung der Ausbeute an DNA. Durch die mechanische Homogenisierung wurde offensichtlich die Zellwand bereits effektiv geschädigt und somit führte der Aufschluss mittels Lysozym zu keiner weiteren Verbesserung. Die dabei im Zelllysat befindlichen Proteine werden durch Proteinase K abgebaut. Diese Beobachtung in Bezug auf das Zusammenspiel von Precellys® 24, Lysozym und Proteinase K lässt sich aber aufgrund unterschiedlicher Bedingungen innerhalb der Vorversuche nicht von Vorversuch 1 auf die übrigen Vorversuche übertragen. Möglicherweise spielt der im Kit enthaltene Lysispuffer ebenfalls eine Rolle. Ob dieser Effekt also auch bei anderen Protokollen auftritt, bedarf weiterer Untersuchungen.

Für das in **Vorversuch 2** verwendete *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche) konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung von Lysispuffer, Precellys® 24 sowie die verlängerte Inkubation mit Proteinase K als Modifikationen im Vergleich zum Herstellerprotokoll signifikante Verbesserungen erreicht werden konnten. Für ein positives Signal in der PCR waren durch diese Modifikationen weniger Zyklen nötig.

Bei dem in **Vorversuch 3** verwendeten *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Fa. Qiagen) konnte neben des signifikanten Einflusses von Precellys® 24 auch gezeigt werden, dass eine Verlängerung der Inkubationszeit mit Lysozym und Proteinase K von 30 min auf 90 min zu keiner signifikanten Verbesserung beim Nachweis von MAP-DNA führt.

6.2 Molekularbiologischer Nachweis

Für Milch auf Verbraucherebene bedeutet die Anwesenheit von MAP-DNA, dass lebende Zellen vorhanden waren und zwar in einer Menge, die von dem PCR-Verfahren erfasst werden kann. Eine Vermehrung außerhalb des Wirtes findet bei dem obligat intrazellulären Erreger nicht statt und damit fällt MAP durch die Verdünnung oft (Hammer et al., 2000), aber nicht notwendigerweise (Grant, 2003), unter die Nachweisgrenze.

Dass PCR-Verfahren nicht zwischen lebend und tot differenzieren, wird oft als Kritikpunkt für diese Methode angeführt. Das Finden von MAP mittels PCR zeigt zwar die Anwesenheit des Erregers an, nicht aber notwendigerweise auch die Anwesenheit intakter lebender Zellen (Aboagye und Rowe, 2011). Dem steht jedoch entgegen, dass insbesondere in unbehandelter Matrix wie Rohmilch keine hohe Prävalenz an toten Zellen zu erwarten ist. Anders als bei der kulturellen Anzucht sind die darin enthaltenen MAP-Zellen nicht nachteilig beeinflusst, wie es nach der chemischen Dekontamination der Fall ist. Sollte es dennoch nötig sein, lebende MAP nachzuweisen, so stünden mit dem kombinierten Phage-PCR-Assay (Weirich, 2012; Foddai et al., 2011) auch molekularbiologische Möglichkeiten zur Verfügung.

6.2.1 Zählkammer

Bei den vorliegenden molekularbiologischen Untersuchungen wurde zur Bestimmung der Einmischkonzentration von MAP das Zählkammerverfahren gewählt. Zuvor wurde die für die artifizielle Kontamination der unterschiedlichen Matrizes verwendete MAP-Suspension mittels Photometer bei einer optischen Dichte (OD) von ca. 10% Transmission bei einer Wellenlänge von 660 nm voreingestellt. Das Zählkammerverfahren ist neben der kulturellen Bestimmung der Kolonie-bildenden Einheiten (KbE) ein häufig verwendetes Verfahren (Herthnek et al., 2006; Tasara und Stephan, 2005). Der größte Unterschied hierbei ist, dass neben den lebenden Zellen auch tote Zellen erfasst werden. Dies entspricht der PCR, auch hier werden lebende und tote MAP-Zellen erfasst. Es ist also nicht verwunderlich, dass bei der kulturellen Anzucht geringere KbE/ml ermittelt wurden als durch die Bestimmung mittels Zählkammerverfahren. Je älter eine Kultur, desto höher ist der zu erwartende Anteil an toten Zellen. Ein weiterer Aspekt ist die Neigung von MAP zur Bildung von Aggregaten. Diese können beim Zählkammerverfahren visuell bestimmt oder ausgeschlossen werden (Kralik et al., 2012), bei der kulturellen Anzucht dagegen ist nicht sicher, ob eine Kolonie das Ergebnis einer einzelnen MAP-Zelle oder eines Zellaggregates ist (Herthnek et al., 2006). Ebenfalls

beschrieben sind Gleichungen, anhand derer die Anzahl der MAP-Zellen in KbE/ml ausgehend von der optischen Dichte (OD) bestimmt werden können (Janagama et al., 2006; Bögli-Stuber et al., 2005; Chui et al., 2004). Institutseigene Untersuchungen haben aber weder eine Korrelation zwischen OD und Zählkammer noch zwischen OD und KbE/ml zeigen können, für Zählkammer und kulturelle Anzucht hingegen schon (Weirich, 2012).

Eigenen Erfahrungen zufolge enthält eine MAP-Suspension etwa 10^8 MAP-Zellen/ml, wenn eine OD von 10% Transmission bei einer Wellenlänge von 660 nm eingestellt wurde. Die durch kulturelle Anzucht ermittelten KbE/ml lagen durchschnittlich 1-2 Zehnerpotenzen darunter. Die tatsächliche Anzahl an MAP wird durch die Anzahl lebender MAP-Zellen aus o.g. Gründen leicht unterbewertet. Würde die Anzahl lebender MAP-Zellen molekularbiologischen Untersuchungen zugrunde gelegt werden, so käme es zu einer Überbewertung der Sensitivität dieser (Herthnek et al., 2006). Es wäre also falsch, die Quantifizierung von MAP mittels kultureller Methoden den molekularbiologischen Untersuchungen zugrunde zu legen. Es ist dennoch wichtig, sich bewusst zu sein, dass die beschriebenen MAP-Konzentrationen, trotz Zählung im Dreifachansatz, Annäherungen darstellen. Die exakte Konzentration von MAP lässt sich nicht bestimmen.

Bei der Zählung der MAP-Zellen erwies sich die für MAP beschriebene Aggregatbildung nicht als Problem. Unter dem Lichtmikroskop waren deutliche Einzelzellen erkennbar. Pickup et al. (2005) beschrieben die Zählung von MAP aufgrund der Aggregatbildung als schwierig und vermuteten eine Unterschätzung der Zahlen. Bei den eigenen Untersuchungen wurden verschiedene Maßnahmen ergriffen, um diesem Problem entgegen zu wirken. So wurde zur Anzucht von MAP ein tweenhaltiges Flüssigmedium eingesetzt. Tween ist ein anionisches Tensid, das die Bildung von Einzelzellen fördern bzw. die Tendenz der Aggregatbildung reduzieren soll (Rowe et al., 2000). Die Anzucht erfolgte schüttelnd, da MAP eine verringerte Bildung von Zellaggregaten zeigt, wenn es schüttelnd in Flüssigmedien angezüchtet wird (Hughes et al., 2001). Zusätzlich enthält jedes Glasfläschchen 10-15 SiLibeads®. Im Vorfeld der photometrischen Einstellung der OD wird die MAP-Suspension ebenfalls mit SiLibeads® gevortext. Dieses Vorgehen erwies sich als wirkungsvoll, um Zellaggregaten entgegen zu wirken.

6.2.2 Extraktionsverfahren

Ein wichtiger Schritt bei der Steigerung der Sensitivität der PCR ist die Probenvorbereitung einschließlich des Extraktionsverfahrens. Unter besonderer Berücksichtigung der speziellen Zellwandstruktur von MAP, die sie resistenter gegen Zelllyse macht als andere Bakterien, sind zahlreiche Verfahren hierfür in der Literatur beschrieben. Die häufigste Vorgehensweise für den Nachweis von MAP in Milch basiert auf der Zentrifugation einer größeren Menge Milch, von der nachfolgend das Pellet mit oder ohne Rahm für die DNA-Extraktion verwendet wird (Bosshard et al., 2006; O'Mahony und Hill, 2004; Rodriguez-Lazaro et al., 2005; Tasara und Stephan, 2005). Diese wiederum besteht aus einer Kombination von mechanischen Verfahren, Lyse und anschließender DNA-Extraktion (Grant et al., 1998b; Odumeru et al., 2001). Mechanische Verfahren (z.B. Bead Beating) alleine erwiesen sich als ausreichend in der Steigerung der Sensitivität für MAP in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS), nicht aber für gespikte Milch oder Kot (Khare et al., 2004). Eine weitere Steigerung der Sensitivität ist auch durch immunomagnetische Separation (IMS) beschrieben (Grant et al., 1998b; Grant et al., 2000; Stratmann et al., 2002; Djønne et al., 2003; Metzger-Boddien et al., 2006).

Zu Beginn der eigenen Untersuchungen wurden sowohl die immunomagnetische Separation (IMS) als auch die peptidvermittelte Separation (PMS) zur Steigerung der Sensitivität bei der Probenvorbereitung getestet. Zum Einsatz kamen zwei Produkte: Pathatrix PM50- und aMptD-gekoppelte Beads. Die kommerziell erhältlichen Pathatrix PM50-Beads (Matrix Microscience Ltd., Newmarket, Großbritannien) haben auf ihrer Oberfläche Antikörpern gegen MAP. Bei dem zweiten Produkt wurde das Peptid aMptD (Fa. Affina Immuntech, Berlin) mittels Kohlenwasserstoff-Carbodiimide-Verbindung an paramagnetischen Beads gekoppelt (Fa. Chemicell, Berlin). Das Prinzip der Bindung von MAP an das Peptid beruht auf einer spezifischen Rezeptor-Ligand-Reaktion. Für beide Verfahren wurde das Probenpellet mit 10 µl der Beads versetzt, gefolgt von einer 30 minütigen Inkubationsphase und zwei Waschschritten. Aus dem verbleibenden Pellet wurde die DNA extrahiert. Verwendet wurden dafür die aus den Hauptversuchen für Milch bekannten modifizierten Protokolle für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega) und das *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche). Für die molekularbiologische Untersuchung wurde die MAPsureEasy® PCR verwendet. Erste Ergebnisse (unveröffentlicht) zeigten keine Steigerung der Sensitivität. Eine zeitgleich veröffentlichte Studie bestätigte die eigenen Ergebnisse. Foddai et al. (2010) zeigten darin, dass die Pathatrix PM50-Beads im Vergleich zu den

anderen untersuchten Beads mit 50% eine höhere Bindungs-Effizienz besaßen. Beads mit dem kovalent gebundenen Peptid aMptD kamen auf nur 30%. Eine Bindungs-Effizienz von 100% wurde von keiner Sorte der verwendeten Beads erreicht. Bei der Untersuchung der nicht-spezifischen Wiederfindungsrate lagen jedoch alle untersuchten Beads bei >10%, Pathatrix PM50 sogar bei 22±11%. Als Empfehlung dieser Studie ging die Verwendung von Beads hervor, welche in einem 50:50 Verhältnis an die biotinylierte Form der aMp3 und aMptD Peptide gebunden waren (Foddai et al., 2010). Eine verringerte Wiederfindung von 16-28% bei kulturellen Verfahren ist auf den Dekontaminationsschritt zurückzuführen (Dundee et al., 2001; Gao et al., 2005). Bei dem beschriebenen Verfahren müsste die Wiederfindung durch IMS bzw. PMS demnach theoretisch bei 100% liegen, da keine Dekontamination nötig ist (Stephan et al., 2007). Dies konnte aber nicht bestätigt werden (ebd). Auch andere Arbeitsgruppen stellten keine Steigerung der Sensitivität bei der Verwendung der IMS im Vergleich zu unbeschichteten Beads fest (Donaghy et al., 2008); eine Beobachtung, die auch schon für Rindersamen gemacht wurde (Herthnek et al., 2006). Andere Studien verzichteten bei vergleichenden Untersuchungen auf die Verwendung von IMS, da Verfahren ohne IMS sich als sensitiver erwiesen (Tasara und Stephan, 2005).

Für die weiteren eigenen Untersuchungen wurde, auch zugunsten von Zeit- und Kostenersparnis, auf die Anwendung der IMS bzw. PMS verzichtet. Stattdessen wurde das *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Fa. Qiagen) als weiteres DNA-Extraktionsverfahren in den Versuchsplan aufgenommen.

Das eingesetzte Probenvolumen für den Nachweis von MAP umfasste 10 ml, unabhängig von der eingesetzten Matrix. Dieses Probenvolumen soll die Nachweiswahrscheinlichkeit für MAP erhöhen, da die Ausscheidung von MAP in Rohmilch gering ist (Sweeney et al., 1992). Ein Volumen von 10 ml ist gut zu verarbeiten. Eine weitere Steigerung des Probenvolumens ist in der Verarbeitung schwieriger. Zudem konnten Untersuchungen von Grant et al. (2000) zeigen, dass das PCR-Signal bei einer konventionellen IS*900* PCR mit steigendem Probenvolumen schwächer wird. Dies kann einerseits an einer schlechteren Wiederfindung bei der Zentrifugation größerer Probenvolumen liegen, andererseits können aber auch mehr hemmende Faktoren im Pellet enthalten sein (Grant et al., 2000). Ziel der Zentrifugationsschritte bei der Probenbearbeitung ist, neben der Konzentration der MAP-Zellen im Pellet, eine Verringerung des Probenvolumens auf ein Maß, das eine DNA-Extraktion ermöglicht.

Die in den Hauptversuchen verwendeten Protokolle wurden in Hinblick auf die Besonderheiten von MAP modifiziert. Das Waschen des Pellets vor der Extraktion soll der Entfernung von Inhibitoren dienen. Dieser Schritt wurde in der Literatur beschrieben (Pillai und Jayarao, 2002; Herthnek et al., 2006; Kaur et al., 2010). Die verwendeten DNA-Extraktionsverfahren unterscheiden sich in ihrem Grundprinzip. Zwei davon basieren auf Säulensystemen mit DNA-Affinität, die über mehrere Waschschritte zu einer Reinigung der DNA von Inhibitoren führen, das dritte Verfahren ist ein automatisiertes System, das mit Hilfe paramagnetischer Magnesil Partikel (PMPs) über eine Reihe von Lyse- und Waschschritten die DNA von MAP isoliert. Allen drei Verfahren gemeinsam sind der vorangestellte mechanische Zellaufschluss durch SiLibeads® im Precellys® 24, Lysisschritte und die anschließende DNA-Aufbereitung. Die statistische Analyse hat gezeigt, dass unabhängig von den unterschiedlichen Grundprinzipien der verwendeten Systeme keine signifikanten Unterschiede bestehen. Dies wird durch die Berechnung der Nachweisgrenze bestätigt. Diese gibt die Zellzahl an, die mit 95%iger Wahrscheinlichkeit von dem Ct-Wert 40, dem sogenannten Cut-off der PCR, unterschieden werden kann. Für die Matrix Rohmilch liegt diese Zellzahl je nach Verfahren in einem Bereich von 600 – 700 MAP-Zellen für ein Probenausgangsvolumen von 10 ml. Damit läge die Nachweisgrenze bei rechnerisch 60-70 MAP-Zellen/ml Rohmilch. Die Matrizes Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ und „One“ haben in den Einmischversuchen eine niedrigere Nachweisgrenze gezeigt. Für Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ liegt diese mit 4-5 MAP-Zellen bei einem Probenausgangsvolumen von 10 ml gut zwei Zehnerpotenzen niedriger als für Rohmilch, für Säuglingsanfangsnahrung „One“ können 60-70 Zellen/10 ml nachgewiesen werden. Rechnerisch läge man damit bei einer Nachweisgrenze von 6-7 MAP-Zellen/ml.

Der Vergleich der gewonnenen Daten mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen ist differenziert zu betrachten. Die Vorgehensweise bei der Bestimmung der eingemischten MAP-Zellen unterscheidet sich teilweise sehr stark. Manche Gruppen legen die ermittelten KbE/ml aus der Anzucht der Verdünnungsreihe der Bestimmung der Nachweisgrenze zugrunde (Donaghy et al., 2011; Odumeru et al., 2001). Da mittels PCR neben lebenden Zellen auch tote Zellen nachgewiesen werden, kann es durch die Unterbewertung der MAP-Zellen durch die Kultur zu einer Überbewertung der Sensitivität der PCR-Methode kommen (Herthnek et al., 2006), wenn diese Zellzahlen dem Einmischversuch zugrunde gelegt werden. Andere Arbeitsgruppen verwenden in ihren Studien das auch in diesen Untersuchungen angewendete Zählkammerverfahren oder Hämozytometrie (Metzger-Boddien et al., 2006;

Khare et al., 2004; Rodriguez-Lazaro et al., 2005). Diese Studien verwenden dafür aber eine andere Zielsequenz in der PCR (Rodriguez-Lazaro et al., 2005) bzw. setzen ein anderes Probenvolumen ein (Slana et al., 2008a), wodurch die Ergebnisse nur eingeschränkt miteinander vergleichbar sind. Ein weiterer Unterschied findet sich in der Probenvorbereitung. In manchen Studien erfolgt der Nachweis von MAP aus dem Pellet (Slana et al., 2008a; Bosshard et al., 2006; Tasara und Stephan, 2005; Rodriguez-Lazaro et al., 2004), wohingegen andere Pellet und Rahm für den Nachweis poolen (Donaghy et al., 2011; O'Mahony und Hill, 2004; Odumeru et al., 2001). Auch die eingesetzte Matrix unterscheidet sich. Das Spektrum umfasst dabei sowohl pasteurisierte Milch (Odumeru et al, 2001), Vollmilch (O'Mahony und Hill, 2004) als auch fettreduzierte Milch (Slana et al., 2008a; Rodriguez-Lazaro et al., 2005). Tabelle 64 gibt eine Übersicht über die Sensitivität verschiedener PCR-Verfahren für den Nachweis von MAP aus Milch.

Tabelle 64: Sensitivität des Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* aus Milch mittels PCR

Referenz	Nachweisgrenze*	Marker	Nachweisverfahren	Proben-volumen
Giese und Ahrens, 2000	1000 KbE/ml	IS*900*	Konventionelle PCR	18 ml
Millar et al., 1996	200-300 MAP/ml	IS*900*	Konventionelle PCR	15 ml
Odumeru et al., 2001	100 KbE/ml	IS*900*	Konventionelle PCR	1 ml
Donaghy et al., 2008	2 MAP-Zellen/ml	IS*900*	Real Time-PCR	10 ml
O'Mahony und Hill, 2004	40 KbE/ml	IS*900*	Real Time-PCR	25 ml
Rodriguez-Lazaro et al., 2005	5 MAP-Zellen/ml	IS*900*	Real Time-PCR	20 ml
Donaghy et al., 2011	0,6 KbE/ml 6,2 KbE/ml	IS*900* *f*57	Real Time-PCR	10 ml
Slana et al., 2008a	83 MAP-Zellen/ml	*f*57	Real Time-PCR	50 ml
Bosshard et al., 2006	100 MAP-Zellen/ml	*f*57	Real Time-PCR	10 ml
Tasara und Stephan, 2005	10-100 KbE/ml	*f*57	Real Time-PCR	10 ml

* Angabe in KbE/ml oder MAP-Zellen/ml, je nach Angabe in der entsprechenden Publikation

Bedingt durch die geringere Anzahl an Kopien im MAP-Genom ist die Sensitivität von *f*57 geringer als die von IS*900* (Donaghy et al., 2011; Hruska et al., 2011; Slana et al., 2008a;

Hruska et al., 2005). Die in den eigenen Untersuchungen ermittelte Nachweisgrenze von 60-70 MAP-Zellen/ml Rohmilch zeigt jedoch, dass unter Verwendung von optimierten DNA-Extraktionsverfahren in Kombination mit einer *f*57-basierten Real Time-PCR ähnliche Nachweisgrenzen, wie Tabelle 64 sie zeigt, erreicht werden können.

Die Tatsache, dass sich die verwendeten DNA-Extraktionsverfahren nicht signifikant unterscheiden und die Nachweisgrenzen der Verfahren untereinander in den verwendeten Matrizes nur geringfügige bis vernachlässigbare Unterschiede aufweisen, ermöglicht, dass andere Kriterien für die Bewertung hinzugezogen werden können. Im Folgenden wird daher auf die Kriterien Anwendbarkeit, Kosten und Zeitaufwand eingegangen.

Die **Anwendbarkeit** wurde in dieser Arbeit nicht für alle drei verwendeten Matrizes mit jedem Verfahren untersucht. Dies war nur für die Matrix Rohmilch der Fall. Die Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ war aufgrund der Zusammensetzung deutlich einfacher zu verarbeiten als Rohmilch. Die Pellets, die bei der Probenvorbereitung entstanden, waren etwas kleiner und ließen sich einfacher resuspendieren. Da die Pellets sich mit dem säulenbasierten Kit der Firma Roche haben aufbereiten lassen, kann davon ausgegangen werden, dass dies auch mit dem ebenfalls säulenbasierten Kit der Firma Qiagen ohne Probleme möglich ist. Die Aufbereitung von Säuglingsanfangsnahrung „One“ stellte dagegen durch den Stärkegehalt eine Herausforderung dar. Das Pellet dieser Proben war deutlich größer als das von Rohmilch und Säuglingsanfangsnahrung „Pre“. Zudem war die bei der Resuspension entstehende Suspension zähflüssig und für den Einsatz der säulenbasierten DNA-Extraktionsverfahren nicht geeignet.

Die **Kosten** (Angabe der Preise ohne Mwst.) für das *High Pure PCR Template Preparation Kit* belaufen sich auf 216 EUR, darin enthalten sind 100 Säulen sowie Puffer und Proteinase K. Aufgrund der Modifikation des Protokolls ist der Binding Buffer jedoch nicht für diese 100 Reaktionen ausgelegt und muss nachgekauft werden. Das *DNeasy® Blood & Tissue Kit* kostet 714 EUR und beinhaltet 250 Säulen sowie Puffer und Proteinase K. Das Maxwell® 16 *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* enthält Kartuschen und Reeagenzien für 48 Proben und liegt bei 120 EUR. Da das Precellys® 24 zum mechanischen Zellaufschluss in der Probenvorbereitung jedes der verwendeten Verfahren vorgesehen ist, wird es bei der Kostenaufstellung nicht weiter berücksichtigt. Kosten und Einsatzmöglichkeiten der verwendeten DNA-Extraktionsverfahren im Vergleich sind in Tabelle 65 dargestellt. Auf die Kosten der kulturellen Anzucht wird an späterer Stelle eingegangen (siehe Kapitel 6.3 Kulturelle Anzucht).

Tabelle 65: Kosten und Einsatzmöglichkeiten für die einbezogenen DNA-Extraktionsverfahren

Extraktions-verfahren	Kosten[4] pro aufbereiteter Probe[5]	Anwendbarkeit der Extraktion auf Milch und Säuglingsanfangsnahrung		
		Milch	„Pre“	„One“
Maxwell[1]	2,50 EUR	✓	✓	✓
Roche[2]	2,16 EUR[6]	✓	✓	-[7]
Qiagen[3]	2,86 EUR	✓	-	-

[1] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[2] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)
[3] *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Fa. Qiagen)
[4] Angabe der Nettopreise (Preis zzgl. Mwst.)
[5] Kontrollen für Aufbereitung und PCR nicht mitgerechnet
[6] zusätzlicher Bedarf an Binding Buffer nicht berücksichtigt
[7] Untersuchung in dieser Arbeit nicht durchgeführt

Für die Betrachtung des **Zeitaufwandes** werden die Probenvorbereitung mit Zentrifugation und Waschschritten sowie das Ansetzen der PCR und der Lauf selbst nicht berücksichtigt, da diese Faktoren bei allen Verfahren die gleiche Zeitdauer in Anspruch nehmen. Ausgehend vom vorbereiteten Pellet bis zum Erhalt des Eluats ist diese Zeitspanne bei Verwendung des *Maxwell® 16 System* mit Abstand am Geringsten. Ein Lauf mit 16 Proben kann innerhalb von 30 min vorbereitet werden, der Lauf selbst dauert 45 min. Diese Zeit kann entweder zur Vorbereitung eines neuen Laufes genutzt werden, oder aber für andere Laborarbeiten. Bei den säulenbasierten Verfahren dagegen zieht sich das Protokoll durch Inkubationen mit Lysozym für 15 min in beiden Protokollen sowie Proteinase K je nach Extraktionskit für 60 min bzw. 30 min in die Länge. Durch die manuelle Bearbeitung der Proben ist die Zeitdauer für die Aufbereitung proportional zu der Anzahl der Proben und kann je nach Probenumfang mehrere Stunden in Anspruch nehmen. Dieser Zeitaufwand ist auf die Vielzahl der Pipettier- und Zentrifugationsschritte zurück zu führen. Doch trotz allem liegt letztlich, unabhängig des gewählten Extraktionsverfahrens, das Endergebnis der molekularbiologischen Untersuchung innerhalb eines Arbeitstages vor und bietet damit einen klaren Vorteil gegenüber der kulturellen Anzucht (siehe Kapitel 6.3 Kulturelle Anzucht).

Ein klarer Vorteil der säulenbasierten Systeme ist die Durchführung in jedem für PCR ausgelegten Labor. Für die Anwendung des automatisierten Verfahrens ist die Anschaffung eines *Maxwell® 16 System* nötig. Als Vorteil steht dem automatisierten System die Ersparnis von Arbeitszeit gegenüber. Auch die verringerte Anzahl manueller Schritte und demzufolge

eine verminderte Kontaminationsgefahr sprechen für dieses Verfahren. Ein weiterer Aspekt, der sich erst später bei der Untersuchung der Proben aus dem Handel zeigte, ist, dass mit dem *Maxwell® 16 System* seltener Hemmungen auftraten (siehe Kapitel 6.2.4 Vergleich von Rohmilch und Säuglingsanfangsnahrung). Hemmungen durch die Probenmatrizes stellten dagegen bei den Einmischversuchen kein Problem dar.

Ansatzpunkt für weitere Verbesserungen der Sensitivität ist die Probenvorbereitung. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rahmschicht nach der Zentrifugation verworfen. Diesem Schritt lag die Überlegung zugrunde, dass Fette mit den im Protokoll enthaltenen Chemikalien interagieren können (Slana et al., 2008a). Obwohl freie MAP sehr lipophil sind, sollte MAP als intrazellulärer Erreger in der Milch aber vorwiegend in eukaryotischen Wirtszellen vorhanden sein. Freie MAP sollten demnach sehr wenige vorliegen (Slana et al., 2008a). Van Brandt et al. (2010) untersuchten die Lokalisierung von MAP in artifiziell kontaminierter Milch und Kolostrum durch Fraktionierung. Es fanden sich 80-90% der MAP im Pellet, während der Gehalt in der Molke mit 0,003% um 4-5 Zehnerpotenzen niedriger lag (ebd.). Die Erklärung dafür ist einerseits physikalisch in der Zentrifugation zu sehen, die MAP durch milde Zentrifugation erlaubt, in die bevorzugte Fraktion zu separieren. Andererseits triggert die hydrophobe Natur des Casein die Interaktion mit der ebenfalls hydrophoben mykobakteriellen Zellwand (Van Brandt et al., 2010).

Die Hauptassoziation mit dem Pellet geht konform mit den Literaturangaben (Spahr und Schafroth, 2002; Donaghy et al., 2004). Die Ergebnisse bezüglich der Anteile von MAP im Pellet unterscheiden sich je nach Publikation. Grant et al. (1998b) untersuchten die Aufteilung von MAP in die Milchfraktionen – der Hauptteil der MAP (69,4%) in 10 ml Milch ging in das Pellet. Diese Veröffentlichung bestätigt die Annahme, dass der Hauptteil von MAP im Pellet zu finden ist, mit 17,6% fanden sich jedoch mehr MAP in der Molke wieder als mit 13% im Rahm (ebd.). In einer anderen Studie dagegen fanden sich dreimal mehr MAP im Rahm (Gao et al., 2005). Das Poolen von Fett und Pellet wird daher von einigen Autoren als sinnvoll angesehen, um die größte Ausbeute an MAP zu bekommen (Gao et al., 2005; Millar et al., 1996; Singh et al., 2007).

Ob sich die Sensitivität des Nachweises von MAP aus Rohmilch damit weiter steigern lässt, oder dies zulasten von Hemmungen in der PCR geht, erfordert weitere Untersuchungen.

6.2.3 Real Time-PCR

In der Theorie sind PCR-Assays sehr sensitiv und benötigen für ein positives Ergebnis nur eine Kopie der DNA-Sequenz. In der Praxis sind diese Assays begrenzt, da die Matrix der Probe die Reaktion inhibieren kann (Whan et al., 2005b).

Das MAPsureEasy® Real Time-PCR Kit (Fa. TransMIT) basiert auf der von Schönenbrücher et al. (2008) entwickelten TaqMan® Real Time-PCR. Diese PCR nutzt für den Nachweis von MAP die beiden Referenzsequenzen *f*57 sowie IS*Mav2* und beinhaltet eine Interne Amplifikationskontrolle (IAK). Die Spezifität wurde mit 42 MAP-Isolaten bovinen, ovinen und humanen Ursprungs untersucht, die alle korrekt amplifiziert wurden (Schönenbrücher et al., 2006). 34 non-MAP-Stämme blieben ohne Kreuzreaktionen, dabei wurden auch Stämme, die bei IS900 für Kreuzreaktionen verantwortlich waren, berücksichtigt (ebd.). Auch 65 non-Mykobakterien zeigten keine Kreuzreaktion (ebd.). Die Bestimmung der Sensitivität erfolgte über einen MAP-Standard und lag bei 1 pg DNA mit 100%iger Wahrscheinlichkeit (Schönenbrücher et al., 2008). In der Triplex Real Time-PCR nach Schönenbrücher et al. (2008) lag die Amplifikations-Effizienz (E) für die als Einzelkopie vorliegende Sequenz *f*57 bei 98,2%, für die in drei Kopien vorliegende Insertions-Sequenz IS*Mav2* bei 97,8%.

Die in den eigenen Untersuchungen eingesetzte MAPsureEasy® (MSE) Real Time-PCR weist die MAP-spezifische Zielsequenz *f*57 nach. Diese wurde bereits in zahlreichen PCR-Systemen, darunter auch Real Time-PCR, mit Milch, Säuglingsanfangsnahrung und anderen Probenmatrizes verwendet (Tasara und Stephan, 2005; Tasara et al., 2005; Bosshard et al., 2006; Stephan et al., 2007; Schönenbrücher et al., 2008; Hruska et al., 2011). Der Vorteil von *f*57 liegt in seiner strengen Einzigartigkeit (Herthnek und Bölske, 2006; Tasara und Stephan, 2005). Möbius et al. (2008) untersuchten verschiedene PCR-Systeme mit unterschiedlichen Zielsequenzen hinsichtlich Spezifität und Sensitivität bestimmter Targetregionen. *f*57 konnte in dieser Studie überzeugen und als Zielsequenz empfohlen werden, wohingegen bei IS*Mav*2 unspezifische Produkte nachgewiesen wurden (Möbius et al., 2008).

Die MSE-PCR ermöglicht eine **vereinfachte Auswertung** im Vergleich zu der ursprünglichen PCR nach Schönenbrücher et al. (2008). Die Fluoreszenzfarbstoffe VIC® und FAM™ für den Nachweis von *f*57 und der IAK haben Fluoreszenzspektren, die sich nicht überschneiden. Im Gegensatz dazu kommt es bei Schönenbrücher et al. (2008) bei den drei verwendeten Farbstoffen VIC®, FAM™ und NED™ zwischen VIC® und NED™ zu Überschneidungen der Fluoreszenzspektren. Dies führt dazu, dass manche PCR-Läufe

manuell ausgewertet werden müssen. Die Läufe der MSE-PCR ließen sich dagegen alle mittels automatischer Analyse auswerten. Dies hat für die Anwendung einen effizienten Aspekt, die Auswertung wird somit erleichtert und vereinheitlicht. Subjektive Auswertungskriterien der Anwender spielen dabei keine Rolle. Zudem hat sich *f*57 als zuverlässige Zielsequenz dargestellt. Proben mit fraglichen Ergebnissen aufgrund unterschiedlicher Ergebnisse der Zielsequenzen spielen bei der MSE-PCR keine Rolle.

Die molekularbiologischen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden sehr umfangreich durchgeführt. Grund dafür war das Ziel, fundierte Aussagen, basierend auf statistisch abgesicherten Ergebnissen, treffen zu können. Für jede Probe wurde daher neben einer Aufbereitung im Dreifachansatz auch die jeweilige Aufbereitung im Dreifachansatz mittels PCR untersucht. Wie nicht anders zu erwarten, war ein Teil der Ergebnisse – hauptsächlich im Bereich der Nachweisgrenze – nicht einheitlich positiv oder negativ. Diese Ergebnisse wurden bei der Analyse der Aufbereitungen und Läufe (siehe Kapitel 5.3 Analyse der Aufbereitungen und Läufe) detailiert dargestellt. Eine eindeutige Empfehlung für die Diagnostik im Hinblick auf die Frage, ob es sinnvoller ist, die Aufbereitung oder den Lauf in der PCR zu wiederholen, lässt sich daraus aber nicht herleiten. Die Zahl der herangezogenen Aufbereitungen und Läufe ist im Vergleich zu den insgesamt durchgeführten relativ gering. Dies liegt daran, dass vor allem Verdünnnungsstufen mit geringer Einmischkonzentration diese unterschiedlichen Ergebnisse aufweisen. Einheitliche Ergebnisse in diesem Bereich wurden nicht berücksichtigt, da diese auch mit höheren Einmischkonzentrationen bei der Betrachtung nicht berücksichtigt wurden. Für eine fundierte Aussage müssten mehr Ergebnisse „uneinheitlich“ sein. Dies bedeutet aber im Umkehrschluss, dass der Großteil der Ergebnisse einheitlich positiv oder negativ war.

Die Standardabweichung hat ebenfalls Einfluss im Hinblick auf die Frage, ob es sinnvoller ist, die Aufbereitung oder den Lauf in der PCR zu wiederholen. Diese basiert durch die umfangreichen Untersuchungen auf zahlreichen Einzelergebnissen. Bei der Analyse der Standardabweichungen hat sich gezeigt, dass die Wiederholung der Aufbereitung einen positiveren Einfluss hat als die Wiederholung des Laufes. Hinzu kommt, dass bei einer weiteren Aufbereitung einer Probe mit geringer MAP-Belastung die Wahrscheinlichkeit eines positiven Nachweises durch das größere absolute Probenvolumen steigt.

Basierend auf den Aspekten Probenvolumen und Standardabweichung ist die **Wiederholung der Aufbereitung zu bevorzugen**.

6.2.4 Vergleich von Rohmilch und Säuglingsanfangsnahrung

In den vorliegenden Untersuchungen wurden als Probenmatrizes Rohmilch und Säuglingsanfangsnahrung verwendet. Letztere lag als milchpulverbasiertes Trockenprodukt vor, das vor Untersuchungsbeginn nach Herstellerangaben rekonstituiert wurde. Die folgende Tabelle 66 veranschaulicht die Zusammensetzung der beiden Matrizes und zeigt im Vergleich die Zusammensetzung von Muttermilch, der die Säuglingsanfangsnahrung nachempfunden ist.

Tabelle 66: Zusammensetzung von Kuhmilch, Muttermilch und Säuglingsanfangsnahrung im Vergleich

Matrix		Kuhmilch[1)]	Muttermilch[1)]	Säuglingsanfangsnahrung	
				Pre[2)]	One[2)]
Energie	kJ	279	288	273 – 281	273 – 290
	kcal	67	69	65 – 67	65 – 69
Eiweiß (g)		**3,08 – 3,88**	1,03 – 1,43	1,2 – 1,7	1,2 – 1,5
Kohlenhydrate (g)		4,7	7,00	7,1 – 7,9	7,4 – 8,1
davon Laktose (g)		4,7	7,00	7,1 – 7,9	5,4 – 7,0
davon Stärke		-	-	-	1,1 – 1,2[3)]
Fett (g)		**3,60** - 3,88	3,50 – 4,62	3,1 – **3,6**	3,1 – **3,6**
Calcium (mg)		**107 - 133**	22 – 32	42 - 67	42 – 62

[1)] Quelle: Souci, Fachmann, Kraut (2008)
[2)] nach Herstellerangaben
[3)] Zwei Produkte enthielten keine Stärke

Das volle Potential der PCR ist begrenzt, da in komplexen biologischen Proben die Anwesenheit von Inhibitoren die Amplifikationseffizienz verringert (Al-Soud und Radström, 2000). Milch ist aufgrund ihres hohen Fettgehaltes und dem Calcium als schwierige Matrix für die PCR beschrieben (Bickley et al., 1996; Lantz et al., 1994). Der hohe Fettgehalt fiel auch im Rahmen der Probenbearbeitung auf, wenn sich nach der Zentrifugation das Fett an der Oberfläche der Flüssigkeitssäule befand. Im Vergleich dazu zeigte sich die rekonstituierte Säuglingsanfangsnahrung trotz des ähnlichen Fettgehaltes insgesamt homogener und auch bei der Zentrifugation war der Gehalt an Fett im Überstand nach der Zentrifugation geringer. Dies ist nicht verwunderlich, da es sich bei der Rohmilch um ein unbehandeltes Produkt handelt,

wohingegen die Säuglingsanfangsnahrung neben der Pasteurisierung der Milch zusätzlich ein mehrstufiges Eindampfverfahren, Konzentrationserhitzung sowie eine Zerstäubungstrocknung durchlaufen hat. Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese matrixbedingten Unterschiede die bessere Nachweisgrenze von zwei Zehnerpotenzen bedingen. Die Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ war aufgrund der Zusammensetzung deutlich einfacher zu verarbeiten als Rohmilch. Die Pellets, die durch die Probenvorbereitung entstanden, waren kleiner und ließen sich einfacher resuspendieren. Die sich bei den Zentrifugationsschritten bildende Rahmschicht war bei Säuglingsanfangsnahrung deutlich dünner. Wenn man davon ausgeht, dass MAP sich aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaft in dieser Rahmschicht zu einem gewissen Prozentsatz anreichert (Grant et al., 1998b; Gao et al., 2005, Millar et al., 1996), so findet sich darin ein erster Ansatzpunkt bei der Ursachenfindung der deutlich besseren Nachweisgrenze. Säuglingsanfangsnahrung „One“ dagegen bringt mit dem Bestandteil der Stärke einen Inhaltsstoff dazu, der aufgrund seiner Beschaffenheit und biochemischen Eigenschaften als Ursache für eine geringgradige Verschlechterung der Nachweisgrenze im Vergleich zu Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ angesehen werden muss.

Bei der Untersuchung der verschiedenen Produkte an Säuglingsanfangsnahrung aus dem Einzelhandel traten bei „Pre“ mit beiden verwendeten Verfahren Hemmungen in der PCR auf. Bei „Pre“ trat mit dem *Maxwell® 16 System* nur bei einer Probe eines Doppelansatzes eine Hemmung auf, die bei der Wiederholung mit der 1+1 Verdünnung als negative Probe gewertet werden konnte. Bei Verwendung des *High Pure PCR Template Preparation Kit* waren es zwei Proben, bei denen sich die Hemmung in beiden Ansätzen zeigte und eine 1+4 Verdünnung der DNA nötig war, da auch die 1+1 Verdünnung noch aufgrund einer erneuten Hemmung nicht auswertbar war. Diese Hemmungen bei beiden Verfahren traten bei unterschiedlichen Proben auf und standen in **keinem Zusammenhang mit extremen Fett- oder Calciumgehalten**. Bei der Untersuchung der Produkte der Säuglingsanfangsnahrung „One“ aus dem Einzelhandel traten keine Hemmungen mit dem *Maxwell® 16 System* auf. Die Zusammensetzung von Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ und „One“ ist bis auf den Stärkegehalt in „One“ ähnlich. Diese führt offensichtlich nicht vermehrt zu Hemmungen, führt aber durch die Auswirkungen auf die Konsistenz zu einer erschwerten Probenbearbeitung.

6.3 Kulturelle Anzucht

Die kulturelle Anzucht von MAP gilt als der *Goldstandard* in der Diagnostik von MAP, obwohl die Ergebnisse molekularbiologischer Untersuchungen teilweise sensitiver sind als kulturelle Methoden (Donaghy et al., 2008). Die Schwierigkeiten und Schwachstellen des Verfahrens haben sich in den eigenen Untersuchungen gezeigt.

Es gibt für den Nachweis von MAP aus Milch kein Standardprotokoll. Die Vielzahl der verwendeten Protokolle für die Anzucht von MAP weisen sowohl unterschiedliche Sensitivitäten als auch unterschiedliche Kontaminationsraten auf. Kleine Unterschiede in den Protokollen können beides beeinflussen. Zudem sind die erzielten Ergebnisse der kulturellen Anzucht auch von Faktoren wie Anzahl der MAP in der Probe, Stammunterschieden, den Probenaufbewahrungsbedingungen, der Dauer bis zur Anzucht der Probe, dem Dekontaminationsverfahren, Art und Anzahl der Begleitflora sowie laborspezifischen Bedingungen abhängig. Insgesamt besteht ein hohes Risiko falsch-negativer Ergebnisse (O'Reilly et al., 2004). Diese unterschiedlichen Einflüsse erschweren den Vergleich der eigenen Ergebnisse mit denen anderer Untersuchungen.

Die **Nachweisgrenze** bei kultureller Anzucht ist unterschiedlich. Die Angaben variieren von 1-10 KbE/ml bis 1-10 KbE/100 ml (Grant et al., 2001). Es ist aber damit zu rechnen, dass die wahre Prävalenz dieses „difficult-to-culture"-Mikroorganismus zwangsläufig unterschätzt wird (O'Doherty et al., 2002).
In den eigenen Untersuchungen gelang der Nachweis für Einmischkonzentrationen im Bereich von 10 bis 100 KbE/10 ml Rohmilch. Anders als bei den molekularbiologischen Untersuchungen basieren diese Zahlen auf den mittels kultureller Anzucht von MAP aus der Verdünnungsreihe ermittelten Einmischkonzentrationen. Im Vergleich zu den ermittelten Einmischkonzentrationen mittels Zählkammer liegen die Werte der Kolonie-bildenden Einheiten teilweise bis zu zwei Zehnerpotenzen unter den tatsächlichen Einmischkonzentrationen. Dieses Phänomen hat verschiedene Ursachen. Das konventionelle Ausplattieren von MAP und die anschließende Koloniezählung sind nicht genau, da MAP-Zellen Aggregate bilden und die Koloniezahl nicht die Zahl vorhandener Zellen wiederspiegelt (O'Mahony und Hill, 2004). Nach Klijn et al. (2001) kann es zu einer Unterschätzung der tatsächlichen Zahlen um den Faktor 100 bis 1000 kommen. Dies entspricht den Beobachtungen bei den eigenen Untersuchungen. Neben der bekannten Problematik, dass MAP zur Bildung von Aggregaten neigt, haben Untersuchungen mit einer

sog. Vitalfärbung gezeigt, dass nur bis zu 10% einer frischen Kultur stoffwechselaktiv sind, der restliche Teil befindet sich offensichtlich in einer Art Ruhezustand (Hammer et al., 2002).

Das **Sichtbarwerden von Kolonien** bei der Anzucht von MAP aus Milch auf HEYM betrug 4-8 Wochen, mitunter auch 11 Wochen. Diese längere Anzuchtdauer war insbesondere bei niedrigeren Einmischkonzentration der Fall. Berichten zufolge benötigt das Wachstum von MAP-Zellen aus Milch mittels konventioneller Kultur länger als aus Kot und Gewebe (Kaur et al., 2010) und liegt bei 12-16 Wochen bis zur endgültigen Bestätigung (Christopher-Hennings et al., 2003). Für hitzegeschädigte MAP aus Pasteurisierungsversuchen sind sogar Bebrütungen von bis zu einem Jahr beschrieben, unabhängig von der Ausgangskeimzahl (Hammer et al., 2000). Unterschiede in der Anzuchtdauer sind auch auf unterschiedliche Anzuchtmedien zurück zu führen. Das Wachstum der Kolonien bei Anzucht der Reinkultur aus der Verdünnungsreihe auf Middlebrook 7H10 lag bei 5-7 Wochen. Nach dieser Zeit veränderte sich die Anzahl der gewachsenen Kolonien meist nicht mehr. Dies stimmt mit den Angaben der Literatur überein. Dort ist beschrieben, dass das Wachstum von Kolonien auf HEYM drei Wochen länger als auf 7H10 benötigt (Damato und Collins, 1990).

Wie schon beim molekularbiologischen Nachweis beschrieben (siehe Kapitel 6.2.1 Zählkammer), hat MAP durch seinen **hydrophoben Charakter** die Tendenz, sich auch in der Fettschicht anzureichern. Daher kann die Chance des Nachweises von MAP erhöht werden, wenn für die kulturelle Anzucht Fettschicht und Pellet gepoolt werden (Gao et al., 2005). Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde jedoch, äquivalent zu den molekularbiologischen Untersuchungen, nur das Pellet für den MAP-Nachweis verwendet, um eine gewisse Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Diese ist dennoch bei kultureller Anzucht und molekularbiologischem Nachweis eingeschränkt, da das erste Verfahren lebensfähige Zellen benötigt, das letztere sowohl lebende und tote Zellen nachweist. Wären bei der kulturellen Anzucht Pellet und Fettschicht gepoolt worden, so wäre ungewiss gewesen, inwieweit eine möglicherweise dadurch verbesserte Sensitivität den Einfluss der Aggregatbildung und Lebensfähigkeit kaschiert hätte.

Neben möglichen Verlusten über Fettschicht und Molke im Rahmen der Probenvorbereitung, spielt der **Dekontaminationsschritt** ebenfalls eine entscheidende Rolle für einen erfolgreichen kulturellen Nachweis. Aufgrund der langen Anzuchtdauer von MAP ist dieser Schritt notwendig, um eine Überwucherung von MAP mit der schnellwachsenden Begleitflora, die in komplexen Matrizes wie Rohmilch oder Kot vorhanden ist, zu verhindern. Ziel der Dekontamination ist es, diese Begleitflora abzutöten, ohne die Lebensfähigkeit von

MAP zu beeinträchtigen. Die Literatur zeigt, dass dies praktisch schwer umzusetzen ist. Bei keiner Methode, die chemische Dekontamination beinhaltet, wurde 100% der zugegebenen MAP wiedergefunden (Dundee et al., 2001). Für Flüssigmedien wird berichtet, dass durch die Inkubation mit HPC für 5 Stunden die Verluste so groß sind, dass die analytische Sensitivität bei 10^2 bis 10^3 MAP/ml Milch liegt (Grant et al., 2003). Spahr und Schafroth (2002) berichten von einem Verlust von 60% der KbE in dekontaminierten Proben von Schweizer Käse im Vergleich zu nicht dekontaminierten Proben. Vergleichende Untersuchungen von vier verschiedenen Dekontaminationsprotokollen für die Isolation von MAP aus Rohmilch haben gezeigt, dass die Dekontamination mit 0,75% HPC für 5 Stunden bei Raumtemperatur das sensitivste Verfahren darstellt, die Nachweisgrenze lag mit diesem Verfahren bei 30 KbE/40ml Milch (Dundee et al., 2001). Die Untersuchungen zeigen aber ebenfalls, dass ein signifikanter Anteil an MAP in Milch nach Dekontamination gar nicht wiedergefunden wird, unabhängig von der verwendeten Methode (ebd.). Für die Dekontamination mit HPC lag der Verlust bei 75-85%, durch Aggregatbildung verringert sich die Wiederfindung ebenfalls (Dundee et al., 2001). Bei Gao et al. (2005) ist eine Wiederfindung von 16% beschrieben. Der mangelnde Nachweis lebender MAP heißt also nicht, dass keine vorhanden sind (Gao et al., 2002), sondern kann vielmehr auch auf andere Faktoren zurück zu führen sein. MAP kann im Rahmen der Dekontamination geschädigt werden, Kontamination kann das Wachstum beeinträchtigen oder geeignete aerobe Bedingungen und vermehrter CO_2-Gehalt waren während der Inkubation nicht gewährleistet, so dass eine erfolgreiche Anzucht nicht mehr möglich ist.

Wie zu Beginn bereits erwähnt, handelt es sich bei der Dekontamination um eine „Gratwanderung“. Aufgrund der langen Anzuchtdauer von MAP ist dieser Schritt notwendig, um eine Überwucherung von MAP mit schnellwachsender Begleitflora zu verhindern. Trotzdem kommt es neben Verlusten von MAP selbst durch Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit auch zu Verlusten durch insuffiziente Dekontamination. Bei den eigenen Untersuchungen (siehe Kapitel 4.4.3 Ergebnisse der kulturellen Untersuchungen) konnten 14,4% der HEYM nicht ausgewertet werden. Diese waren nach einigen Tagen überwuchert mit nicht-säurefesten Bakterien, die den Agar mit schleimigen, ineinander verlaufenden Kolonien bedeckten. Teilweise war der Agar blaugrün verfärbt. Diese Beobachtung ist bekannt dafür, das Wachstum von MAP zu hemmen (Grant et al., 2002a). Bei Grant et al. (2002a) lag die Kontaminationsrate mit 27,8% für die Anzucht von MAP aus Rohmilch fast doppelt so hoch wie bei den eigenen Untersuchungen. Aufgrund des frühen Auftretens der

Veränderung konnte zuvor kein Koloniewachstum beobachtet werden. Dagegen traten Kontaminationen bei der kulturellen Anzucht aus der Verdünnungsreihe auf Middlebrook 7H10-Agar erst in der 7. – 9. Woche auf. Bei den Veränderungen handelte es sich ausnahmslos um das Wachstum von Schimmelpilzen. Zuvor konnten MAP-typische Kolonien aber erkannt und quantifiziert werden, so dass die Bestimmung der eingemischten Kolonie-bildenden Einheiten (KbE/ml), das Ziel dieser Anzucht, nicht beeinträchtigt war. Betroffen waren hiervon immerhin 46,8% der Platten. Eine Verunreinigung der verwendeten Kultur ist unwahrscheinlich, da sich die Kontamination nicht auf einen Stamm beschränkte. Zudem wurde parallel zu den Einmischversuchen immer eine Reinheitskontrolle für den jeweils verwendeten Stamm durchgeführt. Diese zeigte für keinen Stamm Verunreinigungen.

MAP ist bekannt für seine Tendenz zur **Aggregatbildung**. Es sind unterschiedliche Verfahren beschrieben, dem entgegenzuwirken bzw. bereits gebildete Aggregate aufzulösen. Dazu zählen unter anderem das Vortexen mit Kügelchen und die Verwendung von feinen Nadeln, durch die die Bakteriensuspension mehrfach aspiriert wird (Keswani und Frank, 1998). Doch auch die erfolgreiche Zerstörung dieser Zellaggregate ist keine Garantie für Dauerhaftigkeit. Studien zufolge können diese nach 5-10 min erneut wieder auftreten (Grant et al., 2005). In den eigenen Untersuchungen wurde MAP in Middlebrook 7H9-Bouillon unter Beigabe von Tween® 80 angezüchtet, wodurch die Bildung von Einzelzellen gefördert bzw. die Tendenz der Aggregatbildung reduziert werden sollte (Rowe et al., 2000). Die Anzucht erfolgte schüttelnd, wodurch ebenfalls eine verringerte Aggregatbildung erreicht werden kann (Hughes et al., 2001). Zusätzlich enthält jedes Glasfläschchen 10-15 SiLibeads®. Bei den Einmischversuchen selbst wurde die MAP-Suspension mehrfach unter Zugabe steriler SiLibeads® gevortext, um sämtliche Aggregate zu zerstören. Mit dem Zählkammerverfahren wurde dieses kontrolliert. Zellaggregate haben die Zählung nicht beeinträchtigt. Eine Aussage über die Lebensfähigkeit lässt sich allerdings nicht treffen. Es ist aber davon auszugehen, dass das **fehlende Wachstum von Stamm NB** bei der kulturellen Anzucht nicht auf beeinträchtigte Lebensfähigkeit durch das Vortexen zurückzuführen ist, da dies bei drei der vier verwendeten Stämme keine Auswirkungen hatte. Zudem zeigten sich bei der kulturellen Anzucht aus der Verdünnungsreihe keine Unterschiede im Wachstum. Eine besondere Empfindlichkeit dieses Stammes kann demnach ausgeschlossen werden. Somit ist es am Wahrscheinlichsten, dass der Schritt der Dekontamination eine Rolle gespielt hat (siehe oben). Durch Zellen niedriger Lebensfähigkeit kann es zu falsch-negativen Ergebnissen kommen, wenn diese durch den Dekontaminationsschritt neutralisiert werden (Reddacliff et

al., 2003). Auch die für MAP bekannten Mechanismen zum Erreichen einer Keimruhe, Latenz und/oder Persistenz können dabei eine Rolle spielen (Cardona, 2009; Ehlers, 2009; Honer zu Bentrup und Russel, 2001), das Phänomen des „Viable But Non Culturable"-Status (VBNC) ist bei Mykobakterien bekannt (Oliver, 2005).

Trotz der erwähnten Schwierigkeiten bei der kulturellen Anzucht von MAP gilt dieses Verfahren als *Goldstandard*. Mit der Weiterentwicklung des molekularbiologischen Nachweises hat sich im Laufe der letzten Jahre auch die Sensitivität weiter verbessert und so gibt es in der Literatur zahlreiche Beispiele, in denen der Nachweis mittels PCR gelang, obgleich die kulturelle Anzucht versagte (Donaghy et al., 2008; Foddai et al., 2011; Pinedo et al, 2008; Ikonomopoulos et al., 2005). Dies lässt sich bedingt durch das Unvermögen der PCR, zwischen lebenden und toten Zellen zu unterscheiden, erklären. Dem gegenüber steht jedoch die Tatsache (siehe zuvor), dass der mangelnde Nachweis lebender MAP nicht zwangsläufig bedeutet, dass keine vorhanden sind (Gao et al., 2002). Dies haben die Abschwemmungen von dem Schrägagar des Stammes NB mit ihrem positiven PCR-Signal gezeigt.

Im Vergleich mit molekularbiologischen Verfahren bietet die kulturelle Anzucht weder in Hinblick auf Kosten (vgl. Kapitel 6.2.2 Extraktionsverfahren) noch Zeitaufwand einen Vorteil. Die reinen Kosten bei Verwendung des Schrägagars HEYM belaufen sich auf 6,54 EUR (ohne Mwst.) im Einzelansatz. Wird eine Probe im Doppel- bzw. Dreifachansatz angelegt (AVID-Methodensammlung, 2007), erhöhen sich die Kosten für das Nährmedium entsprechend. Weiterhin zu berücksichtigen sind neben diesen auch die Kosten, die während der langen Inkubation der Proben entstehen. Kulturelle Proben benötigen entsprechenden Raum in Brutschränken, müssen wöchentlich kontrolliert und ggf. subkultiviert und bestätigt werden. Während der Zeitaufwand beim kulturellen Anlegen einer Probe mit denjenigen für molekularbiologische Untersuchungen vergleichbar ist, so besteht jedoch ein Mehraufwand bis zum endgültigen Vorliegen eines Ergebnisses. Dies alles unter dem Aspekt, dass ein negatives Ergebnis selbst nach 12-16 Wochen kultureller Anzucht nicht beweisend ist für die Abwesenheit von MAP (Gao et al., 2002).

6.4 Nachweis in Säuglingsanfangsnahrung

Schon vor Jahrzehnten wurde die Ausscheidung von MAP mit der Milch beschrieben. Nicht nur für Tiere, die klinisch an Paratuberkulose erkrankt sind (Taylor et al., 1981), auch im Kolostrum asymptomatischer Tiere konnte MAP nachgewiesen werden (Sweeney et al., 1992). Neben der direkten Kontamination von Milch mit MAP kann es auch zur indirekten Kontamination über Kot während oder nach dem Melken kommen (Eltholth et al., 2009). Es gibt Studien, die einen größeren Eintrag an MAP in Milch über fäkale Kontamination im Melkstand als die Ausscheidung des Erregers selbst bei klinisch auffälligen Tieren vermuten (Nauta und Van der Giessen, 1998). Das Vorhandensein von MAP in Rohmilch ist also generell möglich und wahrscheinlich. Hinzu kommt, dass MAP ein widerstandfähiges Bakterium ist. Es ist in der Lage, den niedrigen pH-Wert des Magens (Pavlik et al., 2000), hohe Temperaturen der Pasteurisierung (Grant et al., 2002b) sowie Tiefgefriertemperaturen (Van Brandt et al., 2011a) zu überleben.

Nachdem der Nachweis von MAP in Rohmilch und Säuglingsanfangsnahrung mittels optimierter DNA-Extraktions-Protokollen validiert worden war, wurde ein repräsentatives Spektrum (n=24) an Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ und „One“ aus dem deutschen Einzelhandel untersucht. Die untersuchten Produkte stammten von neun verschiedenen Herstellern mit deutschen Produktionsstätten und Sitz in Deutschland bzw. der Schweiz.

Die Aufbereitung der DNA erfolgte für **Säuglingsanfangsnahrung „Pre“** jeweils im Doppelansatz mit einem modifizierten Protokoll für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega) sowie einem modifizierten Protokoll für das *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche). Molekularbiologisch konnte mit der MAP-spezifischen MAPsureEasy® Real Time-PCR (Fa. TransMIT) durch den Marker *f*57 in keinem der untersuchten Produkte MAP-DNA detektiert werden. Auch der kulturelle Nachweis sowie die Untersuchung mit dem *FASTPlaque*TB™-Assay, die beide von Frau Weirich im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführt worden waren, erwiesen sich als negativ auf den Nachweis von lebensfähiger MAP-Zellen. Die Proben wurden also insgesamt mit vier Verfahren jeweils im Doppelansatz untersucht.

Säuglingsanfangsnahrung „One“ wurde ebenfalls im Doppelansatz mit dem modifizierten Protokoll für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega) untersucht und kulturell angelegt. Molekularbiologisch konnte mit der MAP-spezifischen MAPsureEasy® Real Time-PCR (Fa. TransMIT) mithilfe des Markers *f*57 auch in diesen untersuchten Produkten keine MAP-DNA

nachgewiesen werden. Auch der kulturelle Nachweis erwies sich als negativ auf den Nachweis von lebensfähigen MAP-Zellen. Diese Proben wurden also insgesamt mit zwei Verfahren jeweils im Doppelansatz untersucht.

Diese Ergebnisse bedeuten nicht zwangsläufig MAP-Freiheit. Durch die Tendenz von MAP zur Aggregatbildung ist es auch denkbar, dass ein Produkt MAP-Zellen enthält, die aber nicht in der untersuchten Teilmenge enthalten waren. Auch ein MAP-Gehalt unterhalb der Nachweisgrenze der vier verschiedenen Verfahren wäre denkbar. Die Nachweisgrenzen der molekularbiologisch verwendeten Verfahren aus den Hauptversuchen liegen mit 4-5 MAP-Zellen/10 ml Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ und 60-70 MAP-Zellen/10 ml Säuglingsanfangsnahrung „One“ allerdings in einem sehr niedrigen Bereich. Selbst wenn aufgrund der Herstellungsverfahren der Produkte lebensfähige MAP-Zellen in den Produkten fraglich sind, so hätte dennoch MAP-DNA nachgewiesen werden können. Bei der Herstellung von pulverförmiger Säuglingsanfangsnahrung ist neben der Pasteurisierung der Milch zusätzlich ein mehrstufiges Eindampfverfahren, Konzentrationserhitzung sowie eine Zerstäubungstrocknung erforderlich, die schätzungsweise zu einer Reduktion von MAP um 10-14 log-Stufen führt (BfR-Stellungnahme, 2012).

Botsaris et al. (2012) untersuchten 35 Proben Säuglingsanfangsnahrung von 11 verschiedenen Herstellern und erhielten bei 21,9% ein positives PCR-Signal. Hruska et al. (2011) untersuchten 51 verschiedene Proben Säuglingsanfangsnahrung von zehn Firmen aus sieben europäischen Ländern. Verwendet wurde der Marker *f*57, der bei 35% der untersuchten Proben ein positives Signal lieferte (Hruska et al., 2011). Frühere Untersuchungen wiesen bei den gleichen Proben in 48,9% der Untersuchungen den Marker *IS900* nach (Hruska et al., 2005). In dieser Studie wurde auch kulturell auf MAP untersucht, der Nachweis lebensfähiger MAP-Zellen wurde aber nicht beschrieben (ebd.). Die Zahl MAP-positiver Säuglingsanfangsnahrungen, der von Hruska et al. (2005 und 2011) in diesen beiden Studien nachgewiesen wurde, ist überraschend hoch. Vor allem wenn man bedenkt, dass diese Mengen an MAP-DNA in einem Probenvolumen von 20 mg getrockneter Säuglingsanfangsnahrung bzw. 200 µl rekonstituiertem Volumen nachgewiesen wurde. Die Wahrscheinlichkeit für einen positiven Nachweis wäre bei dem in dieser Arbeit verwendeten Probenvolumen von etwa 12,9 g getrocknetem Pulver bzw. 10 ml rekonstitierter Säuglingsanfangsnahrung höher gewesen, dennoch konnte weder MAP-DNA noch lebende MAP-Zellen nachgewiesen werden. Eine hervorragende Nachweisgrenze konnte in dem vorangegangenen Hauptversuch mit der Matrix Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ gezeigt

werden. Bei gleicher Belastung der Produkte wie bei Hruska et al. (2005) und (2011) hätten die Untersuchungen ein ähnliches Ergebnis bringen müssen, insbesondere aufgrund des größeren Probenvolumens.

Unabhängig von einem Zusammenhang mit Morbus Crohn könnten so insbesondere Frühgeborene und Flaschenkinder entzündungsfördernden Auslösern von MAP ausgesetzt werden (Hruska et al., 2011). Zu diesen zählen unter anderem Peptidoglykane und Hitzeschockproteine (El-Zaatari et al., 1995; Chamaillard et al., 2003). Muramyldipeptide, die die mykobakterielle Zellwand ausmachen und von Peptidoglykanen freigesetzt werden, sind potentielle Immunmodulatoren und bekannt als Auslöser von Entzündungen (Ellouz et al., 1974; Carbone et al., 2005; Maeda et al., 2005; Coulombe et al., 2009). Sogar tote MAP in Milch und Wasser können für neugeborene Babys ein Risiko darstellen, da ihre Effekte für die Immunmodulation zweifelsfrei sind (Pettis et al., 2000; Maeda et al., 2005; Coulombe et al., 2009). Einige Autoren (Hruska, 2009; Hruska und Pavlik, 2010) vertreten die Theorie, dass MAP den fehlenden Umweltfaktor in der Ätiologie von Morbus Crohn darstellt und sehen sich unterstützt durch Veröffentlichungen, welche die Fütterung von Muttermilch als protektivem Faktor gegen Morbus Crohn beschreiben (Bergstrand und Hellers, 1983; Davis, 2001; Klement et al., 2004; Mikhailov und Furner, 2009; Barclay et al., 2009). Für MAP liegen trotz intensiver Forschung keine endgültigen Informationen bezüglich der Pathogenität für den Menschen, Infektionsdosis und kumulative Effekte vor (Lund et al., 2002). Dies geht auch aus der Risikobewertung des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) zum Nachweis von MAP in Lebensmitteln (BfR-Stellungnahme, 2012) hervor. In dieser Risikobewertung sind zur Expositionsabschätzung die Verdünnungseffekte auf dem Weg zur Verarbeitung in der Molkerei beschrieben und werden im Folgenden wiedergegeben:

Einzelgemelk	10-30 kg
Hoftank	ca. 10.000 kg
Sammelfahrzeug	ca. 20.000 kg
Molkereitank	ca. 100.000 kg

Die Wahrscheinlichkeit, dass pasteurisierte Milch mit überlebenden MAP in den Handel kommt, ist gering, aber möglich (Hammer et al., 2000). Dies erklärt, warum trotz dieser Verdünnungseffekte immer wieder der Nachweis von MAP in hitzebehandelten Produkten wie Milch (Grant et al., 2002a) und Säuglingsnahrung (Botsaris et al., 2012; Hruska et al., 2011) gelingt.

7 Schlussfolgerungen

- Die Nachweisgrenze für Rohmilch liegt für die einzelnen Verfahren im Bereich von $6{,}3x10^2$ bis $7{,}9x10^2$ KbE/10 ml. In Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ liegt die Nachweisgrenze sogar im Bereich von $4{,}1x10^0$ bzw. $4{,}7x10^0$ KbE/10 ml, je nach verwendeter Methode. In Säuglingsanfangsnahrung „One“ liegt die Nachweisgrenze bei $6{,}5x10^1$ KbE/10 ml

- Alle drei DNA-Extraktionsverfahren weisen innerhalb einer Matrix ähnliche Nachweisgrenzen auf. Kombiniert mit der Real Time-PCR MAPsureEasy® können sie als Schnellmethode zum Nachweis von MAP eingesetzt werden.

- Der Vorteil des *Maxwell® 16 Systems* ist in seiner Automatisierung zu sehen, dabei können bis zu 16 Proben in 45 Minuten bearbeitet werden.

- Das Ergebnis für den Nachweis von MAP-DNA in Milch und Säuglingsanfangsnahrung liegt innerhalb eines Arbeitstages vor. Diese kurze Untersuchungsdauer bietet einen großen Vorteil gegenüber der kulturellen Anzucht, die mehrere Wochen in Anspruch nimmt.

- Bei der Untersuchung von Säuglingsanfangsnahrung aus dem deutschen Einzelhandel konnte in keinem der untersuchten Produkte (n=24) MAP-DNA nachgewiesen werden.

8 Zusammenfassung

Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* (MAP) ist der Erreger der Paratuberkulose bei Wiederkäuern. Aufgrund der typischen pathomorphologischen Veränderungen, die MAP in Rindern und Primaten auslöst, wurde ein möglicher Zusammenhang mit der Entwicklung von Morbus Crohn (MC) vermutet (Chiodini et al., 1989). Dieser wird seit Beginn des 20. Jahrhunderts immer wieder diskutiert. Die Wege, über die MAP zum Menschen gelangen kann, sind vielfältig. Das Überleben geringer Mengen MAP in Milch nach der Pasteurisierung konnte in zahlreichen Studien, unter anderem aus Deutschland (Hammer et al., 2002), gezeigt werden. Ist MAP im Ausgangsmaterial vorhanden, kann es aus dieser Milch hergestellte Produkte kontaminieren (Donaghy et al., 2004). Daher können neben Milch auch Milchprodukte wie Käse, Säuglingsnahrung und Sahne als mögliche Quelle für eine Übertragung von MAP auf den Menschen gesehen werden. Im Hinblick auf die erhöhte Empfänglichkeit von Kälbern für MAP (Windsor und Whittington, 2009) und der noch nicht geklärten Frage des zoonotischen Potentials, ist die Untersuchung von Säuglingsnahrung von besonderem Interesse. Die zuverlässige Diagnose einer Infektion mit MAP stellt das Hauptproblem in der Überwachung der Paratuberkulose dar. Die kulturelle Anzucht wird zwar als *Goldstandard* für den Nachweis von MAP beschrieben, aufgrund der kurzen Haltbarkeit von Milch und Milchprodukten und der langen Wachstumsdauer des Erregers ist diese unpraktisch für Routinediagnostik und Überwachung (Tasara und Stephan, 2005).

Ziel der eigenen Untersuchungen war es, ein Verfahren zur Erfassung von MAP-Zellen in Milch und Säuglingsanfangsnahrung als routinetaugliche Screeningmethode zur Verfügung zu stellen. Die in den eigenen Untersuchungen eingesetzte MAPsureEasy® (MSE) Real Time-PCR (Fa. TransMIT, Gießen) weist die MAP spezifische Zielsequenz *f*57 nach. Der Vorteil von *f*57 liegt in seiner strengen Einzigartigkeit (Herthnek und Bölske, 2006), Kreuzreaktionen konnten für *f*57 nicht nachgewiesen werden (Donaghy et al., 2011). Die DNA-Extraktion erfolgte mit jeweils modifizierten Protokollen für das *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche, Mannheim) und das *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Fa. Qiagen, Hilden) sowie das automatisierte System *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega, Mannheim). Die Nachweisgrenze (Nachweiswahrscheinlichkeit 95%) für artifiziell kontaminierte Rohmilch lag für die einzelnen Verfahren im Bereich von $6{,}3x10^2$ bis $7{,}9x10^2$ KbE/10 ml. In Abhängigkeit von der verwendeten Methode lag die Nachweisgrenze bei Säuglingsanfangsnahrung „Pre“ im Bereich von $4{,}1x10^0$ bzw. $4{,}7x10^0$ KbE/10 ml. In Säuglingsanfangsnahrung „One“ lag die Nachweisgrenze bei $6{,}5x10^1$ KbE/10 ml. Kombiniert

mit der Real Time-PCR MAPsureEasy® liegt, unabhängig vom gewählten Extraktionsverfahren, das Endergebnis der molekularbiologischen Untersuchung innerhalb eines Arbeitstages vor. Somit kann die MAPsureEasy® Real Time-PCR als Schnellmethode zum Nachweis von MAP eingesetzt werden.

Im Anschluss an die Hauptversuche wurde ein repräsentatives Spektrum von Säuglingsanfangsnahrung („Pre“, „Pre HA“ und „One“) aus dem deutschen Handel molekularbiologisch, kulturell* und mittels FASTPlaqueTB™-Assay* auf das Vorkommen von MAP untersucht. In keinem der 24 untersuchten Produkte konnten MAP-DNA oder MAP-Zellen nachgewiesen werden.

* Die Untersuchungen mittels FASTPlaqueTB™-Assay sowie ein Teil der kulturellen Anzucht („Pre“ und „Pre HA“) wurden von Frau Weirich (IFTN Gießen) durchgeführt.

9 Summary

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP) is the pathogen causing paratuberculosis in ruminants. Due to the typical pathomorphological changes in cattle and primates, a possible link to the development of Crohn's Disease (CD) was suspected (Chiodini et al., 1989). Since the beginning of the 20th century this repeatedly is discussed. There are a lot of paths through which MAP can get to humans. The survival of MAP in milk after pasteurisation could be demonstrated in several studies, some of them from Germany (Hammer et al., 2002). If MAP is in the basic raw material, it can contaminate dairy products produced from this (Donaghy et al., 2004). Therefore, in addition to milk also dairy products like cheese, powdered infant milk and cream can be seen as a potential source of transmission from MAP to humans. In view of the increased susceptibility of calves for MAP (Windsor and Whittington, 2009) and the unsolved question of the zoonotic potential, the investigation of powdered infant milk is of particular interest. The reliable diagnosis of an infection with MAP represents the main problem in the monitoring of paratuberculosis. Cultivation is described as *goldstandard* for the detection of MAP. However due to the short shelf life of milk and dairy products as well as the long growth duration of MAP it is impractical for routine diagnostic and monitoring (Tasara und Stephan, 2005). The aim of the investigations was to validate a method for the detection of MAP cells in milk and powdered infant formula which can be used for screening. In the investigations the MAPsureEasy® (MSE) real time-PCR (Ltd. TransMIT, Gießen) is used, based on the MAP-specific marker *f*57. The advantage of *f*57 is its strict uniqueness (Herthnek und Bölske, 2006); cross-reactions were not detected for f57 (Donaghy et al., 2011). The DNA extraction was accomplished with each modified protocols for the *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Ltd. Roche, Mannheim) and the *DNeasy ® Blood & Tissue Kit* (Ltd. Qiagen, Hilden) as well for the automated system *Maxwell® 16 System* (Ltd. Promega, Mannheim).

The detection limit (detection probability of 95%) was for artificially contaminated raw milk for each method in the range of $6.3x10^2$ to $7.9x10^2$ CFU/10 ml. Depending on the method used, the detection limit of powdered infant formulas "Pre" was in the range of $4.1x10^0$ or $4.7x10^0$ CFU/10 ml. In powdered infant formula "One" the detection limit was $6.5x10^1$ CFU/10 ml. Combined with the real time-PCR MAPsureEasy®, regardless of method used for DNA extraction, the final result of the molecular-based method is available within one working day. Thus, the MAPsureEasy® real time-PCR may be used as a rapid detection method for MAP.

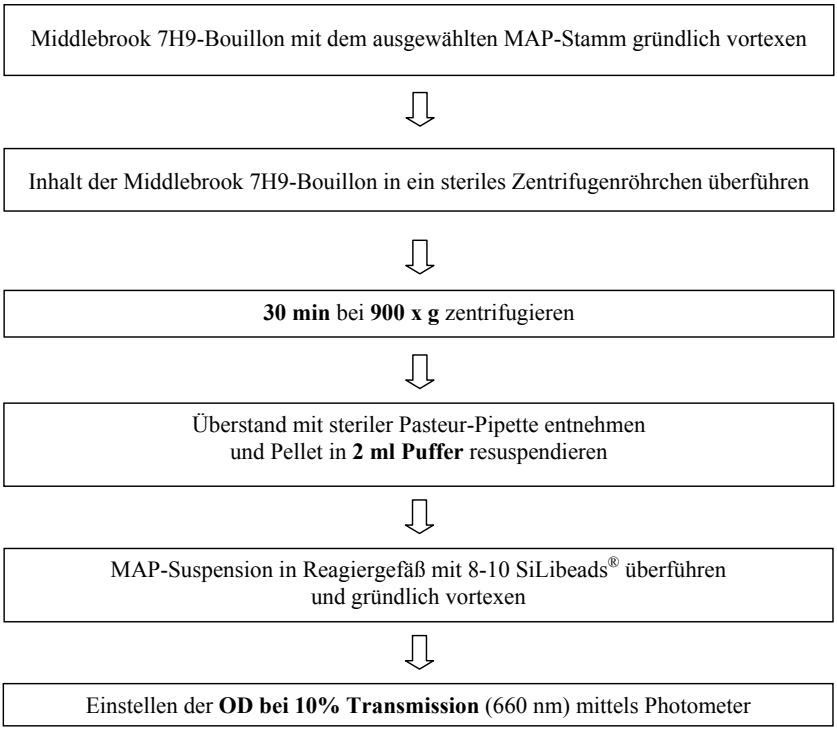
Following the described investigations, a representative spectrum of powdered infant formulas ("Pre", "Pre HA" and "One") at the german retail level was examined molecular-based, cultural* and by FASTPlaqueTB™ assay* for the presence of MAP. In none of the 24 examined products MAP-DNA or MAP-cells could be detected.

* The investigations using FASTPlaqueTB™ assay as well as a part of the cultivation ("Pre" and "Pre HA") were carried out by Mrs. Weirich (IFTN Gießen).

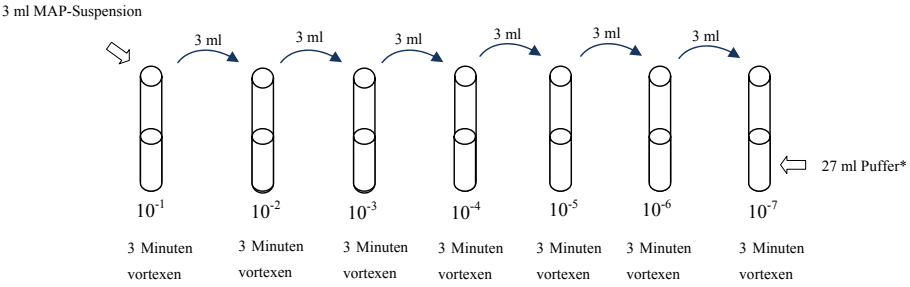
10 Anhang

10.1 Fließdiagramme

10.1.1 Fließdiagramm 1: Herstellung der MAP-Bakteriensuspension für die artifizielle Kontamination

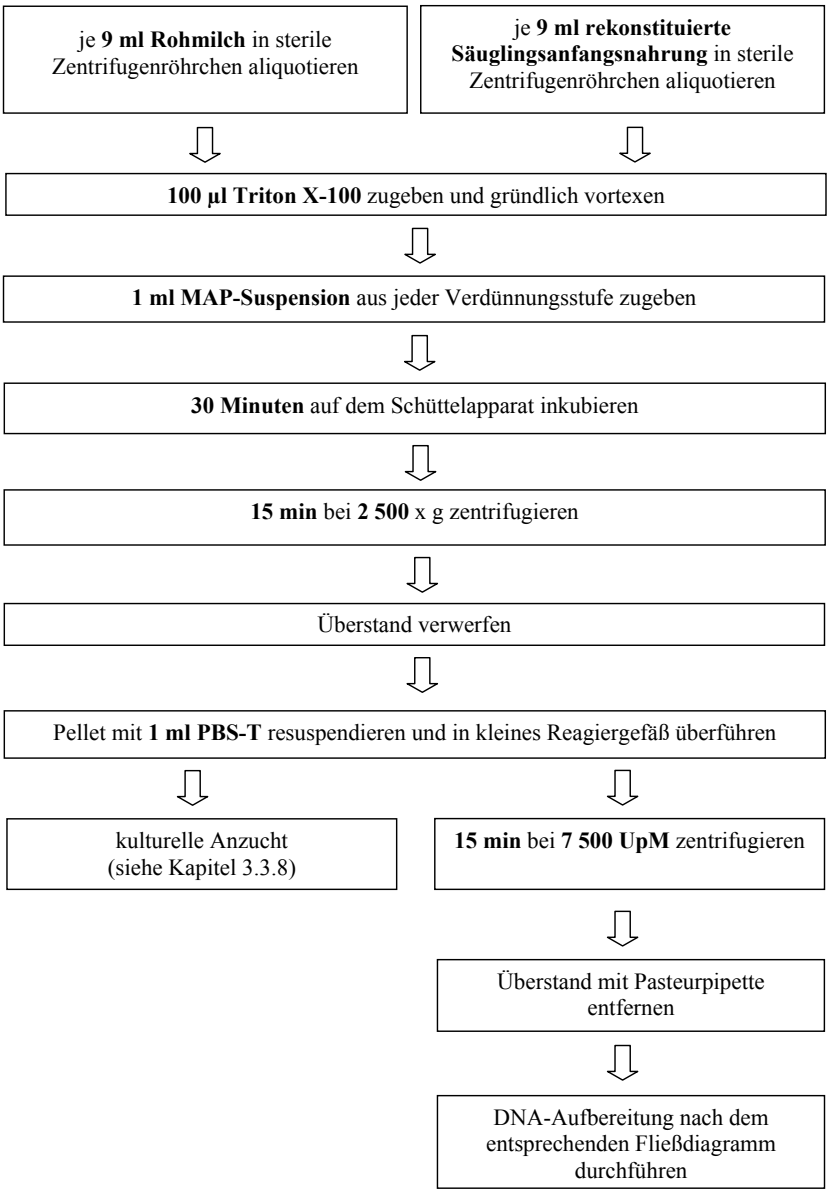


10.1.2 Fließdiagramm 2: Herstellung der Verdünnungsreihe für die artifizielle Kontamination

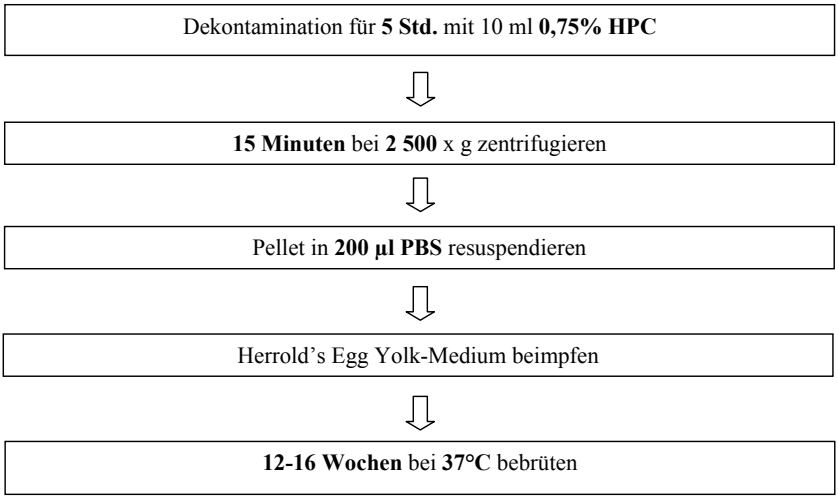


* PBS-T oder Middlebrook 7H9-Bouillon (ohne Zusatz von Tween® 80)

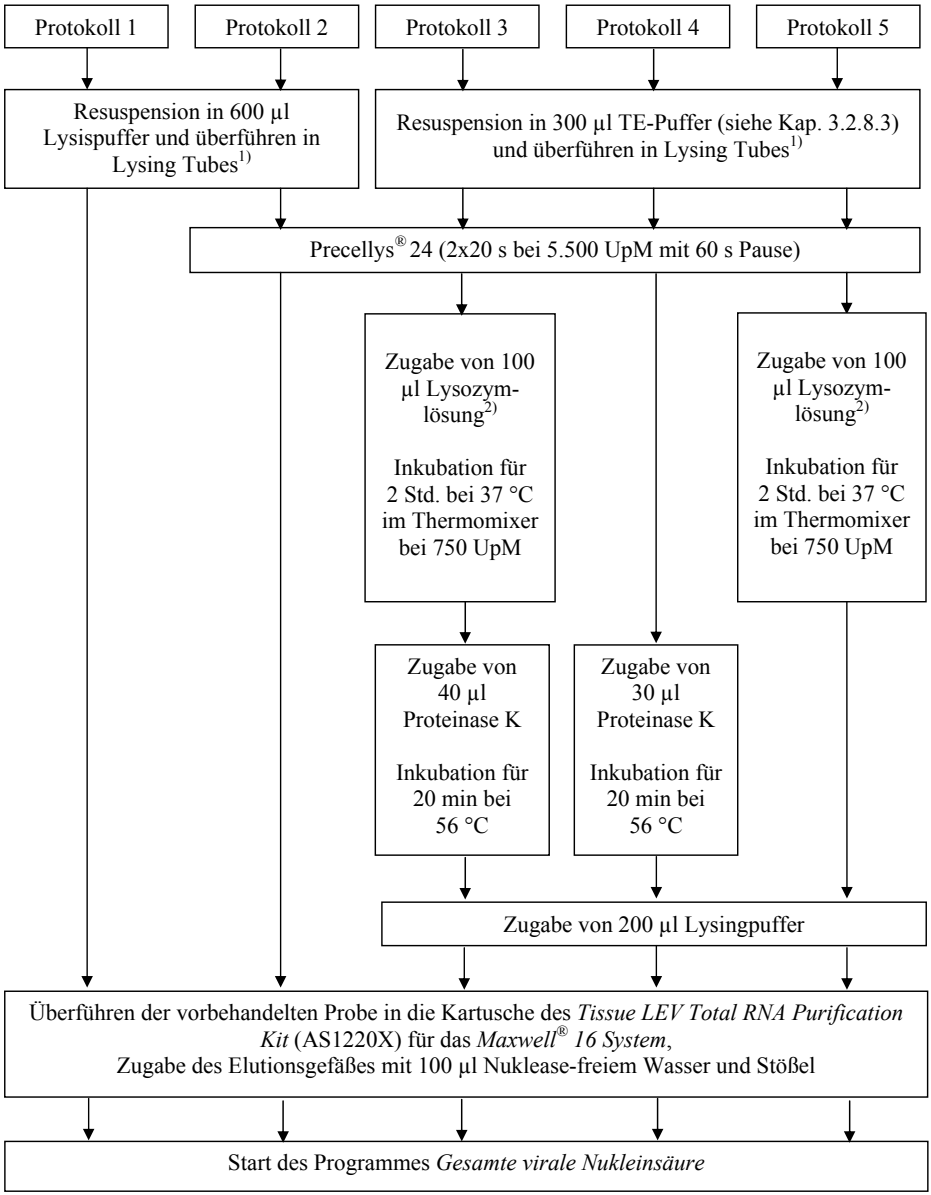
10.1.3 Fließdiagramm 3: Artifizielle Kontamination von Rohmilch und Säuglingsanfangsnahrung



10.1.4 Fließdiagramm 4: Kulturelle Anzucht von MAP aus Milch



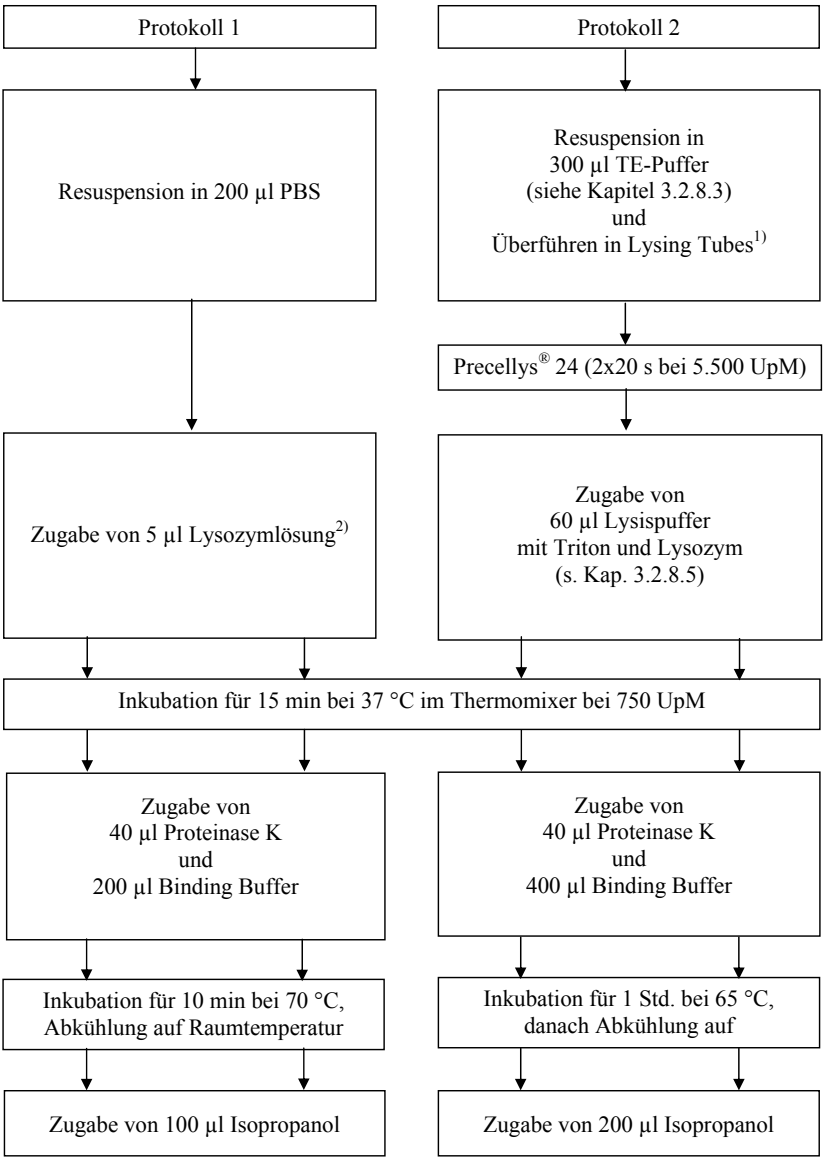
10.1.5 Fließdiagramm 5: Modifizierte Protokolle für den Vorversuch mit dem *Maxwell® 16 System*



[1)] Lysing Tube = Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel (2 ml) und sterilen SiLibeads®

[2)] Lysozymlösung= TE-Puffer mit 25 mg/ml Lysozym

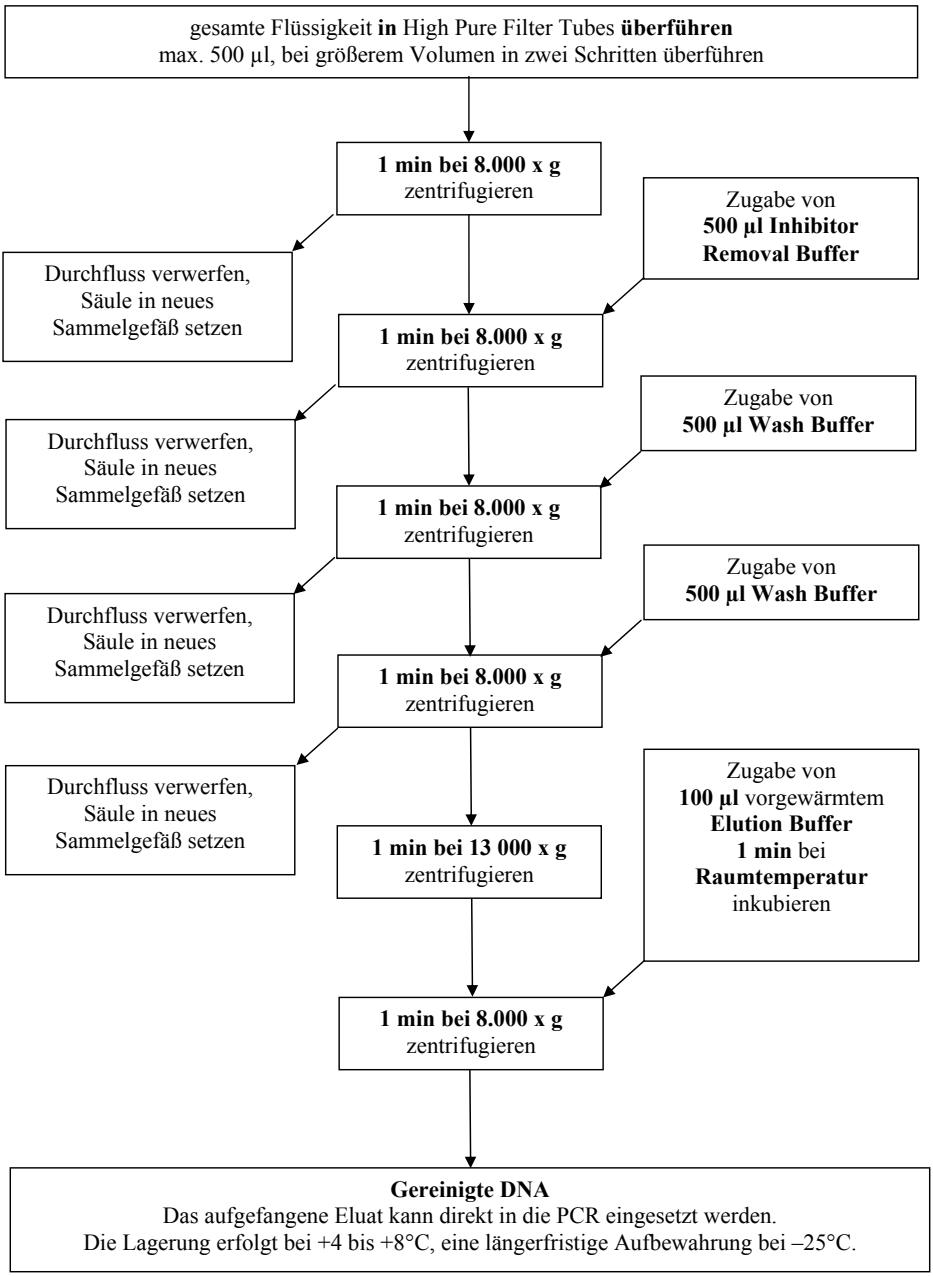
10.1.6 Fließdiagramm 6: Modifizierte Protokolle für den Vorversuch mit dem *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Teil 1)



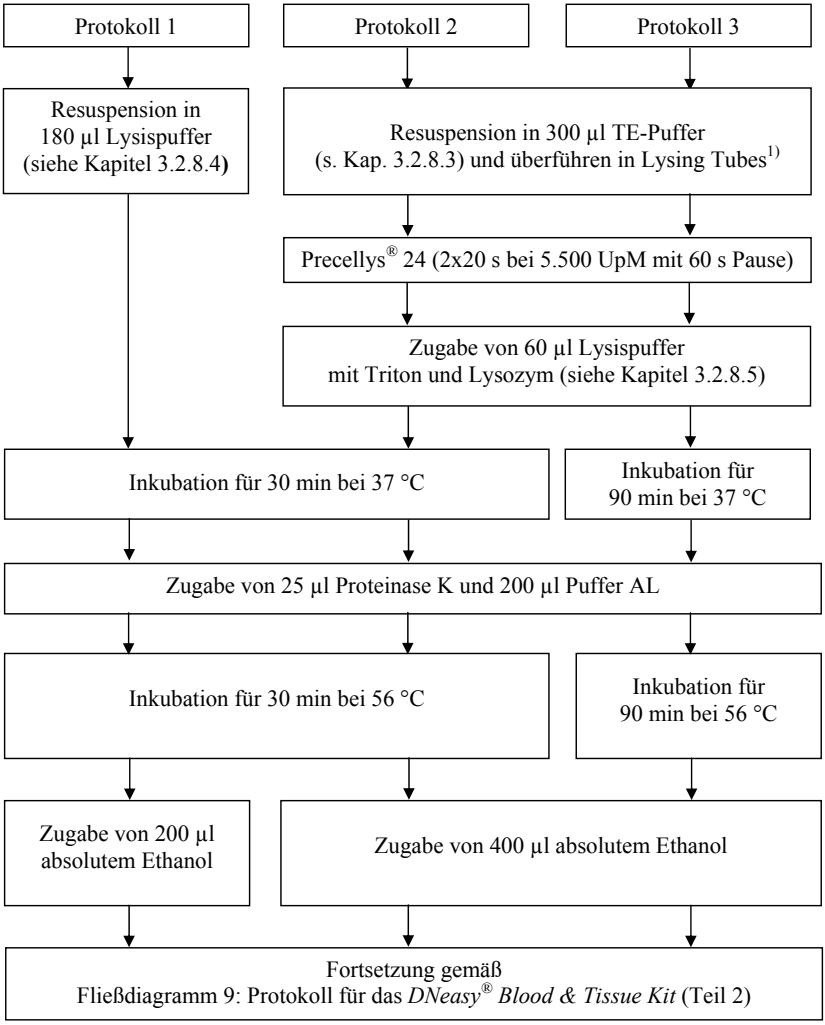
1) Lysing Tube = Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel (2 ml) und sterilen SiLibeads®

2) Lysozymlösung= 10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0

10.1.7 Fließdiagramm 7: Protokoll für das *High Pure Template Preparation Kit* (Teil 2)

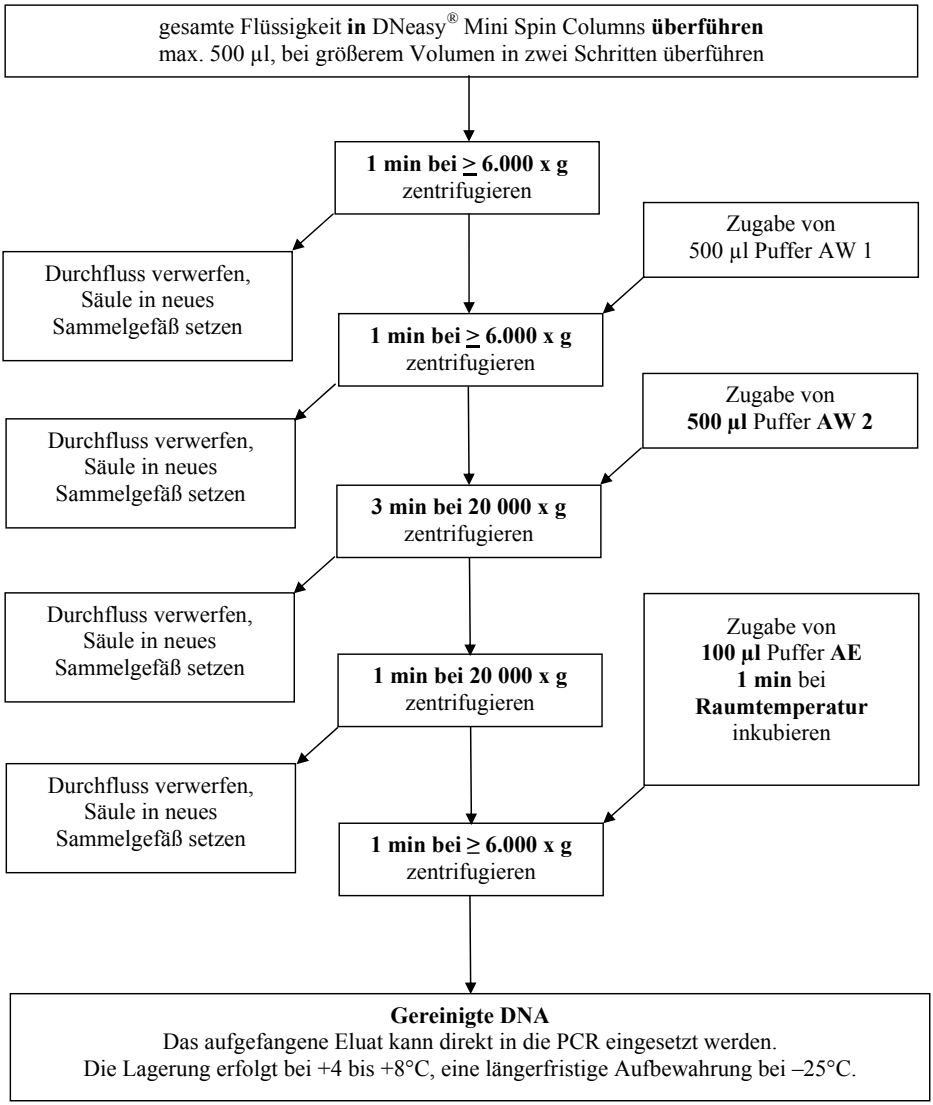


10.1.8 Fließdiagramm 8: Modifizierte Protokolle für den Vorversuch mit dem *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Teil 1)



[1)] Lysing Tube = Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel (2 ml) und sterilen SiLibeads®

10.1.9 Fließdiagramm 9: Protokoll für das *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Teil 2)



10.1.10 Fließdiagramm 10: Modifiziertes Protokoll zur DNA-Isolierung mit dem *Maxwell® 16 System*

Vorbereitung des Laufes gemäß der Angaben in Kapitel 3.3.6.2

⇩

Pellet in **600 µl Lysispuffer (im Kit enthalten)** resuspendieren und in Lysing Tubes[1)] überführen

⇩

Mechanischer Aufschluss im Precellys® 24: **2x20 s** bei **5.500 UpM** mit **60 s Pause** und kurz anzentrifugieren

⇩

Probe in Kartuschenvertiefung Nr. 1 überführen,
vorbereiteten Kartuschenrahmen in das *Maxwell® 16 System* einsetzen

⇩

Start des Aufbereitungsprogrammes *Gesamte virale Nukleinsäure*

⇩

Eluat im Sammelgefäß enthält die gereinigte DNA

[1)] Lysing Tube = Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel (2 ml) und sterilen SiLibeads®

10.1.11 Fließdiagramm 11: Modifiziertes Protokoll zur DNA-Isolierung mit dem *High Pure Template Preparation Kit*

Pellet in **300 µl Lysispuffer** (siehe Kapitel 3.2.8.3) resuspendiert und **in Lysing Tubes**[1)] überführt

⇩

Mechanischer Aufschluss im Precellys® 24: **2x20 s** bei **5.500 UpM** mit **60 s Pause**

⇩

Zugabe von je **60 µl Lysispuffer mit Triton und Lysozym** (siehe Kapitel 3.2.8.5), gründlich vortexen

⇩

Inkubation bei 37 °C für mind. 15 min im Thermomixer schüttelnd

⇩

Zugabe von **40 µl Proteinase K-Lösung** und **400 µl Binding Puffer**,
sorfältig vortexen und kurz anzentrifugieren

⇩

1 Std bei 65 °C im Thermomixer unter Schütteln inkubieren,
nach kurzer Abkühlungsphase vortexen und kurz anzentrifugieren

⇩

Zugabe von **200 µl Isopropanol,**
mehrmals über Kopf mischen, vortexen und kurz anzentrifugieren

⇩

Proben in die vorbereiteten Säulen überführen
(aufgrund zu großen Volumens für die Säule hier 2x je 500 µl überführen)
Zentrifugation jeweils für **1 min bei 8.000 x g,**
Durchfluss verwerfen, Säule in neues Sammelgefäß setzen

⇩

Zugabe von **500 µl Inhibitor Removal Buffer,**
Zentrifugation für **1 min bei 8.000 x g**,
Durchfluss verwerfen, Säule in neues Sammelgefäß setzen

⇩

Zugabe von **500 µl Wash Buffer**,
Zentrifugation für **1 min bei 8.000 x g**,
Durchfluss verwerfen, Säule in neues Sammelgefäß setzen

⇩

erneute Zugabe von **500 µl Wash Buffer**,
Zentrifugation für **1 min bei 8.000 x g,**
Durchfluss verwerfen, Säule in neues Sammelgefäß setzen

⇩

zur vollständigen Entfernung des Waschpuffers noch einmal mind. **1 min full speed** zentrifugieren,
den erhaltenen Restdurchfluss wieder verwerfen, Säule in Reaktionsgefäß setzen

⇩

Zugabe von **100 µl vorgewärmtem (70 °C) Elution Buffer**
1 min bei Raumtemperatur inkubieren

Zentrifugation für **1 min bei 8.000 x g,** Säule verwerfen,
Eluat im Sammelgefäß enthält die gereinigte DNA

[1)] Lysing Tube = Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel (2 ml) und sterilen SiLibeads®

10.1.12 Fließdiagramm 12: Modifiziertes Protokoll zur DNA-Isolierung mit dem *DNeasy® Blood & Tissue Kit*

Pellet in **300 µl TE-Puffer** (siehe Kapitel 3.2.8.3) resuspendieren und **in Lysing Tubes**[1)] überführt

⇩

Mechanischer Aufschluss im Precellys® 24: **2x20 s** bei **5.500 UpM** mit **60 s Pause**

⇩

Zugabe von je **60 µl Lysispuffer mit Triton und Lysozym** (siehe Kapitel 3.2.8.5**)**, gründlich vortexen

⇩

30 min bei 37 °C im Thermomixer schüttelnd inkubieren

⇩

Zugabe von **25 µl Proteinase K**

und Zugabe von **400 µl Puffer AL**

sorgfältig vortexen und kurz anzentrifugieren

⇩

30 min bei 56 °C im Thermomixer unter Schütteln inkubieren,
nach kurzer Abkühlungsphase vortexen und kurz anzentrifugieren

⇩

Zugabe von **400 µl abs. Ethanol**,
mehrmals über Kopf mischen, vortexen und kurz anzentrifugieren

⇩

Proben in die vorbereiteten Säulen überführen
(aufgrund zu großen Volumens für die Säule hier 2x je 500 µl überführen)
Zentrifugation jeweils für **1 min bei ≥ 6.000 x g,**
Durchfluss verwerfen, Säule in neues Sammelgefäß setzen

⇩

Zugabe von **500 µl Puffer AW 1** auf Säule
Zentrifugation für **1 min bei ≥ 6000 x g**,
Durchfluss verwerfen, Säule in neues Sammelgefäß setzen

⇩

Zugabe von **500 µl Puffer AW 2** auf Säule
Zentrifugation für **3 min bei 20000 x g**,
Durchfluss verwerfen, Säule in neues Sammelgefäß setzen

⇩

Zur vollständigen Entfernung von Restpuffer und Alkohol, Säule in neuem Sammelgefäß erneut
Zentrifugation für **1 min bei 20 000 x g**

⇩

Zugabe von **100 µl AE-Puffer** direkt auf den Filter der Säule
1 min bei Raumtemperatur inkubieren

Zentrifugation für **1 min bei ≥ 6.000 x g** , Säule verwerfen,
aufgefangenes Eluat enthält die gereinigte DNA

[1)] Lysing Tube = Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel (2 ml) und sterilen SiLibeads®

10.2 Ergebnistabellen

Tabelle 67: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit MAP-Stamm K10 – Ct-Werte der Real Time-PCR für den Marker *f*57 nach DNA-Aufbereitung mit unterschiedlichen Verfahren

MAP-Zellen pro 10 ml Rohmilch	Real Time-PCR	Einmischversuch K10								
		Maxwell[1)]			Roche[2)]			Qiagen[3)]		
		1. Aufber.	2. Aufber.	3. Aufber.	1. Aufber.	2. Aufber.	3. Aufber.	1. Aufber.	2. Aufber.	3. Aufber.
$1{,}2 \times 10^7$	1. Lauf	19,52	19,70	24,14	19,49	19,61	20,33	18,67	18,92	18,78
	2. Lauf	19,67	19,60	24,14	19,61	19,58	20,41	18,74	18,92	19,00
	3. Lauf	19,50	19,53	24,43	19,38	19,58	20,62	18,69	18,99	19,28
$1{,}2 \times 10^6$	1. Lauf	23,91	24,16	27,85	22,47	22,79	24,28	23,81	23,55	23,66
	2. Lauf	24,15	24,10	27,94	22,76	22,6	24,25	23,95	23,69	23,55
	3. Lauf	23,86	24,18	28,26	22,55	22,75	24,57	23,9	23,66	23,92
$1{,}2 \times 10^5$	1. Lauf	27,90	28,49	32,52	27,16	28,05	28,31	28,01	27,42	28,22
	2. Lauf	28,00	28,43	32,60	27,46	28,03	28,23	28,13	27,39	28,25
	3. Lauf	27,83	28,46	33,82	27,07	27,97	28,79	27,92	27,34	28,52
$1{,}2 \times 10^4$	1. Lauf	31,93	32,22	35,41	30,88	31,89	32,47	30,55	32,65	32,52
	2. Lauf	32,18	32,14	34,88	31,13	31,67	32,05	30,96	32,25	32,38
	3. Lauf	31,71	32,18	35,89	30,77	31,98	32,65	30,48	32,65	32,48
$1{,}2 \times 10^3$	1. Lauf	35,57	35,21	n.n.	34,69	36,06	37,10	36,05	36,34	35,43
	2. Lauf	35,58	35,53	n.n.	35,67	35,21	35,42	35,93	36,99	34,78
	3. Lauf	36,07	34,98	37,97	35,85	35,25	35,71	35,35	35,41	35,58
$1{,}2 \times 10^2$	1. Lauf	38,00	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	2. Lauf	38,39	38,00	n.n.	n.n.	37,79	n.n.	37,86	n.n.	n.n.
	3. Lauf	38,00	n.n.	n.n.	n.n.	36,79	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
$1{,}2 \times 10^1$	1. Lauf	n.n.	37,00	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	2. Lauf	n.n.	38,58	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	3. Lauf	n.n.	38,00	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

[1)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[2)] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)
[3)] *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Fa. Qiagen)
n.n. = nicht nachweisbar

Tabelle 68: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit MAP-Stamm 423 – Ct-Werte der Real Time-PCR für den Marker *f*57 nach DNA-Aufbereitung mit unterschiedlichen Verfahren

MAP-Zellen pro 10 ml Rohmilch	Real Time-PCR	Einmischversuch 423								
		Maxwell[1)]			Roche[2)]			Qiagen[3)]		
		1. Aufber.	2. Aufber.	3. Aufber.	1. Aufber.	2. Aufber.	3. Aufber.	1. Aufber.	2. Aufber.	3. Aufber.
$2{,}0 \times 10^7$	1. Lauf	21,04	20,44	20,31	19,46	21,46	18,34	20,93	21,42	20,31
	2. Lauf	21,00	20,63	20,84	19,36	21,41	18,82	20,67	20,92	20,88
	3. Lauf	20,73	20,11	20,87	19,36	21,28	19,00	20,23	20,63	21,13
$2{,}0 \times 10^6$	1. Lauf	24,62	24,44	24,17	23,46	24,26	24,39	26,24	23,95	21,82
	2. Lauf	24,49	24,63	24,67	23,31	24,54	25,00	26,08	24,13	22,31
	3. Lauf	24,34	24,25	24,74	23,20	24,16	25,08	25,98	23,69	22,55
$2{,}0 \times 10^5$	1. Lauf	29,10	28,72	28,26	26,48	28,3	26,92	30,32	28,58	27,26
	2. Lauf	29,04	28,87	28,81	26,5	28,53	27,11	30,35	28,64	27,70
	3. Lauf	29,00	28,35	28,98	26,39	28,06	27,43	30,11	28,29	27,62
$2{,}0 \times 10^4$	1. Lauf	32,53	31,93	31,79	30,74	32,51	31,59	34,56	32,39	32,28
	2. Lauf	32,56	32,36	32,63	30,67	32,78	31,68	34,28	32,64	33,07
	3. Lauf	32,67	31,94	32,55	30,47	32,03	31,72	34,00	32,28	32,77
$2{,}0 \times 10^3$	1. Lauf	36,90	35,44	35,74	34,90	37,42	38,02	37,77	36,68	34,94
	2. Lauf	36,10	36,41	37,05	34,25	36,79	35,79	36,54	36,23	34,88
	3. Lauf	36,33	34,79	36,2	33,89	36,33	36,37	36,64	35,85	36,06
$2{,}0 \times 10^2$	1. Lauf	n.n.	n.n.	37,00	38,00	n.n.	37,25	n.n.	n.n.	n.n.
	2. Lauf	n.n.	n.n.	n.n.	37,92	n.n.	37,21	n.n.	n.n.	37,56
	3. Lauf	n.n.	37,16	n.n.	n.n.	n.n.	38,09	n.n.	n.n.	n.n.
$2{,}0 \times 10^1$	1. Lauf	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	37,97	n.n.
	2. Lauf	n.n.	n.n.	n.n.	38,86	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	3. Lauf	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	39,00	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

[1)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[2)] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)
[3)] *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Fa. Qiagen)
n.n. = nicht nachweisbar

Tabelle 69: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit MAP-Stamm 44135 – Ct-Werte der Real Time-PCR für den Marker *f*57 nach DNA-Aufbereitung mit unterschiedlichen Verfahren

MAP-Zellen pro 10 ml Rohmilch	Real Time-PCR	Einmischversuch 44135								
		Maxwell[1)]			Roche[2)]			Qiagen[3)]		
		1. Aufber.	2. Aufber.	3. Aufber.	1. Aufber.	2. Aufber.	3. Aufber.	1. Aufber.	2. Aufber.	3. Aufber.
$2{,}0 \times 10^7$	1. Lauf	20,94	19,82	20,63	19,56	19,12	19,33	19,63	19,40	18,87
	2. Lauf	20,74	20,05	20,74	19,44	19,46	19,33	19,31	19,68	19,00
	3. Lauf	21,00	20,06	20,60	19,45	19,27	18,86	19,43	19,76	18,86
$2{,}0 \times 10^6$	1. Lauf	25,31	25,34	25,05	23,54	24,35	24,27	24,86	24,43	23,35
	2. Lauf	25,19	25,55	25,11	23,35	24,61	24,17	24,75	24,65	23,27
	3. Lauf	25,35	25,43	24,71	23,39	24,47	23,84	24,81	24,48	23,02
$2{,}0 \times 10^5$	1. Lauf	30,91	29,26	30,07	28,17	28,89	28,54	29,34	28,17	29,19
	2. Lauf	30,30	29,45	30,09	28,14	29,33	28,39	29,16	28,42	29,31
	3. Lauf	30,81	29,30	29,72	28,17	29,09	28,06	29,23	28,18	28,86
$2{,}0 \times 10^4$	1. Lauf	34,58	34,06	35,92	32,78	32,79	33,62	33,22	32,41	33,13
	2. Lauf	34,07	34,29	35,14	32,85	33,69	32,82	32,79	33,00	32,85
	3. Lauf	33,20	34,00	36,00	32,63	33,18	32,92	33,06	32,93	32,26
$2{,}0 \times 10^3$	1. Lauf	n.n.	37,86	37,90	35,57	37,27	n.n.	39,03	n.n.	34,70
	2. Lauf	36,88	36,18	38,19	36,26	35,76	38,19	n.n.	n.n.	35,60
	3. Lauf	n.n.	36,93	n.n.	n.n.	34,72	36,97	37,94	38,35	34,58
$2{,}0 \times 10^2$	1. Lauf	n.n.	38,15	n.n.	38,00	n.n.	n.n.	n.n.	37,90	n.n.
	2. Lauf	n.n.	n.n.	37,16	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	3. Lauf	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
$2{,}0 \times 10^1$	1. Lauf	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	2. Lauf	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	3. Lauf	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

[1)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[2)] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)
[3)] *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Fa. Qiagen)
n.n. = nicht nachweisbar

Tabelle 70: Artifizielle Kontamination von Rohmilch mit MAP-Stamm NB – Ct-Werte der Real Time-PCR für den Marker *f*57 nach DNA-Aufbereitung mit unterschiedlichen Verfahren

MAP-Zellen pro 10 ml Rohmilch	Real Time-PCR	Einmischversuch NB								
		Maxwell[1)]			Roche[2)]			Qiagen[3)]		
		1. Aufber.	2. Aufber.	3. Aufber.	1. Aufber.	2. Aufber.	3. Aufber.	1. Aufber.	2. Aufber.	3. Aufber.
$1{,}5 \times 10^7$	1. Lauf	23,51	23,20	22,78	23,03	22,01	22,11	22,86	21,75	22,12
	2. Lauf	23,19	23,03	22,62	22,90	21,76	22,50	22,45	21,69	22,27
	3. Lauf	23,33	22,81	22,73	23,05	21,53	22,21	22,53	21,35	22,16
$1{,}5 \times 10^6$	1. Lauf	27,23	27,10	26,22	25,71	26,75	27,91	26,31	25,19	27,17
	2. Lauf	27,10	26,91	26,17	25,49	26,84	26,72	26,08	25,33	27,09
	3. Lauf	27,13	26,63	26,24	25,72	26,44	26,74	26,29	25,19	27,13
$1{,}5 \times 10^5$	1. Lauf	30,46	30,88	30,98	30,43	30,6	31,48	30,29	29,48	31,38
	2. Lauf	30,60	31,13	30,74	30,36	30,36	31,02	30,20	30,00	31,37
	3. Lauf	30,87	30,99	31,1	30,52	30,03	30,93	30,37	29,36	31,51
$1{,}5 \times 10^4$	1. Lauf	35,42	35,26	33,05	35,00	34,18	34,83	33,32	33,57	34,19
	2. Lauf	34,67	35,56	32,72	34,64	34,23	34,53	33,07	33,61	34,83
	3. Lauf	34,76	34,28	33,26	35,00	32,95	35,15	33,57	33,41	34,44
$1{,}5 \times 10^3$	1. Lauf	36,96	36,06	36,87	36,54	38,00	n.n.	37,12	n.n.	n.n.
	2. Lauf	36,27	37,88	n.n.	37,27	n.n.	n.n.	38,14	36,70	38,01
	3. Lauf	36,41	37,72	37,39	37,49	35,24	n.n.	36,60	n.n.	n.n.
$1{,}5 \times 10^2$	1. Lauf	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	2. Lauf	38	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	3. Lauf	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	38	n.n.
$1{,}5 \times 10^1$	1. Lauf	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	2. Lauf	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	3. Lauf	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

[1)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[2)] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)
[3)] *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Fa. Qiagen)
n.n. = nicht nachweisbar

Tabelle 71: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „Pre“ mit MAP-Stamm K10 – Ct-Werte der Real Time-PCR für den Marker *f*57 nach DNA-Aufbereitung mit unterschiedlichen Verfahren

MAP-Zellen pro 10 ml SAN „Pre“	Real Time-PCR	Einmischversuch K10					
		Maxwell[1)]			Roche[2)]		
		1. Aufber.	2. Aufber.	3. Aufber.	1. Aufber.	2. Aufber.	3. Aufber.
$7{,}4 \times 10^4$	1. Lauf	23,57	23,59	24,14	22,17	21,79	21,58
	2. Lauf	23,31	23,31	23,66	21,88	21,38	21,48
	3. Lauf	23,17	23,20	23,55	21,65	21,36	21,09
$7{,}4 \times 10^3$	1. Lauf	27,08	26,92	27,00	25,73	24,93	24,93
	2. Lauf	26,90	26,71	26,66	25,34	24,73	24,68
	3. Lauf	26,65	26,71	26,55	25,19	24,50	24,62
$7{,}4 \times 10^2$	1. Lauf	30,19	29,11	30,68	29,42	28,79	27,32
	2. Lauf	29,89	28,76	30,34	29,44	28,74	27,16
	3. Lauf	29,73	28,55	30,41	29,18	28,49	27,03
$7{,}4 \times 10^1$	1. Lauf	34,03	33,53	33,49	32,98	31,42	31,74
	2. Lauf	33,39	33,78	33,48	32,51	31,50	31,85
	3. Lauf	33,19	33,41	34,17	32,50	31,60	31,42
$7{,}4 \times 10^0$	1. Lauf	37,02	38,25	36,41	34,61	36,28	35,03
	2. Lauf	36,51	37,86	38,31	35,29	35,34	35,00
	3. Lauf	n.n.	35,99	38,00	34,42	35,90	35,87

[1)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[2)] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)
n.n. = nicht nachweisbar

Tabelle 72: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „Pre“ mit MAP-Stamm 44135 – Ct-Werte der Real Time-PCR für den Marker *f*57 nach DNA-Aufbereitung mit unterschiedlichen Verfahren

MAP-Zellen pro 10 ml SAN „Pre“	Real Time-PCR	Einmischversuch 44135					
		Maxwell[1)]			Roche[2)]		
		1. Aufber.	2. Aufber.	3. Aufber.	1. Aufber.	2. Aufber.	3. Aufber.
$9{,}4 \times 10^4$	1. Lauf	22,24	22,70	22,53	21,25	20,37	21,04
	2. Lauf	22,22	22,44	23,00	21,24	20,30	20,72
	3. Lauf	22,12	22,35	22,79	21,24	20,25	20,60
$9{,}4 \times 10^3$	1. Lauf	25,37	26,22	26,26	24,79	23,91	24,51
	2. Lauf	25,43	26,05	26,13	24,30	23,95	24,50
	3. Lauf	25,14	26,12	25,97	24,50	23,88	24,44
$9{,}4 \times 10^2$	1. Lauf	28,72	28,40	29,30	28,49	28,08	27,06
	2. Lauf	28,53	28,37	29,17	28,62	27,80	27,19
	3. Lauf	28,56	28,23	29,18	28,65	27,73	27,21
$9{,}4 \times 10^1$	1. Lauf	33,19	35,32	33,00	31,81	31,94	31,45
	2. Lauf	33,52	35,15	32,23	31,71	31,35	31,16
	3. Lauf	32,64	35,18	32,31	31,75	31,47	31,24
$9{,}4 \times 10^0$	1. Lauf	38,58	37,93	36,99	37,20	35,00	36,18
	2. Lauf	n.n.	38	37,63	n.n.	35,68	36,55
	3. Lauf	37,43	36,21	n.n.	36,09	36,25	35,14

[1)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[2)] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)
n.n. = nicht nachweisbar

Tabelle 73: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „Pre“ mit MAP-Stamm 423 – Ct-Werte der Real Time-PCR für den Marker *f*57 nach DNA-Aufbereitung mit unterschiedlichen Verfahren

MAP-Zellen pro 10 ml SAN „Pre“	Real Time-PCR	Einmischversuch 423					
		Maxwell[1)]			Roche[2)]		
		1. Aufber.	2. Aufber.	3. Aufber.	1. Aufber.	2. Aufber.	3. Aufber.
$9{,}3 \times 10^4$	1. Lauf	23,77	23,86	24,01	22,73	23,05	22,58
	2. Lauf	23,89	24,00	23,90	22,73	23,16	22,37
	3. Lauf	24,08	24,30	24,26	22,91	23,38	22,83
$9{,}3 \times 10^3$	1. Lauf	27,19	27,32	27,38	26,83	26,12	27,19
	2. Lauf	27,33	27,24	27,58	26,85	26,16	27,19
	3. Lauf	27,41	27,56	27,80	27,14	26,41	27,38
$9{,}3 \times 10^2$	1. Lauf	30,85	29,22	31,48	28,93	29,72	29,92
	2. Lauf	30,63	29,30	31,71	29,01	29,98	30,01
	3. Lauf	30,93	29,51	32,00	29,37	30,18	30,19
$9{,}3 \times 10^1$	1. Lauf	34,34	31,29	34,12	33,31	32,25	34,28
	2. Lauf	35,28	31,30	33,72	33,66	32,37	34,05
	3. Lauf	34,40	31,30	34,48	34,16	32,43	34,00
$9{,}3 \times 10^0$	1. Lauf	37,77	37,00	37,92	38,19	n.n.	n.n.
	2. Lauf	36,96	38,00	n.n.	n.n.	37,05	n.n.
	3. Lauf	39,11	37,39	n.n.	n.n.	38,13	38,34

[1)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[2)] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)
n.n. = nicht nachweisbar

Tabelle 74: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „Pre“ mit MAP-Stamm NB – Ct-Werte der Real Time-PCR für den Marker *f*57 nach DNA-Aufbereitung mit unterschiedlichen Verfahren

MAP-Zellen pro 10 ml SAN „Pre“	Real Time-PCR	Einmischversuch NB					
		Maxwell[1)]			Roche[2)]		
		1. Aufber.	2. Aufber.	3. Aufber.	1. Aufber.	2. Aufber.	3. Aufber.
$7{,}0 \times 10^4$	1. Lauf	24,24	24,56	24,91	24,13	23,43	23,93
	2. Lauf	23,92	24,21	24,39	24,00	23,23	23,52
	3. Lauf	23,80	24,22	24,29	23,73	23,33	23,69
$7{,}0 \times 10^3$	1. Lauf	28,27	28,00	28,33	27,56	26,66	26,99
	2. Lauf	27,78	27,39	27,95	27,36	26,33	26,64
	3. Lauf	27,73	27,46	28,04	27,22	26,45	26,66
$7{,}0 \times 10^2$	1. Lauf	31,31	31,55	31,52	31,45	30,53	30,82
	2. Lauf	31,13	30,99	31,25	31,17	30,12	30,77
	3. Lauf	31,13	31,54	31,20	30,94	30,34	30,64
$7{,}0 \times 10^1$	1. Lauf	34,73	34,64	35,21	34,79	34,27	34,61
	2. Lauf	34,82	34,88	33,76	36,03	34,65	34,52
	3. Lauf	34,94	35,27	34,00	35,93	34,47	34,50
$7{,}0 \times 10^0$	1. Lauf	n.n.	n.n.	38,80	n.n.	n.n.	37,81
	2. Lauf	37,61	36,12	n.n.	37,15	37,41	n.n.
	3. Lauf	37,55	37,04	37,79	36,36	36,41	36,77

[1)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
[2)] *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Fa. Roche)
n.n. = nicht nachweisbar

Tabelle 75: Artifizielle Kontamination von Säuglingsanfangsnahrung (SAN) „One“ mit MAP-Stamm 423 – Ct-Werte der Real Time-PCR für den Marker *f*57 nach DNA-Aufbereitung mit unterschiedlichen Verfahren

MAP-Zellen pro 10 ml SAN „One“	Real Time-PCR	Einmischversuch 423		
		Maxwell[1)]		
		1. Aufber.	2. Aufber.	3. Aufber.
$1{,}8 \times 10^5$	1. Lauf	31,47	31,06	29,47
	2. Lauf	31,61	31,07	29,44
	3. Lauf	31,08	30,80	28,96
$1{,}8 \times 10^4$	1. Lauf	33,26	30,86	32,26
	2. Lauf	33,37	30,75	32,34
	3. Lauf	32,88	30,19	31,90
$1{,}8 \times 10^3$	1. Lauf	33,26	35,61	34,96
	2. Lauf	32,55	35,65	35,50
	3. Lauf	32,40	35,94	35,15
$1{,}8 \times 10^2$	1. Lauf	37,00	35,93	37,62
	2. Lauf	36,88	35,54	37,18
	3. Lauf	35,69	36,76	n.n.
$1{,}8 \times 10^1$	1. Lauf	n.n.	n.n.	n.n.
	2. Lauf	n.n.	n.n.	n.n.
	3. Lauf	38,53	n.n.	38,00

[1)] *Tissue LEV Total RNA Purification Kit* für das *Maxwell® 16 System* (Fa. Promega)
n.n. = nicht nachweisbar

11 Literaturverzeichnis

Abbas, B., Riemann, H. P., Hird, D. W. (1993): Diagnosis of Johne's disease (paratuberculosis) in northern California cattle and a note on its economic significance. California Veterinarian **8**: 19±24.

Abbas, B., Riemann, H. P., Hird, D. W. (1983): Diagnosis of Johne's disease (paratuberculosis) in northern California cattle and a note on its economic significance. Calif. Vet. **37**: 16.

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**: 335±339.

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

Abubakar, I., Myhill, D., Aliyu, S. H., Hunter, P. R. (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**: 401–410.

Abubakar, I, Myhill, D. J., Hart, A. R., Lake, I. R., Harvey, I., Rhodes, J. M., Robinson, R., Lobo, A. J., Probert, C. S., Hunter, P. R. (2007): A case-control study of drinking water and dairy products in Crohn's Disease - further investigation of the possible role of Mycobacterium avium paratuberculosis. Am. J. Epidemiol. **165 (7)**: 776–783.

Adaska, J. M. und Anderson, R. J. (2003): Seroprevalence of Johne's disease infection in dairy cattle in California, USA. Prev. Vet. Med. **60**: 255–261.

Akineden, Ö., Fernández-Silva, J. A., Weirich, S., Abdulmawjood, A., Bülte, M. (2011): Comparison of two decontamination procedures, three culture media, and real time-PCR assay for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) from artificially contaminated raw sausage. J. Food Safety and Food Quality/ Arch.Lebensmittelhyg. **62**: 150–156.

Alexander, D. C., Turenne, C. Y., Behr, M. A. (2009): Insertion and deletion events that define the pathogen *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. J. Bacteriol. 191: 1018–1025.

Alexejeff-Goloff, N. A. (1929): Zur Frage der Pathogenese und Bazillenausscheidung der Rinderparatuberculose. Zeitschrift fuer Infektionskrankheiten parasitaere Krankheiten und Hygiene der Haustiere. **36**: 312–317.

Alonso-Hearn, M., Molina, E., Geijo, M., Vazquez, P., Sevilla, I., Garrido, J. M., Juste, R. A. (2009): Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from muscle tissue of naturally infected cattle. Foodborne Pathog. Dis. **6**: 513–518.

Al-Soud, W. A. und Radström, P. (2000): Effects of Amplification Facilitators on Diagnostic PCR in the Presence of Blood, Feces, and Meat. J. Clin. Microbiol. **38 (12)**: 4463–4470.

Amonsin, A., Li, L. L., Zhang, Q., Bannantine, J. P., Motiwala, A. S., Sreevatsan, S., Kapur, V. (2004): Multilocus short sequence repeat sequencing approach for differentiating among *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* strains. J. Clin. Microbiol. **4**: 1694–1702.

Anderson, J. L., Meece, J. K., Koziczkowski, J. J., Clark, D. L. Jr., Radcliff, R. P. Nolden, C. A., Samuel, M. D., Ellingson, J. L. E. (2007):. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in scavenging mammals in Wisconsin. J. Wildl. Dis. **43**: 302–308.

Antognoli, M. C., Garry, F. B., Hirst, H. L., Lombard, J. E., Dennis, M. M., Gould, D. H., Salman, M. D., (2008): Characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* disseminated infection in dairy cattle and its association with antemortem test results. Vet. Microbiol. **127**: 300–308.

Antognoli, M. C., Hirst, H. L., Garry, F. B., Salman, M. (2007): Immune response to and faecal shedding of *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* in young dairy calves, and the association between test results in the calves and the infection status of their dams. Zoonoses Public Health **54**: 152–159.

Antoine, I., Coene, M., Cocito, C. (1988): Size and homology of the genomes of leprosy-derived corynebacteria, *Mycobacterium leprae*, and other corynebacteria and mycobacteria. J. Med. Microbiol. **27**: 45–50.

Argueta, C., Yoder, S., Holtzman, A. E., Aronson, T. W., Glover, N., Berlin, O. G., Stelma, G. N. Jr, Froman, S., Tomasek, P. (2000): Isolation and identification of nontuberculous mycobacteria from foods as possible exposure sources. J. Food Prot. **63 (7)**: 930–933.

Athwal, R. S., Deo, S. S., Imaeda, T. (1984): Deoxyribonucleic acid relatedness among *Mycobacterium leprae*, *M. lepraemurium*, and selected bacteria by dot blot and spectrophotometric deoxyribonucleic acid hybridization assays. Int. J. Syst. Bacteriol. **34**: 371–375.

AVID-Methodensammlung (2007): Mycobacterium *paratuberculosis*. Unter: http://www.dvg.net/fileadmin/Bilder/PDF_AVID_Alt/methoden/AB_AVID-Methode_Paratb.pdf

Ayele, W. Y., Svastova, P., Roubal, P., Bartos, M. and Pavlik, I. (2005): *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic. Appl. Environ. Microbiol. **71**, 1210–1214.

Ayele, W. Y., 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**: 209–217.

Bakker, D. (2010): Paratuberculosis Control Measures in Europe. In: Behr, M. A. und Collins, D. M (Hrsg.), Paratuberculosis: Organism, Disease, Control, S. 306-318. 1. Auflage, CAB International, Oxfordshire, UK.

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

Bannantine, J. P., Baechler, E., Zhang, Q., Li, L., Kapur, V. (2002): Genome scale comparison of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis with Mycobacterium avium subsp. avium reveals potential diagnostic sequences. J. Clin. Microbiol. **40 (4)**: 1303–1310.

Barclay, A. R., Russell, R. K., Wilson, M. L., Gilmour, W. H., Satsangi, J., Wilson, D. C. (2009): Systematic review: The role of breastfeeding in the development of pediatric inflammatory bowel disease. J. Ped. **155**: 421–426.

Bastida, F. und Juste, R. A. (2011): Paratuberculosis control: a review with a focus on Vaccination. J. Immune Based Ther. Vaccines **9**: 8.

Bates, I. (1974): Isolation and purification of deoxyribonucleic acid from mycobacteria. Acta. Pathol. Microbiol. Scad. Sect. B. **82**: 780–784.

Beard, P. M., Rhind, S. M, Buxton, D., Daniels, M. J., Henderson, D., Pirie , A., Rudge, K., Greig, A., Hutchings, M. R., Stevenson, K., Sharp, J. M. (2001a): Natural paratuberculosis infectionin rabbits in Scotland. J. Comp. Pathol. **124**: 290–299.

Beard, P. M., Daniels, M. J., Henderson, D., Pirie, A., Rudge, K., Buxton, D., Rhind, S., Greig, A., Hutchings, M. R., McKendrick, I., Stevenson, K., Sharp, J. M. (2001b): Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. J. Clin. Microbiol. **39**: 1517–1521.

Beckler, D. R., Elwasila, S., Ghobrial, G., Valentine, J. F., Naser, S. A. (2008): Correlation between rpoB gene mutation in *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and clinical rifabutin and rifampicin resistance for treatment of Crohn's disease. World J. Gastroenterol. **14**: 2723–2730.

Behr, M. A. und Kapur, V. (2008): The evidence for *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease. Curr. Opin. Gastroenterol. **24**: 17–21.

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

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

Bergmann, A., Camara, I. S, Voigt, A., (1981): Neue Erkenntnisse zur Paratuberkulose. Mh. Vet. Med. **36**: 471–477.

Bergstrand, O., Hellers, G. (1983): Breast-feeding during infancy in patients who later develop Crohns-disease. Scand. J. Gastroenterol. **18**: 903–906.

Beumer, A., Kind, D., Pfaller, S. L. (2008): Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in drinking water and biofilms using quantitative PCR. Abstracts of the 108th General Meeting of the American Society for Microbiology, abstract Q-487. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.

BfR-Stellungnahme (2012): Bewertung des Nachweises von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in Lebensmitteln. Anlage zu 41-3413-01-7128013 vom 20.12.2012.

Bickley, J., Short, J. K., McDowell, D. G., Parkes, H. C. (1996): Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. Lett. Appl. Microbiol. **22**: 153–158.

Birmingham, P., Helm, J. M., Manner, P. A., Tuan, R. S., (2008): Simulated joint infection assessment by rapid detection of live bacteria with real-time reverse transcription polymerase chain reaction. J. Bone Joint Surg. [Am]. **90 (3)**: 602–608.

Bisping, W. und Amtsberg, G. (1988): Farbatlas zur Diagnose bakterieller Infektionserreger der Tiere, S. 119-120. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg.

Bögli-Stuber, K., Kohler, C., Seitert, G., Glanemann, B., Antognoli, M. C., Salman, M. D., Wittenbrink, M. M., Wittwer, M., Wassenaar, T., Jemmi, T., Bissig-Choisat, B. (2005): Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Swiss dairy cattle by real-Time-PCR and culture: a comparison of the two assays. J. Appl. Microbiol. **99**: 587–597.

Bölske, G. und Herthnek, D. (2010): Diagnosis of Paratuberculosis by PCR. In: Behr, M. A. und Collins, D. M (Hrsg.), Paratuberculosis: Organism, Disease, Control, S. 267-283. 1. Auflage, CAB International, Oxfordshire, UK.

Borrego, S., Niubo, E., Ancheta, O., Espinosa, M. E. (2000): Study of the microbial aggregation in *Mycobacterium* using image analysis and electron microscopy. Tissue Cell **32**: 494–500.

Bosshard, C., Stephan, R., Tasara, T. (2006): Application of an F57 sequence-based realTime-PCR assay for *Mycobacterium paratuberculosis* detection in bulk tank raw milk and slaughtered healthy dairy cows. J. Food Prot. **69**: 1662–1667.

Botsaris, G., Christodoulou, M., Hatzitofi, M., Iannou, I., Rees, C. (2012): Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in infant formulas by culture, PCR and combined Phage-PCR. Proceedings of the 11th International Colloquium on Paratuberculosis, Sydney, Australia.

Botsaris, G., Slana, I., Liapi, M., Dodd, M., 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., Stabel, J. R., Beitz, D. C., Robbe-Austerman, S. (2012): Optimization of Methods for the Detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Milk and Colostrum of Naturally Infected Dairy Cows. Animal Industry Report: AS 658, ASL R2676. Unter: http://lib.dr.iastate.edu/ans_air/vol658/iss1/8.

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.

Brennan, P. J. und Nikaido, H. (1995): The envelope of mycobacteria. Annu. Rev. Biochem. **64**: 29–63.

Buergelt, C. D. und Williams, J. E. (2004): Nested PCR on blood and milk for the detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* DNA in clinical and subclinical bovine paratuberculosis. Aust. Vet. J. **82**: 497–503.

Buergelt, C. D. und Ginn, P. E. (2000): The histopathologic diagnosis of subclinical Johne's disease in North American bison (Bison bison). Vet. Microbiol. **77**: 325–31.

Buergelt, C. D. und Duncan, J. R. (1978): Age and milk production data of cattle culled from a herd with paratuberculosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. **173**: 478–480.

Bull, T. J., Schock, A., Sharp, J. M., Greene, M., McKendrick, I. J., Sales, J., Linedale, R., Stevenson, K. (2013): Genomic variations associated with attenuation in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* vaccine strains. BMC Microbiol. **13**: 11.

Bull, T. J., McMinn, E. J., Sidi-Boumedine, K., Skull, A., Durkin, D., Neild, P., Rhodes, G., Pickup, R., Hermon-Taylor, J. (2003): 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**: 2915–2923.

Bull, T. J., 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. Microbiol. **146**: 3285.

Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft (2005): Leitlinien für den Umgang mit der Paratuberkulose in Wiederkäuerbeständen (Paratuberkuloseleitlinien). Vom 17. Januar 2005. Unter: http://www.animal-health-online.de/gross/wp-content/uploads/2005/02/Paratuberkulose-Leitlinien_17012005.pdf

Calkins, M. und Mendeloff, A. I. (1986): Epidemiology of inflammatory bowel disease. Epidemiol. Rev. **8**: 60–91.

Carbone, K. M., Luftig, R. B., Buckley, M. R. (2005): Microbial triggers of chronic human ilness. American Academy of Microbiology Colloquium, 1–14.

Cardona, P. J. (2009): A dynamic reinfection hypothesis of latent tuberculosis infection. Infection **37**: 80–86.

Cerf, O., Griffiths, M., Aziza, F. (2007): Assessment of the prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in commercially pasteurized milk. Foodborne Pathog. Dis. **4(4)**: 433–447.

Chamaillard, M., Girardin, S. E., Viala, J., Philpott, D. J. (2003): Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. Cell. Microbiol. **5**: 581-592.

Chiodini, R. J. (1996): Immunology: resistance to paratuberculosis. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. **12**: 313–343.

Chiodini, R. J. und Hermon-Taylor, J. (1993): The thermal resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk under conditions simulating pasteurization. J. Vet. Diag. Invest. **5**: 629–631.

Chiodini, R. J. (1989): Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. Clin. Micriobiol. Rev. **2**: 90–117.

Chiodini, R. J. (1986): Biochemical characteristics of various strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. Am. J. Vet. Res. **47 (7)**: 1442–1445.

Chiodini, R. J. und Van Kruiningen, H. J. (1986): The prevalence of paratuberculosis in culled New England cattle. Cornell Vet. **76**: 91–104.

Chiodini, R. J., Van Kruiningen, H. J., Thayer, W. S., Coutu, J. A. (1986): The spheroplastic phase of mycobacteria isolated from patients with Crohn's disease. J. Clin. Microbiol. **24**: 357–363.

Chiodini, R. J., Van Kruiningen, H. J., Merkal, R. S. (1984a): Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. Cornell Vet. **74**: 218–262.

Chiodini, R. J., Van Kruiningen H. J., Merkal, R. S., Thayer, W. R., Coutu, J. A. (1984b): Characteristics of an unclassifed Mycobacterium species isolated from patients with Crohn's disease. J. Clin. Microbiol. **20**: 966–971.

Chiodini, R. J. und Van Kruiningen, H. J. (1983): Eastern white-tailed deer as a reservoir of ruminant paratuberculosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. **182**: 168–169.

Christopher-Hennings, J., Dammen, M. A., Weeks, S. R., Epperson, W. B., Singh, S. N., Steinlicht, G. L., Fang, Y., Skaare, J. L., Larsen, J. L., Payeur, J. B. and Nelson, E. A. (2003): Comparison of two DNA extractions and nested PCR, real-Time-PCR, a new commercial PCR assay and bacterial culture for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine feces. J. Vet. Diagn. Invest. **15**: 87–93.

Christopher-Hennings, J., Nelson, E. A., Nelson, J. K., Hines, R. J., Swenson, S. L., Hill, H. T., Zimmerman, J. J., Katz, J. B., Yaeger, M. J., Chase, C. C. (1995): Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR. J. Clin. Microbiol. **33 (7)**: 1730–1734

Chui, L. W., King, R., Lu, P., Manninen, K., Sim, J. (2004): Evaluation of four DNA extraction methods for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by polymerase chain reaction. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **48**: 39–45.

Clark, D. L. Jr., Koziczkowski, J. J., Radcliff, R. P., Carlson, R. A., Ellingson, J. L. (2008): Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*: comparing fecal culture versus serum enzyme-linked immunosorbent assay and direct fecal polymerase chain reaction. J. Dairy Sci. **91 (7)**: 2620–2627.

Clark, D. L. Jr., Anderson, J. L., Koziczkowski, J. J., Ellingson, J. L. E. (2006): Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* genetic components in retail cheese curds purchased in Wisconsin and Minnesota by PCR. Mol. Cell Probes. **20**: 197–202.

Clark–Curtiss, J. E. (1990): Genome structure of mycobacteria. In: McFadden, J. (Hrsg.), Molecular biology of the mycobacteria, S. 77-96. Surrey University Press, London, UK.

Clark-Curtiss, J. E., Jacobs, W. R., Docherty, M. A., Ritchie, L. N., Curtiss, R. III. (1985): Molecular analysis of DNA and construction of genomic libraries of *Mycobacterium leprae*. J. Bacteriol. **161**: 1093–1102.

Clarke, C. J. (1997): The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. J. Comp. Pathol. **116**: 217–261.

Cocito, C., Gilot, P., Coene, M., De Kesel, M., Poupart, P., Vanuffel, P. (1994): Paratuberculosis. Clin. Microbiol. Rev. **7**: 328–345.

Colgrove, G. S., Thoen, C. O., Blackburn, B. O., Murphy. C. D. 1989): Paratuberculosis in cattle: a comparison of three serologic tests with results of fecal culture. Vet. Microbiol. **19**:183–187.

Collins, M. T. (1996): Diagnosis of paratuberculosis. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. **12(2)**: 357–371.

Collins, M. T., Sockett, D. C., Goodger, W. J., Conrad, T. A., Thomas, C. B., Carr, D. J. (1994): Herd prevalence, geographic distribution of, and riskfactors for, bovine paratuberculosis in Wisconsin. J. Am. Vet. Med. Assoc. **204**: 636–641.

Collins. D. M., Stephens. D. M., de Lisle, G. W. (1993): Comparison of polymerase chain reaction tests and fecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine feces. Vet. Microbiol. **36**: 289–299.

Collins, M. T. und Morgan, I. R. (1991): Economic decision analysis model of a paratuberculosis test and cull program. J Am Vet Med Assoc. **199(12)**: 1724–1729.

Collins, D. M., Gabric, D. M., de Lisle, G. W. (1990): Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. J. Clin. Microbiol. **28**: 1591–1596.

Constans, A. (2005): Giving a NOD2 the right target. Scientist. **19 (3)**: 24–25.

Cook, W. E., Cornish, T. E., Shideler, S., Lasley, B., Collins, M. T. (1997): Radiometric culture of *Mycobacterium avium paratuberculosis* from the feces of tule elk. J. Wildl. Dis. **33**: 635–637.

Cornejo, B. J., Shaguin-Ruiz, A., Suarez-Guemes, F., Thornton, C. G., Ficht, T. A., Adams, L. G. (1998): Comparison of C18-carboxypropylbetaine and glass bead DNA extraction methods for detection of *Mycobacterium bovis* in bovine milk samples and analysis of samples by PCR. Appl. Environ. Microbiol. **64**: 3099–3101.

Corti, S. und Stephan, R. (2002): Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* specific IS*900* insertion sequences in bulk-tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland. BMC Microbiol. **2**: 15.

Coulombe, F., Divangahi, M., Veyrier, F., de Leseleuc, L., Gleason, J. L., Yang, Y., Kelliher, M. A., Pandey, A. K., Sassetti, C. M., Reed, M. B., Behr, M. A. (2009): Increased NOD2-mediated recognition of N-glycolyl muramyl dipeptide. J. Exp. Med. **206**: 1709–1716.

Cousins, D. V., Evans, R. J., Francis, B. R. (1995): Use of BACTEC radiometric culture method and polymerase chain reaction for the rapid screening of faeces and tissues for *Mycobacterium paratuberculosis*. Aust. Vet. J. **72 (12)**: 458–462.

Cramwell, M. P. (1993): Control of Johne's disease in a flock of sheep by vaccination. Vet. Rec. **133**: 219–220.

Crohn, B. B., Ginzburg, L., Oppenheimer, G. (1932): Regional ileitis - a pathologic and clinical entity. J. Am. Med. Assoc. **99**: 1323–1329.

Dailloux, M., Albert, M., Laurain, C., Andolfatto, S., Lozniewski, A., Hartemann, P., Mathieu. L. (2003): *Mycobacterium xenopi* and drinking water biofilms. Appl. Environ. Microbiol. **69**: 6946–6948.

Damato, J. J. und Collins, M. T. (1990): Growth of Mycobacterium paratuberculosis in radiometric, Middlebrook and egg-based media. Vet. Microbiol. **22 (1)**: 31–42.

Daniels, M. J., Ball, N., Hutchings, M. R., Greig, A. (2001): The grazing response of cattle to pasture contaminated with rabbit faeces and the implications for the transmission of paratuberculosis. Vet. J. **161 (3)**: 306–313.

Davis, M. K. (2001): Breastfeeding and chronic disease in childhood and adolescence. Pediatr. Clin. North Am. **48**: 125–141.

Das, S. K., Sinha, R. P., Chauhan, H. V. S. (1992): Chemotherapy of paratuberculosis in goats: streptomycin, rifampicin and levamisole versus streptomycin, rifampicin and dapsone. Indian J. Anim. Sci. **62**: 8–13.

Dasari, B. V., Maxwell, R., Gardiner, K. R. (2010): Assessment of complications following strictureplasty for small bowel Crohn's disease. Ir. J. Med. Sci. **179 (2)**: 201–205.

Davey, K. R. (1990): Equilibrium temperature in a clump of bacteria heated in fluid. Appl. Environ Microbiol. **56**: 566–568.

De Juan, L., Alvarez, J., Romero, B., Bezos, J., Castellanos, E., Aranaz, A., Mateos, A., Domínguez, L. (2006): Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains isolated from cattle and goats. Appl. Environ. Microbiol. **72 (9)**: 5927–5932.

De Juan, L., Mateos, A., Dominguez, L., Sharp, J. M., Stevenson, K. (2005): Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis. Vet. Microbiol. **106**: 249–257.

Dixon, W. J. (Hrsg.) (1993): BMDP Statistical Software Manual, Volume 1 and 2. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London.

Djønne, B., Jensen, M. R., Grant, I. R,. Holstad, G. (2003): Detection by immunomagnetic PCR of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from dairy goats in Norway. Vet Microbiol. **92**: 135–143.

Doetsch, R. N. (1981): Determinitive methods of light microscopy. In: Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Costilow, R. N., Mester, E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R., Phillips, G. B. (Hrsg.), Manual of methods for general bacteriology, S. 21-33. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Dohmann, K., Strommenger, B., Stevenson, K., de Juan, L., Stratmann, J., Kapur, V., Bull, T. J., Gerlach, G. F. (2003): Characterization of genetic differences between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* type I and type II isolates. J. Clin. Microbiol. **41 (11)**: 5215–5223.

Domingue, G. J. und Woody, H. B. (1997): Bacterial persistence and expression of disease. Clin. Microbiol. Rev. **10**: 320–344.

Donaghy, J. A., Johnston. J., Rowe, M. T. (2011): Detection of Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis in cheese, milk powder and milk using IS900 and f57-based qPCR assays. J. Appl. Microbiol. **110 (2)**: 479–489.

Donaghy, J. A., Rowe, M. T., Rademaker, J. L. W., Hammer, P., Herman, L. De Jonghe, V., Blanchard, B., Duhem, K., Vindel, E. (2008): An inter-laboratory ring trial for the detection and isolation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis from raw milk artificially contaminated with naturally infected faeces. Food Microbiol. **25**: 128–135.

Donaghy, J. A., Totton, N. L., Rowe, M. T. (2004): Persistence of *Mycobacterium paratuberculosis* during manufacture and ripening of Cheddar cheese. Appl. Environ. Microbiol. **70**: 4899–4905.

Doré, E., Paré, J., Côté , G., Buczinski, S., Labrecque, O., Roy, J. P., Fecteau, G. (2012): Risk Factors Associated with Transmission of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis to Calves within Dairy Herd: A Systematic Review. J. Vet. Intern. Med. **26**: 32–45.

Doyle, T. M. (1958): Foetal infection in Johne's disease. Vet. Rec. **70:** 238.

Doyle, T. M. (1953): Susceptibility to Johne's disease in relation to age. Vet. Rec. **65:** 363–365.

Dundee, L., Grant, I. R., Ball, H. J., Rowe. M. T. (2001): Comparative evaluation of four decontamination protocols for the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. Lett. Appl. Microbiol. **33**: 173–177.

Dzieciol, M., Volgger, P., Khol, J., Baumgartner, W., Wagner, M., Hein, I. (2010): A novel real-Time-PCR assay for specific detection and quantification of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in milk with the inherent possibility of differentiation between viable and dead cells. BMC Research Notes **3**: 251.

Eamens, G. J., Walker, D. M., Porter, N. S., Fell, S. A. (2008): Radiometric pooled faecal culture for the detection of *Mycobacterium paratuberculosis* subsp *paratuberculosis* in low-shedder cattle. Aust. Vet. J. **86**: 259–265.

Economou, M. und Pappas, G., (2008): New global map of Crohn's disease: genetic environmental and socioeconomic correlations. Inflammatory Bowel Diseases **14**: 709–720.

Ehlers, S. (2009): Lazy, dynamic or minimally recrudescent? On the elusive nature and location of the mycobacterium responsible for latent tuberculosis. Infection **37**: 87–95.

Ellingson, J. L., Anderson, J. L., Koziczkowski, J. J., Radcliff, R. P., Sloan, S. J., Allen, S. E., Sullivan, N. M. (2005): Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. J. Food Prot. **68**: 966–972.

Ellingson, J. L., Stabel, J. R., Bishai, W. R., Frothingham, R., Miller, J. M. (2000): Evaluation of the accuracy and reproducibility of a practical PCR panel assay for rapid detection and differentiation of *Mycobacterium avium* subspecies. Mol. Cell Probes. **14 (3)**: 153–161.

Ellingson, J. L., Bolin, C. A., Stabel, J. R. (1998): Identification of a gene unique to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and application to diagnosis of paratuberculosis. Mol. Cell. Probes. **12**: 133–142.

Ellouz, F., Adam, A., Ciorbaru, R., Lederer, E. (1974): Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. Biochem. Biophys. Res. Commun. **59**: 1317–1325.

Eltholth, M. M., Marsh, V. R., Van Winden, S., Guitian, F. J. (2009): Contamination of food products with *Mycobacterium avium paratuberculosis*: a systematic review. J. Appl. Microbiol. **107:** 1061–1071.

El-Zaatari, F. A. K., Naser, S. A., Engstrand, L., Burch, P. E., Hachem, C. Y., Whipple, D. L., Graham, D. Y. (1995): Nucleotide-Sequence Analysis and Seroreactivities of the 65K Heat-Shock Protein from *Mycobacterium paratuberculosis*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. **2**: 657–664.

Elze, J. (2009): Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* bei Schlachtrindern. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.

Emery, D. L. and Whittington, R. J. (2004): An evaluation of mycophage therapy, chemotherapy and vaccination for control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. Vet Microbiol **104**: 143–155.

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.

Englund, S., Bölske, G., Ballagi-Pordány, A., Johansson, K.-E. (2001): Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue samples by single, fluorescent and nested PCR based on the IS900 gene. Vet. Microbiol. **81**: 257–271.

Englund, S., Ballagi-Pordány, A., Bölske, G., Johansson, K.-E. (1999): Single PCR and Nested PCR with a Mimic Molecule for Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis.* Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **33**: 163–171.

Engvall, A., Larsson, B., Bölske, G., Wahlström, H. (1994): Swedish livestock is considered free from paratuberculosis. In: Proceedings of the 4th International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Cambridge, U.K.

Falkinham J. O. III (2009): Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. J. Appl. Microbiol. **107 (2)**: 356–367.

Falkinham J. O. III (2003): The changing pattern of nontuberculous mycobacterial disease. Can. J. Infect. Dis. **14**: 281–286.

Falkinham, J. O. III, Norton, C. D., Le Chevallier, M. W. (2001): Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* and other mycobacteria in drinking water distribution systems. Appl. Environ. Microbiol. **67**: 1225–1231.

Fang, Y., Wu, W. H., Pepper, J. L., Larsen, J. L., Marras, S. A., Nelson, E. A., Epperson, W. B., 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**: 287–291.

Fecteau, M.-E. und Whitlock, R. H. (2010): *Paratuberculosis* in cattle. In: Behr, M. A. und Collins, D. M (Hrsg.), Paratuberculosis: Organism, Disease, Control, S. 144-156. 1. Auflage, CAB International, Oxfordshire, UK.

Feller, M., Huwiler, K., Stephan, R., Altpeter, E., Shang,A., Furrer, H., Pfyffer, G. E., 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**: 607–613.

Feazel, L. M., Peterson, K. L., Frank, D. N., Harris, J. K., Pace, N. R. (2009): Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **106 (38)**: 16393–16399.

Fischer, O. A., Matlova, L., Dvorska, L., Svastova, P., Peral, D. L., Weston, R. T., Bartos, M., Pavlik, I. (2004a): Beetles as possible vectors of infections caused by *Mycobacterium avium* species. Vet. Microbiol. **102**: 247–255.

Fischer, O. A., Matlova, L., Dvorska, L., Svastova, P., Bartl, J., Weston, R. T., Pavlik, I. (2004b): Blowflies *Calliphora vicina* and *Lucilia sericata* as passive vectors of *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *M. a. paratuberculosis and M. a. hominissuis*. Med. Vet. Entomol. **18**: 116–122.

Fischer, O. A., 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**: 325–338.

Fischer, O. A., Matlova, L., Dvorska, L., Svastova, P., Pavlik, I., (2003b): Larvae of the oriental cockroach, *Blatia orientalis*, as passive vectors of causal agents of avian tuberculosis and paratuberculosis. Med. Vet. Entomol. **17**: 145–150.

Fischer, O., Matlova, L., Dvorska, L., Svastova, P., Bartl, J., Melicharek, I., Weston, R. T., Pavlik, I., (2001): Diptera as vectors of mycobacterial infections in cattle and pigs. Med. Vet. Entomol. **15**: 208–211.

Foddai, A., Strain, S., Whitlock, R.H., Elliott, C. T., Grant, I.R. (2011): Application of a peptide-mediated magnetic separation-phage assay for detection of viable Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis to bovine bulk tank milk and feces samples. J. Clin. Microbiol. **49**: 2017–2019.

Foddai, A., Elliott, C. T., Grant, I. R. (2010): Rapid assessment of the viability of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cells after heat treatment, using an optimized phage amplification assay. Appl. Environ. Microbiol. **76 (6)**: 1777–1782.

Francis, J. (1943): Infection of laboratory animals with *Mycobacterium johnei*. J. Comp. Pathol. Theriogenol. **53**: 140–150.

Gao, A., Mutharia, L., Raymond, M., Odumeru, J. (2007): Improved template DNA preparation procedure for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by PCR. J. Microbiol. Methods. **69**: 417–420.

Gao, A. L., Odumeru, J., Raymond, M., Mutharia, L. (2005): Development of improved method for isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bulk tank milk: Effect of age of milk, centrifugation and decontamination. Can. J. Vet. Res. **69**: 81–87.

Gao, A., Mutharia, L., Chen, S., Rahn, K., Odumeru, J. (2002): Effect of pasteurization on survival of Mycobacterium paratuberculosis in milk. J. Dairy. Sci. **85**: 3198–3205.

Geisbauer, E., Altmann, M., Dünser, M. (2009): Paratuberculosis surveillance in Austria. In: Proceedings of the 10th International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Minneapolis, Minnesota, USA.

Geue, L., Köhler, H., Klawonn, W., Dräger, K., Hess, R. G., Conraths, F. J. (2007): Untersuchungen zur Eignung von ELISAs zum Nachweis von Antikörpern gegen *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Tankmilchproben aus Rheinland-Pfalz. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. **120 (1-2)**: 67–78.

Giese, S. B. und Ahrens, P. (2000): Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture. Vet. Microbiol. **77**: 291–297.

Gilmour, N. J., Nisbet, D. I. Brotherston, J. G. (1965): Experimental oral infection of calves with *Mycobacterium johnei*. J. Comp. Pathol. **75**: 281–286.

Gitnick, G., Collins, J., Beaman, B., Brooks, D., Arthur, M., Imaeda, T., Palieschesky, M. (1989): Preliminary report on isolation of mycobacteria from patients with Crohn's disease. Dig. Dis. Sci. **34 (6)**: 925–932.

Glanemann, B. Schönenbrücher, H., Bridger, N., Abdulmawjood, A., Neiger, R., Bülte, M. (2008): Detection of *Mycobacteriumavium* subspecies *paratuberculosis*-specific DNA by PCR in intestinal biopsies of dogs. J. Vet. Intern. Med. **22**: 1090–1094.

Graham, D. Y., Markesich, D. C., Yoshimura, H. H. (1987): Mycobacteria and inflammatory bowel disease. Results of culture. Gastroent. **92**: 436–442.

Grange, J. M. (1996): The biology of the genus Mycobacterium. Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement 81, 1S– 9S.

Grant, I. R. (2010): *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Animal-derived Foods and the Environment. In: Behr, M. A. und Collins, D. M (Hrsg.), Paratuberculosis: Organism, Disease, Control, S. 29-35. 1. Auflage, CAB International, Oxfordshire, UK.

Grant, I. R. (2005): Zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: the current position. J. Appl. Microbiol. **98 (6)**: 1282–1293.

Grant, I. R., Williams, A. G., Rowe, M. T., Muir, D. D. (2005): Efficacy of Various Pasteurization Time-Temperature Conditions in Combination with Homogenization on Inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Milk. Appl. Environ. Microbiol. **71**: 2853–2861.

Grant, I. R. und Rowe, M. T. (2004): Effect of chemical decontamination and refrigerated storage on the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from heat-treated milk. Lett. Appl. Microbiol. **38 (4)**: 283–288.

Grant I. R. (2003): *Mycobacterium paratuberculosis* and milk. Acta Vet. Scand. **44**: 261–266.

Grant, I. R., Kirk, R. B., Hitchings, E., Rowe, M. T. (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.

Grant, I. R., Ball, H. J., Rowe, M. T. (2002a): Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. Appl. Environ. Microbiol. **68**: 2428–2435.

Grant, I. R., Hitchings, E. I., McCartney, A., Ferguson, F., Rowe, M. T. (2002b): Effect of commercial-scale high-temperature, short-time pasteurization on the viability of *Mycobacterium paratuberculosis* in naturally infected cows' milk. Appl. Environ. Microbiol. **68**: 602–607.

Grant, I. R. und Rowe, M. T. (2001): Methods for the detection and enumeration of viable *Mycobacterium paratuberculosis* from milk and milk products. Bull. Int. Dairy Fed. **362**: 41–52.

Grant, I. R., Rowe, M. T., Dundee, L., Hitchings, E. (2001): *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: its incidence, heat resistance and detection in milk and dairy products. Int. J. Dairy Technol., **54**: 2–13.

Grant, I. R., Pope, C. M., O'Riordan, L. M., Ball, H. J., Rowe, M. T. (2000): Improved detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by immunomagnetic PCR. Vet. Microbiol. **77**: 369–378.

Grant, I. R., Ball, H. J., Rowe, M. T. (1998a): Effect of high temperature, short time pasteurisation on milk containing low numbers of Mycobacterium paratuberculosis. Lett. Appl. Microbiol. **26**: 166–170.

Grant, I. R., Ball, H. J., Rowe, M. T. (1998b): Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from milk by immunomagnetic separation. Appl. Environ. Microbiol. **64**: 3153–3158.

Grant, I. R., Ball, H. J., Neill, S. D., Rowe, M. T. (1996): Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in Cows' Milk at Pasteurization Temperatures. Appl. Environ. Microbiol. **62 (2)**: 631–636.

Green, E. P., Tizard, M. L., Moss, M. T., Thompson, J., Winterbourne, D. J., McFadden, J. J., Hermon-Taylor, J. (1989): Sequence and characteristics of IS*900*, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. Nucleic Acids Res. **17**: 9063–9073.

Greenstein, R. J. (2003): Is Crohn`s disease caused by a mycobacterium? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne`s disease. Lancet. Infect. Dis. **3**: 507–514.

Greig, A., Stevenson, K., Perez, V., Pirie, A. A., Grant, J. M., Sharp, J. M. (1997): Paratuberculosis in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Vet. Rec. **140**: 141–143.

Groenendaal, H., Nielen, M., Jalvingh, A. W., Horst, S. H., Galligan, D. T., Hesselink, J. W. (2002): A simulation of Johne's disease control. Prev. Vet. Med. **54**: 225–245.

Haagsma, J., Mulder, C. J. J., Eger, A., Van Bruin, J., Ketel, R. J., Tytgat, G. N. J. (1989): *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from patients with Crohn's disease in The Netherlands. Scand. J. Gastroenterol. **24**: 158–168.

Hammer, P., Kiesner, C., Walte, H. G., Knappstein, K., Teufel, P. (2002): Heat resistance of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in raw milk tested in a pilot plant pasteurizer. Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **54**: 275–303.

Hammer, P., Kiesner, C., Teufel, P. (2000): Bedeutung der Hitzeresistenz von *Mycobacterium paratuberculosis* für pasteurisierte Milch. Forschungsreport **2**: 14–17.

Hampe, J., Franke, A., Rosenstiel, P., Till, A., Teuber, M., Huse, K., Albrecht, M., Mayr, G., de la Vega, F. M., Briggs, J., Günther, S., Prescott, N. J., Onnie, C. M., Häsler, R., Sipos, B., Fölsch, U. R., Lengauer, T., Platzer, M., Mathew, C. G., Krawczak, M., Schreiber, S. (2007): A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. Nat. Genet. **39(2)**: 207–211.

Hanauer, S. B. (1998): Inflammatory bowel disease. New Engl. J. Med. **334**: 841±848.

Harding, H. (1959): The histopathology of *Mycobacterium johnei* infection in small laboratory animals. J. Pathol. Bacteriol. **78**: 157–169.

Hendrick, S. H., Kelton, D. F., Leslie, K. E., Lissemore, K. D., Archambault, M., Duffield, T. F. (2005): Effect of paratuberculosis on culling, milk production, and milk quality in dairy herds. J. Am. Vet. Med. Assoc. **227**: 1302–1308.

Hermon-Taylor, J., Bull, T. J., Sheridan, J. M., Cheng, J., Stellakis, M. L., Sumar, N. (2000): Causation of Crohn's disease by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Can. J. Gastroenteriol. **14:** 521–539.

Hermon-Taylor, J., Tizard, M., Sanderson, J., Kempsell, K., Sumar, N., Milar, D., Loughlin, M., Ford J., Withey, S. (1994): Mycobacteria and the aetiology of Crohn's disease. In: Rachmilewitz, D. (Hrsg.), Inflammatory Bowel Diseases, S. 51–57. Kluwer Academic Publishers, London.

Herthnek, D., Nielsen, S. S., Lindberg, A., Bölske, G. (2008): A robust method for bacterial lysis and DNA purification to be used with real-Time-PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. J. Microbiol. Methods **75**: 335–340.

Herthnek, D., Englund, S., Willemsen, P., Bölske, D., (2006): Sensitive detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine semen by real-Time-PCR. J. Appl. Microbiol. **200**: 1095–1102.

Herthnek, D. und Bölske, G. (2006): New PCR systems to confirm real-Time-PCR detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. BMC Microbiology **6**: 87.

Hett, E. C. und Rubin, E. J. (2008): Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **72**: 126–156.

Hines, M. E., Stiver, S., Giri, D., Whittington, L., Watson, C., Johnson, J., Musgrove, J., Pence, M., Hurley, D., Baldwin, C., Gardner, I. A., Aly, S. (2007): Efficacy of spheroplastic and cell-wall competent vaccines for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in experimentally-challenged baby goats. Vet Microbiol **120**: 261–283.

Hines, S. A., Buergelt, C. D., Wilson, J. H., Bliss, E. L. (1987): Disseminated *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a cow. J. Am. Vet. Med. Assoc. **190**: 681–683.

Hirch, A. (1956): Infection of hamsters and rabbits with *Mycobacterium johnei*. J. Comp. Pathol. **66**: 260–269.

Hirst, H. L., Garry, F. B., Morley, P. S., Salman, M. D., Dinsmore, R. P., Wagner, B. A., McSweeney, K. D., Goodell, G. M. (2004): Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subsp. p*aratuberculosis* infection among dairy cows in Colorado and herd-level risk factor for seropositivity. J. Am. Vet. Med. Assoc. **225**: 97–101.

Hoffmann, J. C., Preiss, J. C., Autschbach, F., Buhr, H. J., Häuser, W., Herrlinger, K., Höhne, W., Koletzko, S., Krieglstein, C. F., Kruis, W., Matthes, H., Moser, G., Reinshagen, M., Rogler, G., Schreiber, S., Schreyer, A. G., Sido, B., Siegmund, B., Stallmach, A., Bokemeyer, B., Stange, E. F., Zeitz, M. (2008): Clinical practice guideline on diagnosis and treatment of Crohn's disease. Z. Gastroenterol. **46 (9)**: 1094–1146.

Hole, N. H. (1958): Johne's disease. Adv. Vet. Sci. **4**: 341–387.

Holter, P. (1979): Effect of dung beetles (Aphodius spp.) and earthworms on the disappearance of cattle dung. Oikos **32**: 393–402.

Honer zu Bentrup, K. und Russell, D. G. (2001): Mycobacterial persistence: adaptation to a changing environment. Trends Microbiol. **9**: 597–605.

Hope, A. F., Tulk, P. A., Condron, R. J. (1996): Pasteurization of *Mycobacterium paratuberculosis* in whole milk. In: Chiodini, R. J., Hines, M. E., Collins, M. T. (Hrsg.), Proceedings of the 5th International Colloquium on Paratuberculosis, S. 377–382. International Association for Paratuberculosis, Rehoboth, Massachusetts, USA.

Hope, A. F. (1995): Vaccination of cattle against Johne's disease in Australia (Review) Project DAV341. Melbourne: Australian Dairy Research and Development Corporation.

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.

Hruska, K. und Pavlik, I. (2010): Frequently asked questions on the links between mycobacteria and Crohn's disease. In: Keynote lecture delivered at the International Conference on Gastro-Intestinal Microbial Ecology, 8.–11. November 2010, Kosice, Slovak Republic. http://centaur.vri.cz/docs/files/FAQ_2010_Kosice.pdf

Hruska, K. (2009): Possible risk of autoimmune or autoinflammatory diseases triggered by mycobacteria. In: Kazda, J., Pavlik, I., Falkinham, J. O. 3rd, Hruska, K. (Hrsg), The Ecology of Mycobacteria: Impact on Human and Animal's Health, S. 333-338. 1. Auflage, Springer Verlag, Dordrecht, Heidelberg, New York, London.

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**: 327–335.

Hughes, V., Bannantine, J. P., Denham, S., Smith, S., Garcia-Sanchez, A., Sales, J., Paustian, M. L., Mclean, K., Stevenson, K. (2008): Immunogenicity of Proteome-Determinded *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-Specific Proteins in Sheep with Paratuberculosis. Clinical and Vaccine Immunology **15**: 1824–1833.

Hughes, V.M., Stevensen, K., Sharp, J. (2001): Improved preparation of high molecular weight DNA for pulse-field gel electrophoresis from mycobacteria. J. Microbiol. Methods **44**: 209– 215.

Hugot, J. P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J. P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C. A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J.-F., Sahbatou, M., Thomas, G. (2001): Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature **411**: 599–603.

Ikonomopoulos, J., Pavlik, I., Bartos, M., Svastova, P., Ayele, W. Y., 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**: 8934–8936.

Ikonomopoulos, J., Gazouli, M., Pavlik, I., Bartos, M., Zacharatos, P., Xylouri, E., Papalambros, E., Gorgoulis, V. (2004): Comparative evaluation of PCR assays for the robust molecular detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. J. Microbiol. Methods **56**: 315–321.

Imaeda, T., Broslawski, G., Imaeda, S. (1988): Genomic relatedness among mycobacterial species by nonisotopic blothybridization. Int. J. Syst. Bacteriol. **38**: 151–156.

Imaeda, T. (1985): Deoxyribonucleic acid relatedness among selected strains of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium microti*, and *Mycobacterium africanum*. Int. J. Syst. Microbiol. **35**: 147–150.

Imaeda, T., Kirchheimer, W. F., Barksdale, L. (1982): DNA isolated from *Mycobacterium leprae*: genome size, base ratio, and homology with other related bacteria as determined by optical DNA-DNA reassociation. J. Bacteriol. **150**: 414–417.

Irenge, L. M., 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* subsp. *paratuberculosis* in faecal samples. Vet. Microbiol. **136**: 166–172.

Janagama, H. K., Jeong, K., Kapur, V., Coussens, P., Sreevatsan, S. (2006): Cytokine responses of bovine macrophages to diverse clinical *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* strains. BMC Microbiol. **6**:10.

Jayarao, B. M., Pillai, S. R., Wolfgang, D. R., Griswold, D. R., Rossiter, C. A., Tewari, D., Burns, C. M., Hutchinson, L. J. (2004): Evaluation of IS900-PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *Paratuberculosis* infection in cattle using quarter milk and bulk tank milk samples. Foodborne Pathog. Dis. **1 (1)**: 17–26.

Jessup, D. A. und Williams, E. S. (1999): Paratuberculosis in free-ranging wildlife in North America. In: M. E. Fowler and R. E. Miller (Hrsg.), Zoo and wild animal medicine, S. 616–620. 4. Auflage, W. B. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, USA.

Jewell, D. P. (1987): Crohn's disease. In: Weatherall, D. J., Ledingham, J. G. G., Warrell, D. A. (Hrsg.), Oxford Textbook of Medicine, 12.121±12.126. Oxford Medical Publications, Oxford.

Johne, H. A. und Frothingham, L. (1895): Ein eigenthümlicher Fall von Tuberculose beim Rind. Deutsche Zeitschrift für Thiermedicin **21**: 438–453

Johnson-Ifearulundu, Y. J., Kaneene, J. B., Lloyd, J. W. (1999): Herdlevel economic analysis of the impact of paratuberculosis on dairy herds. J. Am. Vet. Med. Assoc. **214**: 822–825.

Johnson-Ifearulundu, Y. J., und Kaneene, J. B. (1997): Epidemiology and economic impact of subclinical Johne's disease: A review. Vet. Bull. **67**: 437–447.

Jørgensen, J. B. (1982): An improved medium for culture of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine faeces. Acta Vet. Scand. **23**: 325–335.

Jørgensen, J. B. (1977): Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry. Nord. Vet. Med. **29**: 267–270.

Jubb, T. F. und J. W. Galvin (2004): Effect of a test and control program for bovine Johne's disease in Victorian dairy herds 1992– 2002. Aust. Vet. J. **82**: 228–232.

Juste, R. A., Alonso-Hearn, M., Molina, E., Geijo, M., Vazquez, P., Sevilla, I. A., Garrido, J. M. (2009): Significant reduction in bacterial shedding and improvement in milk production in dairy farms after the use of a new inactivated paratuberculosis vaccine in a field trial. BMC Research Notes. **2**: 233.

Kalis, C. H. J., Hesselink, J. W., Barkema, H. W. (1999): Long-term use of a killed vaccine does not prevent fecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. In: Manning, E. J. B. und Collins, M. T. (Hrsg.), Proceedings of the 6th International Colloquium on Paratuberculosis, S. 153–156. International Association for Paratuberculosis, Rehoboth, Massachusetts, USA.

Kaur, P., Filia, G., Singh, S. V., Patil, P. K., Sandhu, K. S. (2010): Molecular detection and typing of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from milk samples of dairy animals. Trop. Anim. Health Prod. **42**:1031–1035.

Kazda, J., Pavlik, I., Falkinham, J. O. III, Hruska, K. (2009): The ecology of mycobacteria: Impact on animal's and human's health, S. 517. 2. Auflage, Springer Verlag, New York.

Kazda, J. (2000): The Ecology of the Mycobacteria. 1. Auflage, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Kennedy, D., Holmstrom, A., Plym Forshell, K. (2001): On farm management of paratuberculosis (Johne's disease) in dairy herds. In Mycobacterium paratuberculosis Bulletin of the International Dairy Federation **362**: 18– 31.

Keswani, J. und Frank, J. F. (1998): Thermal inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. J. Food Prot. **61**: 974–978.

Khare, S., Ficht, T. A., Santos, R. L., Romano, J., Ficht, A. R., Zhang, S., Grant, I. R., Libal, M., Hunter, D., Adams, L. G. (2004): Rapid and Sensitive Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Bovine Milk and Feces by a Combination of Immunomagnetic Bead Separation-Conventional PCR and Real-Time-PCR. J. Clin. Microbiol. **42 (3)**: 1075–1081.

Khol, J. L., Beran, V., Kralik, P., Trckova, M., Pavlik, I., Baumgartner, W. (2010): Grass silage contaminated with Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis (MAP): a possible source of paratuberculosis infection in ruminants? Vet. Med. - Czech. **55 (5)**: 225–232.

Khol, J. L., Duenser, M., Damoser, J., Baumgartner, W. (2009): A new approach in the compulsory fight against paratuberculosis – eradication of clinical cases. In: Nielsen, S. S. (Hrsg.), Proceedings of the 9th International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wisconsin, USA.

Kim, S. G., Shin, S. J., Jacobson, R. H., Miller, L. J., Harpending, P. R., Stehman, S. M., Rossiter, C. A., Lein, D. A. (2002): Development and application of quantitative polymerase chain reaction assay based on the ABI 7700 system (TaqMan) for detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. J. Vet. Diagn. Invest. **14 (2)**: 126– 131.

Kirsner, J. B. und Shorter, R. G. (1982): Recent developments in "nonspecific" inflammatory bowel disease. N. Engl. J. Med. **306**: 775–785.

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**: 150–155.

Klawonn, W., Cussler, K., Dräger, K. G., Gyra, H., Köhler, H., Zimmer, K., Hess, R. G. (2002): [The importance of allergic skin test with Johnin, antibody ELISA, cultural fecal test as well as vaccination for the sanitation of three chronically paratuberculosis-infected dairy herds in Rhineland-Palatinate]. Dtsch. Tierarztl. Wochenschr. **109**: 510–516.

Klee, W. (2002): Paratuberkulose (Johne'sche Krankheit). In: Dirksen, G., Gründer, H.-D., Stober, M. (Hrsg.), Innere Medizin und Chirurgie des Rindes, S. 586-591. 4. Auflage, Parey im Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin/Wien.

Kleine Klausing, H. (2003): Getreide für die Ferkelfütterung veredeln. Europäische Zeitschrift für die Futtermittel- und Getreidewirtschaft **11-12**: 1–6.

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**: 1342–1352.

Klijn, N., Herrewegh, A. A., de Jong, P. (2001): Heat inactivation data for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: implications for interpretation. J. Appl. Microbiol. **91 (4)**: 697–704.

Kobayashi, S., Tsutsui, T., Yamamoto, T., Nishiguchi, A. (2007): Epidemiological indicators associated with within-farm spread of Johne's disease in dairy farms in Japan. J. Vet. Med. Sci. **69**: 1255–1258.

Köhler, H., Burkert, B., Pavlik, I., Diller, R., Geue, L., Conrarhs, F. J., Martin, g. (2008): Evaluation of five ELISA test kits for the measurement of antibodies against *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in bovine serum. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. **121 (5-6)**: 203–210.

Koenig, G. J., Hoffsis, G. F., Shulaw, W. P., Bech-Nielsen, S., Rings, D. M., St-Jean, G., (1993): Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from mononuclear cells in tissues, blood, and mammary glands of cows with advanced paratuberculosis. Am. J. Vet. Res. **54**: 1441–1445.

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**:114.

Kralik, P., Nocker, A., Pavlik, I. (2010): *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability determination using F57 quantitative PCR in combination with propidium monoazide treatment. Int. J. Food Microbiol. **141**: 80–86.

Kreeger, J. (1991): Ruminant paratuberculosis - a century of progress and frustration. J. Vet. Diagn. Invest. **3**: 373–382.

Kudahl, A. B., Nielsen, S. S., Østergaard, S. (2008): Economy, efficacy, and feasibility of a risk-based control program against paratuberculosis. J Dairy Sci. **91 (12)**: 4599–4609.

Kudahl, A. B., Østergaard, S., Sørensen, J. T., Nielsen, S. S. (2007): A stochastic model simulating paratuberculosis in a dairy herd. Prev. Vet. Med. **78**: 97–117.

Lambeth, C., Reddacliff, L. A., Windsor, P., Abbott, K. A., McGregor, H., Whittington, R. J. (2004): Intrauterine and transmammary transmission of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in sheep. Aus. Vet. J. **82 (8)**: 504–508.

Lambrecht, R. S. und Collins, M. T. (1992): *Mycobacterium paratuberculosis*: factors which influence mycobactin-dependence. Diagnosis and Microbiology of Infectious Diseases **15**: 239–246.

Lambrecht, R. S., Carriere, J. F., Collins, M. T. (1988): A model for analyzing growth kinetics of a slowly growing *Mycobacterium sp*. Appl Environ Microbiol. **54**: 910–916.

Lamont, E. A., Bannantine, J. P., Armién, A., Ariyakumar, D. S., Sreevatsan, S. (2012): Identification and characterization of a spore-like morphotype in chronically starved *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cultures. PLoS One. **7 (1)**: e30648.

Lantz, P. G., Hahnhagerdal, B., Radstrom, P. (1994): Sample preparation methods in PCR-based detection of food pathogens. Trends Food Sci. Technol. **5**: 384–389.

Larsen, A. B., Stalheim, O. H., Hughes, D. E., Appell, L. H., Richards, W. D., Himes, E. M. (1981): *Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and genital organs of a semen-donor bull. J. Am. Vet. Med. Assoc. **179**: 169–171.

Larsen, A. B. und Miller, J. M. (1979): Susceptibility of the lemming (*Dicrostonyx rubricatus*) to *Mycobacterium paratuberculosis*. Am. J. Vet. Res. **40**: 1657–1658.

Larsen, A. B., Merkal, R. S., Cutlip, R. C. (1975): Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. Am. J. Vet. Res. **36**: 255–257.

Larsen, A. B., Merkal, R. S., Vardaman, T. H. (1956): Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis.* Am. J. Vet. Res. **17**: 549–551.

Laurin, E., Keefe, G., McKenna, S., Chaffer M (2012): Shedding patterns of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in feces, milk and colostrum of dairy cows. In: Proceedings of the 11th International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Sydney, Australia.

Le Dantec, C., Duguet, J. P., Montiel, A., Dumoutier, N., Dubrou, S., Vincent, V. (2002): Chlorine disinfection of atypical mycobacteria isolated from a water distribution system. Appl. Environ. Microbiol. **68(3)**:1025–1032.

Li, L., Bannantine, J. P., Zhang, Q., Amonsin, A., May, B. J., Alt, D., Banerji, N., Kanjilal, S., Kapur, V. (2005): The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Proc. NatI. Acad. Sci. USA **102 (35)**: 12344–12349.

Lloyd, J. B., Whittington, R. J., Fitzgibbon, C., Dobson, R. (2001): Presence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in suspensions of ovine trichostrongylid larvae produced in faecal cultures artificially contaminated with the bacterium. Vet. Rec. **148 (9)**: 261–263.

Lockhart-Mummery, H. E. und B. C. Morson (1960): Crohn's disease (regional enteritis) of the large intestine and its distinction from ulcerative colitis. Gut **1**: 87–105.

Loftus, E. V. Jr, Silverstein, M. D., Sandborn, W. J., Tremaine, W. J., Harmsen, W. S., Zinsmeister A. R. (1998): Crohn's Disease in Olmsted County, Minnesota, 1940–1993: incidence, prevalence, and survival. Gastroent. **114**: 1161–1168.

Lombard, J. E., Garry, F. B., McCluskey, B. J., Wagner, B. A. (2005): Risk of removal and effects on milk production associated with paratuberculosis status in dairy cows. J. Am. Vet. Med. Assoc. **227**: 1975–1981.

Lovell, R., Levi, M., Francis, J. (1944): Studies on the survival of Johne's bacilli. J. Comp. Pathol. **54**: 120–129.

Lund, B. M., Gould, G. W., Rampling, A.M. (2002): Pasteurization of milk and the heat resistance of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review of the data. Int. J. Food Microbiol. **77**: 135–145.

Maeda, S., Hsu, L. C., Liu, H., Bankston, L. A., Iimura, M., Kagnoff, M. F., Eckmann, L., Karin, M. (2005): NOD2 mutation in Crohn‘s disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. Science **307**: 734–738.

Manning, E. J. B., Kucera, T. E., Gates, N. B., Woods, L. M., Fallon-McKnight, M. (2003): Testing for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in asymptomatic free-ranging tule elk from an infected herd. J. Wildl. Dis. **39**: 323–328.

Manning, E. J. B. und Collins, M. T. (2001): *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. **20**: 133–150.

Markesich, D. C., Graham, D. Y., Yoshimura, H. H. (1988): Progress in culture and subculture of spheroplasts and fastidious acid bacilli isolated from intestinal tissues. J. Clin. Microbiol. **26**: 1600±3.

Marsh, I. B. und Whittington, R. J. (2007): Genomic diversity in *Mycobacterium avium*: single nucleotide polymorphisms between the S and C strains of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* and with *M. a. avium*. Mol. Cell. Probes **21:** 66–75.

Marsh, I. B., Bannantine, J. P., Paustian, M. L., Tizard, M. L., Kapur, V., Whittington, R. J. (2006): Genomic comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* sheep and cattle strains by microarray hybridization. J. Bacteriol. **188**: 2290–2293.

Marsh, I. B. und Whittington., R. J. (2005): Deletion of an *mmpL* gene and multiple associated genes from the genome of the S strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* identified by representational difference analysis and in silico analysis. Mol. Cell. Probes **19**: 371–384.

Mathews, P. R. J. und Sargent, A. (1977). The isolation of mycobacteria from the brown hare (*Lepus europaeus*). Br. Vet. J. **133**: 399.

McClure, H. M., Chiodini, R. J., Anderson, D. C., Swenson, R. B., Thayer, W. R., Coutu, J. A. (1987): *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a colony of stumptail macaques (*Macaca arctoides*). J. Infect. Dis. **155**: 1011–1019.

McDonald, W. L., O’Riley, K. J., Schroen, C. J., Condron, R. J. (2005): Heat inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. Appl. Environ. Microbiol. **1**:1785–1789.

McFadden, J. J., Butcher, P. D., Chiodini, R. J., Hermon-Taylor, J. (1987a): Determination of genome size and DNA homology between an unclassified Mycobacterium species isolated from patients with Crohn's disease and other mycobacteria. J. Gen. Microbiol. **133**: 211–214.

McFadden, J. J., Butcher, P. D., Chiodini, R. J., Hermon-Taylor. J. (1987b): Crohn's disease-isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*, as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species. J. Clin. Microbiol. **25**: 796–801.

McNeil, M., Daffe, M., Brennan, P. J. (1991): Location of the mycolyl ester substituents in the cell walls of mycobacteria. J. Biol. Chem. **266**: 13217–13223.

Meadus, W. J., Gill, C. O., Duff, P., Badoni, M., Saucier, L. (2008): Prevalence on beef carcasses of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* DNA. Int. J. Food. Microbiol. **124**: 291–294.

Mendoza, J. L., Lana, R., Díaz-Rubio, M. (2009): *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and its relationship with Crohn's disease. World J. Gastroenterol. **15:** 417–422.

Merkal, R. S. (1984): Paratuberculosis: advances in cultural, serologic, and vaccination methods. J. Am. Vet. Med. Assoc. **184**: 939–943.

Merkal, R. S. und McCullough, W. G. (1982): A new mycobactin, mycobactin J, from *Mycobacterium paratuberculosis*. Curr. Microbiol. **7**, 333–335.

Merkal, R. S. und Curran, B. J. (1974): Growth and Metabolic Characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. Appl. Microbiol. **28(2)**: 276–279.

Merkal, R. S., Kopecky, K., Larsen, A., Ness. R. (1970): Immunologic mechanisms in bovine paratuberculosis. Am. J. Vet. Res. **31**:475–485.

Merkal, R. S., Kopecky, K. E., Larsen, A. B., Thurston J. R. (1964): Improvements in the techniques for primary cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis*. Am. J. Vet. Res. **25**: 1290–1294.

Metzger-Boddien, C., Khaschabi, D., Schonbauer, M., Boddien, S., Schlederer, T., Kehle, J. (2006): Automated high-throughput immunomagnetic separation-PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk. Int. J. Food. Microbiol. **110**: 201–208.

Meyer, A. L. und Hall, H. H. (1994): Economic Analysis of the Impact of Paratuberculosis on the Kentucky Cattle. University of Kentucky, Department of Agricultural Economics, Staff Paper No. 31980.

Meylan, M., Rings, D. M., Shulaw, W. P., Kowalski, J. J., Bech-Nielsen, S., Hoffsis, G. F. (1996): Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* and preservation of immunoglobulin G in bovine colostrum under experimental conditions simulating pasteurization. Am. J. Vet. Res. **57**: 1580–1585.

Middlebrook, G., Cohn, M. L., Dye, W. E., Russell, W.B. Jr., Levy. D. (1960): Microbiologic procedures of value in tuberculosis. Acta Tuberc. Scand. **38**: 66–81.

Mikhailov, T. A. und Furner, S. E. (2009): Breastfeeding and genetic factors in the etiology of inflammatory bowel disease in children. World J. Gastroenterol. **15**: 270–279.

Millar, D., Ford, J., Sanderson, J., Withey, S., Tizard, M., Doran, T., Hermon-Taylor, J. (1996): IS*900* PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. Appl. Environ. Microbiol. **62**: 3446–52.

Möbius, P., Hotzel, H., Raßbach, A., Köhler, H. (2008): Comparison of 13 single-round and nested PCR assays targeting IS*900*, IS*Mav2*, f57 and locus 255 for detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. Vet. Microbiol. **126**: 324–333.

Mohan, M. S., Duraisamy, P., Praveena, P. E., Siva Kumar, P. E., Tripathi, B. N., Singh., N. (2009): Prevalence of paratuberculosis in cattle and buffaloes. Indian. Vet. J. **86**: 4–6.

Mokresh, A. H., und Butler, D. G. (1990): Granulomatous enteritis following oral inoculation of newborn rabbits with *Mycobacterium paratuberculosis* of bovine origin. Can. J. Vet. Res. **54**: 313–319.

Mokresh, A. H., Czuprynski, C. J., Butler, D. G. (1989): A rabbit model for study of *Mycobacterium paratuberculosis* infection. Infect. Immun. **57**: 3798–3807.

Momotani, E., Whipple, D., Thiermann, A., Cheville, N. (1988): Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* into domes of ileal Peyer's patches in calves. Vet. Pathol. **25**: 131–137.

Moss, M. T., Sanderson, J., Tizard, M., Hermon-Taylor, J., El-Zaatari, F., Markesich, D., Graham, D. (1992): PCR detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in long term cultures from Crohn's disease tissues. Gut **33**: 1209–1213.

Münster, P., Völkel, I., Wemheuer, W., Schwarz, D., Döring, S., Czerny, C.-P. (2012): A Longitudinal Study to Characterize the Distribution Patterns of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Semen, Blood and Faeces of a Naturally Infected Bull by IS*900*, Semi-Nested and Quantitative Real-Time-PCR. Transboundary Emerg. Dis. **60 (2)**: 175–187.

Mukamolova, G. V., Kaprelyants, A. S., Kell, D. B., Young, M. (2003): Adoption of the transiently non-culturable state – a bacterial survival strategy? Adv. Microb. Physiol. **47**: 65–129.

Mutharia, L. M., Klassen, M. D., Fairies, J., Barbut, S., Gill, C. O. (2010): *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in muscle, lymphatic and organ tissues from cows with advanced Johne's disease. Int. J. Food Microbiol. **136**: 340–344.

Nassal, J., Breunig, W., Schnedelbach, U. (1974): Atypical mycobacteria in fruit, vegetables, and cereals. Prax. Pneumol. **28 (12)**: 667–674.

Naser, S.A., Schwartz, D., Shafran, I. (2000b): Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from breast milk of Crohn's disease patients. Am. J. Gastroenterol. **95**: 1094–1095.

National Animal Health Monitoring System (2002) In: Part I: Reference of Dairy Health and Management in the United States. USDA: APHIS: VS, CEAH, Fort Collins, Colorado. Available at: http://nahms.aphis.usda.gov/dairy/index.htm (accessed 14 May 2009).

National Animal Health Monitoring System (1997) In: Johne's Disease on U.S. Dairy Operations. USDA: APHIS: SEA, Fort Collins, Colorado. Available at: http://nahms.aphis.usda.gov/beefcowcalf/index.htm (accessed 14 May 2009).

Nauta, M. J. und van der Giessen, J.W. (1998): Human exposure to *Mycobacterium paratuberculosis* via pasteurised milk: a modelling approach. Vet. Rec. **143**: 293–296.

Nebbia, P., Robina, P., Ferroglio, E., Rossi, L., Meneguz, G., Rosati, L. (2000): Paratuberculosis in red deer (*Cervus elaphus hippelaphus*) in the western. Alps. Vet. Res. Commun. **24**: 435–443.

Neilands, J. B. (1995): SIderophores:structure and function of microbial iron transport compounds.. J. Biol. Chem. **270**: 26723–26726.

Nielsen, K. K. und Ahrens, P. (2002): Putative in vitro expressed gene fragments unique to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. FEMS Microbiol. Lett. **214**: 199–203.

Nielsen, S. S. und Toft, N. (2011): Effect of management practices on paratuberculosis prevalence in Danish dairy herds. J. Dairy Sci. **94**: 1849-1857.

Nielsen, S. S. und Toft, N. (2009): A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. Prev. Vet. Med. **88**: 1–14.

Nielsen, S. S. (2009a): Programmes on Paratuberculosis in Europe. In: Proceedings of the 10th International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Minneapolis, Minnesota, USA.

Nielsen, S. S. (2009b): Use of diagnostics for risk-based control of paratuberculosis in dairy herds. In Practice, **31**: 150–154.

Nielsen, S. S., Bjerre, H., Toft, N. (2008): Colostrum and milk as risk factors for infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy cattle. J. Dairy Sci. **91**: 4610–4615.

Nielsen, S. S. (2007): Danish control programme for bovine paratuberculosis. Cattle Practice, **15**: 161–168.

Nielsen, S. S., Nielsen, K. K., Huda, A., Condron, R., Collins, M. T. (2001): Diagnostic techniques for paratuberculosis. Bull. Int. Dairy Fed. **362**: 5–17.

Nielsen, S. S., Thamsborg, S. M., Houe, H., Bitsch, V. (2000): Bulk-tank milk ELISA antibodies for estimating the prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds. Prev. Vet. Med. **44**: 1–7.

Nordlund, K. V., Goodger, W. J., Pelletier, J., Collins, M. T. (1996): Associations between subclinical paratuberculosis and milk production, milk components, and somatic cell counts in dairy herds. J. Am. Vet. Med. Assoc. **208**: 1872±1876.

O'Doherty, A., O'Grady, D., O'Farrell, K., Smith, T., Egan, J. (2002): Survey of Johne's disease in imported animals in the Republic of Ireland. Vet Rec. **150 (20)**: 634–636.

Odumeru, J., Gao, A., Chen, S., Raymond, M., Mutharia, L. (2001): Use of the bead beater for preparation of *Mycobacterium paratuberculosis* template DNA in milk. Can. J. Vet. Res. **65**: 201–205.

Ogura, Y., Bonen, D. K., Inohara, N., Nicolae, D. L., Chen, F. F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R. H., Achkar, J. P., Brant, S. R., Bayless, T. M., Kirschner, B.S., Hanauer, S.B., Nuñez, G., Cho, J.H. (2001): A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. Nature **411**: 603–606.

O'Mahony, J. und Hill, C. (2004): Rapid real-Time-PCR for detection and quantitation of *Mycobacterium avium* subsp.*paratuberculosis* DNA in artificially contaminated milk. Appl. Environ. Microbiol. **70**: 4561–4568.

O'Mahony, J. und Hill, C. (2002): A real-Time-PCR assay for the detection and quantitation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using SYBR green and the Lightcycler. J. Microbiol. Methods **51**: 282–293.

Oliver, J. D. (2005): The viable but nonculturable state in bacteria. J. Microbiol. **43**: 93–100.

O'Reilly, C. E., O'Connor, L., Anderson, W., Harvey, P., Grant, I. R., Donaghy, J., Rowe, M., O'Mahony, P. (2004): Surveillance of bulk raw and commercially pasteurized cows' milk from approved Irish liquid-milk pasteurization plants to determine the incidence of *Mycobacterium paratuberculosis*. Appl. Environ. Microbiol. **70**: 5138–5144.

Ott, S. L., Wells, S. J., Wagner, B. A. (1999): Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. Prev. Vet. Med. **40**:179–192.

Owen, R. J. und Borman, P. (1987): A rapid biochemical method for purifying high molecular weight bacterial chromosomal DNA for restriction enzyme analysis. Nucleic Acids Res. **15(8)**: 3631.

Papapetropoulou, M., Tsintzou, A., Vantarakis, A. (1997): Environmental mycobacteria in bottled table waters in Greece. Can. J. Microbiol. **43**: 499–502.

Patterson, D. S. und Berrett, S. (1969): Malabsorption in Johne's disease in cattle: an in vitro study of L-histidine uptake by isolated intestinal tissire preparations. J. Med. Microbiol. **2**: 327–334.

Patterson, D. S. und Berrett, S. (1968): Malabsorption in Johne's disease of cattle: depressed in vitro amino-acid uptake by isolated intestinal tissue preparations. Vet. Rec. **83**: 55–56.

Patterson, D. S., Allen, W. M., Lloyd, M. K. (1967): Clinical Johne's disease as a protein losing enteropathy. Vet. Rec. **81**: 717–718.

Pavlik, I., Yayo Ayele, W., 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*. 7th International Colloqium on Paratuberculosis, 11. – 14. Juni 2002 in Bilbao, Spanien

Pavlik, I., Matlova, L., Bartl, J., Svastova, P., Dvorska, L., Whitlock, R. (2000): Parallel faecal and organ *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* culture of different productivity types of cattle. Vet. Microbiol. **77**: 309–324.

Pavlik, I., Horvathova, A., Dvorska, L., Bartl, J., Svastova, P., du Maine, R., Rychlik, I., (1999): Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. J. Microbiol. Methods **38**: 155–167.

Pearce, L. E., Truong, H. T., Crawford, R. A., Yates, G. F., Cavaignac, S., de Lisle, G. W. (2001): Effect of turbulent-flow pasteurization on survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* added to raw milk. Appl. Environ. Microbiol. **67**: 3964–3969.

Pedley, S., Bartram, J., Rees, G., Dufour, A., Cotruvo, J. A. E. (2004): Pathogenic mycobacteria in water – A guide to public health consequences, monitoring and management. IWA Publishing 222.

Pettis, R. J., Hall, I., Costa, D., Hickey, A. J. (2000): Aerosol delivery of muramyl dipeptide to rodent lungs. AAPS Pharmsci. **2**, article 25, 1–9.

Pickup, R. W., Rhodes, G., Bull, T. J., Arnott, S., Sidi-Boumedine, K., Hurley, M., Hermon-Taylor, J. (2006): *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in lake catchments, in river water abstracted for domestic use, and in effluent from domestic sewage treatment works: diverse opportunities for environmental cycling and human exposure. Appl. Environ. Microbiol. **72 (6)**: 4067–4077.

Pickup, R. W., Rhodes, G., Arnott, S., Sidi-Boumedine, K., Bull, T. J., Weightman, A., Hurley, M., Hermon-Taylor, J. (2005): *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the catchment area and water of the River Taff in South Wales, United Kingdom, and its potential relationship to clustering of Crohn's disease cases in the city of Cardiff. Appl. Environ. Microbiol. **71 (4)**: 2130–2139.

Pierce, E.S. (2009). Possible transmission of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* through potable water: lessons from an urban cluster of Crohn's disease. Gut Pathogens **1 (1)**: 17.

Pinedo, P. J., Williams, J. E., Monif, G. R. G., Owen Rae, D., Buergelt, C. D. (2008): *Mycobacterium paratuberculosis* shedding into milk: Association of ELISA Seroactivity with DNA detection in milk. Intern. J. Appl. Res Med **6:** 137–144.

Pillai, S. und Jayarao, B. (2002): Application of IS900 PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* directly from raw milk. J. Dairy Sci. **85**: 1052–1057.

Poupart, P., Coene, M., Van Heuverswyn, H., Cocito, C. (1993): Preparation of a specific RNA probe for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and diagnosis of Johne's disease. J. Clin. Microbiol. **31**: 1601–1605.

Pribylova, R., Slana, I., Kralik, P., Kralova, A., Babak, V., Pavlik, I. (2011a): Correlation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis counts in gastrointestinal tract, muscles of the diaphragm and the masseter of dairy cattle and potential risk for consumers. Int. J. Food Microbiol. **151**: 314–318.

Pribylova, R., Slana, I., Kaevska, M., Lamka, J., Babak, V., Jandak, J., Pavlik, I. (2011b): Soil and plant contamination with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* after exposure to naturally contaminated mouflon feces. Curr. Microbiol. **62 (5)**: 1405–1410.

Primm, T. P., Lucero, C. A., Falkinham, J. O. (2004): Health impacts of environmental mycobacteria. Clin. Microbiol. Rev. **17**: 98–106.

Rademaker, J. L., Vissers, M. M., Te Giffel, M. C. (2007): Effective heat inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk contaminated with naturally infected feces. Appl. Environ. Microbiol. **73(13)**: 4185–4190.

Rademaker, J. L. W., Meeuwisse, J., Te Giffel, M. C. (2003): Heat inactivation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. 7th International Colloqium on Paratuberculosis, 11. – 14. Juni 2002 in Bilbao, Spanien

Radstrom, P., Knutsson, R., Wolffs, P., Lovenklev, M., Lofstrom, C. (2004): Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. Mol. Biotechnol. **26**: 133–146.

Rahn, K., Shin, S., Wilson, J., Johnson, R. P., Alves, D., McNab, B., Lachowski, W., Odumeru, J., Spika, J. (1998): Milk as a potential source of human exposure to *Mycobacterium paratuberculosis*. 98th General Meeting of the American Society for Microbiology. 17. – 21. Mai 1998 in Atlanta, GA

Rampling, A. (1998): The microbiology of milk and milk products. In: Collier, L., Balows, A., Sussman, M. (Hrsg.), Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, S. 367–393, 9. Auflage, Balows, A. und Duerden, B. I. (Hrsg.), Systematic Bacteriology, Band 2, Edward Arnold, London, UK.

Reddacliff, L. A., Marsh, I. B., Fell, S. A., Austin, S. L., Whittington, R. J. (2010): Isolation of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from muscle and peripheral lymphnodes using acid-pepsin digest prior to BACTEC culture. Vet. Microbiol. **145**: 122–128.

Reddacliff, L., Eppleston, J., Windsor, P., Whittington, R., Jones, S. (2006): Efficacy of a killed vaccine for the control of paratuberculosis in Australian sheep flocks. Vet. Microbiol. **115**: 77–90

Reddacliff, L. A., Vadali, A., Whittington, R. J. (2003): The effect of decontamination protocols on the numbers of sheep strain Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis isolated from tissues and faeces. Vet Microbiol. **95 (4)**: 271–282.

Richardson, E. K. B. und More, S. J. (2009): Direct and indirect effects of Johne's disease on farm and animal productivity in an Irish dairy herd. Ir. Vet. J. **62 (8)**: 526–532.

Rohde, R. E. und Shulaw, W. P. (1990): Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the uterine flush fluids of cows with clinical paratuberculosis. Am. J. Vet. Res. **51**: 708–710.

Robino, P., Nebbia, P., Menequz, P. G., De Meneghi, D. (2002): Survey of paratuberculosis in roe deer (*Capreolus capreolus*). 7th International Colloqium on Paratuberculosis, 11. – 14. Juni 2002 in Bilbao, Spanien

Rodriguez-Lazaro, D., D'Agostino, M., Herrewegh, A., Pla, M., Cook, N., Ikonomopoulos, J. (2005): Real-Time-PCR-based methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in water and milk. Int. J. Food Microbiol. **101**: 93–104.

Rosenberger, G. (1978): Infektionskrankheiten des Verdauungsapparates. Unter: Paratuberkulose (Johne'sche Krankheit). In: Rosenberger, G. (Hrsg.), Krankheiten des Rindes. S. 756-760. 2. Auflage, Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg.

Rossiter, C. J. und Henning, W. R. (2001): Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from thin market cows at slaughter. J. Anim. Sci. **79**: 113.

Rowe, M. T. und Grant, I. R. (2006): *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* and its potential survival tactics. Lett Appl Microbiol. **42 4)**: 305–311.

Rowe, M. T., Grant, I. R., Dundee, L., Ball, H. J. (2000): Heat resistance of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. Irish. J. Agricult. Food Res. **39**: 203–208.

Rudoler, N. (2004): Is *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* an etiological factor in Crohn's disease? Isr. J. Vet. Med. **59**: 60–67.

Satsangi, J., Jewell, D. P., Bell, J. I. (1997): The genetics of inflammatory bowel disease. Gut **40**: 572–574.

Saxegaard, F., Baess, I., Jantzen, E. (1988): Characterization of clinical isolates of *Mycobacterium paratuberculosis* by DNA-DNA hybridization and cellular fatty acid analysis. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. **96**: 497–502.

Saxegaard, F. (1985): Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from intestinal mucosa and mesenteric lymph nodes of goats by use of selective Dubos medium. J. Clin. Microbiol. **22**: 312–313.

Schaaf, J. und Beerwerth, W. (1960): Die Bedeutung der Generalisation der Paratuberkulose, der Ausscheidung des Erregers mit der Milch und der kongenitalen Übertragung für die Bekämpfung der Seuche. Med. Tierheilk. 12, Suppl. Rindertuberkulose und Brucellose **2**: 115–124.

Schönenbrücher, H., Abdulmawjood, A., Failing, K. and Bülte, M. (2008): New triplex real-Time-PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine feces. Appl. Environ. Microbiol. **74**: 2751–2758.

Schönenbrücher, H., Abdulmawjood, A., Bülte, M. (2006): Real Time-PCR-assay for the detection of *Mycobacterium avium* ssp *paratubercuiosis* - Development and validation. Fleischwirtschaft **86**:123–125.

Schwartz, D., Shafran Naser Romero, C., Piromalli, C., Biggerstaff, J., Naser, N., Chamberlin, W., Naser, S. A. (2000): Use of short-term culture for identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue from Crohn's disease patients. Clin. Microbiol. Infect. **6**: 1±6.

Seitz, S. G., Heider, L. E., Hueston, W. D., Bech-Nielsen, S., Rings, D. M., Spangler, L. (1989): Bovine fetal infection with *Mycobacterium paratuberculois.* J. Am. Vet. Med. Assoc. **194**: 1423–1426.

Selby, W. (2000): Pathogenesis and therapeutic aspects of Crohn's disease. Vet. Microbiol. **77**: 505–511.

Sharp, J. M., Stevenson, K., Challans, J. A., Ramage, C., Hitchcock, D., Reid, H. W. (1995): Mycobacterial infections of free living deer in Scotland. In: Chiodini, R. J., Hines, M. E., Collins, M. T. (Hrsg.), Proceedings of the 5th International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wisconsin, USA.

Shivananda, S., Lennard-Jones, J., Logan, R., Fear, N., Price, A., Carpenter, L., van Blankenstein, M. (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: 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.

Sibartie, S., Scully, P., Keohane, J., O'Neill, S., O'Mohony, J., O'Hanlon, D., Kirwan, W. O., O'Mahony, L., Shanahan, F. (2010): Mycobacterium avium subsp *paratuberculosis* (MAP) as a modifying factor in Crohn's disease. Inflamm. Bowel Dis. **16**: 296–304.

Sibley, J. A., Woodbury, M. R., Appleyard, G. D., Elkin, B. (2007): *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Bison (Bison bison) from Northern Canada. J. Wildl. Dis. **43 (4)**: 775–779.

Singh, S. V., Singh, A. V., Singh, R., Sandhu, K. S., Singh, P. K., Sohal, J. S., Gupta, V. K., Vihan, V.S. (2007): Evaluation of highly sensitive indigenous milk ELISA kit with fecal culture, milk culture and fecal-PCR for the diagnosis of bovine Johne's disease (BJD) in India. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. **30**: 175–186.

Skovgaard, N. (2007): New trends in emerging pathogens. Int. J. Food Microbiol. **120**: 217–224.

Slana, I., Pribylova, R., Kralova, A., Pavlik, I. (2011): Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* at a Farm-Scale Biogas Plant Supplied with Manure from Paratuberculosis-Affected Dairy Cattle. Appl. Environ. Microbiol. **77 (9)**: 3115–3119.

Slana, I., Liapi, M., Moravkova, M., Kralova, A., Pavlik, I., (2009): *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cow bulk tank milk in Cyprus detected by culture and quantitative IS900 and F57 real-Time-PCR. Prev. Vet. Med. **89**: 223–226.

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**: 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. Veterinarni Medicina **53**: 283–306.

Sloan, L. M. (2007): Real-Time-PCR in clinical microbiology: verification, validation, and contamination control. Clinical Microbiology Newsletter **29**: 87–95.

Smith, H. W. (1960): The examination of milk for the presence of Mycobacterium johnei. J. Pathol. Bacteriol. **80**: 440.

Sockett, D. C., Conrad, T. A., Thomas, C. B., Collins, M. T. (1992): Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. J. Clin. Microbiol. **30**: 1134–1139.

Souci, S. W., Fachmann, W., Kraut, H. (2008): Die Zusammensetzung der Lebensmittel Nährwert-Tabellen. Kapitel 1: Milch. 7. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.

Spahr, U. und Schafroth, K. (2002): Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk cheese. 7th International Colloqium on Paratuberculosis, 11. – 14. Juni 2002 in Bilbao, Spanien

Spahr, U. und Url, B. (1994): Behaviour of pathogenic bacteria in cheese - A synopsis of experimental data. Bull. Intl. Dairy Federation **298**: 2–16.

Stabel, J. R. und Bannantine, J. P. (2005): Development of a Nested PCR Method Targeting a Unique Multicopy Element, ISMap*02*, for Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Fecal Samples. J. Clin. Microbiol. **43 (9)**: 4744–4750.

Stabel, J. R. und Lambertz, A. (2004): Efficacy of Pasteurization Conditions for the Inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Milk. J. Food Prot. **67 (12)**: 2719–2726.

Stabel, J. R., Bosworth, T. L., Kirkbride, T. A., Forde, R. L., Whitlock, R. H. (2004): A simple, rapid and effective method for the extraction of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA from fecal samples for polymerase chain reaction. J. Vet. Diagn. Invest. **16**: 22–30.

Stabel, J. R., Wells, S. J., Wagner, B. A. (2002): Relationships Between Fecal Culture, ELISA, and Bulk Tank Milk Test Results for Johne's Disease in US Dairy Herds. J. Dairy Sci. **85**: 525–531.

Stabel, J. R., Steadham, E. M., Bolin, C. A. (1997): Heat inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk: are current pasteurization conditions effective? Appl. Environ. Microbiol. **63**: 4975–4977.

Stable, J. R., de Lisle, G. W., Sockett, D. C. (1996): Debate: paratuberculosis control. Vaccination vs. eradication by on-farm infection control and test-and-slaughter. In: Proceedings of the 5th International Colloquium on Paratuberculsis. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wisconsin, USA.

Stähr, E. (2005): Gekauft und bezahlt. Deutsches Tierärzteblatt 5/05.

Stephan, R. (2007): Diagnostische Systeme zum Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. J. Verbr. Lebensm. **2**: 222–227.

Stephan, R., Schumacher, S., Tasara, T., Grant, I. R. (2007): Prevalence of *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* in Swiss Raw Milk Cheeses Collected at the Retail Level. J. Dairy Sci. **90**: 3590–3595.

Stephan, R., Bühler, K., Corti, S. (2002): Incidence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in bulk-tank milk samples from different regions in Switzerland. Vet Rec. **150 (7)**: 214–215.

Stevenson, K., Alvarez, J., Bakker, D., Biet, F., de Juan, D., Denham, S., Dimareli, Z., Dohmann, K., Gerlach, G. F., Heron, I., Kopecna, M., May, L., Pavlik, I., Sharp, J. M., Thibault, V. C., Willemsen, P., Zadoks, R. N., Greig, A. (2009): Occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* across host species and European countries with evidence for transmission between wildlife and domestic ruminants, BMC Microbiol **9**: 212

Stevenson, K., Hughes, V. M., de Juan, L., Inglis, N. F., Wright, F., Sharp, J. M. (2002): Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. J. Clin. Microbiol. **40**: 1798–1804.

St. Jean, G. (1996): Treatment of clinical paratuberculosis in cattle. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. **12**: 417–420.

Stratmann, J., Dohmann, K., Heinzmann, J., Gerlach, G.-F. (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, G.-F. (2002): Development of a peptide-mediated capture PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. J. Clin. Microbiol. **40**: 4244–4250.

Streeter, R.N., Hoffsis, G. F., Bech-Nielson, S., Shulaw, W. P., Rings, D. M. (1995): Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. Am. J. Vet. Res. **56**: 1322–1324.

Strommenger, B., Stevenson, K., Gerlach, G.-F. (2001): Isolation and diagnostic potential of IS*Mav2*, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. FEMS Microbiol. Lett. **196**: 31–37.

Sung, N. und Collins, M. T. (2003): Variation in resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* to acid environments as a function of culture medium. Appl. Environ. Microbiol. **69 (11)**: 6833–6840.

Sung, N. und Collins, M. T. (2000): Effect of three factors in cheese production (pH, salt, and heat) on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability. Appl. Environ. Microbiol. **66 (4)**: 1334–1339.

Sung, N. und Collins, M.T. (1998): Thermal tolerance of Mycobacterium paratuberculosis. Appl. Environ. Microbiol. **64**: 999–1005.

Sweeney, R. W., Uzonna, J., Whitlock, R. H., Habecker, P. L., Chilton, P., Scott, P. (2006): Tissue predilection sites and effect of dose on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* organism recovery in a short-term bovine experimental oral infection model. Res. Vet. Sci. **80**: 253–259.

Sweeney, R. W. (1996): Transmission of paratuberculosis. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. **12**: 305–312.

Sweeney, R.W., Whitlock, R. H., Rosenberger, A. E. (1992): *Mycobacterium paratuberculosis* Cultured from Milk and Supramammary Lymph Nodes of Infected Asymptomatic Cows. J. Clin. Microbiol. **30 (1)**: 166–171.

Taddei, R., Barbieri, I., Pacciarini, M. L., Fallacara, F., Belletti, G. L., Arrigoni, N. (2008): *Mycobacterium porcinum* strains isolated from bovine bulk milk: Implications for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* detection by PCR and culture. Vet. Microbiol. **130**: 338–47.

Tasara, T. und Stephan, R. (2005): Development of an F57 sequence-based real-Time-PCR assay for detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in milk. Appl. Environ. Microbiol. **71**: 5957–5968.

Tasara, T., Hoelzle, L. E., Stephan, R. (2005): Development and evaluation of a *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) specific multiplex PCR assay. Int. J. Food Microbiol. **104**: 279–287.

Taylor, A. W. (1953) Experimental Johne's disease in cattle. J. Comp. Pathol. **63**: 355–367.

Taylor, T. K., Wilks, C. R., McQueen, D. S. (1981): Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of a cow with Johne's disease. Vet. Record **109**: 532–533.

Thomsen, V. T., Nielsen, S. S., Thakur, A., Jungersen, G. (2012): Characterization of the long-term immune response to vaccination against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Danish dairy cows. Vet. Immunol. Immunopathol. **145**: 316– 322.

Thoen, C.O. und Baum, K. H. (1988): Current knowledge of paratuberculosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. **192**: 1609–1611.

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.

Tiwari, A., Van Leeuwen, J. A., McKenna, S. L., Keefe, G. P., Barkema, H. W. (2006): Johne's disease in Canada, part I. Clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis and prevalence in dairy herds. Can. Vet. J. **47**: 874–882.

Török, H. P., Glas, J., Tonenchi, L., Lohse, P., Beynon, V., Malachova, O., Brand, S., Jagiello, P., Epplen, J. T., Klein, W., Schiemann, U., Müller-Mhysok, B., Folwaczny, M., Ochsenkühn, T., Folwaczny, C. (2005): OCTN1 und OCTN2-Kationtransporter-Gene im IBD5-Locus in der Ätiologie chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen. Z. Gastroenterol **43**: Poster_14.

Torensma, R., Vissner, M. J. C., Aarsman, C. J. M., Poppeier, M. J. J. G., Van Beurden, R., Fluit, A. C., Verhoef, J. (1993): Monoclonal antibodies that detect live salmonellae. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 3868–3872.

Torvinen, E., Lehtola, M.J., Martikainen, J., Miettinen, I.T. (2007): Survival of *Mycobacterium avium* in drinking water biofilms as affected by water flow velocity, availability of phosphorus, and temperature. Appl. Environ. Microbiol. **73**: 6201–6207.

Twort, F. W. und Ingram, G. L. Y. (1912) A method for isolating and cultivating the *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosae bovis*, Johne, and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudotuberculous enteritis of bovines. Proc. Soc. London **84**: 517–545.

Ulrichs, T. und Kaufmann, S.H. (2002): Mycobacterial persistence and immunity. Front. Biosci. **7**: 458–469.

Van Boxtel, R. M., Lambrecht, R. S., Collins, M. T. (1990): Effect of polyoxyethylene sorbate compounds (Tweens) on colonial morphology, growth, and ultrastructure of *Mycobacterium paratuberculosis*. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand **98**: 901–908.

Van Brandt, L., Coudijzer, K., Herman, L., Michiels, C., Hendrickx, M., Vlaemynck, G. (2011a): Survival of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in yoghurt and in commercial fermented milk products containing probiotic cultures. J. Appl. Microbiol. **110**: 1252–1261.

Van Brandt, L., Van der Plancken, I., De Block, J., Vlaemynck, G., Van Coillie, E., Herman, L., Hendrickx, M. (2011b): Adequacy of current pasteurization standards to inactivate *Mycobacterium paratuberculosis* in milk and phosphate buffer. Int. Dairy J. **21**: 295–304.

Van Brandt, L., Coudijzer, K., Vlaemynck, G., Hendrickx, M., Michiels, C., Messens, W., Herman, L., De Block, J. (2010): Localization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in artificially inoculated milk and colostrum by fractionation. J. Dairy Sci. **93 (10)**: 4722–4729.

Van der Giessen, J. W. B., van Dijk, L., Bleumink-Pluym, N., Eger, A., Haagsma, J., van der Zeijst, B.A.M. (1995): The spatial distribution of Mycobacterium paratuberculosis in infected cattle. Implications for pathogenesis and diagnosis. In: Chiodini, R. J., Collins, M. T., Bassey, E. O. E. (Hrsg.), Proceedings of the 4th International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Rehoboth, Massachusetts, USA.

Van Kruiningen, H. J. (1999): Lack of support for a common etiology in Johne's disease of animals and Crohn's disease in humans. Inflamm. Bowel Dis. **5**: 183–191.

Vansnick, E., De Rijk, P., Vercammen, F., Geysen, D., Rigouts, L., Portaels, F. (2004): Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* subsp.*paratuberculosis*. Vet. Microbiol. **100**: 197–204.

Vary, P. H., Andersen, P. R., Green, E., Hermon-Taylor, J., McFadden, J. J. (1990): Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in Johne's disease. J Clin Microbiol **28**: 933–937.

Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G. F., Chater, K. F., van Sinderen, D. (2007): Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. Microbiol Mol Biol Rev **71**: 495–548.

Viske, D., Larsson, B., Engvall, A., Bölske, G. (1996): Paratuberculosis in Sweden. In: Proceedings of the 5th International Colloquium on Paratuberculsis. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wisconsin, USA.

Waddell, L. A., Rajic´, A., Sargeant, J., Harris, J., Amezcua, R., Downey, L., Read, S., McEwen, S. A. (2008): The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis*: a systematic review. Can. J. Public Health **99**: 145–155.

Wagner, J., Skinner, N. A., Catto-Smith, A. G., Cameron, D. J., Michalski, W. P., Visvanathan, K., Kirkwood, C. D. (2013): TLR4, IL10RA, and NOD2 mutation in paediatric Crohn's disease patients: an association with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and TLR4 and IL10RA expression. Med. Microbiol. Immunol. Epub March 2, 2013.

Walenta, W. und Kessler, H. G. (1986): Causes of defects in milk heaters and remedial measures. In: Kessler, H. G. (Hrsg.), Considerations in Relation to Some Technological and Engineering Aspects, Chapter XV, S. 89–98. In: Monograph on Pasteurized Milk. Bulletin of the International Dairy Federation, 200.

Waters, W. R., Miller, J. M., Palmer, M. V., Stabel, J. R., Jones, D. E., Koistinen, K. A., Steadham, E. M., Hamilton, M. J., Davis, W. C., Bannantine, J. P. (2003): Early induction of humoral and cellular immune responses during experimental *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of calves. Infect. Immun. **71**: 5130–5138.

Wayne, L. G. und Kubica, G. P. (1986): Family Mycobacteriaceae. In: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. und Holt, J. G. (Hrsg.), Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, S. 1435–1457. 2. Auflage, Williams und Wilkins, Baltimore, Maryland, USA.

Weber, M. F., Kogut, J., de Bree, J., van Schaik, G., Nielen, M. (2010): Age at which dairy cattle become *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* faecal culture positive. Prev. Vet. Med. **97**: 29–36.

Weber, M. F. und van Schaik, G. (2009): Results of the Dutch bulk milk quality assurance programme for paratuberculosis. In: Nielsen, S. S. (Hrsg.), Proceedings of the 9th International Colloquium on Paratuberculosis. International Association for Paratuberculosis, Madison, Wisconsin, USA.

Weersma, R. K., Stokkers, P. C., van Bodegraven, A. A., van Hogezand R. A., Verspaget H. W., de Jong, D. J., van der Woude, C. J., Oldenburg, B., Linskens, R. K., Festen, E. A., van der Steege, G., Hommes, D. W., Crusius, J. B., Wijmenga, C., Nolte, I. M., Dijkstra, G.; Dutch Initiative on Crohn and Colitis (ICC) (2009): Molecular prediction of disease risk and severity in a large Dutch Crohn's disease cohort. Gut. **58(3):** 388–395.

Weirich, S. (2012): Entwicklung und Validierung eines fluoreszenzmikroskopischen Schnellnachweisverfahrens für lebensfähige *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP)-Zellen in Milch und Säuglingsanfangsnahrung. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen, ISBN: 978-3-8359-5942-2.

Weirich, S., Molitor, A., Akineden, Ö., Failing K., Bülte, M. (2011): Nachweis von Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis (MAP) in Säuglingsanfangsnahrung auf Milchpulverbasis. 52. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Garmisch-Partenkirchen (Poster).

Wentink, G. H., Bongers, J. H., Zeeuwen, A. A., Jaartsveld, F. H. (1994): Incidence of paratuberculosis after vaccination against *Mycobacterium paratuberculosis* in two infected dairy herds. J. Vet. Med. Ser. B. **41**: 517–522.

Whan, L., Ball, H. J., Grant, I. R., Rowe, M. T. (2005a): Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Untreated Water in Northern Ireland. Appl. Environ. Microbiol. **71**: 7107–7112.

Whan, L., Ball, H. J., Grant, I. R., Rowe, M. T. (2005b): Development of an IMS–PCR assay for the detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in water. Lett. Appl. Microbiol. **40**: 269–273.

Whan, L. B., Grant, I. R., Ball, H. J., Scott, R., Rowe, M. T. (2001): Bactericidal effect of chlorine on Mycobacterium paratuberculosis in drinking water. Lett. Appl. Microbiol. **33**: 227–231.

Whiley, H., Keegan, A., Giglio, S., Bentham, R. (2012): Mycobacterium avium complex-the role of potable water in disease transmission. J. Appl. Microbiol. **113 (2)**: 223–232.

Whipple, D. L., Kapke, P. A., Andersen, P. R. (1992): Comparison of a commercial DNA probe test and three cultivation procedures for detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine feces. J. Vet. Diagn. Invest. **4**: 23–27.

Whittington, R. J., Marsh, I. B., Saunders, V., Grant, I. R., Juste, R., Sevilla, I. A., Manning, E. J. B., Whitlock, R. H. (2011): Culture Phenotypes of Genomically and Geographically Diverse *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Isolates from Different Hosts. J. Clin. Microbiol. **49 (5)**: 1822–1830.

Whittington, R. J. und Windsor, P. A. (2009) In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis. Vet. J. **179**: 60–69.

Whittington, R. J., Marsh, I. B., Reddacliff, L. A. (2005): Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dam water and sediment. Appl. Environ. Microbiol. **71**: 5304–5308.

Whittington, R. J., Marshall, D. J., Nicholls, P. J., Marsh, I. B., Reddacliff, L. A. (2004): Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment. Appl. Environ. Microbiol. **70**: 2989–3004.

Whittington, R. J. und Sergeant, E. (2001): Progress towards understanding the spread, detection and control of Mycobacterium avium subsp paratuberculosis in animal populations. Aust. Vet. J. **79**: 267–278.

Whittington, R. J., Fell, S., Walker, D., McAllister, S., Marsh, I., Sergeant, E., Taragel, C. A., Marshall, D. J., Links, I. J. (2000): Use of pooled fecal culture for sensitive and economic detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in flocks of sheep. J. Clin. Microbiol. **38**: 2550–2556.

Whittington, R. J., Reddacliff, L., Marsh, I., Saunders, V. (1999): Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin-fixed paraffinembedded intestinal tissue by IS*900* polymerase chain reaction. Aust. Vet. J. **77**: 392–397.

Whitlock, R. H. (2009): Johne's disease. In: Smith, B.P. (Hrsg.), Large Animal Internal Medicine, S. 881-887. 4. Auflage, Mosby Elsevier, St Louis.

Whitlock, R. H., Whittington, R. J., Marsh, I. B., Turner, M. J., Saunders, V., Kemsley, P. D., Rayward, D. (2000): ELISA and fecal culture for Paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. Vet. Microbiol. **77**: 387–398.

Whitlock, R. H. und Buergelt, C. (1996): Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. **12**: 345–356.

Whitlock, R. H (1992): Diarrhea in cattle. In: Anderson, N. V. (Hrsg.), Veterinary Gastroenterology, S. 783. 2. Auflage, Lea & Febiger, Philadelphia.

Whitlock, R. H., Rosenberger, A. E., Spencer, P. A. (1989): Laboratory culture techniques for Johne's disease: a critical evaluation of contamination and incubation times. In: Proceedings of the 93rd Annual Meeting of the US Animal Health Association, S. 382-386. US Animal Health Association, Richmond, Virginia, USA.

Whitlock, R. H., Bruce, J. B., Spencer, P. A., Hutchinson, L. T. (1988): Mycobacterium paratuberculosis diagnosis: an improved culture technique utilizing centrifugation. In: Proceedings of the 69th Annual Conference of Research Workers in Animal Diseases, Chicago, Illinois, USA.

Whitlock, R. H., Hutchinson, L. T., Glickman, L. T., Meinersmann, R., Rossiter, C., Bruce, J., Merkal, R., Dick, J. (1986): Paratuberculosis (Johne's disease) update. Bovine Pract. **21**: 24–30.

Whitlock, R. H., Hutchinson, L. T., Merkal, R., Glickman, L. T., Rossiter, C., Harmon, S., Spencer, P., Fetrow, J., Bruce, J., Benson, C. E., Dick, J. (1985): Prevalence and economic consideration of Johne's disease in the northeastern US. In: Proceedings 89th Annual Meeting, S. 484±490. US Animal Health Association, Milwaukee, Wisconsin, USA.

Williams, A. G. und Withers, S. E. (2010): Microbiological characterisation of artisanal farmhouse cheeses manufactured in Scotland. Int. J. Dairy Technol. **63**: 356–369.

Williams, E. S., Spraker, T. R., Schoonveld, G. G. (1979): Paratuberculosis (Johne's disease) in bighorn sheep and a rocky mountain goat in Colorado. J. Wild. Dis. **15**: 221–227.

Williams, M. M., Yakrus, M. A., Arduino, M. J., Cooksey, R. C., Crane, C. B., Banerjee, S. N., Hilborn, E. D., Donlan, R. M. (2009): Structural analysis of biofilm formation by rapidly and slowly growing nontubercuous mycobacteria. Appl. Environ. Microbiol. **75**: 2091–2098.

Wilson, D. J., Rossiter, C., Han, H. R., Sears, P. M. (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**: 1851–1857.

Windsor, P.A. und Whittington, R. J. (2009): Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. Vet. J. **184 (1)**: 37–44.

Yacoob, R. K. und Zealey, G. R. (1988): A one-step procedure for the purification of high molecular weight bacterial chromosomal DNA. Nucleic Acids Res. **16 (4)**: 1639.

Yoshimura, H. H., Graham, D. Y., Estes, M. K., Merkal, R. S. (1987): Investigation of association of mycobacteria with inflammatory bowel disease by nucleic acid hybridization. J. Clin. Microbiol. **25**: 45±51.

Zwick, L. S., Walsh, T. F., Barbiers, R., Collins, M. T., Kinsel, M. J., Murnane, R. D. (2002): Paratuberculosis in a mandrill (Papio sphinx). J. Vet. Diagn. Invest. **14 (4)**: 326–328.

Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Bülte für die Überlassung des Themas sowie seine fachliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Dr. Amir Abdulmawjood danke ich für die Unterstützung bei der Einarbeitung in das Thema sowie in allen molekularbiologischen Fragestellungen. Dr. Ömer Akineden danke ich für die Hilfe bei den ersten Einmischversuchen.

Ich bedanke mich bei allen Kolleginnen und Kollegen dieses Instituts. Mein besonderer Dank gilt Claudia Walter für die umfassende praktische und technische Einarbeitung in den Bereich der Molekularbiologie, den fachlichen Austausch und die kritische Hinterfragung bei molekularbiologischen Fragen jeglicher Art. Ich danke ihr und Karin Simon für die Hilfe bei der Bearbeitung der Proben und der angenehmen Arbeitsatmosphäre. Cornelia Dürrschmidt, Margot Lechner und Brigitte Marx danke ich für die Einarbeitung in den mikrobiologischen Teil des Labors, die weitläufigen Hilfestellungen und die gemeinsame Zeit, Malik M'Bodj für die Einarbeitung und Hilfe in der institutseigenen Nährbodenküche.

Andrea Bartels und Sonja Schmidt danke ich für die angenehme Atmosphäre in unserem gemeinsamen Büro und die vielen schönen Gespräche. Kim Nguyen danke ich für ihre Hilfsbereitschaft bei Problemen jeglicher Art und ihre fundierten Lösungsansätze. Frank Schmidt danke ich für das offene Ohr, das er zu jeder Zeit für mich hatte.

Ein sehr großer Dank gilt Herrn Dr. Klaus Failing für seine umfassende Beratung und seine unendliche Geduld bei meinen Fragen zu der statistischen Auswertung der Daten. Dieser Dank gilt auch seinen Mitarbeitern Andreas Schaubmar und Marion Sparenberg.

Der Firma Promega danke ich für die Bereitstellung des *Maxwell® 16 Systems* während des praktischen Teils dieser Arbeit.

Prof. Dr. K. Doll und seinen Mitarbeitern danke ich für die Bereitstellung der Rohmilch.

Die Untersuchungen wurden durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen des Projekts „Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis – von der Johne'schen Krankheit zum Morbus Crohn – ZooMAP" gefördert (Förderkennzeichen 01Kl0754 und 01Kl1003E).

Meinem Vater danke ich für seine uneingeschränkte und ermutigende Unterstützung sowie den unerschütterlichen Glauben an mich und meine Arbeit zu jeder Zeit.

Meiner Mutter danke ich für ihre fachliche Unterstützung bei der Drucklegung der Dissertation.

Mein spezieller Dank gilt Andreas Rembow, dessen vielfältige Unterstützung für mich eine unbeschreibliche Hilfe bei der Entstehung dieser Arbeit war. Seine Einführung in das Prinzip der Scrum-Methode hat mir den Weg zur Fertigstellung dieser Arbeit sehr erleichtert. Er stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite, hat diese Arbeit geduldig, gewissenhaft und gründlich Korrektur gelesen und mich immer wieder liebevoll-energisch ermutigt.

Christian Berg danke ich für das offene Ohr, dass er zu jeder Zeit für mich hat, hatte und hoffentlich immer haben wird!

Larissa Michels danke ich für alle Gespräche, die wir zu jeder Tages- und Nachtzeit in einer Dauer von Mikro bis Makro geführt haben.

Tini Hofmann danke ich dafür, dass sie immer für mich da ist, auch wenn wir uns viel zu selten sehen.

Ich danke allen, die an mich geglaubt haben. Insbesondere dann, wenn ich es gerade nicht tat. Dies gilt meiner geliebten Familie genauso wie meinen Freunden. Ein großer Dank vor allem in die Schweiz! Und an meine Zweit-Familie in Pohlheim!

Erklärung

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

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

Gießen, den 08.01.2014

Annalena Molitor



ISBN 978-3-86345-213-1

Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Friedrichstraße 17 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375
E-Mail: info@dvg.de · Internet: www.dvg.de