

REGINA A. R. FÜLLGRABE

UNTERSUCHUNGEN ZUM KULTURELLEN UND
MOLEKULARBIOLOGISCHEN NACHWEIS VON
MYCOBACTERIUM AVIUM SSP. *PARATUBERCULOSIS*
(MAP) AUS HUMANEN DARMBIOPSTATEN

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



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2009

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

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

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

Betreuer: Prof. Dr. M. Bülte

**Untersuchungen zum kulturellen und molekularbiologischen
Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP)
aus humanen Darmbiopтатаen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Regina A. R. Füllgrabe

Tierärztin aus Kassel

Gießen 2008

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. M. Bülte

Prof. Dr. R. Bauerfeind

Tag der Disputation: 18.12.2008

Meinen Eltern

Einige Ergebnisse dieser wissenschaftlichen Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

FÜLLGRABE, R., SCHÖNENBRÜCHER, H., ABDULMAWJOOD, A. und M. BÜLTE (2005):

Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* aus humanen Darmbiopaten.

„Mensch-Ernährung-Umwelt“-Seminartag, 05. Oktober 2005, Gießen (Vortrag)

FÜLLGRABE, R., SCHÖNENBRÜCHER, H. und M. BÜLTE (2006):

Kultureller Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) – Vergleichende Untersuchungen.

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG)-Fachgruppentagung "Bakteriologie und Mykologie", 15.-17. Juli 2006, Wetzlar

FÜLLGRABE, R., SCHÖNENBRÜCHER, H., ABDULMAWJOOD, A. und M. BÜLTE (2006):

Kultureller und molekularbiologischer Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) aus humanen Darmbiopaten.

47. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Dtsch. Vet. Med. Ges. (DVG), 26.-29. Sep. 2006, Garmisch-Partenkirchen

FÜLLGRABE, R., SCHÖNENBRÜCHER, H., ABDULMAWJOOD, A. und M. BÜLTE (2006):

Molecular and Cultural Detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) In Patients with Inflammatory Bowel Disease and in Controls.

58. Tagung der Deutsche Gesellschaft Hygiene Mikrobiologie (DGHM), 01.-04. Oktober 2006, Würzburg

FÜLLGRABE, R., SCHÖNENBRÜCHER, H. und M. BÜLTE (2006):

Comparative Studies of Culture Media for the Detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP).

58. Tagung der Deutsche Gesellschaft Hygiene Mikrobiologie (DGHM), 01.-04.10. 2006, Würzburg

FÜLLGRABE, R., SCHÖNENBRÜCHER, H., ABDULMAWJOOD, A. und M. BÜLTE (2006):

Kultureller und molekularbiologischer Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) aus humanen Darmbiopтатаen - erste Ergebnisse.

3. Arbeitstagung „Mykobakterieninfektionen“, 11.-12. Oktober 06, Jena (Vortrag)

FÜLLGRABE, R., SCHÖNENBRÜCHER, H., ABDULMAWJOOD, A. und M. BÜLTE (2006):

Kultureller und molekularbiologischer Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* aus humanen Darmbiopтатаen - Vorläufige Ergebnisse.

„Mensch-Ernährung-Umwelt“-Seminartag, 6. Dezember 2006, Gießen (Vortrag)

FÜLLGRABE, R., SCHÖNENBRÜCHER, H., ABDULMAWJOOD, A. und M.
BÜLTE (2007):

Kultureller und molekularbiologischer Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp.
paratuberculosis (MAP) aus Darmbiopsaten von Morbus Crohn- und Colitis
ulcerosa-Patienten sowie Kontrollen – vorläufige Ergebnisse.

„Mensch-Ernährung-Umwelt“-Seminartag, 30. Mai 2007, Gießen (Poster)

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT	2
2.1 Mykobakterien	2
2.2 <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	3
2.2.1 Taxonomie	3
2.2.2 Vorkommen und Tenazität	5
2.3 Paratuberkulose	7
2.3.1 Klinik, Pathologie und Epidemiologie der Paratuberkulose	7
2.3.2 Ökonomische Aspekte der Paratuberkulose	13
2.4 <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> in Lebensmitteln	14
2.4.1 Milch und Milcherzeugnisse	15
2.4.2 Fleisch und Fleischerzeugnisse	17
2.4.3 Wasser	18
2.4.4 Lebensmittel pflanzlichen Ursprungs	19
2.5 Nachweismethoden für <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> ..	20
2.5.1 Kulturelle Nachweisverfahren	20
2.5.2 Polymerase-Kettenreaktion	23
2.5.2.1 Grundlagen	23
2.5.2.2 Das Prinzip der Real Time-PCR	25
2.5.2.3 Nachweis von <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> mit PCR- Verfahren	28

2.5.2.4	Molekulare Identifizierung von Mykobakterienspezies.....	31
2.6	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen des Menschen	32
	Morbus Crohn und Colitis ulcerosa.....	32
2.6.1	Ätiologie chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen.....	36
2.6.1.1	<i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> und Morbus Crohn	42
2.6.2	Epidemiologie und ökonomische Aspekte chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen	52
2.6.3	Diagnostik chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen.....	56
2.6.3.1	Morbus Crohn.....	56
2.6.3.2	Colitis ulcerosa	59
2.6.4	Therapie chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen	60
2.6.4.1	Morbus Crohn.....	60
2.6.4.2	Colitis ulcerosa	63
3	MATERIAL UND METHODEN	65
3.1	Referenz- und Kontrollstämme	65
3.2	Vergleichende Untersuchungen zum kulturellen Nachweis von <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	66
3.3	Dekontaminationswirkung von N-Acetyl-L-Cystein-NaOH auf <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	73
3.4	Darmbioptate von Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten sowie Kontrollprobanden	78
3.4.1	Probanden	78
3.4.2	Darmbioptate	79
3.4.3	Charakterisierung des Probandenkollektivs.....	83

3.4.4	Charakterisierung der Darmbioptate.....	84
3.4.5	Weiteres Vorgehen nach Fluoreszenz oder 12-wöchiger Inkubation...	86
3.4.6	Sequenzanalyse säurefester Stäbchen	99
3.4.7	Archivierung der Isolate aus humanen Biopaten und der Referenzstämme	101
3.5	Statistische Auswertung	103
4	ERGEBNISSE.....	105
4.1	Vergleichende Untersuchungen zum kulturellen Nachweis von <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	105
4.2	Validierung der Wirkung von N-Acetyl-L-Cystein-NaOH auf <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	109
4.3	Mikrobiologische Ergebnisse bei humanen Darmbiopaten	120
4.4	Molekularbiologische Ergebnisse der mit humanen Darmbiopaten inokulierten BBL Mycobacteria Indicator Tubes (MGIT)	121
4.5	Ergebnisse der Sequenzanalyse	137
4.6	Archivierung humaner Isolate und boviner Referenzstämme	142
5	DISKUSSION.....	143
5.1	Medienvergleich.....	143
5.2	Validierung der Dekontaminationswirkung von N-Acetyl-L-Cystein- NaOH auf <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	146
5.3	Kultureller und molekularbiologischer Nachweis von MAP aus Darmschleimhaut von Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten sowie Kontrollprobanden	148

5.3.1	Methodische Aspekte	148
5.3.2	Vorkommen von <i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> im Darmgewebe von Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten sowie Kontrollprobanden	155
6	SCHLUSSFOLGERUNGEN	164
7	ZUSAMMENFASSUNG	165
8	SUMMARY.....	168
9	LITERATURVERZEICHNIS	170
10	ANHANG	259
10.1	Puffer und Lösungen	259
10.1.1	Puffer und Lösungen für die Dekontamination.....	259
10.1.2	Puffer und Lösungen für die PCR.....	259
10.1.3	Lösungen für die Dekontaminationsvalidierung	262
10.1.3.1	Referenzsuspension.....	262
10.2	Nährmedien	263
10.2.1	Löwenstein-Jensen-Festmedium	263
10.2.2	Middlebrook 7H10-Agar.....	263
10.2.3	<i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> -Nachweis bei Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten sowie Kontrollprobanden.....	264
	DANKSAGUNG.....	292

VERZEICHNIS RELEVANTER BZW. HÄUFIG VERWENDETER ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN

%	Prozent
=	gleich
+	positiv, plus
-	minus, negativ, keine Angaben
+/-	plus minus
≥	größer als
≤	kleiner als
∅	nicht durchgeführt
®	geschütztes Warenzeichen
™	geschütztes Warenzeichen (engl.: <u>trademark</u>)
°C	Grad Celsius
μl	Mikroliter
Aqua dest.	<u>Aqua destillata</u>
ca.	<u>circa</u>
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankung(en)
cm	Zentimeter
CU	<u>Colitis ulcerosa</u>
DIN	<u>D</u> eutsches <u>I</u> nstitut für <u>N</u> ormung e.V.
DNA	<u>d</u> esoxyribo <u>n</u> ucleid <u>a</u> cid
DSMZ	<u>D</u> eutsche <u>S</u> ammlung für <u>M</u> ikroorganismen und <u>Z</u> ellkulturen
ELISA	<u>E</u> nzyme- <u>l</u> inked <u>i</u> mmuno <u>s</u> orbent <u>a</u> ssay

et al.	et altera (und andere)
Fa.	Firma
g	<u>G</u> ramm
HEYM	<u>H</u> errod's <u>E</u> gg <u>Y</u> olk <u>M</u> edium
i. d. R.	<u>i</u> n <u>d</u> er <u>R</u> egel
IFTN	<u>I</u> nstitut für <u>T</u> ierärztliche <u>N</u> ahrungsmittelkunde
KbE	<u>K</u> olonie- <u>b</u> ildende <u>E</u> inheit(en)
MAA	<i><u>M</u>ycobacterium <u>a</u>vium ssp. <u>a</u>vium</i>
MAP	<i><u>M</u>ycobacterium <u>a</u>vium ssp. <u>p</u>aratuberculosis</i>
max.	<u>m</u> aximal
MC	<u>M</u> orbus <u>C</u> rohn
MGIT	<u>M</u> ycobacteria <u>G</u> rowth <u>I</u> ndicator <u>T</u> ube
min	<u>M</u> inute
mind.	<u>m</u> indestens
ml	<u>M</u> illiliter
n	Anzahl
NALC	<u>N</u> - <u>A</u> cetyl- <u>L</u> - <u>C</u> ystein
NaCl	<u>N</u> atrium <u>c</u> hlorid
nCED	<u>n</u> icht <u>c</u> hronisch- <u>e</u> ntzündlich <u>d</u> armerkrankter Patient (Kontrollproband)
Nr.	<u>N</u> ummer
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction (Polymerase-Kettenreaktion)
s	<u>S</u> ekunde
z. B.	zum <u>B</u> eispiel

1 EINLEITUNG

Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* (MAP) ist der Erreger der Paratuberkulose bei Wiederkäuern. Bereits seit Anfang des letzten Jahrhunderts wird vor allem aufgrund der ähnlichen Pathomorphologie ein Zusammenhang mit Morbus Crohn (MC), einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung des Menschen, vermutet und seitdem kontrovers diskutiert. Der Großteil der bisherigen Studien bediente sich allein eines molekularbiologischen Nachweisverfahrens zur Detektion von MAP-Desoxyribonukleinsäure im Darmgewebe der Patienten. Zudem wurden überwiegend Marker eingesetzt (auf Basis des *IS900*-Elementes), bei denen Kreuzreaktionen zu anderen Mykobakterienspezies beobachtet werden konnten. Den bisher eingesetzten Polymerase-chain-reaction (PCR)-Verfahren fehlt vielfach eine Qualitätssicherung der Diagnostik, insbesondere die Berücksichtigung einer internen Amplifikationskontrolle (IAK) zum Ausschluss falsch-negativer Ergebnisse, die Folge von PCR-Inhibitoren sein können. Zusätzlich unterblieb häufig die kulturelle Überprüfung der Vermehrungsfähigkeit von MAP.

In der eigenen Arbeit sollte die kulturelle Anzucht von MAP aus humanen Darmbiopaten unter Einsatz eines zuvor eigens validierten Dekontaminationsverfahrens mit N-Acetyl-L-Cystein-NaOH mit der PCR-Analytik kombiniert werden. Um die Treffsicherheit des molekularbiologischen Nachweisverfahrens zu steigern, wurde eine nested-PCR (BULL et al., 2003) und eine Triplex Real Time-PCR (SCHÖNENBRÜCHER et al., 2008) inklusive einer IAK verwendet. So konnten insgesamt drei MAP-spezifische Marker in die Untersuchungen einbezogen werden. Für die Subkultivierung von Mykobakterienstämmen sollten in einer vergleichenden Untersuchung preiswerte, einfach zu handhabende und produktive Selektivfestmedien geprüft werden.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Mykobakterien

Das Genus *Mycobacterium* (*M.*) bildet die einzige Gattung der Familie *Mycobacteriaceae* in der Ordnung *Actinomycetales*. Chronologisch gesehen wurde als erste Spezies der Mykobakterien der Erreger der Lepra, *M. leprae* beschrieben. Dann folgte 1882 die Entdeckung des Tuberkuloseerregers *M. tuberculosis*, an die sich wenige Jahre später die Abgrenzung des Erregers der Rindertuberkulose, *Mycobacterium bovis*, des Erregers der Vogel- und Geflügeltuberkulose, *Mycobacterium avium* sowie des Erregers der Johne'schen Krankheit, *Mycobacterium paratuberculosis* anschloss. Neben den obligaten Pathogenen für Mammalia und Vögel enthält die Gattung saprophytäre und in der Umwelt (Boden, Wasser) verbreitete Mykobakterien (BLOBEL und SCHLIESSER, 1985).

Die leicht gebogenen Stäbchen bis kurzen Filamente ohne Verzweigungen sind schwach grampositiv (HOLT et al., 1994). Charakteristisch für Mykobakterien ist die sog. Säure-Alkohol-Festigkeit, die als Widerstandsfähigkeit gegen eine Entfärbung mit Salzsäure-Alkohol nach Anfärbung mit Anilinfarbstoffen definiert wird. Der Lipidgehalt der Zellwände ist besonders hoch und enthält die für Mykobakterien typischen hochmolekularen Fettsäuren (Mykolsäuren) mit ca. 60-90 C-Atomen. Das Wachstum ist aerob. Man unterscheidet langsam und schnell wachsende Spezies, wobei große und typische Unterschiede innerhalb der Gattung auftreten können. Manche Spezies zeigen Pigmentbildung (β -Karoteine) (BLOBEL und SCHLIESSER, 1985; HOLT et al., 1994; STAHL und URBANCE, 1990). Als besondere Substanzen in der Zytoplasmamembran der

Mykobakterien sind Exocheline und Mykobaktine enthalten, die dem Eisentransport dienen. Nach MACHAM et al. (1975) bringen die wasserlöslichen Exocheline Eisen an die Bakterienoberfläche heran, von wo aus die lipophilen Mykobaktine den weiteren Transport bis zur Plasmamembran übernehmen. Mykobaktin gilt als besonderer Wachstumsfaktor für *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP).

2.2 *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*

2.2.1 Taxonomie

MAP wurde zum ersten Mal 1894 beschrieben und als Auslöser der Johne'schen Krankheit 1910 bestätigt (SONGER und POST, 2005). Isoliert wurde das Bakterium 1912 von TWORT und INGRAM. Es gehört zum *M. avium*-Komplex und stimmt genotypisch zu 95 % mit *M. avium* ssp. *avium* überein (THOREL et al., 1990). Phänotypisch unterscheidet sich MAP durch langsameres Wachstum, seine Mykobaktinabhängigkeit und die größere Virulenz bei Säugetieren (COLLINS, 1997). MAP weist eine Länge von 1-2 µm und eine Breite von 0,5 µm auf. Es gehört zu den langsam wachsenden Mykobakterien mit einer Generationszeit von mindestens 1,2 Tagen (LAMBRECHT et al., 1988) und einer Inkubationsdauer von 3 Wochen, die allerdings häufig auf bis zu 5 Monate ausgedehnt werden muss, bis Kolonien makroskopisch auf festen Nährmedien sichtbar werden (SONGER und POST, 2005). MAP-Stämme können durch molekularbiologische Charakterisierung mittels Pulsfeld-Gel-Elektrophorese (PFGE) sowie *IS900*-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) und ihrer Kultureigenschaften in

drei Gruppen unterteilt werden (COLLINS et al., 1990; DE JUAN et al., 2005; PAVLIK et al., 1999; STEVENSON et al., 2002): Typ I und Typ III wurden ursprünglich bei Schafen nachgewiesen (COLLINS et al., 1990). Sie wachsen extrem langsam und sind schwer zu kultivieren und zu subkultivieren. Später gelang die Isolation auch bei Rindern und Ziegen (DE JUAN et al., 2006; DE JUAN et al., 2005; WHITTINGTON et al., 2001). Da sie kaum voneinander unterschieden werden können, werden sie als Typ I/III bezeichnet (DE JUAN et al., 2006). Stämme vom Typ II wachsen langsam und wurden zunächst bei Rindern beschrieben; mittlerweile gelang der Nachweis jedoch bei einer Vielzahl von Wirten, Menschen und Wildtiere eingeschlossen, in zahlreichen Ländern (PAVLIK et al., 1999; STEVENSON et al., 2002). Isolate von Morbus Crohn-Patienten wurden bislang dem Stammtyp II zugeordnet (PAVLIK et al., 1999).

In der Literatur werden zellwanddefekte Formen, sog. Sphäroblasten, beschrieben (HULTEN et al., 2000b; WALL et al., 1993; CHIODINI et al., 1986; BURNHAM und LENNARD-JONES, 1978). Sie sind extrem schwer zu isolieren und lassen sich in der Ziehl-Neelsen-Färbung nicht darstellen. Gewöhnlich wandeln sich Sphäroblasten während der Kultivierung zu zellwandintakten Formen um (HINES und STYER, 2003). Mittels PCR-Verfahren ist eine Unterscheidung beider Formen nicht möglich, allerdings wurden *in situ*-Hybridisierungsmethoden entwickelt, die eine Differenzierung in Gewebeabschnitten ermöglichen (HULTEN et al., 2000a).

2.2.2 Vorkommen und Tenazität

Neben dem Vorkommen bei Wiederkäuern gelang der Nachweis des Erregers bei einer Vielzahl recht unterschiedlicher Säugetier- und Vogelarten: braunes Hermelin (*Mustela erminea*), Fuchs (*Vulpes vulpes*), Krähe (*Corvus corone*), Saatkrähe (*Corvus frugilegus*), Dohle (*Corvus monedula*), Ratte (*Rattus norvegicus*), Maus (*Apodemus sylvaticus*), Feldhase (*Lepus europaeus*), Dachs (*Meles meles*) (BEARD et al., 2001a), Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) (BEARD et al., 2001b), Feldmaus (*Microtus arvalis*), Spitzmaus (*Crocidura suaveolens*), Wildschwein, Bär (KOPECNA et al., 2005), Gürteltier, Opossum (MANNING et al., 2005) und verwilderten Katzen (PALMER et al., 2005). Auch Affen (*Macaca arctoides*) können sich mit dem Erreger infizieren und ihn im Kot ausscheiden (McCLURE et al., 1987). Dipteren, wie *Calliphora vicina* und *Lucilla sericata* (FISCHER et al., 2004), genauso wie die Nymphen der Kakerlake *Blatta orientalis* (FISCHER et al., 2003) und die Larven von *Eristalis tenax* (KOPECNA et al., 2005) können als Vektoren eine wichtige Rolle bei der Erregerübertragung spielen. Durch das dritte Larvenstadium von Nematoden, die sich im Kot infizierter Schafen entwickeln, kann ebenfalls eine vektorielle Übertragung von MAP stattfinden (WHITTINGTON et al., 2001). Im Inneren einer, durch Trinkwasser übertragbaren Amöbe (*Acanthamoeba castellanii*), erfährt *M. avium* neben der Replikation sogar eine Virulenzsteigerung (CIRILLO et al., 1997). Und auch in der unbelebten Umwelt ist der Erreger weit verbreitet (COLLINS et al., 2001) und besitzt eine hohe Tenazität (Tabelle 1).

Tabelle 1: Tenazität von *M. avium* ssp. *paratuberculosis* in der Umwelt in unterschiedlichen Matrizes und unter verschiedenen Bedingungen

Matrix	Bedingungen	Überlebensdauer/ Prozentsatz überlebender MAP	Autor
Rinderkot	gewöhnliche Wetter- bedingungen	246 Tage	LOVELL et al., 1944
Leitungswasser	-	17 Monate	LARSEN et al., 1956
Schweine- und Rindergülle	5 °C	252 Tage	JORGENSEN, 1977
Rindergülle	15 °C	98 Tage	
Wasser	pH 5,3	8-9 Monate	COLLINS et al., 2001
Boden	trocken	8 Wochen/30 %	
	feucht	8 Wochen/100 %	
Weide	trocken und schattig	55 Wochen	WHITTINGTON et al., 2004
Schlamm	pH 12,5	72 Stunden	FLYNN et al., 2005
Stauwasser	-	36 Wochen	WHITTINGTON et al., 2005
Rindergülle	-	56 Tage	GREWAL et al., 2006

2.3 Paratuberkulose

Per definitionem ist die Paratuberkulose (Johne'sche Krankheit) eine durch *M. avium* ssp. *paratuberculosis* hervorgerufene Infektionskrankheit mit langer Inkubationszeit, vorwiegender Manifestation im Dünndarm in Form einer spezifischen Enteritis, chronischem klinischen Verlauf, der durch Abmagerung und Durchfall gekennzeichnet ist, und stets tödlichem Ausgang. Andere Bezeichnungen sind „Johne's disease“ und „Entérite paratuberculeuse“ (KLEE, 2006).

2.3.1 Klinik, Pathologie und Epidemiologie der Paratuberkulose

Die Paratuberkulose ist eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung der Wiederkäuer. Sie wurde zuerst 1895 von JOHNE und FROTHINGHAM im Zusammenhang mit einer tuberkuloseähnlichen Erkrankung eines Rindes als „ein eigenthümlicher Fall von Tuberkulose beim Rind“ beschrieben. Sie kommt bis heute insbesondere bei der Tierart Rind und seltener bei den kleinen Wiederkäuerarten vor, ist aber auch bei einer Reihe von Wildwiederkäuern beschrieben worden (GODFROID et al., 2005, MACHACKOVA et al., 2004). MAP-Infektionen treten weltweit auf, insbesondere in Gegenden mit intensiver Rinderhaltung (KLEE, 2006). Die Empfänglichkeit der Rinder für MAP ist in den ersten Lebensmonaten am höchsten, sie nimmt mit zunehmendem Alter immer weiter ab. Die Tiere infizieren sich durch Aufnahme von Kot, z. B. durch Saugen an mit Kot verschmutzten Zitzen, sowie von erregerhaltigem Kolostrum, Milch, Futter und Wasser (MERKAL, 1984). Nach der oralen Aufnahme siedelt sich MAP in der Schleimhaut des Dünndarmes sowie in den Mesenterial-

lymphknoten an. Die Mykobakterien werden von Makrophagen phagozytiert, in denen sie sehr lange überleben können. Es kommt zum verstärkten Einstrom mononukleärer Phagozyten in die Darmschleimhaut. Dadurch verdickt sich die Darmschleimhaut zunehmend, woraus Malabsorption und chronischer Durchfall resultieren (KÖHLER et al., 2003). Die chronische granulomatöse Entzündung ist meist im Ileum lokalisiert. Es ist am stärksten entzündet und beherbergt die meisten MAP. Sekundär sind die zugehörigen Lymphknoten betroffen und tertiär Leber, Milz und darmferne Lymphknoten (ANONYMOUS, 2007). Im Endstadium verstärkt sich der Durchfall, und als Folge der enteralen Eiweißverluste können hypoproteinämische Ödeme auftreten (DOLL, 2006). Nach anhaltender Inkubationszeit von meist 2-3 Jahren, kommt es zum Krankheitsausbruch. Typische Symptome der Johne'schen Krankheit sind rascher Gewichtsverlust bei therapieresistenter andauernder Diarrhöe. Die Tiere zeigen ungestörtes Allgemeinbefinden, physiologische Körpertemperatur und Appetit (COLLINS, 1997). Allerdings treten nicht in jedem infizierten Bestand klinische Erkrankungsfälle auf. Stattdessen kann sich die Bestandsinfektion lediglich in unbefriedigender Leistung, v. a. bei den 3- bis 6jährigen Kühen äußern. Die klinisch manifeste Phase der Erkrankung beginnt meist im Anschluss an eine Kalbung, also in einer Situation mit erhöhter Belastung, selten schon bei Rindern, welche noch nicht gekalbt haben. Im Gegensatz zu den Verhältnissen beim Rind manifestiert sich die Paratuberkulose bei kleinen Wiederkäuern und bei Wildwiederkäuern überwiegend in chronischer Abmagerung. Durchfall tritt nur in etwa 15 % der Fälle auf (DOLL, 2006). Die Paratuberkulose gilt als unheilbar (KLEE, 2006).

KOETS et al. (2000) beschreiben genetische Einflüsse der Empfänglichkeit der Rinder für Paratuberkulose.

MAP wird mit dem Kot, der Milch und dem Sperma (LARSEN et al., 1981) ausgeschieden. An Paratuberkulose erkrankte Tiere können mit dem Kot bis zu 10^{12} MAP/g ausscheiden, persistent infizierte Tiere immer noch mehr als 10^8 MAP/g (CHIODINI et al., 1984). Wenn die MAP-Konzentration im Kot hoch ist, ist auch die Prävalenz in der Milch höher (SWEENEY et al., 1992). Sogar inapparent infizierte Tiere scheiden den Erreger in der Milch aus. Die Wahrscheinlichkeit der Ausscheidung steigt mit dem Fortschreiten der Infektion. Das Internationale Tierseuchenamt (Office Internationale des Epizooties, OIE) führt die Paratuberkulose der Wiederkäuer in der Liste der Erkrankungen mit sozioökonomischer Bedeutung und/oder Bedeutung als Zoonose. Dies ermöglicht es Drittländern, für den Import von Zuchtrinden, Sperma und Embryonen einen Nachweis der Paratuberkulose-Unverdächtigkeit zu verlangen. EU-rechtlich zählt die Paratuberkulose der Wiederkäuer zu den „Endemischen Krankheiten mit vorgeschriebenen oder fakultativen Bekämpfungs- bzw. Tilgungsmaßnahmen auf Bestands- oder Herdenebene“ (Gruppe 1 der Liste der Tierkrankheiten; Entscheidung 90/424/EWG des Rates vom 26. Juni 1990). In Deutschland sind Paratuberkulose-Fälle bei Wiederkäuern meldepflichtig. So wurden für das Jahr 2005 290, für 2006 244 und für 2007 insgesamt 305 Fälle gemeldet. Die relativ geringe Zahl der über das Tierseuchen-Nachrichtensystem gemeldeten Fälle ist allerdings vorsichtig zu interpretieren, denn nur ein geringer Teil der Infektionen dürfte tatsächlich erkannt und dann auch gemeldet werden. Zur Abschätzung der

Paratuberkulose-Prävalenz wurden im letzten Jahrzehnt zahlreiche Untersuchungen durchgeführt (Tabelle 2). Nord- und Westaustralien wird als paratuberkulosefrei angesehen (KENNEDY et al., 2002).

Tabelle 2: Angaben zur Seroprävalenz der Paratuberkulose bei Rindern (Anteil Paratuberkulose-positiver Herden) in einigen Ländern und Regionen

Land (Region)	Prävalenz	Autoren
USA (Wisconsin)	50,0 %	COLLINS et al., 1994
Österreich	7,0 %	GASTEINER et al., 1999
Belgien	17,4 %	BOELAERT et al., 2000
Dänemark	55,0 %	NIELSEN und AGGER, 2000
Vereinig. Königreich (Wales)	17,0 %	ÇETINKAYA et al., 1998
Italien (Latium)	42,0 %	LILLINI et al., 2005
Schweiz	8,0 %	STÄRK et al., 1997
Niederlande	53,0 %	VAN SCHAİK et al., 2003
Deutschland (Arnsberg)	10-30 %	BÖTTCHER, 1997
Deutschland (Thüringen)	> 80 %	ELSCHNER und HORNER, 2003
Deutschland (Meckl.- Vorp.)	84,7 %	HACKER et al., 2004
Deutschland (Sachsen)	90,5 %	DONAT, 2005
Deutschland (Bayern)	19,0 %	BÖTTCHER und GANGL, 2004

Aufgrund methodischer Unzulänglichkeiten – wie Nichtbeachtung der diagnostischen Validität der angewandten Testverfahren oder inadäquates Beprobungsschema – dürften diese Daten die tatsächliche Situation allerdings nur unzulänglich wiedergeben. Nach Angaben des Sachverständigengremiums im Bundesinstitut für Risikobewertung (ANONYMUS, 2001) muss von bis zu 30 % MAP-positiven Rinder- sowie bis ca. 60 % MAP-positiven Ziegenbeständen ausgegangen werden. Wenn man allerdings aktuelle Nachweisquoten blut- bzw. milchserologischer oder bakteriologischer Reagenten zu Grunde legt, ist von einer durchgehend höheren Prävalenz auszugehen. So sind aus einigen Bundesländern, basierend auf blutserologischen Untersuchungen, Herdenprävalenzen von über 80 % bei Einzeltierprävalenzen zwischen ca. 1 % bis 17 %, selten höher, ermittelt worden (HACKER et al., 2004; BÖTTCHER et al., 2005, DONAT, 2005; ELSCHNER, 2005). Nach Untersuchungen von DOLL (2006) wurden in 11 von 12 zufällig ausgewählten hessischen Milchviehbetrieben mittels Svanovir-ELISA seropositive Reagenten festgestellt. Die Untersuchungen aus Ziegenbeständen in vier Bundesländern ergaben in 17-62 % der Bestände serologisch positive Reaktionen (ANONYMUS, 2001). In Westfalen-Lippe ergaben serologische Untersuchungen Herdenprävalenzen von 36 % bei Schafen und 27,8 % bei Ziegen, bei Durchschnittsprävalenzen innerhalb der Herden von 3,1 % bzw. 3,8 % (ADAMS, 2001). In Nordrhein-Westfalen konnten in 18 von 28 untersuchten Wanderschafherden Tiere mit Antikörpern nachgewiesen werden; in 40 % der positiven Herden lagen die Einzeltierprävalenzen über 5 % (VOGEL et al., 2005). Diese Daten bedürfen jedoch einer zurückhaltenden Auslegung,

da sie teilweise mit unterschiedlichen Testkits und an differierenden Altersklassen ermittelt wurden. Ein verlässliches flächendeckendes Überwachungssystem existiert für die BRD bisher nicht (KÖHLER et al, 2003).

2.3.2 Ökonomische Aspekte der Paratuberkulose

Neben den Tierverlusten selber kommt es zu finanziellen Einbußen aufgrund verringerter Milchleistung, vermehrter Krankheitsanfälligkeit, verminderter Fruchtbarkeit und verringerten Gewichtszunahmen und damit geringerem Schlachterlös (WILSON et al., 1997; KÖHLER et al., 2003). Laut BENEDICTUS et al. (1987) haben Kühe im klinischen Stadium der Erkrankung eine verminderte Milchleistung um durchschnittlich 19,5 %, verglichen mit der vorletzten Laktation sowie um ca. 5 %, verglichen mit der vorangegangenen Laktationsperiode. Bei subklinischen Tieren beläuft sich der Rückgang auf durchschnittlich 16 % bzw. 6 %. Die wirtschaftlichen Folgen durch Leistungsrückgang (v. a. Milchproduktion), Tierverluste, verminderte Fertilität, eine erhöhte Anfälligkeit für weitere Infektionen, sowie die Therapiekosten werden auf ca. 250 € pro Rind und Jahr sowie auf ca. 100 € pro Schaf und Jahr in infizierten Beständen geschätzt (BENEDICTUS et al., 1987; OTT et al., 1999). Berechnungen aus den Niederlanden kamen zu dem Ergebnis, dass der Schaden für einen Betrieb mit 100 Milchkühen über einen Zeitraum von 20 Jahren 6 800 € pro Jahr betragen kann. In Betrieben mit klinisch kranken Tieren wird der Schaden auf 900 € pro klinisch krankem Tier geschätzt (KÖHLER et al., 2003). STABEL (1998) schätzt die finanziellen Einbußen in den USA auf 1,5 Milliarden \$ pro Jahr. Bei der Betrachtung solcher Berechnungen ist allerdings

zu bedenken, dass die Verluste in direktem Zusammenhang mit den Produktionssystemen der berücksichtigten Herden stehen. Herdengröße und -management müssen neben weiteren Parametern Beachtung finden (DUFOUR et al., 2004).

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

Der Erreger kann direkt über das Tier, vor allem durch fäkale Kontamination, in Lebensmittel tierischer und pflanzlicher Herkunft eingetragen werden und über diese oder direkt zum Menschen bzw. in die Umwelt und das Wasser gelangen. Die hohe Tenazität von MAP, die jahrelanges Überleben in Erde und Wasser erlaubt, ermöglicht dann das Kreislaufgeschehen in der Umwelt (siehe Abbildung 1; COLLINS et al., 2001; LARSEN et al., 1956).

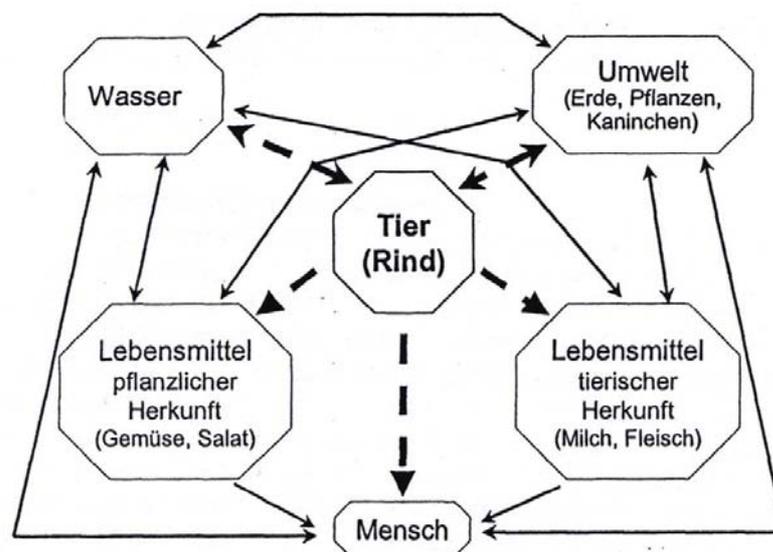


Abbildung 1: Theoretische Verbreitungs- und Übertragungsmöglichkeiten von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (HAMMER, 2003)

2.4.1 Milch und Milcherzeugnisse

Die Ausscheidung von MAP über die Milch erwies sich bei SWEENEY et al. (1992) mit 2-8 KBE/50 ml als recht gering. Die fäkale Sekundärkontamination ist wohl der entscheidende Eintragsweg, da einmal infizierte Tiere den Erreger streuen können, wobei eine intermittierende Ausscheidung charakteristisch zu sein scheint (WHITLOCK et al., 1986). Bei fäkaler Kontamination ist die Keimzahl abhängig von der die Milch verunreinigenden Kotmenge und der darin vorhandenen MAP-Zellen. Die handelsübliche Pasteurisierung von Milch ist nach Definition des Internationalen Milchwirtschaftsverbandes eine Hitzebehandlung mit dem Ziel, die Anzahl beliebiger pathogener Mikroorganismen in Milch und Milcherzeugnissen – falls vorhanden – so zu vermindern, dass sie kein bedeutendes Gesundheitsrisiko darstellen. SUNG und COLLINS (1998) haben D-Werte (dezimale Reduktionszeit) für MAP in Milch bestimmt. Für Sammelproben aus Rinder- und Humanisolaten wurden Werte ermittelt, die beträchtlich höher liegen als die für *Listeria*, *Salmonella* und *Coxiella* spp. publizierten und die für *M. bovis* geschätzten Werte. Dies belegt die erheblich höhere Thermotoleranz für MAP. Die Studie unterstützt die Prämisse, dass MAP-Keime die Kurzzeitpasteurisierung (72-75 ° C, 15-30 Sekunden) überleben können, wenn die initiale Bakteriendichte 10^1 Zellen/ml übersteigt. Die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen sind hier zwar widersprüchlich, das Überleben der Kurzzeiterhitzung wurde jedoch von HAMMER et al. (2002) mit einer Pilotpasteuranlage bestätigt. Es ist also nicht verwunderlich, dass MAP in pasteurisierter Milch nachgewiesen werden kann (Übersicht: HAMMER und KNAPPSTEIN, 1998; ILSI, 2004; PAOLICCHI et al., 2005; AYELE et al., 2005).

Allerdings ist in einer Vielzahl der Studien die untersuchte Milch artifiziiell kontaminiert worden (MEYLAN et al., 1996; GRANT et al., 1998; SUNG und COLLINS, 1998; GAO et al., 2002; GRANT et al., 2005). Ob Laborstämme eine andere Hitzeresistenz besitzen als Feldstämme, ist jedoch ungewiss (ANONYMOUS, 2005). Durch den Nachweis kultivierbarer MAP-Bakterien in pasteurisierter Milch aus dem englischen (MILLAR et al., 1996; GRANT et al., 2002a) und US-amerikanischen Handel (ELLINGSON et al., 2005) sowie bei einem Großversuch mit einer kommerziellen Pasteurisierungsanlage und natürlich kontaminierter Milch (GRANT et al., 2002b) konnte allerdings auch diese Fragestellung erhellt werden. Die Temperatur-Zeitbedingungen für die Dauer- und die Kurzzeiterhitzung sind ab 1935 auf Basis der Inaktivierung von *M. bovis* und *M. tuberculosis* festgelegt worden. Im Vordergrund stand dabei die Inaktivierung der Infektiösität dieser Testkeime und nicht so sehr der kulturelle Nachweis überlebender Bakterien. In diesem Zusammenhang wäre dringend zu prüfen, ob die kulturell nachgewiesenen MAP-Zellen überhaupt noch infektiös sind (HAMMER, 2003).

Für im Laborversuch hergestellten Käse (Hartkäse, halbfester Schnittkäse) wurde in zwei Arbeiten eine relativ lange Überlebensdauer von MAP von 28-45 Tagen beschrieben (SUNG und COLLINS, 2000; SPAHR und SCHAFFROTH, 2001). Daher muss davon ausgegangen werden, dass insbesondere in mit MAP-kontaminiertem Rohmilchkäse eine entsprechende Überlebensdauer des Erregers möglich ist. In Käse aus dem Handel konnte MAP molekularbiologisch und kulturell nachgewiesen werden (IKONOMOPOULOS et al., 2005; STEPHAN et al., 2006). HRUSKA et al. (2005) untersuchten 51 Milchpulver-

produkte für Säuglinge aus sieben Ländern. Molekularbiologisch konnten mittels IS900 25 (49,0 %) und mittels F57 18 (35,3 %) Proben als MAP-positiv erkannt werden. Eine Probe war kulturell positiv. Da das Ergebnis nicht reproduzierbar war, sind die Daten kritisch zu betrachten. Von AKINEDEN et al. (2006) wurden 59 deutsche Milchtrockenerzeugnisse als Säuglingsfertig-nahrungsmittel kulturell auf das Vorkommen von MAP untersucht. Vier positive Kulturen konnten molekularbiologisch bestätigt werden. Weitere Erhebungen zum Vorkommen von MAP in Milchprodukten sind derzeit nicht bekannt.

Für das Vorkommen und das Verhalten von MAP in Milch und Milchprodukten sind im Vergleich zu den anderen Lebensmitteln die meisten Daten erhoben worden. Dies bedeutet aber nicht zwangsläufig, dass Milch der wichtigste mögliche Überträger ist.

2.4.2 Fleisch und Fleischerzeugnisse

Eine primäre Kontamination von Fleisch infizierter Rinder auf hämatogenem Wege oder eine sekundäre bei der Schlachtung ist nicht auszuschließen. Aus Deutschland liegen hierzu bisher keine Daten vor. Eine gezielte Untersuchung auffällig magerer Milchkühe und weiblicher Mastrinder nach der Schlachtung in den USA zeigte bei 11,1 % von 189 Kühen und 0,7 % von 350 Mastrindern kulturell positive Befunde in fleischassoziierten Lymphknoten (*Ln. cervicalis supf.* und *Ln. popliteus*) und der Leber (ROSSITER und HENNING, 2001). Die nachgewiesenen Keimzahlen schwankten stark und lagen im Bereich 10-3 000 KbE/1 g. Auch bei den Untersuchungen von SWEENEY et al. (1992) und WHITLOCK et al. (1996) konnte in fleischhygienisch relevanten Lymphknoten

von Wiederkäuern MAP nachgewiesen werden. Insbesondere die Befunde in den Lymphknoten zeigen, dass auch Fleisch den Erreger enthalten kann. Auch in zahlreichen Organen und Geweben von Wiederkäuern konnte MAP nachgewiesen werden (LARSEN et al., 1981; HINES et al., 1987; SEITZ et al., 1989; GWOZDZ et al., 1997; GWOZDZ et al., 2000; PAVLIK et al., 2000; AYELE et al., 2004; LAMBETH et al., 2004; BOSSHARD et al., 2006; TASARA et al., 2006). Nach den Ergebnissen von SEITERT et al. (2003) ist bei zwei Drittel der Fälle die Muskulatur MAP-positiv, wenn die Lymphknoten ein positives Ergebnis liefern. Nach persönlicher Aussage von John Egan (Department of Agriculture Food and Forestry, Ireland [siehe auch RYAN und CAMPBELL, 2006]) wurde zwischen Juni und November 2004 eine Untersuchung von 114 Proben Rinderhackfleisch in Irland durchgeführt. Die Ergebnisse der ausschließlich kulturellen Diagnostik mit BACTEC[®] 12 B-Flüssigmedium ließen die Forscher schlussfolgern, dass irisches Rindfleisch keine oder nur sehr wenige MAP enthält.

2.4.3 Wasser

Auf die Bedeutung des Trinkwassers als Vehikel für MAP-Infektionen ist in der wissenschaftlichen Literatur mehrfach hingewiesen worden (MAYBERRY und HITCHENS, 1978; CHIODINI et al., 1984). Als primäre Eintragsquelle ist das mit Fäzes infizierter Tiere kontaminierte Oberflächenwasser anzusehen. MAP wurde bereits im Wasser von Einzugsgebieten zur Trinkwasseraufbereitung nachgewiesen (PICKUP et al., 2005a und 2005b; ROWE et al., 2005; WHAN et al., 2005; PICKUP et al., 2006). MAP kann bis zu 36 Wochen in Stauwasser

überleben und sogar 12 Wochen länger im Sediment (WHITTINGTON et al., 2005). Aufgrund der Resistenz des Erregers gegenüber Chlor ist die Überlebensfähigkeit selbst bei derartiger Trinkwasseraufbereitung gegeben (WHAN et al., 2001).

2.4.4 Lebensmittel pflanzlichen Ursprungs

MAP konnte kulturell in Stängeln, Blättern und Früchten von Tomaten, Radieschen und Salat nachgewiesen werden, die mit artifiziell kontaminiertem Rinderdung gedüngt worden waren (PAVLIK et al., 2002). Dies bedeutet, dass eine entsprechende Düngung solcher Kulturfleichen zu einer MAP-Kontamination der Lebensmittel führen kann. Weitere Daten zum Vorkommen von MAP in pflanzlichen Lebensmitteln existieren bislang nicht.

Neben dem direkten Tierkontakt kann eine Exposition des Menschen gegenüber MAP auch über Lebensmittel tierischer und pflanzlicher Herkunft sowie Wasser erfolgen. Da MAP sich nur im Wirt vermehren kann (COLLINS, 2003; EL-ZAATARI et al., 2001; HAMMER et al., 2000), nach dem Eintritt in die Nahrungskette bzw. die Umwelt praktisch unmittelbar Verdünnungseffekte wirksam werden und weitere Reduzierungen bei der Be- und Verarbeitung von Lebensmitteln zu erwarten sind, ist bei der Exposition aber eher von sehr geringen Zellzahlen auszugehen (HAMMER, 2003).

2.5 Nachweismethoden für *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*

Die Diagnose von Infektionen mit *M. avium* ssp. *paratuberculosis* ist eine komplizierte Fragestellung in der veterinärmedizinischen Bakteriologie. Für den Nachweis des Erregers stehen kulturelle, mikroskopische, immunchemische und molekulargenetische Methoden zur Verfügung. Je nach vorliegender Probenmatrix sind die einzelnen Verfahren unterschiedlich geeignet. Die Ziehl-Neelsen-Färbung (ZN) zur Überprüfung der Alkohol-Säurefestigkeit ist ein schnelles, einfach anzuwendendes und kostengünstiges Verfahren. Die Sensitivität und Spezifität sind jedoch nur gering (THORNTON et al., 1998). Weiterentwicklungen in Form einer mit der *in situ*-Hybridisierung gekoppelten konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie sind für die Aufarbeitung klinischen Sektionsmaterials von NASER et al. (2002) vorgestellt worden. Die Autoren selbst werten ihr Verfahren als methodische Ergänzung zur weiteren Erforschung der Morbus Crohn-Pathogenese.

2.5.1 Kulturelle Nachweisverfahren

Nach wie vor ist die kulturelle Anreicherung von MAP im Rahmen der Paratuberkulose-Diagnostik als „golden standard“ zu betrachten (MERKAL et al., 1964; STABEL, 1997; DIMARELLI-MALLI und SARRIS, 2001; BARTOS et al., 2003; KÖHLER et al., 2003). Die kulturelle Diagnostik ist sehr spezifisch, jedoch kontaminationsanfällig und Wachstumsergebnisse können durch das vorherige und erforderliche Dekontaminationsverfahren beeinflusst werden (THORNTON et al., 1998). Da der Erreger zunächst nur in geringen Mengen

und intermittierend ausgeschieden wird, ist die Sensitivität des Nachweises, besonders in der frühen Phase der Erkrankung, nur gering. Bei einer Spezifität von 100 % wird sie auf ca. 35 % geschätzt (KÖHLER et al., 2003). Der kulturelle Nachweis benötigt wenigstens drei Wochen Inkubationsdauer (SONGER und POST, 2005). Manche Schaf- oder Humanstämme können sogar Monate oder Jahre benötigen bis sie auf dem Selektivmedium sichtbar werden; einige MAP-Stämme lassen sich überhaupt nicht kultivieren (HERMON-TAYLOR und EL-ZAATARI, 2004).

MAP benötigt zur Vermehrung *in vitro* die Hämosiderinkomponente Mykobaktin (FRANCIS, 1953; MERKAL et al., 1964; BARCLAY und RATLEDGE, 1983). Allerdings können MAP-Stämme, die im Labor mehrfach subkultiviert werden, die typische Mykobaktinabhängigkeit verlieren und auf weniger komplexen Nährmedien schneller wachsen. Bei einer ausreichenden Konzentration von Eisenammoniumcitrat im Nährmedium kann ebenfalls auf eine Mykobaktinzugabe verzichtet werden (MERKAL und CURRAN, 1974). Um die Begleitflora der Matrices zu unterdrücken, werden Kot- und Gewebeproben von Wiederkäuern mit Hexadodecylpyridiniumchlorid (HPC) und humane Gewebeproben und Milchprodukte mit N-Acetyl-L-Cystein (NALC) dekontaminiert (STACHELSCHIED, 1989; JUSTE et al., 1991; BULL et al., 2003a; DONAGHY et al., 2003). Die Medien werden außerdem mit einem Antibiotikagemisch versetzt. Bei Eigelbnährböden wie Herrolde's Egg Yolk-Medium (HEYM) kann Vancomycin, Amphotericin B und Nalidixinsäure, bei Flüssigmedien Polymyxin, Amphotericin B, Nalidixinsäure und Azlozillin (PANTA) ohne nachteilige Effekte auf das MAP-Wachstum zugegeben werden, um das Wachstum von

Kontaminanten zu verhindern (WHITTINGTON et al., 1999; BULL et al., 2003a; DONAGHY et al., 2003; GRANT et al., 2003).

Klassische Festmedien zur Kultivierung von MAP sind Eigelbnährböden. Ein hoher Eigelbgehalt neutralisiert die bakteriostatische Wirkung der Dekontaminationsmittel (STACHELSCHIED, 1989). Die Koloniemorphologie ist unabhängig von der Herkunft des Stammes, jedoch nicht vom Medium: auf mykobaktinhaltigen Eigelbmedien wächst MAP klein, glatt, feucht, konvex und nicht-pigmentiert. Auf eigelbfreien Festmedien, wie Middlebrook-7H11, erscheinen MAP-Kolonien rau und durchscheinend. Wenn die Kolonien älter werden und das Medium trockener wird, können die Kolonien ein krümeliges Erscheinungsbild annehmen oder es bildet sich ein Hohlraum zwischen Koloniezentrum und Agaroberfläche. In Flüssigmedien wächst MAP in charakteristischer Klumpenform (MERKAL und CURRAN, 1974; HERMONTAYLOR und EL-ZAATARI, 2004). Flüssigmedien, supplementiert mit Mykobaktin, erlauben einen vergleichsweise schnellen Nachweis von MAP (DAMATO et al., 1987; DAMATO und COLLINS; 1990). Ohne Dekontaminationsschritt ermöglichen sie den Nachweis von 10^1 - 10^2 Zellen pro Milliliter Milch in 30-40 Tagen (GRANT et al., 2003). Der kombinierte Einsatz von Anreicherungsmedium und charakterisierender PCR wurde erfolgreich zum Nachweis von bovinen, ovinen und humanen MAP-Stämmen aus Kot-, Milch- und Gewebeproben eingesetzt. Die Nachweisdauer kann auf bis zu drei Tage verkürzt werden (COUSINS et al., 1995; DE LISLE et al., 1999; SCHWARTZ et al., 2000; BULL et al., 2003a).

Radiometrisch gestützte Analyseverfahren (BACTEC; Becton Dickinson®) basieren auf einem ^{14}C -Nachweis als Bestandteil von Kohlenstoffdioxid. CO_2 entsteht infolge Bakterienmetabolismus, Kohlenstoffquelle ist die im Flüssigmedium enthaltene Palmitinsäure. Sie bieten den Vorteil eines schnelleren Nachweises und sind sensitiver als konventionelle Nährmedien (COUSINS et al., 1995). Allerdings setzen sie im Vorfeld hohe Anschaffungskosten für das Analysegerät und teilweise weitere Modifikationen der Flüssigmedien in Bezug auf die zugesetzten Antibiotika voraus (KÜHN, 2003). Dieses System ist überdies nicht für alle Probenmatrizes standardisiert und wenig spezifisch. Für geringe Probenaufkommen können ohne Sensitivitätsverlust alternativ manuelle, nicht-radiometrisch gestützte Verfahren eingesetzt werden (GRANT et al., 2003). Grundsätzlich ist immer auch die Eignung für die Detektion subletal geschädigter MAP bzw. Sphäroblasten zu berücksichtigen. Dabei muss sowohl bei Antibiotikazusatz als auch bei inadäquater Dekontamination mit falsch-negativen Ergebnissen gerechnet werden (GRANT et al., 2000).

2.5.2 Polymerase-Kettenreaktion

2.5.2.1 Grundlagen

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde im Jahr 1985 von Kary Mullis in Kalifornien entwickelt. Die PCR ist eine *in vitro*-Technik, mit der man gezielt Desoxyribonukleinsäure (DNA) -Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen flankiert werden, vervielfältigen kann (MULLIS und FALOONA, 1987). Zur Amplifizierung von DNA benötigt man als Starthilfe

Oligonukleotidprimer. Das sind kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der DNA-Matrize (template) sind. Die Synthese neuer, zur DNA-Matrize komplementärer DNA-Stränge, erfolgt mit Hilfe eines Enzyms, der DNA-Polymerase. Unter den richtigen Reaktionsbedingungen und in Gegenwart von Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTP's) verlängert diese DNA-Polymerase die Primer entlang der einzelsträngigen denaturierten DNA-Matrize zu neuer doppelsträngiger DNA. Zur Wiederholung dieses Vorgangs muss die doppelsträngige DNA jedoch wieder durch Hitze aufgeschmolzen werden, um nach Abkühlung eine weitere Primerbindung (Annealing) zu ermöglichen. Nun beginnt ein neuer Vermehrungszyklus. Dabei dienen auch die neusynthetisierten DNA-Stränge als Matrize, so dass die Ziel-Sequenzen exponentiell vermehrt werden.

Die Polymerase-Kettenreaktion läuft also in drei sich zyklisch wiederholenden Reaktionsschritten ab:

- Denaturierung: DNA-Doppelstränge werden durch Erhitzen voneinander getrennt
- Annealing: Anlagerung der Primer bei Temperaturen zwischen ca. 40 und 60 °C.
- Extension: Neusynthese eines Komplementärstranges mit Hilfe der DNA-Polymerase (bei ca. 72 °C).

Die Primer einer verschachtelten (nested) PCR hybridisieren innerhalb eines DNA-Abschnitts, der von einem ersten Primerpaar abgesteckt wird. Das im

ersten PCR-Zyklus entstandene DNA-Molekül dient in einer zweiten PCR als Matrize.

Mit einer nested PCR kann die Empfindlichkeit und Spezifität der DNA-Vervielfältigung gesteigert werden. Die Spezifität ist deshalb so groß, weil mit dieser Methode nahezu alle falschen, unspezifischen Kopien unberücksichtigt bleiben. Denn nach dem ersten Zyklus bieten die unspezifischen Produkte nicht mehr genügend komplementäre Sequenzen für die inneren Primer und stehen somit in den weiteren Runden nicht mehr als Matrize zur Verfügung. Daher wird vorzugsweise die Zielsequenz amplifiziert. Durch die außerordentliche Empfindlichkeit der Methode wächst allerdings auch die Anfälligkeit für Verunreinigungen.

Die Amplifikation von Nukleinsäuren ist die sensitivste Nachweismethode, da sie theoretisch nur ein einziges Zielmolekül erfordert. Allerdings ist sie relativ teuer, technisch komplex und anfällig für Hemmstoffe (THORNTON et al., 1998).

2.5.2.2 Das Prinzip der Real Time-PCR

Die quantitative Real Time-PCR ist eine relativ neue Technik, die zu Beginn der 1990er Jahre entwickelt wurde und seit ca. zehn Jahren kommerziell verfügbar ist. Die Technologie kombiniert die DNA-Amplifikation (PCR) mit der Detektion des Produktes in einem einzigen Reaktionsgefäß vom Ansatz bis zur Auswertung. Durch das Wegfallen der zeitaufwendigen Auswertung mittels Agarose-Gelelektrophorese reduziert sich mit dieser Methode ferner das Kontaminationsrisiko. Die Visualisierung des Amplikons ist grundsätzlich mit

zwei verschiedenen Detektionssystemen möglich: die Verwendung von fluoreszierenden Farbstoffen, die sich unspezifisch an jede doppelsträngige DNA während der Amplifikation anlagern, oder der Einsatz von sequenzspezifischen fluorophormarkierten DNA-Sonden. Bei letzteren handelt es sich um Oligonukleotide, welche spezifisch an eine Region innerhalb des Zielgenes binden. Unabhängig vom verwendeten System emittiert die Probe innerhalb des Zyklus ein Fluoreszenzsignal nur bei Anwesenheit des Amplifikats. Die Intensität ist proportional zur Menge des amplifizierten Produktes. Der „Schwellenwertzyklus“ (Threshold Cycle; Ct-Wert) gibt den Zyklus an, in dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt und wird zur Quantifizierung der Ausgangs-DNA herangezogen (FENOLLAR und RAOULT, 2004, MACKAY, 2004).

Unspezifische DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe, z. B. Sybr Green und Ethidiumbromid, lagern sich in die doppelsträngige DNA ein (interkalieren), wodurch die Fluoreszenz dieser Farbstoffe ansteigt. Der gebundene Farbstoff fluoresziert etwa 1 000mal stärker als der ungebundene. Bei dieser Methode entfällt einerseits die kostenintensive Synthese von sequenzspezifischen Sonden und sie ist universell einsetzbar, andererseits lagern sich die Farbstoffe grundsätzlich an doppelsträngige DNA an, also auch an Primerdimere oder nicht-spezifische PCR-Produkte und weisen deshalb nur eine geringe Spezifität auf (BANGSOW et al., 2002; JOTHIKUMARD und GRIFFITHS, 2002; FENOLLAR und RAOULT, 2004; McKILLIP und DRAKE, 2004). Da jedoch jedes PCR-Produkt aufgrund der Länge und des CG-Gehaltes bei einer charakteristischen Temperatur schmilzt, kann anhand einer Schmelzkurve

zwischen verschiedenen Amplifikaten differenziert werden (WITTEWER et al., 2001).

Bei den sequenzspezifischen Hybridisierungssonden handelt es sich um fluorophormarkierte Oligonukleotide, die mit der Zielsequenz hybridisieren. Da sie nur an eine bestimmte Sequenz innerhalb des gewünschten PCR-Produktes binden, sind sie hochspezifisch und sehr sensitiv. Entsprechend der Amplifikation des spezifischen PCR-Fragments steigt das Fluoreszenzsignal an. Dabei ist die Fluoreszenzzunahme dem Zuwachs an PCR-Amplifikat direkt proportional (McKILLIP und DRAKE, 2004). Die meisten der gewöhnlich verwendeten fluorogenen Oligonukleotide basieren auf dem Prinzip des Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers (FRET): ein Donor-Fluorochrom (Reporter), der durch eine Lichtquelle angeregt wird, gibt einen Teil seiner Energie an ein in ausreichender Nähe befindliches Akzeptor-Fluorochrom (bzw. einen "dunklen" Quencher) ab. Nimmt der Abstand zwischen Akzeptor und Donor zu, so nimmt FRET und somit das Fluoreszenzsignal des Akzeptors ab, während das des Donors zunimmt. Diese Methode ist sehr aufwendig und teuer, bietet aber den Vorteil der hohen Spezifität des Assays (FÖRSTER, 1948; CLEGG, 1992; SELVIN, 1995). Ein Beispiel für Hydrolysesonden sind TaqMan[®]-Sonden. Real Time PCR-Verfahren mit Einsatz von TaqMan[®]-Technologien sind ein mittlerweile weit verbreitetes Werkzeug, welches einen schnellen, sensitiven und spezifischen Nachweis von PCR-Produkten erlaubt. Die Gefahr von Kreuzkontaminationen und falsch-positiven Ergebnissen ist im Vergleich mit einer nested PCR herabgesetzt (COCKERILL und UHL, 2001). Bei einem Vergleich von Real Time-PCR mit Fluoreszenzsonden und nested

PCR sowie einer kulturellen Methode zum Nachweis von MAP, schnitt die Real Time-PCR als sensitivstes Verfahren ab (FANG et al., 2002).

2.5.2.3 Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* mit PCR-Verfahren

Der Standardnachweis von MAP mittels Polymerase-Kettenreaktion erfolgt seit Jahren über die *IS900*-Sequenz, die zum einen relativ spezifisch für MAP ist und zum anderen in hoher Kopienzahl im MAP-Genom vorkommt. Die Sequenz wurde von STEVENSON und SHARP (1997) entdeckt und wird 15-20 Mal im MAP-Genom wiederholt (GREEN et al., 1989). *IS900* wurde lange Zeit als hochspezifisch für MAP angesehen (VARY et al., 1990; MOSS et al., 1991; MOSS et al., 1992). Der Einsatz in der Diagnostik verschiedener Matrices ist weit gefächert: Formalin-fixiertes, Paraffin-eingebettetes Gewebe (WHITTINGTON et al., 1999), BACTEC 12B-Kulturen (WHITTINGTON et al., 1998), Tankmilchproben (GRANT et al., 2000) und humane Darmbiopaten (COLLINS et al., 2000; BULL et al., 2003; AUTSCHBACH et al., 2005). MAP ist eng verwandt mit den ubiquitären Stämmen des *Mycobacterium-avium*-Komplexes. Von einer 97 %igen DNA-Homologie zwischen MAP und *Mycobacterium avium* ssp. *avium* (MAA) wurde berichtet (BANNANTINE et al., 2002). Mit *IS900* verwandte Sequenzen wurden in MAA (*IS901*) und anderen Mykobakterien (*IS902*) gefunden. Die Insertionssequenz *IS1626* ist eine weitere eng verwandte Sequenz zu *IS900* (PUYANG et al., 1999). So genannte „*IS900* like-Sequenzen“ können bei eng verwandten mykobakteriellen Spezies vorkommen und die Spezifität des PCR-Verfahrens beeinflussen (COUSINS et al., 1999; NASER et al., 1999b; ENGLUND et al., 2002; BULL et al., 2003a und

2003b; MOTIWALA et al., 2004). Daher sollten PCR-Ergebnisse von Verfahren, die die Zielsequenz *IS900* nutzen, vorsichtig interpretiert werden (TASARA et al., 2005). ENGLUND et al. (2002) empfehlen die nachfolgende Überprüfung *IS900*-positiver Ergebnisse mittels Sequenzierung oder einem anderen MAP-Zielgen. Als alternative Marker kommen F57, *ISMav2* und HSP X in Betracht. F57- und HSP X-Sequenzen kommen als Einfachkopie im MAP-Genom vor, wohingegen *ISMav2* mit wenigstens drei Kopien auftritt (POUPART et al., 1993; ELLINGSON et al., 1998; STROMMENGER et al., 2001). Obwohl diese Marker nicht so sensitiv sind wie die mehrfach enthaltene *IS900*-Sequenz, sind sie hochspezifisch für MAP und daher weniger anfällig für falsch-positive Ergebnisse (POUPART et al., 1993; ELLINGSON et al., 1998; COETSIER et al., 2000; ELLINGSON et al., 2000; STRATMANN et al., 2002; VANSNICK et al., 2004; TASARA et al., 2005). Die F57-Sequenz konnte als spezifisch für MAP erkannt werden, da sie bisher in keiner anderen Mykobakterienspezies nachgewiesen werden konnte. Es handelt sich um ein 620 bp-Segment mit einem G/C-Gehalt von 58,9 % (POUPART et al., 1993; COETSIER et al., 2000; HARRIS und BALRLETTA, 2001). SCHÖNENBRÜCHER et al. (2008) sicherten die hohe Spezifität der Marker F57 und *ISMav2* anhand von 205 Referenzstämmen, darunter 105 MAP-Stämmen bovinen, ovinen und humanen Ursprungs, ab. BANNANTINE et al. (2002) entdeckte in einem Genomvergleich von MAP und MAA 21 potentielle diagnostische Sequenzen, die in einem Multiplex PCR-Verfahren zum Einsatz kommen können.

Der MAP-Erregernachweis mittels PCR gestaltet sich aufgrund der heterogen-komplexen Matrices (Fäzes, Lebensmittel, Bioptate) mit einer Vielzahl von

PCR-Inhibitoren sehr schwierig (BICKLEY et al., 1996; STEVENSON und SHARP, 1997; AL-SOUD und RADSTROEM, 2000; RIFFON und SAYASITH, 2001). Der Einsatz sog. Interner Amplifikationskontrollen (IAK) wurde bislang nur in wenigen Arbeiten für den PCR-basierten MAP-Nachweis umgesetzt (ENGLUND et al., 2001). Eine Interne Amplifikationskontrolle dient dem Ausschluss falsch-negativer Ergebnisse, die die Folge von PCR-Inhibitoren sein können. Die Anwesenheit eines PCR-Kontrollproduktes in Abwesenheit des Zielprodukts ermöglicht die Unterscheidung zwischen auswertbaren und falsch-negativen „Resultaten“. Diese wichtigen Aspekte müssen bei der Anwendung eines PCR-Verfahrens auf eine komplexe biologische Matrix kontrolliert werden können (TASARA et al., 2005). Die Sensitivität des PCR-Verfahrens kann überdies durch die zur Dekontamination verwendeten Reagenzien Hexadecyl-pyridinium-clhlorid (HPC) (WHIPPLE et al., 1991; REDDACLIFF et al., 2003) und N-Acetyl-L-Cystein (NALC) herabgesetzt werden.

Das Real Time-PCR-Verfahren nach SCHÖNENBRÜCHER et al. (2005, 2006 und 2008) kann mit 100 %iger Wahrscheinlichkeit die Amplifikation von 1 pg DNS pro PCR-Ansatz gewährleisten und arbeitet außerdem mit einer internen Amplifikationskontrolle.

Für die Anwendung magnetischer Separationstechniken werden magnetische Partikel mit spezifischen Antikörpern oder Proteinen, die auf der Oberfläche von Bakteriophagen präsentiert werden, gekoppelt. Zielbakterien binden an diese Strukturen und können so mit Hilfe eines Magneten absedimentiert, aufkonzentriert und schließlich nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei bis zu 10^3 KbE/g Fäzes. Dabei ist zu berücksichtigen,

dass die Mehrzahl der Verfahren eine deutlich schlechtere Sensitivität aufwies; auch fiel die Reproduzierbarkeit geringer aus. Exemplarisch verdeutlichten GRANT et al. (1998 und 2000) den Anteil an arbeitsintensiven und schwer standardisierbaren Vorgehensweisen bei der Untersuchung von Milchproben. Mit dem von STRATMANN et al. (2002) vorgestellten phagengestützten „Biopanning“ ist die Nachweisgrenze auf bis zu 10^2 Phage Forming Unit (PFU)/ml Milch zu reduzieren. Eine interne Kontrolle bleibt jedoch auch hier unberücksichtigt.

2.5.2.4 Molekulare Identifizierung von Mykobakterienspezies

Gegenüber der phänotypischen hat die molekulare Identifizierung verschiedener Mykobakterienspezies zwei große Vorteile: kurze Dauer und hohe Genauigkeit. Die drei genetischen Ziele, die sich bei der Identifikation bewährt haben, sind die 16S ribosomalen RNA-Gene (16S rDNA) (KIRSCHNER et al., 1993; HARMSEN et al., 2003), die „internal transcribed spacer“ (ITS)-Region (ROTH et al., 2000) und das *hsp65*-Gen (DEVALLOIS et al., 1997). Der Hauptvorteil der 16S rRNA-Genanalyse ist die mögliche Anwendung auf alle Bakterienzellen, auch tote und nicht kultivierbare. Die ITS-Region hat eine größere Unterscheidungskraft als die 16S rDNA. Sie ermöglicht jedoch nicht die Erkennung und verlässliche taxonomische Platzierung von zuvor nicht beschriebenen Spezies. Eine Differenzierung von MAA, MAP und *M. avium* ssp. *silvaticum* ist auf Ebene der 16S rDNA nicht möglich. Die häufigste Methode der Ziel-charakterisierung ist die Amplifikation, gefolgt von Hybridisierung, „Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Analyse“ oder Sequenzierung. Und obwohl die Sequenzanalyse stark spezialisierte

Ausstattung benötigt, bietet sie das höchste Maß an Auflösung und Portabilität und ist als zweckmäßigste Methode bei der Identifikation von Mykobakterien in klinischen Laboratorien zu betrachten (SPRINGER et al., 1996; PATEL et al., 2000). Der Informationsgehalt des 5'-Endes ist für die Identifizierung der meisten Bakterienspezies ausreichend.

2.6 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen des Menschen

Zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) des Menschen gehören der „Morbus Crohn“ (MC), die „Colitis ulcerosa“ (CU) und die nicht klassifizierbare chronische Colitis (KELLER und NÜTZENADEL, 2002). MC und CU teilen eine Reihe von Gemeinsamkeiten, unterscheiden sich jedoch in charakteristischen Eigenschaften. Zur Unterscheidung werden vor allem Befallsmuster, makroskopischer Befund und Histologie herangezogen. In einigen Fällen ist eine exakte Zuordnung nicht möglich, hier spricht man von der „Colitis indeterminata“ (HERRLINGER und STANGE, 2003).

Morbus Crohn und Colitis ulcerosa

Das Krankheitsbild einer regionalen Ileitis wurde 1932 von CROHN, GINSBURG und OPPENHEIMER beschrieben, wobei heute die Bezeichnung „Morbus Crohn“ (MC) für Manifestationen in allen Abschnitten des Magen-Darm-Trakts benutzt wird (VON TIRPITZ et al., 2004). Die Symptomtrias Bauchschmerzen (84 %), Gewichtsverlust (80 %) und chronische Durchfälle (79 %) ist typisch für einen MC. Weitere Leitsymptome können Anorexie,

Aktivitätsverlust, Aphthen im Mund, Cheilitis oder Augenentzündungen sein. Ferner können rezidivierende Fieberschübe (44 %), unspezifische Arthralgien oder Arthritiden und Hautveränderungen wie Erythema nodosum oder isolierte perianale Beschwerden vorkommen (KELLER und NÜTZENADEL, 2002). Der MC kann prinzipiell Bereiche des gesamten Verdauungstraktes befallen, d. h. vom Mund bis zum After. Die Erkrankung tritt bevorzugt im distalen Dünndarm und im proximalen Dickdarm, segmental im Wechsel mit gesunden Darmabschnitten auf und betrifft nicht nur die Mukosa sondern die gesamte Darmwand. Fisteln und zahlreiche extraintestinale Komplikationen kennzeichnen diese chronische Entzündung (FIOCCHI, 1998).

Aufgrund unterschiedlicher therapeutischer Prinzipien ist es sinnvoll, den MC nach dem anatomischen Befallsmuster zu klassifizieren. Zur Objektivierung des Schweregrades haben sich für die Studienvergleiche so genannte Aktivitätsindizes bewährt. Für die Routine haben sie sich jedoch nicht allgemein durchgesetzt (KELLER und NÜTZENADEL, 2002). Histopathologisch ist MC als diskontinuierlich entlang der Darmoberfläche ausgedehnte chronisch-ulzeröse Entzündung zu charakterisieren. Im Verlauf dehnt sich die Erkrankung vornehmlich nach oralwärts weiter aus. Eine metachrone lang gestreckte oder multisegmentale Manifestation ist wesentlich häufiger als eine synchrone lang gestreckte Ausdehnung eines MC. Die häufigsten Lokalisationen sind das prävalvuläre Ileum, oder das Ileum mit dem rechtsseitigem Kolon kombiniert (VON HERBAY, 1999), seltener ist der isolierte Dünndarm-Crohn oder die ausschließliche Colitis-Crohn. Sehr selten ist eine exklusive perianale Manifestation des MC (KELLER und NÜTZENADEL, 2002).

Der Begriff „ulcerative Colitis“ wurde 1859 erstmals von WILKS benutzt und hat sich dann im Sprachgebrauch durchgesetzt, obwohl die Schleimhautulzeration keine Grundbedingung ist. Die Colitis ulcerosa ist eine entzündliche Erkrankung der Kolonmukosa, die sich überwiegend im distalen Kolon manifestiert. (VON TIRPITZ et al., 2004). Bei der Colitis ulcerosa und der nicht-klassifizierbaren Colitis stehen meist blutige, nur tags und/oder auch nachts auftretende Durchfälle ganz im Vordergrund und führen zu einem meist viel kürzeren Intervall bis zur definitiven Diagnose als bei MC (KELLER und NÜTZENADEL, 2002). Die CU beginnt typischerweise distal im Rektum und breitet sich kontinuierlich nach proximal aus. Die Schleimhaut ist kontinuierlich befallen. Histologisch sind Kryptenabszesse charakteristisch. Vom Befallsmuster werden die Proktitis, die Linksseitenkolitis mit Befall bis zur linken Flexur und die ausgedehnte Kolitis unterschieden. Diese kann im Maximalfall als „Pancolitis ulcerosa“ bis zum *Cecum* reichen, selten mit sog. „Back-wash-Ileitis“ (HERRLINGER und STANGE, 2003). Colitis ulcerosa ist histopathologisch als eine kontinuierlich entlang der Oberfläche ausgedehnte CED zu charakterisieren, welche vornehmlich in der Mukosa manifestiert ist. Die mikroskopischen Befunde reflektieren einerseits die aktuelle Aktivität, andererseits aber auch die Folgen des vorangegangenen Krankheitsverlaufs. Histologisch lassen sich drei Phasen unterscheiden: aktive CU, Rückbildungsphase und ruhende bzw. inaktive CU. Diese Phasen können beim gleichen Patienten metachron oder synchron vorliegen (diskontinuierliche Aktivität). Die Korrelation der histologischen Aktivität zur Klinik ist nicht immer unmittelbar, oft ist die Symptomatik zeitversetzt präsent (VON HERBEY, 1999). Zur

Bestimmung des Schweregrades der Erkrankung werden klinische, laborchemische und endoskopische Parameter herangezogen, ohne dass sich einheitliche Indizes herauskristallisiert hätten (KELLER und NÜTZENADEL, 2002). Extraintestinale Manifestationen beider Erkrankungen können fast jedes Organsystem betreffen. Am häufigsten sind jedoch Haut, Augen, Gelenke, die Galle und die Lunge betroffen. Manche Symptome, wie Läsionen im Mundraum, Gallensteine, Pankreatitis, Nephrolithiasis und Amyloidose sind häufiger bei MC anzutreffen (GIONCHETTI, 2006).

Oftmals lassen sich die erhobenen Befunde jedoch nicht eindeutig einem Morbus Crohn oder einer Colitis ulcerosa zuordnen, was zur Einführung der Begriffe „indeterminate Colitis“ und „probable Crohn`s disease“ geführt hat. In einer schwedischen Studie, die mehr als die Hälfte der Kinder in Schweden erfasst, werden die Zahlen für indeterminate Colitis mit 9,2 %, und die für probable Crohn`s disease sogar mit 22,1 % angegeben. Dies zeigt, dass 31,3 % der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nicht genau zugeordnet werden können (LINDBERG et al., 2000). Es wird sogar bezweifelt, ob es sich bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa wirklich um zwei verschiedene Erkrankungen mit ähnlichen Krankheitserscheinungen oder um zwei verschiedene Manifestationen ein und derselben Erkrankung handelt (HYAMS, 1996).

2.6.1 Ätiologie chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen

Obwohl chronisch entzündliche Darmerkrankungen als klinisches Krankheitsbild seit über 100 Jahren bekannt sind, wurden Ätiologie und Pathogenese noch nicht völlig geklärt. Es gibt jedoch zahlreiche Erklärungsansätze. Mit großer Sicherheit spielen mehrere Faktoren eine Rolle. So sollen genetische, immunologische, diätetische, psychologische und infektiöse Ursachen Einfluss auf die Erkrankung haben. Der Verdacht einer genetischen Komponente bei der Entstehung von CED scheint durch die Ergebnisse von Familienstudien bewiesen. Das gehäuft familiäre Auftreten (ORHOLM et al., 1991), die höhere Inzidenz bei bestimmten Gruppierungen wie Juden (ROTH et al., 1989) und das übereinstimmende Vorkommen bei 58 % monozygoten Zwillingen gegenüber 0 % bei dizygoten Zwillingen (ORHOLM et al., 2000) deutet auf eine genetische Empfänglichkeit für CED hin. Für MC und CU ist die Prävalenz bei Verwandten ersten Grades deutlich höher als bei nicht verwandten Personen (MONSEN et al., 1987; MEUCCI et al., 1992; BERNSTEIN et al., 2006). Veränderungen auf bestimmten Chromosomen sind mit dem Entstehen von MC oder Colitis ulcerosa verbunden (OGURA et al., 2001). Die intensiviertete Untersuchung von Chromosom 16 bei CED-Familien führte zur Abgrenzung eines Genlokus, genannt „IBD1“, der mit dem Auftreten von MC verknüpft war. Eine detaillierte Analyse von Chromosom 16 hatte die Identifizierung eines an der Krankheit mitbeteiligten Gens zur Folge (HUGOT et al., 1996; OHMEN et al., 1996; HUGOT et al., 2001). Dieses Gen ist verantwortlich für die Kodierung eines zytoplasmatischen Proteins, das ursprünglich als NOD2 und inzwischen als CARD15 (caspase activation and recruitment domain) bekannt ist. Die

Entdeckung dieses Gens eröffnet neue Möglichkeiten, die Wechselwirkung der bakteriellen Darmflora mit dem Immunsystem zu untersuchen. Defensine sind endogene antimikrobielle Peptide mit breitem Wirkungsspektrum. Bereits mikromolare Konzentrationen reichen aus, um gramnegative und grampositive Bakterien, aber auch Mykobakterien sowie Pilze, Viren und Protozoen effektiv abzutöten. Als wichtiger Teil des angeborenen Immunsystems werden sie im Darmepithel exprimiert und tragen damit zur Aufrechterhaltung der intestinalen Mukosabarriere bei. Diese scheint bei chronischen Darmentzündungen defekt zu sein. Eine mögliche Erklärung beruht auf einer defekten Defensinexpression. Tatsächlich findet sich bei Morbus Crohn mit Befall des terminalen Ileums, insbesondere bei einer Mutation im NOD2-/CARD15-Gen, eine verminderte α -Defensinexpression und im entzündeten *Colon* eine im Vergleich zur Colitis ulcerosa verminderte β -Defensinantwort. Dies könnte durch Beeinträchtigung der chemischen Mukosabarriere zu einer vermehrten bakteriellen Invasion in die Darmschleimhaut führen und als eigentliche Ursache für die adäquate Entzündungsantwort betrachtet werden (SCHMID et al., 2004). Drei Varianten im CARD15-Gen sind in hohem Maße mit dem Auftreten des MC assoziiert. Das Erkrankungsrisiko für Träger dieses Defektgens liegt ca. 30 bis 100-fach über dem der Normalbevölkerung. Interessanterweise ist das Vorliegen von Varianten im NOD2-/CARD15-Gen mit einer hohen Wahrscheinlichkeit des Ileumbefalls gekoppelt (HAMPE et al., 2002). Man nimmt an, dass ca. 25 % der Patienten mit MC ein genetisches Risiko haben, an dem das mutierte CARD15-Gen beteiligt ist.

Die Theorie einer übersteigerten Immunantwort des Patienten auf diverse Antigene basiert auf der Feststellung, dass die extraintestinalen Manifestationen der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen häufig autoimmune Phänomene charakterisieren (CHACON et al., 2004). Für eine immunpathologische Genese mag außerdem das gute therapeutische Ansprechen auf Corticoide und Azathioprin sowie die häufig eindrucksvolle Remission unter Nahrungskarenz (Allergenkarenz ?) sprechen (CASPARY und WEHRMANN, 2005).

Es wurde eine negative Korrelation des Stillens und der späteren Entwicklung von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa beschrieben (RIGAS et al., 1993). BERGSTRAND und HELLERS (1983) bemerkten mehr Morbus Crohn-Patienten unter den nicht oder nur kurzzeitig gestillten Personen. Wohingegen in einer internationalen Veröffentlichung von GILAT et al. (1987) kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen hinsichtlich der Stillfrequenz beobachtet werden konnte.

Seit der Erstbeschreibung von Morbus Crohn wird ein Zusammenhang von psychologischen Faktoren und der Ursache bzw. dem Verlauf der Krankheit diskutiert. MC-Patienten werden immer wieder als depressiv belastet und vermehrt ängstlich beschrieben (SHEFFIELD und CARNEY, 1976; HELZER et al., 1984; ANDREWS et al., 1987). In einer Studie von PROBST et al. (1990) beschrieben sich die Patienten mit MC und CU selbst als signifikant nervöser, aggressionsgehemmter, ungeselliger, weniger gelassen, gehemmter, verschlossener und introvertierter als die Kontrollpersonen. Die Theorien primärer psychosomatischer Ätiologie rühren aus frühen, retrospektiven Studien

fraglicher Aussagekraft. So konstatierte WITTKOWER (1938), dass ein bestimmter Personentyp bzw. ein bestimmtes psychologisches Profil die Entstehung von Colitis ulcerosa vorbestimmt. Die betroffenen Menschen wurden als nicht konfliktfähig beschrieben. Anstatt Schwierigkeiten zu bewältigen, würden die Patienten Durchfall bekommen. Er charakterisierte sie als kindische, abhängige Persönlichkeiten, die sich derart deutlich von anderen Typen abgrenzen ließen, dass eine Kontrollgruppe unnötig sei. Eine markante zeitliche Beziehung zwischen dem Auftreten von Symptomen und emotionalen Unruhen konnte MURRAY (1930) erkennen. ANDREWS et al. (1987) untersuchten 91 MC- und 71 CU-Patienten mittels Fragebogen, der Hospital Anxiety and Depression Scale (HAD) und in einem strukturierten psychiatrischen Interview zur Einschätzung der Patienten nach den Kriterien des DSM-III (Dysthymia/major depressive disorder). Die Punktprävalenz für depressive Symptome gemäß dem DSM-III geben die Autoren für MC-Patienten mit 27 %, für die Colitis-Patienten mit 26 % an, die totale Prävalenz psychischer Störungen mit 33 % respektive 34 %. Bei einer Untersuchung von 50 MC- und 50 Kontrollpatienten mit chronischen Erkrankungen auf die Verbindung von Morbus Crohn und psychiatrischen Krankheiten konnte kein Beweis einer Wechselbeziehung erbracht werden. Allerdings zeigte eine signifikant größere Anzahl der MC-Probanden zu einem beliebigen Zeitpunkt in ihrem Leben psychiatrische Störungen und bei einer signifikant größeren Zahl wurden Depressionen diagnostiziert (HELZER et al., 1984). In einer multizentrischen, randomisierten Studie mit 108 MC-Patienten wurde der Einfluss von psychodynamischer Therapie und Entspannungsmethoden als

Begleitung zur standardisierten Glukocorticoidtherapie untersucht. Der somatische Verlauf sowie der psychosoziale Status der Patienten wurden beobachtet. Nach zwei Jahren konnte eine Tendenz zu einer geringeren Rate chirurgischer Eingriffe und eine Reduktion von Depressionen bei den Probanden bemerkt werden (KELLER et al., 2004). In Zahl, Dauer und Schwere der Rezidive unterschieden sich jedoch Probanden und Kontrollgruppe nicht wesentlich (JANTSCHEK et al., 1998). Kurzzeitige Stressexposition hat nach LEVENSTEIN et al. (2000) keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf von Morbus Crohn, allerdings kann Langzeitstress das Risiko einer Verschlechterung der Symptome erhöhen.

HUGOT et al. postulierten 2003 einen neuen Mechanismus für die Entstehung von Morbus Crohn. Die Hypothese basiert im Wesentlichen auf der Identifikation von Risikofaktoren, die auf den westlichen Lebensstil zurückzuführen sind und auf der sozioökonomischen Entwicklung in Ländern mit unterschiedlicher Morbus Crohn-Prävalenz. Alle Ergebnisse gehen konform mit der Kühlung von Speisen als einem Risikofaktor für die Entstehung von Morbus Crohn und werden mit psychotropen Bakterien, wie *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum* und *Bacillus cereus* in Verbindung gebracht. FORBES und KALANTZIS (2006) führten demgemäß eine Fall-Kontrollstudie mit MC- und CU-Patienten, sowie Kontrollprobanden durch und ermittelten das durchschnittliche Alter in dem ein Kühlschranks im Haushalt angeschafft wurde. Bei den jeweils 88 Probanden lag das Durchschnittsalter bei 5,6 Jahren bei den MC-Patienten und bei 5,5 Jahren bei den CU-Patienten. Die Kontrollprobanden nahmen im Mittel mit 7,6 Jahren

zum ersten Mal gekühlte Speisen zu sich. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese mit einer statistischen Signifikanz ($p = 0,045$) für Morbus Crohn-Patienten, verglichen mit den Kontrollen.

Masernviren können im Darmgewebe persistieren. Nach THOMPSON et al. (1995) kann insbesondere eine frühe Exposition in Form eines Lebendimpfstoffes als Risikofaktor für die Entstehung von Morbus Crohn betrachtet werden. In einer Fall-Kontroll-Studie mit 140 CED-Patienten, davon 83 mit MC, alle in oder nach 1968 geboren und 280 Kontrollpersonen, nach Alter und Geschlecht ausgewählt, wurde der Einfluss der Masernimpfung und der späteren Entwicklung von CED von FEENEY et al. (1997) dokumentiert. Es konnte kein signifikanter Beweis gefunden werden, der die Hypothese der Impfung in der Kindheit und der Entstehung von CED, insbesondere MC, bekräftigt hätte. Auch PATJA et al. (2000) konnten in einer 12-jährigen Studie keine Assoziation zwischen CED und vorangegangenen Immunisierungen gegen Masern feststellen. Es wurden 1,2 Mio. Personen mit annähernd 3 Mio. Impfdosen immunisiert und kein Fall von CU, MC oder anderen chronischen Darmerkrankungen konnte beobachtet werden. WAKEFIELD et al. (1995) konnten allerdings Nucleocapsid-Proteine von Masernviren im Gewebe von MC-Patienten nachweisen und sie vermuteten, MC könnte durch eine chronische, granulomatöse Vasculitis als Folge einer persistierenden Maserninfektion innerhalb des Endothels entstehen. Andere Studien kamen wiederum zu anderen Resultaten: MATSON et al. (1995) konnten nachweisen, dass die Granulome im Gewebe von Morbus Crohn-Patienten gewöhnlich nicht mit

Blutgefäßen in Verbindung stehen und in Granulomen konnten Masernviren nicht nachgewiesen werden (AFZAL et al., 2000).

Der Schwund von Helminthen ist ein unlängst aufgetretenes Phänomen der Industriegesellschaften. WEINSTOCK et al. (2002) legten dar, dass im Eifer der Parasitenbeseitigung ein wichtiger T-Zell regulierender Faktor eliminiert wurde, von dem das menschliche Immunsystem Mitarbeit erwartet. Bei Patienten mit Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa gerät die normalerweise streng kontrollierte Schleimhaut-assoziierte Immunreaktion außer Kontrolle und es kommt zu einer überschießenden TH1-Antwort. Die Lymphozyten TH1 und TH2 regulieren über die Ausschüttung von Zytokinen Entzündungsvorgänge und inhibieren sich gegenseitig. Zur Limitierung der Parasitenansiedlung ist bei einer Helmintheninfektion die Ausschüttung von TH2 erhöht. Diese Reaktion kann zu einer modulierenden Immunantwort gegenüber anderen parasitären, bakteriellen und viralen Infektionen führen (ELLIOTT et al., 2000 und 2004). Die Abwesenheit von Helminthen könnte ein wesentlicher Faktor zur Ausprägung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen sein.

2.6.1.1 *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* und Morbus Crohn

Ein Zusammenhang von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* und Morbus Crohn wird seit Anfang des 20. Jahrhunderts vermutet und seitdem kontrovers diskutiert. Von Thomas Dalziel wurde erstmals 1913 im British Medical Journal eine Ähnlichkeit der Johne'schen Erkrankung des Rindes und einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung des Menschen beschrieben (DALZIEL, 1913). Erst danach erschien die erste Publikation von Dr. Burril B.

Crohn und seinen Mitarbeitern im Mount Sinai Hospital über eine „regionale Ileitis“ unbekannter Ätiologie, die heute als Morbus Crohn bekannt ist (CROHN et al., 1932). Sie ähnelt der Johne'schen Erkrankung in klinischer Symptomatik, Pathologie und Epidemiologie. 1984 berichteten CHIODINI et al. zum ersten Mal von der Isolation zellwanddefekter MAP bei Morbus Crohn-Patienten: einem 15-jährigen Mädchen (Stamm Linda), einem 12-jährigen Jungen (Stamm Dominic) und einem 78-jährigen Mann (Stamm Ben). Es stellte sich heraus, dass diese Stämme genetisch identisch mit Rinderstämmen sind und Paratuberkulose bei jungen Ziegen auslösen können (VAN KRUININGEN et al., 1986). Seitdem wurde in zahlreichen Arbeiten MAP aus Darmgewebe von MC- und CU-Patienten sowie Kontrollen isoliert (CHIODINI et al., 1984; GITNICK et al., 1989; MOSS et al., 1992; SINGH et al., 2005), molekularbasiert nachgewiesen (SANDERSON et al., 1992; RIGGIO et al., 1997; RYAN et al., 2002; BERNSTEIN et al., 2003; AUTSCHBACH et al., 2005; ROMERO et al., 2005) oder eine Kombination beider Verfahren zum MAP-Nachweis eingesetzt (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Kultureller und molekularbiologischer Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Gewebeproben von Patienten mit Morbus Crohn

Probenart	Proben zahl	intakte MAP	Sphäroblasten -form	negative Proben	Medium	Dekonta- mination	DNA-Nachweis (PCR)	Ziel- Sequenz	Autoren
Darmbioptate	18		6	12	MG3	nicht angegeben	6 (33,3 %)	IS900	MOSS et al., 1992
Resektionsmaterial (Darmgewebe)	30	0	14	16	HEYM	nicht angegeben	14 (46,7 %)	IS900	WALL et al., 1993
Resektionsmaterial und Bioptate (Darmgewebe)	25	0	0	24	HEYM	HPC	1 (4,0 %)	IS900	CLARKSTON et al., 1998
Stuhlproben	32	8 (25,0 %)	0	PCR: 17 Kultur: 24	Löwenstein- Jensen	Hexadecyl- trimethyl ammonium bromid (CTAB)	15 (46,8 %)	IS900	DEL PRETE et al., 1998
Resektionsmaterial (Darmgewebe)	487	0	0	462	BECTEC 12B	HPC	25 (5,1 %)	IS900	COLLINS et al., 2000
Resektionsmaterial (Darmgewebe)	7	6 (86,0 %)	-	1	MBA 7H9 (MGIT & 12B BECTEC Bottle)	NALC	6 (86,0 %)	IS900	SCHWARTZ et al, 2000
Bioptate (Darmgewebe)	20	4 (20,0 %)	-	16			4 (20,0 %)		

HPC: Hexadecylpyridiniumchlorid MBA: Middlebrook Agar MGIT: Mycobacteria Growth Indicator Tube NALC: N-Acetyl-L-Cystein

PCR: Polymerase-chain-reaction -: nicht unterschieden zwischen intakten MAP und Sphäroblastenform

Fortsetzung Tabelle 3: Kultureller und molekularbiologischer Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Gewebeprobe von Patienten mit Morbus Crohn

Probenart	Probenzahl	intakte MAP	Sphäroblasten -form	negative Proben	Medium	Dekontamination	DNA-Nachweis (PCR)	Zielsequenz	Autoren
Darmbiopsiate	15 (MGIT) 37 (PCR)	9 (60,0 %)	-	6	MGIT	NALC	34 (92,0 %)	IS900	BULL et al., 2003
Blut	28	14 (50,0 %)	-	14	MBA 7H9 (MGIT & 12B BECTEC Bottle)	-	13 (46,0 %)	IS900	NASER et al., 2004
Biopsiate	30	19 (63,3 %)	-	11	MGIT	NaOH (2 %ig)	25 (83,3 %)	IS900	SECHI et al., 2005
Biopsiate	8	0	-	8	MBA 7H9 (BacT/ALE RT 3D System)	nicht angegeben	0	IS900	TADDEI et al., 2005a

HPC: Hexadecylpyridiniumchlorid MBA: Middlebrook Agar MGIT: Mycobacteria Growth Indicator Tube NALC: N-Acetyl-L-Cystein

PCR: Polymerase-chain-reaction -: nicht unterschieden zwischen intakten MAP und Sphäroblastenform

Wenn ein bestimmter Mikroorganismus Auslöser einer Erkrankung ist, ist davon auszugehen, dass das Immunsystem des Wirtskörpers zumindest in einigen Phasen der Krankheit auf dieses Agens reagiert. Antigene, die hier in Frage kommen, sind z. B. bestimmte Proteine, Glycolipide oder Ganzzellextrakte. Als besonders spezifisch gilt das Protein p43, das von der *Insertionssequenz* 900 codiert wird. Der Nachweis eines Antikörpertiters hat jedoch nur geringe Aussagekraft, da ein Titeranstieg auch bei anderen pathogenen Keimen beobachtet werden kann, ohne dass die Person jemals klinisch erkrankt gewesen wäre (z. B. bei *L. monocytogenes*) (HAMMER und KNAPPSTEIN, 1998). Bei der Paratuberkulose des Rindes tritt eine Serokonversion erst relativ spät im Verlauf der Erkrankung (im Alter von 2-3 Jahren) und nicht bei allen Tieren auf (KÖHLER et al., 2003), so dass auch falsch-negative Ergebnisse denkbar sind. Tabelle 4 zeigt Ergebnisse einiger serologischer Untersuchungen von MC-Patienten und Kontrollprobanden. Die Studiendesigns sind in Bezug auf die Zielantikörper und die Kontrollgruppen, die aus gesunden Blutspendern und Patienten mit Colitis ulcerosa und anderen Darmerkrankungen zusammengesetzt sind, sehr unterschiedlich. Kontrollprobanden sind auffällig seltener positiv für MAP-spezifische Antikörper, die Ergebnisse sind jedoch nicht immer statistisch signifikant verschieden.

Tabelle 4: Nachweishäufigkeit von Antikörpern gegen *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* bei Morbus Crohn-Patienten und Kontrollen

Anzahl MC- Patienten	Anzahl Kontrollen	Antigen	Test- Verfahren	Ergebnisse				Autoren
				MC-Patienten		Kontrollen		
				pos.	neg.	pos.	neg.	
5	-	lösl. Ganzzellextrakt	ELISA	2 (40,0 %)	3 (60,0 %)	-	-	PRANTERA et al., 1989
108	149	protoplasmatisches Antigen	ELISA	4 (3,7 %)	104 (96,3 %)	3 (2,0 %)	146 (98,0 %)	BRUNELLO et al., 1991
29	18	38 kD u. 24 kD Bande M. para Extrakt, 18 kD Bakterioferritin	ELISA	5 (17,2 %)	24 (82,8 %)	k. A.	k. A.	ELSAGHIER et al., 1992
38	45	lösl. Ganzzellextrakt	ELISA	6 (15,8 %)	32 (84,2 %)	4 (8,9 %)	41 (91,1 %)	STAINSBY et al., 1993
13	12	hsp-65K	Immuno- blotting	7 (53,8 %)	6 (46,2 %)	5 (41,7 %)	7 (58,3 %)	EL-ZAATARI et al., 1995
40	21	18 kD Bakterioferritin	ELISA	0	40 (100 %)	0	21 (100 %)	WALMSLEY et al., 1996
61	47	p35 und p36	Immuno- blotting	47 (77,0 %)	14 (23,0 %)	0 (0 %)	47 (100 %)	NASER et al., 1999a
13	20	protoplasmatisches Antigen	ELISA	5 (38,5 %)	8 (61,5 %)	1 (5,0 %)	19 (95,0 %)	SUENAGA et al., 1999

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Essay IgA: Immunglobulin A IgG: Immunglobulin G k. A.: keine
Angaben kD: kilo Dalton MC: Morbus Crohn-Patienten neg.: Anteil negativer Probanden pos.:
Anteil positiver Probanden -: keine Kontrollgruppe vorhanden

Fortsetzung Tabelle 4: Nachweishäufigkeit von Antikörpern gegen *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* bei Morbus Crohn-Patienten und Kontrollen

Anzahl MC-Patienten	Anzahl Kontrollen	Antigen	Test-Verfahren	Ergebnisse				Autoren
				MC-Patienten		Kontrollen		
				pos.	neg.	pos.	neg.	
53	35	p35-Antigen	SDS-Immuno-blotting	40 (75,0 %)	13 (15,0 %)	5 (14,0 %)	30 (86,0 %)	NASER et al., 2000b
89	50	p36-Antigen		79 (89,0 %)	10 (11,0 %)	7 (14,0 %)	43 (86,0 %)	
10	-	AhpC	ELISA	10 (100 %)	0	-	-	OLSEN et al., 2001
		AhpD						
		14kD Antigen						
283	402	k. A.	ELISA	106 (37,8 %)	177 (62,2 %)	135 (33,6 %)	267 (66,4 %)	BERNSTEIN et al., 2004
50	44	<i>IS900</i> -GST (anti- <i>IS900</i>)	ELISA	IgA: 22 (44,0 %) IgG: 24 (48,0 %)	IgA: 28 (56,0 %) IgG: 26 (52,0 %)	0	44 (100 %)	NAKASE et al., 2006

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Essay IgA: Immunglobulin A IgG: Immunglobulin G k. A.: keine Angaben kD: kilo Dalton MC: Morbus Crohn-Patienten neg.: Anteil negativer Probanden pos.: Anteil positiver Probanden
-: keine Kontrollgruppe vorhanden

DEL PRETE et al. (1998) konnten nachweisen, dass Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen den Erreger im Stuhl ausscheiden und NASER et al. (2000a) gelang die MAP-Isolierung aus der Muttermilch von 2 MC-Patientinnen. Ein weiterer Meilenstein war der kulturelle Nachweis aus dem Blut von MC- und CU-Patienten sowie von Kontrollprobanden (NASER et al., 2004). Auch frappierende Einzelberichte werden in die Diskussion um MAP und MC eingebracht. So entwickelte ein zuvor gesunder siebenjähriger Junge 1988 eine zervikale Lymphadenitis. Die gängige antituberkulöse Behandlung zeigte keinen Erfolg und die vergrößerten Lymphknoten wurden reseziert. Fünf Jahre später zeigte der Patient starke Veränderungen im terminalen Ileum und im Colon und die Diagnose MC wurde gestellt. Nach einem Jahr Behandlung mit den speziell gegen MAP gerichteten Antibiotika Rifabutin und Clarithromycin heilte die Entzündung aus. In der zurückbleibenden Narbe konnte molekularbasiert MAP nachgewiesen werden (HERMON-TAYLOR et al., 1998). Zudem wurde von RICHTER et al. (2002) behauptet, dass MAP Todesfälle bei immunsupprimierten Patienten auslösen kann. Bemerkenswert ist auch die Krankheitsgeschichte eines deutschen Tierarztes, der nach der Diagnose „Morbus Crohn“ sein Blut mit einem Paratuberkulosestest für Rinder untersuchen ließ. Aufgrund des deutlich positiven Ergebnisses ließ er sich von Prof. Dr. Hermon-Taylor auf MAP untersuchen und anschließend antibiotisch behandeln. Nach zwei Jahren Therapie war der Patient klinisch gesund und die mikrobiologischen Untersuchungen fielen nunmehr negativ aus (ANONYMOUS, 2005b).

Zahlreiche Untersuchungen haben sich mit der Wirksamkeit von Antibiotika bei MC-Patienten beschäftigt. Es wurden sowohl deutliche Erfolge (PRANTERA et al., 1996; GREENBLOOM et al., 1998; PRANTERA et al., 2006) als auch Misserfolge (THOMAS et al., 1998) verzeichnet. Die Beteiligung von Mykobakterien voraussetzend, wurden in verschiedenen Studien entsprechend wirksame Antibiotika wie etwa Makrolide in verschiedenen Kombinationen und über längere Zeiträume hinweg verabreicht. Bei vielen Patienten verbesserte sich das Krankheitsbild dadurch deutlich (THAYER, 1992; GUI et al., 1997; SHAFRAN et al., 2002). In einer aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass Methotrexat und 6-Mercaptopurin, zwei häufig in der MC-Behandlung angewandte Immunmodulatoren, das MAP-Wachstum *in vitro* hemmen. Die Autoren sehen die Ergebnisse als Bestätigung des Zusammenhangs von MC und MAP (GREENSTEIN et al., 2007).

Morbus Crohn kommt bei allen Bevölkerungsgruppen vor. Studien, die eine besondere Häufung, z. B. bei Landwirten oder Tierärzten erkennen ließen, liegen bisher nicht vor. Im Gegenteil, trotz erhöhter Exposition von Landwirten (CHERNEY und COLLINS, 1996), lassen sich keine Assoziationen von MC- bzw. CU-Fällen und dem Vorkommen von Paratuberkulose auf Farmen beobachten (JONES et al., 2000 und 2006). Obwohl die Paratuberkulose in Schweden praktisch nicht vorkommt (STERNBERG et al., 2002; STERNBERG und VISKE, 2003; STERNBERG et al., 2005) ist die Prävalenz und Inzidenz von Morbus Crohn dort vergleichbar mit Ländern hoher Prävalenzdaten für Paratuberkulose (HRUSKA et al., 2005). Laut HERMON-TAYLOR und EL-ZAATARI (2004) ist es unwahrscheinlich, dass Menschen, die dieselben

geographischen Gebiete mit Tierpopulationen teilen, die weitgehend durchseucht sind, diesem robusten und wandlungsfähigen Bakterium nicht ausgesetzt sind. Trotzdem scheinen Bewohner urbaner Populationen häufiger betroffen zu sein (MAHMUD und WEIR, 2001). Dafür kann eine genetische Prädisposition mancher Individuen verantwortlich sein. Mutationen auf dem Chromosom 16, bekannt als NOD2/CARD15 werden mit MC assoziiert (HAMPE et al., 2001; HUGOT et al., 2001; OGURA et al., 2001). Additiv muss eine Umweltkomponente von Bedeutung sein, denn Migranten, die aus einer Region geringer in eine Umgebung mit hoher MC-Prävalenz umsiedeln, erkranken mit gleicher Häufigkeit, wie die alteingesessene Bevölkerung (PROBERT et al., 1993; VAN GOSSUM et al., 1996).

Bei der Ursachenforschung von Morbus Crohn unterscheidet sich MAP von allen anderen verdächtigen Mikroorganismen durch seine Eigenschaft bei einem weiten Speziesspektrum – Primaten eingeschlossen – chronische Entzündungen im Magen-Darm-Trakt hervorzurufen. Seine Gegenwart bei der Mehrheit von MC-Patienten legt Kausalität nahe. Allerdings kann gegenwärtig nicht ausgeschlossen werden, dass MAP nicht als Ursache, sondern als Konsequenz einer chronischen Entzündung mit erhöhter Darmpermeabilität nachzuweisen ist. Bezüglich der Annahme einer kausalen Verbindung zwischen MAP und MC existieren widersprüchliche Untersuchungen mit jeweils niedrigem Evidenzniveau. Dies ist auch die Schlussfolgerung einer ausführlichen Literaturstudie des RKI in Zusammenarbeit mit dem BFR (SCHRAUDER et al., 2003). Hierbei zeigte sich, dass die Mehrzahl der bisher durchgeführten Studien starke methodische Schwächen aufwies. So fanden sich keine Arbeiten, die

den Kriterien einer Fall-Kontroll-Studie entsprachen. Lediglich die Studie von THOMAS et al. (1998) entspricht den Kriterien einer Kohortenstudie. Zudem waren keine Reviews zu finden, die den formalen Vorgaben eines systematischen Reviews genügen. Die meisten Übersichtsarbeiten verfolgten das Ziel, die bestehenden Kenntnisse zusammenzufassen bzw. die Problematik eines möglichen Zusammenhangs zu diskutieren. Keine der Arbeiten kommt zusammenfassend zu einer eindeutigen Bewertung. Alle gemeinsam beschreiben jedoch die widersprüchlichen Ergebnisse, die unzureichende Evidenz und die Notwendigkeit für weitere Studien.

2.6.2 Epidemiologie und ökonomische Aspekte chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen

Der Morbus Crohn ist neben der Colitis ulcerosa die bekannteste chronisch entzündliche Darmerkrankung. In der Häufigkeit des Morbus Crohn liegt Deutschland mit 5,2 pro 100 000 Einwohner im Durchschnitt Europas, das bei einer jährlichen Inzidenz von 5,6 pro 100 000 liegt. Die jährlichen Neuerkrankungen für Colitis ulcerosa werden mit 10,4 pro 100 000 Einwohner angegeben (SHIVANANDA et al., 1996, TIMMER et al., 1999). Die Deutsche Crohn und Colitis Vereinigung e. V. rechnet mit ca. 320 000 Patienten entzündlicher Darmerkrankungen in Deutschland (ANONYMOUS, 2007). Nach neuesten Schlussfolgerungen ist es wahrscheinlich, dass 400 000 Personen in den USA an Morbus Crohn leiden. Das bedeutet bei 270 Mio. Einwohnern eine Prävalenz von 148 Fällen pro 100 000 Einwohner. Andere Länder mit einer hohen Prävalenz sind Kanada, Schweden, Norwegen, England, die Niederlande, Belgien, Frankreich, die Schweiz, Österreich, Spanien, Portugal,

Griechenland, Italien, Irland, Australien, Neuseeland und viele andere Länder in Ost- und Zentraleuropa (HRUSKA et al., 2005). In Schottland hat die Inzidenz im Vergleich zu 1993 bei Kindern um 30 % zugenommen (ARMITAGE et al., 2001). Eine steigende Inzidenz für Morbus Crohn konnte außerdem in Dänemark (FONAGER et al., 1997), Minnesota, USA (LOFTUS et al., 1998) und im nördlichen Stockholm (HILDEBRAND et al., 2003) beobachtet werden. Die weltweit höchste Inzidenz und Prävalenz für Morbus Crohn und Colitis ulcerosa wurde für Manitoba, Kanada beschrieben (BERNSTEIN et al., 1999). Für die verschiedenen Länder sind Prävalenz- und Inzidenzdaten für Morbus Crohn in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Inzidenz- und Prävalenzdaten pro 100 000 Einwohner für die chronisch-entzündliche Darmerkrankung Morbus Crohn in Europa, Nordamerika und Asien

Land	Prävalenz	Inzidenz	Quelle
Europa	-	5,6	SHIVANANDA et al., 1996
Deutschland	122 – 201	5,2	ANONYMOUS, 2007; TIMMER et al., 1999
England (Norden)	144,8	8,3	RUBIN et al., 2000
Frankreich (Nordwesten)	-	9,2	SHIVANANDA et al., 1996
Griechenland (Nordwesten)	-	0,9	SHIVANANDA et al., 1996
Italien (Florenz)	40	3,4	TRALLORI et al., 1996
Spanien	19,8	1,6	MATE-JIMINEZ et al., 1994
Niederlande	-	9,2	SHIVANANDA et al., 1996
Island	-	5,5	BJORNSSON und JOHANSSON, 2000
USA	148	3,6	KURATA et al., 1992
Kanada (Manitoba)	198,5	15,6	BERNSTEIN et al., 1999; BLANCHARD et al., 2001
Japan	5,8	0,5	MORITA et al., 1995

Der Beginn der Erkrankungssymptome liegt im Mittel bei 30 Jahren (TIMMER et al., 1999), d.h. die Patienten sind häufig während ihrer gesamten beruflichen Laufbahn von der Erkrankung betroffen. Dementsprechend belasten sowohl die direkten medizinischen Kosten als auch die Arbeitsausfälle durch rezidivierende Schübe oder chronische Aktivität das Sozialwesen mit erheblichen Kosten. SILVERSTEIN et al. (1999) haben die lebenslangen Kosten für einen repräsentativen Morbus Crohn-Patienten in den USA ermittelt. Sie kommen auf einen arithmetischen Mittelwert von \$ 125 404 und auf einen Median von \$ 39 906. Die höchsten Kosten werden durch chirurgische Eingriffe verursacht. In einer deutschen Studie schätzten ROSCH et al. (2002) mit einem spezifischen Kostentagebuch für CED-Patienten die Ausgaben für vier Wochen auf 1 500 € und für ein Jahr auf 20 000 €. 69 % der Kosten fallen als indirekte Kosten an (Produktivitätsverluste), 27 % als direkte medizinische Kosten und 4 % als direkte nicht-medizinische Kosten. Ebenfalls mit Hilfe eines Kostentagebuchs ermittelten STARK et al. (2006) die in Deutschland mit der Krankheit assoziierten Kosten für vier Wochen. Im Mittel wurden 1 425 € von Morbus Crohn-Patienten und 1 015 € von Colitis ulcerosa-Patienten für Gesundheitsvorsorge, Arzneimittel, Krankheitsausfall und eigene medizinische Auslagen aufgewendet. 64 % der Gesamtkosten fallen dabei als indirekte Kosten (frühere Pensionierung, Krankheitsausfall) und 32 % als direkte medizinische Kosten bei MC-Patienten gegenüber 41 % direkten medizinischen Kosten und 54 % indirekten Kosten bei CU-Patienten an.

2.6.3 Diagnostik chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen

Die Diagnose einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung ergibt sich immer aus der Berücksichtigung von Klinik, Laborbefunden und bildgebenden Verfahren. In der Regel reicht hierzu ein einzelner diagnostischer Aspekt nicht aus. Besonders initial kann die Differentialdiagnose zur infektiösen, selbst-limitierenden Darmerkrankung manchmal schwierig und oft nur über den Krankheitsverlauf zu stellen sein (HERRLINGER und STANGE, 2003).

2.6.3.1 Morbus Crohn

In der Akut- und Verlaufsdagnostik des Morbus Crohn sind die Bestimmung von C-reaktivem Protein, Thrombozyten, Hämoglobin/Hämatokrit sowie Leukozyten sinnvoll. Weitere Parameter wie das Differentialblutbild und Albumin können ergänzende Funktion ausüben. Der transabdominelle Ultraschall eignet sich zum Nachweis entzündlicher Darmwandveränderungen und dient der Detektion von Fisteln, Abszessen und Stenosen (ANONYMOUS, 2003). Mit Hilfe der rektalen Endosonographie lassen sich perianale Fisteln und Abszesse sowie deren Beziehung zu umgebenden Strukturen gut darstellen (VON TIRPITZ et al., 2004). Eine Ileoskopie mit Segmentbiopsien ist unbedingter Bestandteil der Initialdiagnostik und auch vor elektiven Darmoperationen indiziert. Sie ist im Verlauf nicht regelmäßig erforderlich, jedoch bei jeder akuten Symptomatik bzw. vor einer neuen antientzündlichen Therapie anzuraten. Eine obere endoskopische Diagnostik sollte in der Primärdiagnostik bei jedem Patienten erfolgen. Der Nutzen eines Überwachungsprogramms mit Ileoskopie

zur Früherkennung eines Karzinoms ist bei Colitis Crohn ungeklärt (ANONYMOUS, 2003).

Im Rahmen der Diagnostik bilden histologische Untersuchungen von Mukosabioptaten einen wichtigen Baustein. Dafür sind Biopate aus makroskopisch auffälligen und unauffälligen Arealen zu entnehmen. Um die Möglichkeiten der histopathologischen Differentialdiagnostik effizient nutzen zu können, sind erforderlich: Biopate aus mindestens fünf verschiedenen anatomischen Segmenten des gesamten Kolons einschließlich des Rektums, Biopate aus dem terminalen Ileum und aus dem oberen Magen-Darm-Trakt (ANONYMOUS, 2003). Die mukosabioptische Diagnostik unterliegt dabei bestimmten Voraussetzungen, ihren Möglichkeiten stehen auch gewisse Grenzen gegenüber. Zu den Voraussetzungen gehören: Kenntnisse über die Personalien (Geschlecht, Alter), die Anamnese, die Therapieanamnese, den makroskopischen (endoskopischen) Befund, sowie eine ausreichende Anzahl von Biopaten aus möglichst verschiedenen Abschnitten. Nur vor dem Hintergrund ausreichender Informationen und Biopaten ist der mikroskopische Befund individuell zu interpretieren. Die Diagnose eines MC orientiert sich am Phänotyp der Erkrankung. Klinischer und histopathologischer Phänotyp sind dabei keineswegs kongruent (VON HERBAY, 1999). Ein morphologischer Einzelbefund ist weder makroskopisch noch mikroskopisch ausreichend um die Diagnose zu etablieren. Erst anhand einer charakteristischen Konstellation von Befunden ist dies möglich. Manche der charakteristischen Veränderungen beim MC sind tiefer in der Darmwand ausgebildet, als mittels Mukosabiopsie erfassbar (HAMILTON, 1991; VON HERBAY, 1996). Es ist aber möglich

anhand von Mukosabioptaten die Diagnose eines MC zu stellen (TANAKA et al., 1999; VON HERBAY, 1999). Wenn stufenweise entnommene Bioptate aus allen anatomischen Segmenten des Dickdarms (Caecum, Ascendens, Transversum, Descendens, Sigma, Rektum) untersucht werden, ist die histopathologische Diagnosestellung eines MC mit einer Sensitivität und Spezifität bis zu 86 % möglich. Obwohl ein kleiner Anteil Morbus Crohn-Patienten eine makroskopisch diffuse und kontinuierliche Verteilung der pathologischen Veränderungen zeigt, ist histologisch nur eine multifokale oder segmentale Verbreitung zu beobachten. Leitbefunde im Rahmen von Biopsien sind eine diskontinuierliche Störung der Kryptenarchitektur, in Kombination mit diskontinuierlicher Infiltration der Mukosa durch Lymphozyten und Plasmazellen (TANAKA et al., 1999). Charakteristische endoskopisch erfassbare Veränderungen sind zudem die diskontinuierliche und segmentale Ausbreitung im Darm, wobei ein Nebeneinander gesunder und erkrankter Darmabschnitte zu beobachten ist, und aphtoide Läsionen, die zu länglichen fissuralen Ulzerationen („Schneckenpurulzerationen“) konfluieren können. Obwohl das terminale Ileum am häufigsten betroffen ist, kann der gesamte Magen-Darm-Trakt befallen sein (VON TIRPITZ et al., 2004).

Mit Hilfe der Röntgenuntersuchung nach Sellink lassen sich auch proximal lokalisierte entzündliche Veränderungen des Dünndarms nachweisen. Im Rahmen der Erstdiagnose kann eine Röntgenuntersuchung zur Evaluierung des Befallsmusters indiziert sein. Sie besitzt außerdem eine hohe Sensitivität beim Nachweis von Stenosen und enteroenteralen Fisteln (VON TIRPITZ et al., 2004).

Die Remission des MC wird klinisch definiert. Kriterien für diese Definition sind fehlende klinische Zeichen und Symptome eines MC (Bauchschmerzen, Diarrhöe, Fistelsekretion, andere intestinale und extraintestinale Symptome).

Ein Rezidiv liegt vor, wenn wieder klinische Zeichen und Symptome des MC aufgetreten sind (ANONYMOUS, 2003).

2.6.3.2 Colitis ulcerosa

Das Leitsymptom der Colitis ulcerosa sind blutige Durchfälle (VON TIRPITZ et al., 2004). Häufig werden blutige Diarrhöen, erhöhte Stuhlfrequenz, vermehrter Stuhldrang, nächtliche Defäkation, Tenesmen, das Gefühl der unvollständigen Stuhlentleerung und Fieber beschrieben. Sowohl in der initialen Diagnostik als auch im Verlauf ist die Bestimmung der Entzündungsaktivität, repräsentiert durch C-reaktives Protein, und ein Blutbild aussagekräftig. Die Bestimmung des Blutbildes dient der Aktivitätseinschätzung (insbesondere Hämatokrit) und kann darüber hinaus Hinweise auf infektiöse Komplikationen (Leukozytose) und Mangelerscheinungen geben. Die Bestimmung von γ -GT und Alkalischer Phosphatase (AP) dient der Erkennung einer primär sklerosierenden Cholangitis. Bakteriologische Stuhluntersuchungen auf pathogene Keime und *Clostridium difficile*-Toxin A sind initial und beim fulminanten Schub im Rahmen einer Ausschlussdiagnostik obligat. Im Einzelfall sind sie auch beim Rezidiv notwendig. Gegebenenfalls sind bei klinischem Verdacht ergänzende mikrobiologische Untersuchungen in Serum, Stuhl und Biopsaten erforderlich (z. B. Amöben, Parasiten etc.). Zur Initialdiagnostik gehört auch eine komplette Ileokoloskopie mit Biopsie aus dem terminalen Ileum und jedem Kolonsegment,

unabhängig vom Befallsmuster. Bei der akuten schweren initialen Erkrankung kann eine Sigmoidoskopie zunächst ausreichend sein. Im Rahmen der Diagnosesicherung bilden histologische Untersuchungen von Biopstaten einen wichtigen Baustein. Um die Möglichkeiten der histopathologischen Differentialdiagnostik effizient nutzen zu können, sind erforderlich: Biopsien aus dem terminalen Ileum, dem Rektum und jedem Kolonsegment aus makroskopisch betroffenen und makroskopisch freien Abschnitten des Kolons, Berücksichtigung von Informationen über die vorausgegangene Therapie und Diagnostik, Berücksichtigung von Informationen über die Krankheitsdauer, Berücksichtigung des Endoskopiebefundes (ANONYMOUS, 2004). Unter Verwendung von hochfrequenten Ultraschallscannern und bei entsprechender Erfahrung des Untersuchers ist es bei einer Darmwandsonographie möglich, Darmwandverdickungen als Zeichen der Entzündung darzustellen. Der Ultraschall hat als Screeningmethode eine Sensitivität von 90 %, sie kann aber die Ileoskopie mit Biopsie im Rahmen der Primärdiagnose und im Verlauf zum Nachweis von Dysplasien nicht ersetzen. Im Verlauf der Erkrankung kann die Darmwandsonographie Hinweise auf die Ausbreitung der Colitis ulcerosa liefern, sie korreliert jedoch nicht mit der Krankheitsaktivität (VON TIRPITZ et al., 2004).

2.6.4 Therapie chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen

2.6.4.1 Morbus Crohn

Da weder chirurgische noch medikamentöse Maßnahmen eine vollständige Heilung herbeiführen können, ist das primäre Ziel einer Therapie wenigstens

eine Remission einzuleiten und zu erhalten. Die Milderung der Symptome und die Verbesserung der Lebensqualität des Patienten ist die höchste Intention (SIEGMUND und ZEITZ, 2005). Das zur Verfügung stehende medikamentöse Handwerkszeug umfasst antiinflammatorische Arzneimittel (Aminosalizylate und Steroide), Antibiotika und Immunmodulatoren (Azathioprin, 6-Mercaptopurin, Cyclosporin und Methotrexat). Diese Medikamente supprimieren Entzündungsprozesse unspezifisch. Ihre Effizienz ist limitiert und sie besitzen deutliche Nebenwirkungen (MARTÍNEZ-MONTIEL und MUNOZ-YAGÜE, 2006). Ein therapeutischer Ansatz zielt auf Zytokine, ihre Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle ab. Infliximab ist ein chimärer monoklonaler Antikörper gegen den Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α), welcher die Therapie von MC dramatisch verändert hat. Er leitet eine Remission effektiv ein und kann sie aufrechterhalten (NAKAMURA et al., 2006). Seine Effektivität konnte ebenfalls für enterokutane Fisteln und extraintestinale Symptome gezeigt werden (HOMMES et al., 2006).

Die Wahl des Therapieverfahrens hängt von der Krankheitsphase ab, in dem sich der Patient befindet. Im akuten Schub ist die initiale Therapie abhängig vom Schweregrad des Schubes (Klinik und Labor) sowie der Lokalisation der Erkrankung und dem Vorliegen von Komplikationen. Bei Verdacht auf Abszess oder Perforation und bei Vorliegen eines Subileus, ausgeprägter Fisteln oder eines Megakolons ist das therapeutische Vorgehen kooperativ zwischen Internisten/Gastroenterologen und Chirurgen festzulegen (ANONYMOUS, 2003). Bei einem leichten bis mäßig schweren Schub ist ein Therapieversuch mit 5-Aminosalicylsäure gerechtfertigt (PODOLSKY, 2002). Bei Nicht-

Ansprechen können topische Steroide, wie Budesonid verabreicht werden. Sind Patienten damit leicht in Remission zu bringen und v. a. lange Zeit zu halten, kann Remissionserhaltung mit 5-ASA-Präparaten versucht werden (OCHSENKÜHN et al., 2003).

Die Indikation zur Ernährungstherapie, insbesondere der Anwendung von Elementardiäten oder einer kompletten parenteralen Ernährung, ergibt sich bei ausgeprägter Malabsorption, enteralen Eiweißverlusten und Kachexie. Vor allem bei Morbus Crohn besitzt bereits die alleinige Ernährungstherapie einen antiinflammatorischen Effekt. Zudem wurde bei 80 % kindlicher Morbus Crohn-Patienten durch alleinige Ernährungstherapie ein Übergang in die Remissionsphase erzielt (HYAMS, 1996; HYAMS, 2000; WALKER-SMITH, 2000; KIRSCHNER, 1996).

Der chronisch aktive MC sollte in erster Linie mit der langfristigen Anwendung von Azathioprin oder 6-Mercaptopurin behandelt werden. Medikament der zweiten Wahl ist Methotrexat. Antibiotika sind beim chronisch-aktiven Verlauf nicht indiziert. Eine enterale oder parenterale Ernährung hat in besonderen Ausnahmefällen einen Stellenwert in der Behandlung des chronisch-aktiven Verlaufs. Eine Indikation zum operativen chirurgischen Eingriff mit der Resektion von Darmabschnitten ist nur bei postprandialen Schmerzen, bei auf konservative Therapie refraktärem Subileus sowie bei Colonstenosen unklarer Dignität gegeben (ANONYMOUS, 2003).

Ein weiterer Erfolg versprechender Ansatz besteht in der Therapie mit *Trichuris suis*-Eiern. 29 Morbus Crohn-Patienten im aktiven Krankheitsschub nahmen im

Abstand von drei Wochen jeweils 2 500 lebendige *Trichuris suis*-Eier für die Dauer von 24 Wochen auf. Bei 23 (79,3 %) konnte eine Linderung der Symptomatik und bei 21 (72,4 %) Probanden sogar eine vollständige Remission der Krankheit beobachtet werden (SUMMERS et al., 2005b). In einer anderen, randomisierten, doppelt blinden und Placebo-kontrollierten Untersuchung wurden 54 Personen mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen *Trichuris suis*-Eier oder ein Placebo im Abstand von zwei Wochen über einen Zeitraum von 12 Wochen eingegeben. Eine Besserung konnte bei vier von 24 (16,7 %) Patienten nach Placebothherapie und bei 13 von 30 (43,3 %) Personen nach Einnahme von Parasiteneiern beobachtet werden (SUMMERS et al., 2005a).

2.6.4.2 Colitis ulcerosa

Die Wahl des richtigen Medikamentes und die Applikationsform richten sich nach der Entzündungsaktivität und dem Befallsmuster der Erkrankung (VON TIRPITZ et al., 2004; CASPARY und WEHRMANN, 2005). Ein Schub leichter bis mittlerer Aktivität bei distaler Colitis ulcerosa (CU) soll bevorzugt topisch mit Aminosalizylaten therapiert werden: bei Proktitis mit Zäpfchen, bei Prokto-sigmoiditis mit Klysmen oder Schäumen. Bei Ausdehnung bis zur linken Flexur erscheint eine Kombination mit einem oralen Aminosalizylat sinnvoll. Die Primärbehandlung des schweren Schubes einer distalen Colitis sollte mit systemisch wirksamen oralen Steroiden in Kombination mit lokaler Anwendung von Mesalazin erfolgen. Bei einem leichten bis mittleren Schub einer ausgedehnten CU werden orale Aminosalizylate, bei einem schweren Schub systemisch Steroide eingesetzt. Orale systemische Steroide sind aufgrund ihrer

Nebenwirkungen nicht als Dauertherapie indiziert. Der Therapieerfolg wird anhand der Besserung der Symptome beurteilt (ANONYMOUS, 2004). Eine CU ist im Gegensatz zum MC grundsätzlich durch eine Operation heilbar. Die Indikation zur Proktokolektomie mit ileoanaler Pouchanlage wird bei Patienten gestellt, bei denen histologisch Dysplasien im Kolon nachgewiesen wurden und bei therapierefraktären Krankheitsverläufen (VON TIRPITZ et al., 2004). Parenterale oder enterale künstliche Ernährung und besondere Diätformen sind nicht wirksam, gelegentlich aber zur Verbesserung des Ernährungszustandes sinnvoll. Bei schweren Schüben ist die Hypalbuminämie durch Gabe von Humanalbumin, die Anämie durch Transfusionen zu behandeln (CASPARY und WEHRMANN, 2005).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Referenz- und Kontrollstämme

Zur Bewertung von Nährmedien und Dekontaminationsverfahren sowie als Positiv- bzw. Negativkontrollen wurden folgende Mykobakterienstämme eingesetzt:

Tabelle 6: Verwendete Referenz- und Kontrollstämme

Spezies	Stamm- Bezeichnung	Herkunft	Quelle/Bezug
<i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	Feldisolat (423)	Rinderkot	Landesuntersuchungsamt Koblenz, Dr. Dräger
<i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	Hum1	Humanisolat	Department of Cardiovascular Medicine [Crohn's Disease Group] London, Dr. T. Bull
<i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	DSMZ-Nr. 44133	Rinderkot	Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Jena, Dr. Heike Köhler
<i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>	DSMZ-Nr. 44135	Rinderkot	Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Jena, Dr. Heike Köhler
<i>M. fortuitum</i> ssp. <i>fortuitum</i>	DSMZ-Nr. 46621	Mensch (Abszess)	Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Jena, PD Dr. Irmgard Moser
<i>M. scrofulaceum</i>	DSMZ-Nr. 43992	Mensch (zervikaler Lymphknoten)	Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Jena, PD Dr. Irmgard Moser

DSMZ: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

Die Stämme wurden freundlicherweise von oben genannten Personen zur Verfügung gestellt.

3.2 Vergleichende Untersuchungen zum kulturellen Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*

Um das bestmögliche Nährmedium zur Anzucht von MAP zu finden, wurden sowohl klassische als auch bisher unbeachtete Nährmedien neuerer Rezeptur hinsichtlich ihrer Eignung verglichen. Dabei wurden neben den Kosten und der Handhabung der Medien, besonders der Zeit bis zum frühesten Nachweis von Kolonien und der Produktionsleistung (Koloniezahl) Aufmerksamkeit geschenkt. Die Nährmedien sollten für den Direktnachweis von MAP aus verschiedenen Matrices (Rinderkot, Rindergewebe, humanem Gewebe und Lebensmitteln), für die Subkultivierung und die Stammhaltung eingesetzt werden. Alle eingesetzten Medien wurden vor ihrem Einsatz einer Qualitätskontrolle unterzogen, d.h. mindestens 1 % jeder neuen Charge wurde nach den Angaben des Herstellers überprüft.

Unter den fünf vergleichend untersuchten Medien befanden sich vier Schrägnährmedien und ein in Petrischalen gegossener Nährboden. Davon wurden zwei Festmedien in der institutseigenen Nährbodenküche hergestellt und drei jeweils gebrauchsfertig vom Hersteller bezogen. Das Middlebrook 7H10-Agarmedium wurde mit dem Basispulver der Firma Becton Dickinson® (262710) in Petrischalen ohne Nocken gegossen. Mycobactin J (112407, Synbiotics Europe SAS) und BBL OADC (Ölsäure, Dextrose und Katalase [Becton Dickinson, 212240]) sowie das antibiotische Gemisch BBL MGIT

PANTA (Becton Dickinson, 245114) wurden zugefügt. Das eigelbhaltige Herrol'd's Egg Yolk-Schrägmedium (HEYM) mit Mycobactin J und ANV (Amphotericin B, Nalidixinsäure, Vancomycin; Becton Dickinson[®], 222233) wurde gebrauchsfertig bezogen. Das Löwenstein Jensen-Medium (LJ) wurde mit der Basis der Firma Becton Dickinson[®] und mit dem Zusatz von Mycobactin J hergestellt. Dieses Volleimedium wurde in der institutseigenen Nährbodenküche in Schraubröhrchen aus Glas (02.352.1000, Nerbe Plus GmbH) gegossen. Der Stonebrink-Nährboden (Bioservice Waldenburg[®], A32) ist ein Volleimedium ohne Glycerin und mit Piperacillin, Amphotericin, Colistinsulfat und Trimethoprim (PACT). Er wird kommerziell als mycobactinhaltiges Schrägmedium mit Belüftungsverschluss angeboten. Die Firma Artelt-ENCLIT[®] (0124) bietet einen verwendungsbereiten Paratuberkulose-Nährboden mit Glycerin und Mycobactin J, aber ohne Pyruvat an. Eine Übersicht der im Vergleich eingesetzten Medien ist in Tabelle 7 dargestellt. Die Zusammensetzung dieser Nährböden ist in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 7: Feste Kultivierungsmedien zum Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* bei eigenen Untersuchungen

Bezeichnung	Akronym	Firma	Eianteil	Aufbereitung
Herrold's Egg Yolk Agar	HEYM	Becton Dickinson	Eigelb	Schrägmedium
Löwenstein-Jensen-Medium	LJ	Basis von Becton Dickinson	Vollei	Schrägmedium
Middlebrook 7H10-Agar, mod.	MBA	Basis von Becton Dickinson	-	Platten
Stonebrink-Nährboden	SB	Bioservice Waldenburg GmbH	Vollei	Schrägmedium
Paratuberkulose-Nährboden	ENCLIT	Artelt-ENCLIT	Vollei	Schrägmedium

Tabelle 8: Zusammensetzung gebräuchlicher Nährmedien für den Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (Angaben pro Liter Nährmedium)

	Herrold's Egg Yolk Agar	Löwenstein- Jensen Medium	Middlebrook 7H10- Medium	Paratuberkulose- Nährboden (ENCLIT)	Stonebrink (keine Mengenangaben durch Hersteller)
Basis					
Agar	15,3 g		15 g		
Dextrose			2 g		
Pankreatisch abgebautes Kasein	9,0 g				
Salzlösung				330 ml	
Supplemente					
Ammoniumsulfat			0,5 g		
Asparagin		5,76 g	0,5 mg	6,0 g	-
Biotin					
Brenztraubensäure		10,0 g			
Calciumchlorid			0,05 mg		
L-Glutaminsäure			0,5 g		
Glycerin	27,0 ml	20,0 g	0,55 ml	20,0 ml	-
Kartoffelmehl		50,0 g			
Katalase			4 mg		
Kupfersulfat			1 mg		
Magnesiumsulfat		0,4 g	0,025 g	0,4 g	

Fortsetzung Tabelle 8: Zusammensetzung gebräuchlicher Nährmedien für den Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (Angaben pro Liter Nährmedium)

	Herrold's Egg Yolk Agar	Löwenstein- Jensen Medium	Middlebrook 7H10, mod.	Paratuberkulose- Nährboden (ENCLIT)	Stonebrink (keine Mengenangaben durch Hersteller)
Mycobactin J	2,0 mg	2,5 mg	2,0 mg	2,0 mg	+
Natriumchlorid	4,0 g		0,85 g		
Natriumpyruvat	4,1 g				+
Ölsäure			0,05 g		
Pyridoxin- hydrochlorid			1 mg		
Rindfleischextrakt	2,7 g				
Zinksulfat			1 mg		
Selektiva					
Amphotericin B	50 mg		0,21 g		+
Azlocillin			0,21 g		
Chloramphenicol		50 mg			
Colistinsulfat					+
Cycloheximide		1,66 g			
Malachitgrün	100 mg	700 mg	0,25 mg	190 mg	+
Nalidixinsäure			8,4 g		
Penicillin		500 000 I.E.			
Piperacillin					+
Polymyxin B			210 000 IE		+
Trimethoprim			0,21 g		

Fortsetzung Tabelle 8: Zusammensetzung gebräuchlicher Nährmedien für den Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (Angaben pro Liter Nährmedium)

	Herrold's Egg Yolk Agar	Löwenstein- Jensen Medium	Middlebrook 7H10, mod.	Paratuberkulose- Nährboden (ENCLIT)	Stonebrink (keine Mengenangaben durch Hersteller)
Schutzmittel					
Eier (Stück)	33				
Eigelb	100,0 ml				
Eimasse (Vollei)				670 ml	koaguliert
Rinderalbumin		5 g			
Puffer					
Kaliumdihydrogen- phosphat				4,0 g	+
Kaliumphosphat		4,00 g	1,5 g		
Magnesiumcitrat		1,0 g		1,0 g	
Natriumcitrat			0,4 g		+
Di- Natriumhydrogen- phosphat					
Di- Natriumphosphat			1,5 g		
Indikatoren					
Eisenammonium- citrat			40 mg		
Aqua dest.	873,0 ml		100 ml		+

Bei den fünf vergleichend untersuchten Nährmedien wurden folgende Parameter erhoben:

- Zeit bis erste Bakterienkolonien makroskopisch sichtbar wurden (Time to Detection, TTD)
- semiquantitative Produktionsleistung (Koloniezahl)
- Koloniemorphologie
- Verteilung der Kolonien auf der Nährbodenoberfläche
- Handhabung
- Kosten

Dabei wurden die *M. paratuberculosis*-Stämme mit den DSMZ-Nummern 44133 und 44135, sowie der als Referenzstamm für andere Mykobakterienstämme angegebene *M. fortuitum* (DSMZ-Nr. 46621) eingesetzt. In ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen wurden 2 ml sterile physiologische Kochsalzlösung gegeben. Wenig Koloniematerial, gewachsen auf HEYM, wurde mit einer Impföse zuerst an der Röhrchenwand verrieben und dann mit der Kochsalzlösung vermischt. Durch Zugabe von ungefähr zehn Ribolyserkügelchen (Lysis Matrix D-Tubes, Q-Biogen, Darmstadt) pro Röhrchen und gründlichem Mischen, wurden Zellklumpen weitestgehend aufgelöst. Von einer dekadischen Verdünnungsreihe mit steriler physiologischer Kochsalzlösung wurde ein Tropfen der jeweiligen Bakteriensuspension in der Zählkammer nach TÜRCK ausgezählt (siehe Kapitel 3.3). Von der durchschnittlichen Bakterienzahl pro μl wurde das Suspensionsvolumen errechnet, in dem ca. 10^3 Mykobakterien enthalten waren und durch dekadische Verdünnung weitere Ansätze mit ungefähr 10^2 bzw. 10^1 Mykobakterien hergestellt. Diese Ansätze wurden

anschließend im Parallelansatz auf alle fünf Nährmedien ausgebracht. Das Inokulum wurde mit einer 1 ml-Glaspipette auf der Nährbodenoberfläche der Schrägmedien verteilt. Die Verteilung auf dem vorgetrockneten Middlebrook 7H10-Agar wurde im Spatelverfahren durchgeführt. Diese Versuchsansätze wurden zeitlich versetzt zweimal wiederholt.

Die Schraubdeckel der Schrägmedien wurden nur locker aufgesetzt und die Medien anfangs in so genannten Schräggestellen (E101.1, 20 mm, Carl Roth GmbH) in Schräglage bebrütet. Nach einer Woche wurden sie fest verschlossen und in aufrechte Position verbracht. Die Platten des Middlebrook 7H10-Agars wurden doppelt mit Parafilm[®] M (291F1213, Merck) umwickelt, um einer Austrocknung entgegenzuwirken.

Alle Medien wurden im gleichen Brutschrank bei 37 ° C inkubiert. Täglich fand eine Wachstumskontrolle unter einer Lupenlampe statt. Die abschließende Koloniezählung wurde nach 12 Wochen Inkubation durchgeführt und nach folgendem Bewertungsschlüssel eingestuft: 0: kein Wachstum, ±: weniger als 50 Kolonien, (+): 50 bis 100 Kolonien, ++: mehr als 100 Kolonien, +++: dichtes aber nicht-konfluierendes Wachstum, ++++: Bakterienrasen.

3.3 Dekontaminationswirkung von N-Acetyl-L-Cystein-NaOH auf *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*

Um die Wirkung von N-Acetyl-L-Cystein (NALC)-NaOH (1.12422.0025, Merck) auf MAP zu überprüfen, wurden drei verschiedene MAP-Stämme (DSMZ-Nr.: 44133, DSMZ-Nr.: 44135, Feldisolat) und *M. fortuitum* ssp. *fortuitum* (DSMZ-Nr. 46621) eingesetzt. Zur Anzucht wurde das modifizierte Middlebrook 7H10-

Festmedium (Basis von Becton Dickinson[®], 262710), in Petrischalen gegossen, verwendet (Rezeptur siehe Kapitel 10.2.2).

Mit den vier Stämmen wurde jeweils eine Bakteriensuspension mit einem Bakterienfeuchtgewicht von 1 mg/ml (entspricht gemäß DIN 58943-3 einer gehäuften Öse, innerer Durchmesser 3 mm) hergestellt. Als Suspensionsmedium diente 0,9 %ige NaCl-Lösung. Die Bakterienmasse wurde in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen übertragen und hierfür zunächst trocken an der Wand verrieben. Durch tropfenweise Zugabe von Suspensionsmedium wurde eine möglichst homogene Suspension hergestellt. Diese wurde im Anschluss mit etwa 10 Ribolyzerkügelchen/Zentrifugenröhrchen gründlich gemischt um möglichst viele Zellklumpen zu zerkleinern. Nach etwa 10 min. Sedimentationszeit, in der grobe Bakterienkonglomerate absinken konnten, wurde der Überstand in ein anderes Zentrifugenröhrchen übertragen. Die Dichte der Suspension wurde nun durch visuellen Vergleich mit einer Referenzsuspension (Bariumsulfat, McFarland-Standard 1,0; siehe Anhang 10.1.3) eingestellt. Die Suspension mit ausreichender Bakteriendichte diente im Folgenden als Ausgang für eine dezimale Verdünnungsreihe im Suspensionsmedium bis zur Verdünnungsstufe 10^{-4} . In der Zählkammer nach TÜRCK wurde die Bakterienkonzentration der Verdünnungen ausgezählt und nach folgenden Formeln berechnet

Durchschnittliche Bakterienzahl / Kleinstquadrat:

$$Z = \text{Gesamtzahl Bakterien} / 80$$

Durchschnittliche Bakterienzahl pro μl :

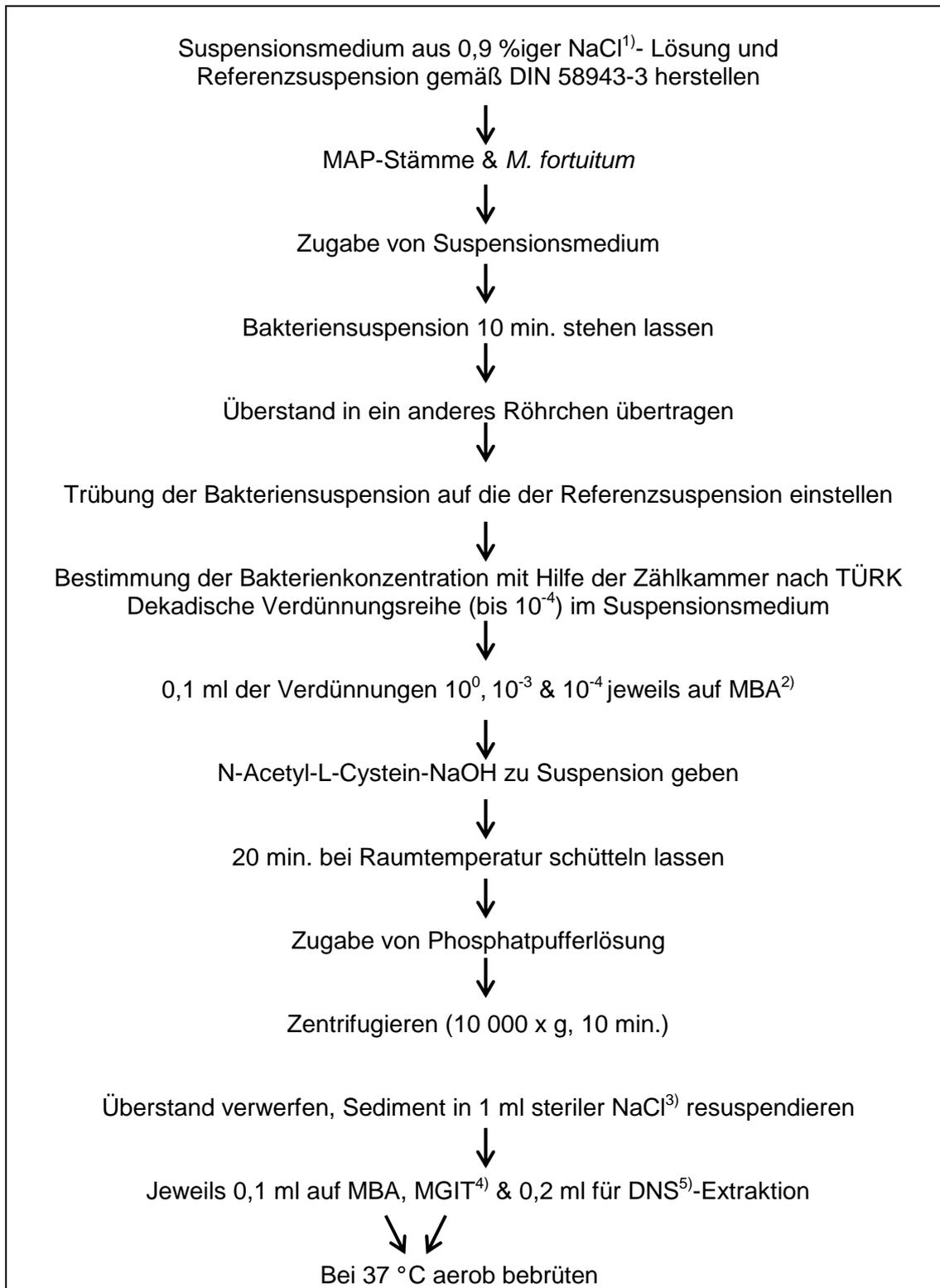
$$N = Z \times 4\,000 \times V \quad (V = \text{Verdünnungsfaktor})$$

Im Anschluss wurden von den Verdünnungsstufen 10^0 , 10^{-3} und 10^{-4} jeweils 100 μl im Doppelansatz auf Middlebrook 7H10-Agarplatten ausgespatelt und gleichzeitig 500 μl in vorbereitete BBL Mycobacteria Growth Indicator Tubes (MGIT) Flüssigmedien gegeben (siehe Kapitel 3.4.2). MGIT (245113, Becton Dickinson) basiert auf einer Middlebrook 7H9-Bouillon, die mit einem Supplement aus Ölsäure, Dextrose und Katalase (BBL MGIT OADC, Becton Dickinson[®], 212240), einem antibiotischen Gemisch aus Polymyxin B, Amphotericin, Nalidixinsäure, Trimethoprim und Azlozillin (BBL MGIT PANTA, Becton Dickinson, 245114) sowie Mycobactin J (112407, Synbiotics Europe SAS) versetzt wurde. Zur restlichen Suspensionsmenge wurde anschließend die gleiche Menge N-Acetyl-L-Cystein-NaOH (NALC; siehe Anhang 10.1.1; Endkonzentration 2,5 g/l) gegeben. Nach Durchmischung wurden die Röhren 20 min. bei Raumtemperatur geschüttelt. Im Verhältnis ein Teil Suspension ohne NALC zu 1,5 Teilen Phosphatpuffer wurde Phosphatpuffer (Siehe Anhang 10.1.1) hinzugemischt. Nun schloss sich bei 10 000 x g ein 10 minütiger Zentrifugationsschritt (Multifuge 1S-R Heraeus) an. Der Überstand wurde schließlich mit einer Pasteurpipette (Volac, D 8112, Länge 230 mm) abgesaugt und das Pellet in steriler physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert. Von dieser Suspension wurden wieder 100 μl auf Middlebrook 7H10-Agar im Spatelverfahren aufgebracht, 500 μl in supplementiertes MGIT-Flüssigmedium pipettiert und 200 μl für die PCR abgenommen (siehe Kapitel 3.4.5).

Alle beimpften Medien wurden bei 37 °C bebrütet. In regelmäßigen Abständen wurden die Medien auf Wachstum bzw. Fluoreszenz überprüft. Die Festmedien wurden nach 12 Wochen Inkubation durch semiquantitative Abstufung des Bakterienwachstums nach folgendem Schema der DIN 58943-3 „Kulturelle Methoden zum Nachweis von Mykobakterien“ beurteilt: +++: dichter Rasen (konfluierendes Wachstum), ++: aufgelockerter Rasen, +: mehr als 100 Einzelkolonien, (+): mehr als 50, weniger als 100 Einzelkolonien.

Gemäß DIN 58943-3 sollten die vor der Dekontamination mit der 10^{-3} -Suspension beimpften Medien ein Wachstum von „+++“ und die mit der 10^{-4} -Suspension beimpften ein Wachstum von „++“ zeigen; nach der Vorbehandlung sollten entweder die gleichen Ergebnisse oder um eine Stufe geringeres Wachstum erzielt werden.

In einem zweiten Versuchsansatz wurden zusätzlich zum Middlebrook 7H10-Festmedium noch MGIT-Flüssigmedien (245113, Becton Dickinson) sowohl mit 500 µl der Ausgangssuspensionen als auch mit 500 µl der dekontaminierten Bakteriensuspensionen beimpft. Aus allen Ansätzen wurde vor sowie nach jeweiliger Dekontamination DNA extrahiert und sowohl mit einem nested PCR- als auch mit einem Real Time PCR-Verfahren untersucht (siehe Kapitel 3.4.5). Auch aus den beimpften, aber unbebrüteten Flüssigmedien wurden 200 µl abgenommen und molekularbiologisch untersucht. Auf diese Weise wurde zusätzlich eine Wachstumskontrolle ermöglicht. Ein entsprechendes Fließdiagramm ist in der Abbildung 2 wiedergegeben.



¹⁾ sterile Kochsalzlösung
lösung

²⁾ Middlebrook 7H10-Agar
⁴⁾ BBL Mycobacteria Growth Indicator Tube

³⁾ physiologische Kochsalz-
lösung
⁵⁾ Desoxyribonukleinsäure

Abbildung 2: Fließschema Prüfung der Dekontaminationswirkung von N-Acetyl-L-Cystein-NaOH auf *M. avium* ssp. *paratuberculosis* und *M. fortuitum*

3.4 Darmbioptate von Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten sowie Kontrollprobanden

3.4.1 Probanden

Die Patienten des Zentrums für Innere Medizin des Universitätsklinikums Gießen und Marburg (UKGM) kommen sowohl aus der Stadt Gießen als auch dem Landkreis, aber auch aus Gegenden außerhalb Hessens.

Da es sich bei den geplanten Untersuchungen gemäß § 2 der Satzung der Ethik-Kommission des Fachbereichs Medizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen um „klinische Untersuchungen am Menschen“ handelt, wurde die Prüfung auf ethische, medizinisch-wissenschaftliche und rechtliche Unbedenklichkeit durch die Ethik-Kommission beantragt (AZ.: 8404, vom 03.06.2004) und positiv beschieden.

Die Zuordnung der Probanden in eine der drei Gruppen „Morbus Crohn“, „Colitis ulcerosa“ und „Kontrollproband“ wurde von auf chronisch-entzündliche Darmerkrankungen spezialisierten Gastroenterologen durchgeführt. Die Diagnostik und Probandeneinteilung erfolgte in der Zusammenschau klinischer, labormedizinischer, endoskopischer, histologischer sowie radiologischer Untersuchungsergebnisse auf Basis der Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten für die Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn bzw. der Colitis ulcerosa (ANONYMOUS, 2003; ANONYMOUS, 2004). Die Bioptate wurden im Institut für Pathologie des UKGM histologisch untersucht.

Die Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten wurden aus der Sprechstunde für Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

des Zentrums für Innere Medizin rekrutiert. 104 Patienten wurden von den Mitarbeitern der Medizinischen Klinik und Poliklinik III vorab per Post über das Forschungsvorhaben informiert und gebeten, dieses durch zur Verfügung stellen von Biopaten bei der nächsten Routineuntersuchung zu unterstützen. Kein Patient hatte sich nach eigenen Angaben zuvor einer antimykobakteriellen Antibiose unterzogen. Personen, die sich einer Untersuchung im Rahmen einer Darmkrebsvorsorge unterzogen haben oder Patienten, die nicht an einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung litten, wurden als Kontrollpersonen herangezogen (siehe auch Anhangstabelle 1).

Alle Probanden gaben ihr Einverständnis zur Teilnahme an der wissenschaftlichen Untersuchung ihrer Darmbiopate und deren Entnahme.

Die Darmbiopsien der Probanden wurden zwischen dem 3. Januar 2005 und dem 6. April 2006 durchgeführt.

Die klinischen Daten zur Charakterisierung des Patientenkollektivs wurden durch Mitarbeiter der Medizinischen Klinik und Poliklinik III des UKGM zur Verfügung gestellt. Folgende Parameter wurden dabei erhoben: Name des Probanden, Geburtsdatum, Geschlecht, Kollektivzuordnung, klinisches Stadium, Komorbiditäten, sonstige Bemerkungen.

3.4.2 Darmbiopate

Es wurden Darmbiopate von Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa- Patienten, sowie von Kontrollpersonen untersucht. Die Biopate wurden bei den Probanden aus vier verschiedenen Darmabschnitten entnommen:

- I: Terminales Ileum (Endabschnitt des Krummdarms)
- II: Appendix (Blinddarm)

III: Colon transversum (Quergrimmdarm)

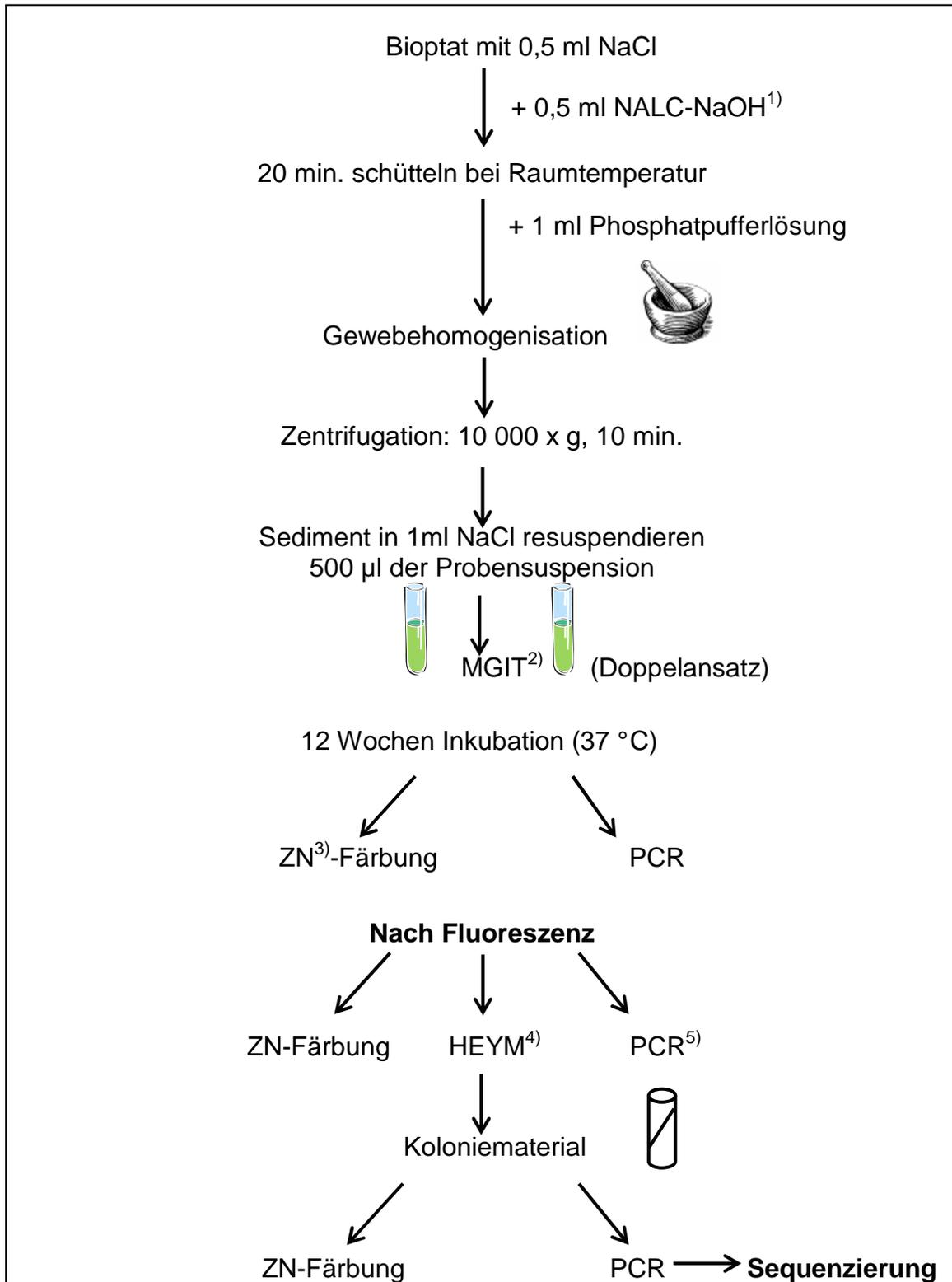
IV: Colon sigmoideum (Sigma)

Die Koloskopie der Probanden wurde von den ärztlichen Mitarbeitern der Medizinischen Klinik und Poliklinik III, des UKGM, dort im Hause durchgeführt. Pro Darmabschnitt wurden i. d. R. zwei Schläge mit der Biopsiezange getätigt. Bei vorliegender Entzündung stammten die Biopate aus der das Entzündungszentrum umgebenden Schleimhaut. Die Proben wurden, nach Darmabschnitten sortiert, in 0,5 ml sterile physiologische Kochsalzlösung, befindlich in sterilen 2 ml-Eppendorfgefäßen, verbracht. Um eine mögliche Bias zu verhindern, wurde die Studie einfach blind durchgeführt. Die Proben wurden codiert und für die Auswertung anhand des Codierungsschlüssels wieder entschlüsselt.

Im Anschluss an die Koloskopie wurden die Biopate unverzüglich in das Labor verbracht. Kam es dennoch zu kurzfristigen Verzögerungen, wurden die Proben im Kühlschrank bei + 4-8 °C gelagert. Proben von zwei CU-Patienten, wurden bei ca. -20 °C eingefroren. Der Transport erfolgte nach DIN 58943-3 in einem Gefäß mit übergreifendem Schraubverschluss. Die Temperatur wurde durch eine Styroporbox konstant gehalten, und die Probengefäße wurden während des Transportes durch Gestelle in aufrecht stehender Position fixiert.

Nach dem Probeneingang erfolgte unverzüglich die Dekontamination (siehe Abbildung 3). Sie richtete sich nach DIN 58943-3 und der Publikation von BULL et al. (2003), wobei nach DIN ein Zentrifugationsschritt von mindestens 3 300 x g für 20 min und nach BULL et al. (2003) eine Kombination von 10 000 x g und 10 min beschrieben wird.

Pro Darmabschnitt wurden in einem sterilen 15 ml-Zentrifugenröhrchen jeweils 0,5 ml N-Acetyl-L-Cystein-NaOH (NALC; 1.124.22.0025, Merck) vorgelegt. Der gesamte Inhalt jeweils eines Eppendorfgefäßes wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt, gemischt und 20 min. bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Zugabe von jeweils 1 ml Phosphatpuffer (siehe Anhang 10.1.1) und gründlichem Mischen, wurden die Gewebeteile mit Hilfe einer Einmal-Pasteurpipette (Volac, Länge 230 mm, D 8112) in einen sterilen Mörser (410-9111, VWR) gegeben und mit wenig sterilem Seesand und einem sterilen Pistill (410-9131, VWR) homogenisiert.



¹⁾ N-Acetyl-L-Cystein

²⁾ BBL Mycobacteria Indicator Tube

³⁾ Ziehl-Neelsen-Färbung

⁴⁾ Herrold's Egg Yolk-Medium

⁵⁾ Polymerasekettenreaktion

Abbildung 3: Fließschema des Untersuchungsganges von humanen Darmbiopptaten auf *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP)

Der gesamte Mörserinhalt wurde anschließend wieder in das Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 10 000 x g 10 min. zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Sediment mit einem Milliliter steriler physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert und auf zwei BBL Mycobacteria Growth Indicator Tubes (MGIT; 245113, Becton Dickinson) aufgeteilt. Die Flüssigmedien wurden zuvor mit 500 µl OADC, 9,42 µl Mycobactin J und 100 µl des antibiotischen Gemischs PANTA vorbereitet (siehe auch Kapitel 3.3). Jede neue Charge MGIT wurde vor ihrer Verwendung einer Qualitätskontrolle nach Angaben des Herstellers unterzogen. Die Inkubation erfolgte bei 37 ° C. In wöchentlichen Abständen wurden die Flüssigmedien unter UV-Licht (MinUVIS Analysenlampe, DESAGA GmbH, 13 12 00) bei 365 nm auf Fluoreszenz geprüft. Eingebettet in Silikon am Boden befand sich eine Verbindung, welche auf das Vorliegen von in der Bouillon aufgelöstem Sauerstoff ansprach und keine Fluoreszenz zeigte. Später nahmen aktiv respirierende Mikroorganismen den Sauerstoff auf und Fluoreszenz war zu beobachten. Zur Kontrolle wurden jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt.

3.4.3 Charakterisierung des Probandenkollektivs

Insgesamt wurden Biopate von 32 Probanden untersucht. Davon wurden 12 (37,5 %) Personen nach konventionellen klinischen, radiologischen, endoskopischen sowie histologischen Kriterien als Morbus Crohn-Patienten (MC) und 8 (25,0 %) als Colitis ulcerosa-Patienten (CU) eingestuft. 12 (37,5 %) Personen konnten als Kontrollprobanden, die nicht an einer chronisch-

entzündlichen Darmerkrankung litten (nCED), herangezogen werden (siehe Tabelle 9).

In allen drei Gruppen überwiegt der Männeranteil und dadurch ergibt sich insgesamt ein Anteil der männlichen Probanden von 62,5 %. Im arithmetischen Mittel sind die Probanden 44,3 Jahre alt, der jüngste war 17 und der älteste 76 Jahre alt.

Tabelle 9: Anzahl, Alter und Geschlecht des Probandenkollektivs

Gruppe	MC¹⁾	CU²⁾	nCED³⁾	Gesamt
Anzahl	12 (37,5 %)	8 (25,0 %)	12 (37,5 %)	32
weiblich	5 (41,7 %)	3 (37,5 %)	4 (33,3 %)	12 (37,5 %)
männlich	7 (58,3 %)	5 (62,5 %)	8 (66,7 %)	20 (62,5 %)
Alter⁴⁾				44,3

¹⁾ Morbus Crohn-Patienten, ²⁾ Colitis ulcerosa-Patienten, ³⁾ Kontrollprobanden

⁴⁾ arithmetischer Mittelwert in Jahren

3.4.4 Charakterisierung der Darmbioptate

Aufgrund zurückliegender Darmresektionen oder Schwierigkeiten in das *terminale Ileum* vorzudringen war es nicht bei allen Patienten möglich alle Darmabschnitte zu beproben, so dass nicht von allen Probanden Bioptate (siehe Abbildung 4) aus allen Darmabschnitten zur Untersuchung vorlagen. Insgesamt wurden 120 Proben im Doppelansatz und 239 Biopsieschläge entnommen (Siehe Tabelle 10). Das *Colon sigmoideum* konnte mit 33 Proben

und 76 Biopsieschlägen am häufigsten biopsiert werden, wohingegen aus dem *Caecum* die geringste Anzahl von 28 Proben und 55 Biopsieschlägen bezogen wurde. Im Mittel wurden pro Patient 7,3 Biopsieschläge getätigt. In Abbildung 4 sind Darmbioptate nach dem Probeneingang zu sehen.

Tabelle 10: Probenübersicht: Anzahl der Proben und Biopsieschläge

Darmabschnitt	Anzahl	
	Proben	Biopsieschläge
<i>Terminales Ileum</i>	29	54
<i>Caecum</i>	28	55
<i>Colon transversum</i>	30	54
<i>Colon sigmoideum (Sigma)</i>	33	76
Gesamt	120	239

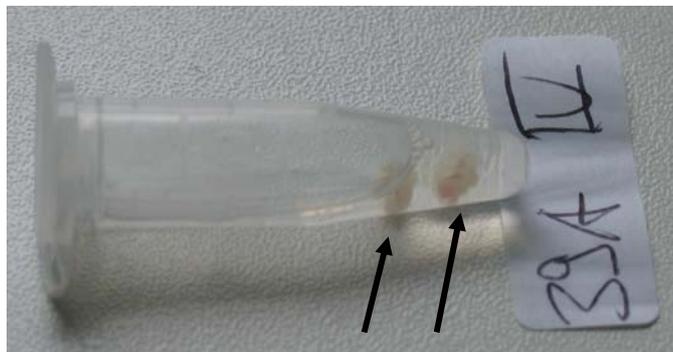


Abbildung 4: Probeneingang. Zwei Biopsieschläge aus dem *Colon sigmoideum (Sigma)*

Es konnte eine mittlere Gesamtmenge pro Proband von 144,3 mg untersucht werden. Im Mittel aller Probanden konnte die größte Probenmasse pro

Darmabschnitt mit 46,9 mg aus dem *Colon sigmoideum* und die geringste mit 31,1 mg aus dem *Caecum* gewonnen werden.

3.4.5 Weiteres Vorgehen nach Fluoreszenz oder 12-wöchiger Inkubation

Sobald unter der UV-Lampe Fluoreszenz im MGIT beobachtet werden konnte bzw. alternativ nach einer Inkubationszeit von 12 Wochen, wurde eine Färbung auf Säurefestigkeit („Ziehl-Neelsen“ [ZN]-Färbung) durchgeführt. Dazu wurden aus den gründlich gemischten Flüssigmedien 250 µl abgenommen, in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 3 000 x g 10 min zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Sediment mit einer Drahtöse auf einem Objektträger ausgestrichen und an der Luft getrocknet. Die Hitzefixierung wurde durch dreimaliges Durchziehen des Objektträgers über eine Bunsenbrennerflamme erreicht. Anschließend wurde der Ausstrich mit Karbolfuchsin (Becton Dickinson, 212511) bedeckt und die Färbelösung mittels Bunsenbrennerflamme 5 min bis zum Dampfen erhitzt. Das Karbolfuchsin wurde mit Leitungswasser abgespült und der Ausstrich durch Auftropfen von Entfärbelösung (Becton Dickinson, 212517) von überschüssiger Farbe befreit. Nach dem Spülen mit Leitungswasser wirkte Methylenblau (Becton Dickinson, 212516) 30 sek. ein, bevor auch diese Lösung mit Leitungswasser entfernt wurde. Der Ausstrich trocknete an der Luft und wurde unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Verdächtige Strukturen erschienen bei 1000facher Vergrößerung mit Immersionsöl als rote Stäbchen, die in Nestern angeordnet lagen. Eine Positivkontrolle mit dem MAP-Humanisolat (Hum2) und eine mit *M. fortuitum* ssp. *fortuitum* (DSMZ-Nr. 46621) sowie eine Negativkontrolle mit *Lactobacillus*

plantarum und eine bakterienfreie Färbung ermöglichten einen direkten Vergleich. Alle Ziehl-Neelsen-positiven Proben wurden fotografisch mit einer 200- und 400fachen Vergrößerung dokumentiert.

Das verbleibende Flüssigmedium wurde weiter bei 37 °C inkubiert.

Die DNS-Isolierung nach Fluoreszenz bzw. 12 Wochen Inkubation erfolgte aus Flüssigmedien mittels DNeasy[®] Tissue Kit (Katalog-Nr. 69504, Fa. Qiagen) nach dem Protokoll für grampositive Bakterien. Es wurden jeweils alle Ansätze pro Proband und Darmabschnitt aufbereitet. Ein Milliliter Anreicherungsmedium wurde in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß für 10 min. bei 7 500 Umdrehungen pro Minute (UpM) bzw. 5 000 x g zentrifugiert (Kühlzentrifuge Centrifuge 5403, Eppendorf, Hamburg). Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und verworfen. Das restliche Flüssigmedium wurde sofort weiterhin bei 37 °C inkubiert.

Zur Bestätigung von Mykobakteriensubkulturen wurde eine Impföse mit Koloniematerial von festen Nährböden abgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 180 µl enzymatischem Lysispuffer für grampositive Bakterien eingerieben. Im Anschluss wurde für 1,5 Stunden bei 37 °C im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach der Zugabe von 25 µl Proteinase K (Fa. Roche, 3115828) und 200 µl Puffer AL wurde für 1,5 Stunden bei 70 °C im Thermomixer unter leichtem Schütteln inkubiert. Hinterher wurden die Proben 15 min. im Wasserbad gekocht. In einem neuen Reaktionsgefäß wurde das Volumen näherungsweise mit einer 100-1 000 µl Varipipette (Reference, Eppendorf, Hamburg) überprüft. Das halbe Volumen abs. Ethanol (96-100 %, P076.1, Carl Roth) wurde anschließend

hinzugefügt. Die gesamte Flüssigkeit wurde nun in eine QiAmp spin Säule überführt und 1 min. bei 8 000 UpM ($\geq 6\ 000 \times g$) zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule in ein neues Sammelgefäß eingesetzt. Nach der Zugabe von 500 μ l Puffer AW1 wurde der Zentrifugationsschritt wiederholt. Erneut wurde die Säule in ein frisches Sammelgefäß eingesetzt und 500 μ l Puffer AW2 auf die Säule gegeben. Bei 14 000 UpM ($20\ 000 \times g$) wurde zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Zur vollständigen Entfernung von Restpuffer und Alkohol und zur Trocknung des Filters folgte der Einsatz des Eppendorfgefäßes in ein unbenutztes Sammelgefäß und Zentrifugation bei voller Leistung (14 000 UpM) für eine Minute.

Zur Elution wurde die Säule in ein 1,5 ml-Probengefäß gesetzt, 100-200 μ l AE-Puffer zugesetzt und 1-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1 min. bei 8 000 UpM ($\geq 6\ 000 \times g$) zentrifugiert. Das aufgefangene Eluat war DNS und konnte direkt in eine PCR eingesetzt werden. Die Aufbewahrung erfolgte bei $-25\ ^\circ\text{C}$ oder bei $+4-8\ ^\circ\text{C}$.

Es wurde ein an der Professur für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde von SCHÖNENBRÜCHER et al. (2008) entwickeltes Triplex Real Time-PCR-Verfahren, das als Methodenplattform für die Analyse von Rinderkotproben, bovinen und humanen Biopaten sowie Lebensmitteln angewendet wird, verwandt. Anhand von Referenzsequenzen für das Insertionselement *ISMav2* (STROMMINGER et al., 2001) und F57 (POUPART et al., 1993) wurden Oligonukleotidprimer und TaqMan[®]-Fluoreszenzsonden abgeleitet. Die Referenzsequenzen sind unter den Zugriffsnummern X70277, AE016958 und

AF286339 in der GenBank® des National Center of Biotechnology (NCBI) veröffentlicht. Für die Real Time-PCR-Analytik wurden die ausgewählten Primer und Fluoreszenzsondensysteme mit der für F57 entwickelten internen Amplifikationskontrolle (IAK), zum Ausschluss falsch-negativer Ergebnisse, als Triplex PCR-Verfahren kombiniert (SCHÖNENBRÜCHER et al., 2008). Als konventionelles PCR-Vergleichssystem diente die auf dem Marker *IS900* basierende nested PCR nach BULL et al. (2003) mit beiden Außenprimern TJ1/2 und den Innenprimern TJ3/4. Eine Übersicht der verwendeten Oligonukleotidprimer- und SONDENSEQUENZEN, der Mastermixzusammenstellung und des Thermocyclerprofils ist Tabelle 11, Tabelle 12 und Tabelle 13 zu entnehmen.

Als Positivkontrolle wurde ein aus Rinderkot isolierter MAP-Feldstamm (423) eingesetzt. Es wurde eine Mastermixkontrolle (Leerwert Mastermix) und mindestens eine Negativkontrolle (*M. scrofulaceum*) mitgeführt. Aufbereitungskontrollen wurden in regelmäßigen Abständen (pro DNS-Isolierungscharge) mitgeführt. Als Positivaufbereitungskontrolle diente ein Aliquot eines mit dem MAP-Stamm 423 beimpftes MGIT-Flüssigmedium und als Negativaufbereitungskontrolle ein unbeimpftes Flüssigmedium. Die Aufbereitungskontrollen sicherten die Kontaminationsfreiheit und die Qualität der DNA-Aufbereitung. Alle Kontrollen dienten der Überprüfung des PCR-Laufes. Zeigten die Kontrollen nicht die gewünschten Ergebnisse, war der PCR-Lauf inklusive DNA-Extraktion zu wiederholen.

Tabelle 11: Basensequenzen und Amplifikatgröße der nested PCR-Primer TJ 1/TJ 2 und TJ 3/TJ 4 nach BULL et al. (2003)

Primer- Nomenklatur	Primersequenzen	Amplifikatgröße (Bp)
TJ 1 (Vorwärtsprimer außen)	5' - GCT GAT CGC CTT GCT CAT – 3' (18-mer)	355
TJ 2 (Rückwärtsprimer außen)	5' – CGG GAG TTT GGT AGC CAG TA – 3' (20-mer)	
TJ 3 (Vorwärtsprimer innen)	5' – CAG CGG CTG CTT TAT ATT CC – 3' (20-mer)	294
TJ 4 (Rückwärtsprimer innen)	5' – GGC ACG GCT CTT GTT GTA GT – 3' (20-mer)	

Der PCR-Ansatz wurde in einem PCR-Kabinett (UV-Chamber Typ 825-UCV/22, PlasLabs) vorgenommen. Nach dem vollständigen Auftauen der bei mindestens -18 °C gelagerten Reagenzien wurde der so genannte „Mastermix“ hergestellt, für den pro Einzelansatz die in Tabelle 12 aufgeführten Mengen an Reagenzien unter Auslassung der Template-DNA in der angegebenen Reihenfolge in ein

Reaktionsgefäß (Multi Safe Seal Tubes, 1,7 ml Tubes, peqlab Biotechnologie GmbH, 81-11510) pipettiert wurden.

Tabelle 12: PCR-Ansatz für die *IS900*-nested-PCR

Reagenz	Menge/Einzelansatz (μl)
Aqua dest. für PCR-Zwecke	36,5
Puffer (10 x Polymerase-Puffer mit 15 mM MgCl ₂ , Fa. Applied Biosystems, N 808-0129)	5,0
dNTP-Mix (10 mM each)	1,0
Primer TJ 1/2 bzw. TJ 3/4 (10 μ M)	je 1,0
Polymerase AmpliTaq Gold™ (5 U/ μ l), (Applied Biosystems, N808-0242)	0,5
DNS bzw. 1:10 verdünntes Amplifikat*	5,0
Volumen/Reaktionsgefäß	50,0

* Das mit den beiden Außenprimern TJ 1/2 generierte Produkt wird nach einer 1:10 Verdünnung mit Aqua dest. für PCR-Zwecke mit den Innenprimern TJ 3/4 nach oben genanntem Protokoll amplifiziert (nested PCR).

Dem so hergestellten Mastermix wurde anschließend die präparative DNS-Probe bzw. das mit den beiden Außenprimern TJ 1/2 generierte verdünnte Produkt zugegeben. Die Ansätze wurden anschließend in den Thermocycler (GeneAMP PCR-System 9600, Perkins Elmer, N801-0002) verbracht. Er wurde wie in Tabelle 13 beschrieben, programmiert.

Tabelle 13: Thermocycler-Programm für die *IS900*-nested-PCR

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	
Denaturierung	94 °C	30 s	} 35 Zyklen
Annealing	60 °C	30 s	
Extension	72 °C	30 s	
Finale Extension	72 °C	5 min	
Abkühlung auf 4 °C			

Die erhaltenen Amplifikate wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung dargestellt. Zur Herstellung des Gels wurden 1,5 % Agarose LE (Roche, 1685678) in 1 x TBE-Puffer (siehe Anhang 10.1.2) aufgekocht (Mikrowelle Dimension 4, Panasonic) im Wasserbad (Typ 3041, Köttermann KG) auf 50 °C abgekühlt und auf einem Gelträger (Blue Marine 200 BM 200/2, Serva Feinbiochemica GmbH & Co. KG) bei Raumtemperatur zum Erstarren stehen lassen. Die Amplifikate wurden mit 6,25 µl Gel-Loading-Buffer (siehe Anhang 10.1.2) vermischt; 8 µl davon wurden in die Geltaschen pipettiert. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 5 V/cm für 1,5 h in einer Horizontalgelkammer (Blue Marine 200 BM 200/2, Serva Feinbiochemica GmbH & Co. KG; Power Supply: PS 250, Hoefer Scientific Instruments), die mit 1 x TBE-Puffer als Laufpuffer gefüllt war. Als Längenstandard wurde der Marker XIV (Fa. Roche Diagnostic GmbH, 1721933) mitgeführt.

Die Färbung des Gels erfolgte 20 min in Ethidiumbromid-Lösung (siehe Anhang 10.1.2) auf einem Horizontalschüttler (HS 500, IKA-Werk, Janke & Kunkel GmbH & Co. KG). Nicht gebundenes Ethidiumbromid wurde anschließend 10 min lang in destilliertem Wasser auf dem Horizontalschüttler ausgewaschen. Die Darstellung der Amplifikate erfolgte unter UV-Licht bei 302 nm auf einem Transilluminator (Mighty Bright UVTM 25 230 V, Hoefer Scientific Instruments) und wurde fotografisch dokumentiert (Gerät Polaroid Instant Camera System, Polaroid MP4⁺, Modell 44-16; Film Schwarzweiß-Sofort-Packfilm, Typ 667; beides Polaroid).

Wurde in der untersuchten Probe der für *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* spezifische Abschnitt des Markers *IS900* nachgewiesen, stellt sich bei der Verwendung des äußeren Primerpaares eine Bande bei 355 Bp und bei Verwendung des inneren Primerpaares eine solche von 294 Bp dar. Die Probe galt als „*IS900*-positiv“, wenn jeweils beide Banden oder nur die Bande des inneren Primerpaares nachgewiesen wurde.

Für das Triplex Real Time-PCR-Verfahren zum qualitativen Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* mit den Markern F57 und ISMav2 (SCHÖNENBRÜCHER et al., 2008) wurden die Primer F57po-244F, F57po-306R (Fa. MWG Biotech), ISMav2-735F und ISMav2-896R (MWG Biotech) eingesetzt (SCHÖNENBRÜCHER et al., 2008). Die entsprechenden Sequenzen sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Basensequenzen und Amplifikatgröße der Primer F57po-244F, F57po-306R, ISMav2-735F und ISMav2-896R einschließlich der TaqMan[®]_{mgb}-Sonden für das Triplex Real Time PCR-Verfahren

Nomenklatur	Basensequenzen	Amplifikatgröße (Bp)
F57po-244F (Vorwärtsprimer)	5'–TAC GAG CAC GCA GGC ATT C–3' (19-mer)	62
F57po-306R (Rückwärtsprimer)	5'–CGG TCC AGT TCG CTG TCA T–3' (19-mer)	
F57-TaqMan [®] _{mgb} -Sonde	VIC-CCT GAC CAC CCT TC-MGB	
F57-TaqMan [®] _{mgb} -IAK-Sonde	NED-CGA GTT ACA TGA TCC C-MGB	
ISMav2-735F (Vorwärtsprimer)	5'–CGG CAA AAT CGA GCA GTT TC–3' (20-mer)	161
ISMav2-896R (Rückwärtsprimer)	5'–TGA GCC GGT GTG ATC ATC TTT–3' (21-mer)	
ISMav2-TaqMan [®] _{mgb} -Sonde	FAM-CGC TGA GTT CCT TAG-MGB	

Primer

Nach Vorschrift des Herstellers wurde aus dem jeweiligen Lyophilisat (F57po-244F/F57po-306R bzw. *ISMav2-735F/ISMav2-896R*) mit Aqua dest. für PCR-Zwecke zuerst eine Stammlösung von 100 pmol/µl hergestellt. Die Gebrauchslösung wurde aus der Stammlösung durch eine Verdünnung im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest. hergestellt. Sie wurde als 50 µl-Aliquots in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf-Tubes, Hamburg) aufbewahrt. Die Lagerung dieser Lösungen erfolgte bei mindestens -18 °C.

Interne Amplifikationskontrolle

Die interne Amplifikationskontrolle (IAK) wurde wie bereits von ABDULMAWJOOD et al. (2002) beschrieben, konstruiert (siehe auch SCHÖNENBRÜCHER et al. [2008]). Sie wurde unter Verwendung des kommerziell erhältlichen Plasmids pUC19 (Promega, M11662) als Matrize in einer vorangegangenen PCR gewonnen. Die Primer waren an den 5'-Enden identisch mit den F57-Primern (in Tabelle 15 unterstrichen dargestellt) und an den 3'-Enden komplementär zur Sequenz des pUC19 Plasmids (in Tabelle 15 kursiv dargestellt). Die Primersequenzen wurden mit Hilfe der OLIGO Primer Analysis Software (USA) ausgewählt. Die spezifische TaqMan[®]-Sonde wurde der pUC19-Vektorsequenz entsprechend gestaltet und am 5'-Ende mit NED (Applied Biosystems) markiert. Die Sequenz der Oligonukleotidprimer ist in Tabelle 15 aufgeführt. Sie wurden von MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) hergestellt.

Tabelle 15: Basensequenzen der IAK-Primer F57po-244-pUC19-IAK-F und F57po-306-pUC19-IAK-R sowie der F57-TaqMan[®]_{mgb}-IAK-Sonde

Nomenklatur	Sequenzen
F57po-244-pUC19-IAK-F (Vorwärtsprimer)	5'– <u>TAC GAG CAC GCA GGC ATT C CCG GTT CCC</u> AAC GAT CAA G –3'
F57po-306-pUC19-IAK-R (Rückwärtsprimer)	5'– <u>CGG TCC AGT TCG CTG TCA T ACT GCG GCC</u> AAC TTA CTT CTG –3'
F57-TaqMan [®] _{mgb} -IAK-Sonde	NED- CGA GTT ACA TGA TCC C -MGB

Die Amplifikation der IAK wurde wie von ABDULMAWJOOD et al. (2001) beschrieben durchgeführt. Das so erhaltene Amplifikat mit einer Größe von 105 bp wurde mit dem PCR Purification Kit (Fa. Qiagen, 28104) nach dem entsprechenden Protokoll aufgereinigt.

PCR-Ansatz

Der PCR-Ansatz wurde in einem PCR-Kabinett (UV-Chamber Typ 825-UCV/22, PlasLabs) vorgenommen. Nach dem vollständigen Auftauen der bei mindestens -18 °C gelagerten Reagenzien wurde der „Mastermix“ hergestellt, für den pro Einzelansatz der in Tabelle 16 aufgeführten Mengen an Reagenzien unter Auslassung der Template-DNA in der angegebenen Reihenfolge in ein Reaktionsgefäß (Multi Safe Seal Tubes, 1,7 ml Tubes, peqlab Biotechnologie GmbH, 81-11510) gegeben wurden.

Tabelle 16: PCR-Ansatz für Triplex Real Time PCR-Verfahren

Reagenz	Menge/Einzelansatz (µl)
TaqMan [®] Universal PCR Mastermix (2 x) (Applied Biosystems, 4304437)	25,0
Primer F57po-244F/-306R (10 µM)	je 1,0
Primer ISMav2-735F/-896R (10 µM)	je 1,0
ISMav2- und F57-TaqMan [®] _{mgb} -Sonde	je 2,0
F57-TaqMan [®] _{mgb} -IAK-Sonde	2,0
F57-Interne Amplifikationskontrolle (IAK)	5,0
Aqua dest.	5,0
Ziel-DNS	5,0
Volumen/Reaktionsgefäß	50,0

Die PCR wurde im Thermocycler ABI Prism 7 000 (Applied Biosystems) eingesetzt. Er wurde, wie in Tabelle 17 aufgeführt, programmiert.

Tabelle 17: Thermocyclerprogramm des Triplex-Real Time PCR-Verfahrens (F57//SMav2)

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer	
Aktivierung AmpErase UNG	50 °C	2 min	
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	} 50 Zyklen
Denaturierung	95 °C	15 s	
Annealing/Extension (optional)	60 °C	1 min	

Die Auswertung der PCR-Läufe erfolgte durch Verwendung der Software des ABI PRISM® 7 000 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems). Die Probe galt als „*Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*-positiv“, wenn der Schwellenwertzyklus (Ct-Wert) des jeweiligen Zielgens der untersuchten Probe zwischen 17,0 und 39,0 (+/- 1) lag.

Konnten in der Ziehl-Neelsen-Färbung säurefeste Stäbchen bestätigt oder molekularbiologisch MAP-DNA in einem MGIT nachgewiesen werden, so wurden 100 µl MGIT-Flüssigmedium auf die Oberfläche des Schrägagars Herrold's Egg Yolk mit Mycobactin J (Becton Dickinson, 222233) getropft und mit einer Glaspipette verteilt. In der ersten Woche der Inkubation bei 37 °C wurde das Röhrchen nur locker verschlossen und befand sich in Schräglage. Danach wurde es dicht zugedreht und in senkrechte Position gebracht. Die inokulierten Medien wurden wöchentlich auf Wachstum überprüft.

Koloniematerial von Subkulturen wurde in der Ziehl-Neelsen-Färbung auf säurefeste Stäbchen untersucht. Hierfür wurde ein Tropfen sterile, physiologische Kochsalzlösung auf einen Objektträger aufgebracht. Anschließend wurde mit einer abgeflamnten Impföse Koloniematerial eingerieben und auf dem Objektträger verteilt. Nach dem Lufttrocknen des Ausstrichs erfolgte die Hitzefixierung über einer Bunsenbrennerflamme und eine Ziehl-Neelsen-Färbung (siehe Kapitel 3.4.5).

3.4.6 Sequenzanalyse säurefester Stäbchen

Konnten in der Ziehl-Neelsen-Färbung säurefeste Stäbchen nachgewiesen werden, wurde von den betreffenden Kolonien DNA extrahiert und eine PCR durchgeführt (siehe Kapitel 3.4.5). Dabei kamen die Primer der Marker *ISMav2* und *F57* (siehe Tabelle 14) und die Primer *16S-27F* und *16S-907R* für die 16S ribosomale DNA-PCR und die Primer *16S-1511F* und *23S-23R* für die Amplifikation der ITS-Region zum Einsatz (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18: Basensequenzen der Sequenzierungsprimer 16S-27f, 16S-907r, 16S-1511f und 23S-23r nach HARMSEN et al. (2003)

Primer- Nomenklatur	Primersequenzen
16S-27F (Vorwärtsprimer)	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG -5'
16S-907R (Rückwärtsprimer)	5'-CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT -3'
16S-1511F (Vorwärtsprimer)	5'- AAG TCG TAA CAA GGT ARC CG -3'
23S-23R (Rückwärtsprimer)	5'- TCG CCA AGG CAT CCA CC -3'

Kulturmaterial wurde durch Sequenzierung der 16S-ribosomalen RNS (Ribonukleinsäure) und der 16S-23S „intrinsic spacer region“ (ITS) molekularbiologisch bestätigt. Die ermittelten DNA-Basensequenzen wurden über eine Internetschnittstelle mit den Informationen der Datenbanken „Basic Local Alignment Search Tool“ (BLAST [NCBI]) und „Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms“ (RIDOM [Ridom GmbH]) verglichen. Die Subspezies mit der größten Übereinstimmung wurden als Ergebnisse zurückgegeben.

3.4.7 Archivierung der Isolate aus humanen Biopptaten und der Referenzstämme

Für die Archivierung der Mykobakterienstämme und -isolate wurde sowohl die Lyophilisierung (Gefriertrocknung) als auch die Aufbewahrung in Form von Gefrierkulturen, sog. Glycerinstocks, überprüft. Dafür wurden Originalkulturen bzw. Stämme verwendet, die maximal einmal subkultiviert worden waren. Für die Lyophilisate wurde eine Magermilch-Glukose-Lösung hergestellt. 125 g Magermilchpulver (LP0031, Oxoid) und 7,5 g Glukose (1.08337.1000, Merck, Darmstadt) wurden in sterilem Aqua dest. gelöst. Der pH-Wert wurde auf 6,2–6,4 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung 20 min. bei 100 °C im Dampftopf gekocht. Pro sterile Injektionsflasche (151116, MAGV) wurden 1,5 ml der Magermilch- Glukose- Lösung pipettiert, in welche eine Impföse Koloniematerial eingerieben wurde. Jede Flasche wurde locker mit einem Gefriertrocknungsstopfen (151246, MAGV) verschlossen. Bei –20 °C wurde die Lösung 24 Stunden vorgefroren. Die gefrorenen Flaschen wurden anschließend in die Gefriertrocknungsanlage eingesetzt und innerhalb von 18-24 Stunden wurde dem Inhalt die Flüssigkeit unter Vakuum entzogen. Noch unter Vakuum erfolgte der vollständige Verschluss der Injektionsflaschen. War die Kontrolle frei von Mängeln, konnten die Flaschen mit Bördelkappen (151 230, MAGV) versehen werden. Die Lagerung der Lyophilisate erfolgte lichtgeschützt bei +4-8 °C.

Das Flüssigmedium BBL Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT; 245113, Becton Dickinson) wurde mit 0,5 ml OADC (212240, Becton Dickinson), 0,1 ml PANTA (245114, Becton Dickinson) und 9,42 µl Mycobactin J (112407,

Synbiotics Europe SAS) angereichert. Nach Beimpfung des Mediums mit einer Öse Koloniematerial erfolgte die aerobe Bebrütung bei 37 ° C. Fluoreszenz unter einer UV- Lampe (365 nm) zeigte nach Angaben des Medienherstellers Wachstum von 10^4 - 10^7 KBE/ml an. Der Inhalt eines Fluoreszenz-positiven MGIT wurde gleichmäßig auf drei 2 ml- Eppendorfhütchen (Eppendorf, Hamburg) aufgeteilt. Die Eppendorfgefäße wurden bei 3 000 x g und 8 ° C 10 min. zentrifugiert (Centrifuge 5403, Eppendorf Hamburg) und der Überstand mit einer Pasteurpipette (Volac, D 8112, Länge 230 mm) abgesaugt. Nun wurde das Pellet mit 500 µl MGIT resuspendiert.

Die 2 ml-Kryoröhrchen (T309-2A, Simport) wurden mit 500 µl Glycerin (1.10493, Merck) befüllt und die Bakteriensuspension wurde hinzugegeben. Nach dem Mischen folgte der Einsatz in einen Kryokasten. Der befüllte Kasten wurde bei -80 °C schockgefroren und gelagert.

Zur Qualitätssicherung wurden pro Arbeitsgang Lyophilisierung bzw. Herstellung von Gefrierkulturen ein Lyophilisat/Glyzerinstock im Anschluss auf HEYM angezchtet und somit die Charge auf erhaltene Vermehrungsfähigkeit und Kontaminationsfreiheit geprüft.

Nach Abschluss der praktischen Arbeiten für die Dissertation wurden alle gesammelten und archivierten Stämme revitalisiert und auf Vermehrungsfähigkeit und Kontamination geprüft. Dafür wurden die Lyophilisate in 1,5 ml sterilem Aqua dest. gelöst und 100 µl der Suspension mit einer 1 ml-Glaspipette auf der Nährbodenoberfläche eines HEY-Schrägmediums verteilt und zuerst mit aufgesetztem Deckel in Schräglage bebrütet. Nach Ablauf einer Woche wurde der Deckel fest zgedreht und die Röhrchen senkrecht positioniert. Von den

Gefrierkulturen wurde eine Öse in vorbereitete MGIT-Flüssigmedien (siehe Kapitel 3.4.2) gegeben und bebrütet. Nach erfolgtem Wachstum wurden 100 µl Flüssigmedium auf HEYM verteilt und bebrütet. Alle Nährmedien wurden bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert.

3.5 Statistische Auswertung

Die Datenhaltung und -auswertung sowie die Erstellung der grafischen Abbildungen im Rahmen der Ergebnispräsentation erfolgte auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die statistischen Auswertungen wurden unter Verwendung des Statistikprogrammpakets BMDP/Dynamic, Release 7.0, (DIXON, 1993) durchgeführt. Die grafischen Abbildungen wurden auf einem Personalcomputer mit dem Programm PlotIT, Version 2.0, (EISENSMITH, 1993) bzw. PlotIT für Windows, Version 3.20h, (EISENSMITH, 1994) erzeugt.

Zur Beschreibung der Daten wurden arithmetische Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen (s) berechnet und tabellarisch wiedergegeben.

Die qualitativen Merkmale wurden nach Gruppen getrennt ausgezählt und in Form von Häufigkeitstabellen (Kontingenztafeln) dargestellt.

Zur statistischen Prüfung des Gruppeneinflusses auf Signifikanz wurde bei den angenähert normalverteilten Merkmalen eine einfaktorielle (bzw. zweifaktorielle) Varianzanalyse mit dem Programm BMDP7D durchgeführt.

Die Untersuchung der Zusammenhänge erfolgte bei den quantitativen Merkmalen mit Hilfe von Korrelations- bzw. Regressionsanalysen mit dem Programm BMDP6D unter Angabe des Korrelationskoeffizienten (r) und der Regressionsgeraden ($y = m \cdot x + b$) bzw. mit dem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (r_s).

Für die Gegenüberstellung qualitativer Merkmale wurden Häufigkeitstabellen mit dem Programm BMDP4F erzeugt und mit dem (verallgemeinerten) Fisher-Test/Chi-Quadrat-Test auf signifikante Zusammenhänge geprüft. Hier kam ein Eigenprogramm der AG Biomathematik und DV zum Einsatz.

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. Zusätzlich wird - wenn möglich - der exakte p-Wert angegeben.

4 ERGEBNISSE

4.1 Vergleichende Untersuchungen zum kulturellen Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*

Alle einbezogenen fünf Nährmedien waren für die Anzucht von MAP-Reinkulturen geeignet. Die Zeit bis zum Wachstumsnachweis der eingesetzten Stämme und die Produktionsleistung der Festmedien bei allen Stämmen in den unterschiedlichen Verdünnungsstufen sind Tabelle 19 und Tabelle 20 zu entnehmen.

Tabelle 19: Zeit bis Kolonien der Mykobakterienreferenzstämme makroskopisch sichtbar wurden (Time To Detection [TTD]), angegeben in Tagen und als arithmetischer Mittelwert mit Standardabweichung aller drei Versuchsansätze

Nährmedium	<i>M. fortuitum</i> (DSMZ-Nr.: 46621)	<i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> (DSMZ-Nr.: 44133)	<i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> (DSMZ-Nr.: 44135)	Mittelwert (DSMZ-Nr.: 44133 & DSMZ-Nr.: 44135)
Middlebrook 7H10-Agar	3,7 ± 0,9	22,4 ± 2,5	20,6 ± 0,8	21,5
Herrold's Egg Yolk-Medium	3,0 ± 0,0	21,8 ± 2,8	20,5 ± 0,5	21,2
Löwenstein Jensen-Medium	3,7 ± 2,7	25,3 ± 3,7	21,8 ± 1,4	23,6
ENCLIT Nährmedium	3,5 ± 0,0	28,7 ± 10,9	21,8 ± 1,6	25,3
Stonebrink Nährmedium	4,1 ± 3,1	32,2 ± 8,5	28,7 ± 5,0	30,5

Tabelle 20: Semiquantitative Produktionsleistung (Koloniezahl) der Nährmedien Middlebrook 7H10-Agar, Herrold's Egg Yolk Agar, Löwenstein Jensen-Nährmedium, ENCLIT-Medium und Stonebrink-Medium nach 12 Wochen Inkubation bei Beimpfung mit drei verschiedenen Zellzahlen.

	Middlebrook 7H10-Agar	Herrold's Egg Yolk Medium	Löwenstein Jensen- Medium	ENCLIT Medium	Stonebrink Medium
Zellzahl					
<i>M. fortuitum</i> (DSMZ-Nr.: 46621)					
10	++	++	++(+)	++	++
100	+++	+++	+++(+)	+++	+++
1000	++++	++++	++++	++++	++++
<i>M. avium ssp. paratuberculosis</i> (DSMZ-Nr.: 44133)					
10	+	+/-	+	+/-	++
100	++	+(+)	++(+)	+(+)	++
1000	++++	++	+++(+)	++	+++
<i>M. avium ssp. paratuberculosis</i> (DSMZ-Nr.: 44135)					
10	+	+	+	(+)	+
100	++	++	++	++(+)	++
1000	+++	+++(+)	+++	+++	+++

0: kein Wachstum, ±: weniger als 50 Kolonien, (+): 50 bis 100 Kolonien, ++: mehr als 100 Kolonien, +++: dichtes, nicht konfluierendes Bakterienwachstum, ++++: konfluierendes Bakterienwachstum

Auf dem **HEY-Medium** wurde die kürzeste Zeit bis zum Nachweis erster Kolonien (Time To Detection: TTD) beobachtet. Koloniewachstum konnte hier schon nach durchschnittlich 21,8 Tagen bei dem DSMZ-Stamm 44133 und nach 20,5 Tagen bei dem DSMZ-Stamm 44135 ausgemacht werden. Die Kolonien waren rund, glatt, glänzend, von weiß-beiger Farbe und kuppelförmig über die Medienoberfläche erhaben. Der Durchmesser betrug ca. 1 mm. Auf dem gleichen Medium war bei *M. fortuitum* nach durchschnittlich 3 Tagen

Wachstum zu beobachten. Die Standardabweichung (s) betrug 2,8 bzw. 0,5 Tage bei MAP und 0 Tage bei *M. fortuitum*. Der Preis dieses Eigelbschrägagar beträgt zurzeit 5,80 € inkl. MwSt. pro Röhrchen.

Auf dem **7H10-Middlebrook-Agar** wuchsen die MAP-Stämme als erhabene, weiß-beige Kolonien mit unregelmäßigem Rand und rauer, trockener Oberfläche mit einem Durchmesser von ca. 5 mm. Gelegentlich waren spiegeleiförmige Kolonien zu beobachten. *M. fortuitum* wuchs im Mittel nach 3,7 und MAP nach 21,5 Tagen. Die Standardabweichung (s) lag bei 0,8 Tagen bei *M. fortuitum*, bei 0,9 Tagen bei MAP mit der DSMZ-Nr. 44135 und bei 2,5 mit der DSMZ-Nr. 44133. Der Preis ist mit ungefähr 3,32 € inkl. MwSt. pro Platte anzugeben.

Auch auf dem **Löwenstein Jensen-Medium** konnte sehr schnell Koloniewachstum beobachtet werden. MAP-Stämme zeigten hier im Mittel nach 21,8 bzw. 25,3 Tagen Koloniewachstum. Die Kolonien waren 0,5 mm groß, von grau-weißer Farbe, rund, glatt, glänzend und über die Nährbodenoberfläche erhaben. *M. fortuitum* zeigte auf diesem Nährboden nach 3,7 Tagen Wachstum. Die Produktionsleistung dieses Mediums ist bei dem Preis von zurzeit 1,54 € inkl. MwSt. bei allen drei Stämmen sehr gut.

Das Schrägmedium **ENCLIT** zeigte bei den MAP-Stämmen erst nach 21,7 bzw. 28,1 Tagen Koloniewachstum. Bei *M. fortuitum* waren nach 3,5 Tagen Kolonien auszumachen. Die Standardabweichung (s) ist mit 10,9 und 1,6 Tagen für *M. paratuberculosis* sehr unterschiedlich. Da die Koloniefarbe der Farbe des Nährbodens glich, hoben sich die Kolonien optisch kaum vom Agar ab und waren schwerlich zu erkennen. Darin könnte die große Standardabweichung (s)

begründet sein. Die Kolonien stellten sich rund, glatt, glänzend und erhaben dar. Sie maßen 0,5 mm im Durchmesser und waren von weiß-gelber Farbe. Dieser Nährboden ist von allen untersuchten Medien mit derzeit 0,79 € inkl. MwSt. der preisgünstigste.

Auf dem **Stonebrink-Nährboden** wuchs *M. fortuitum* am langsamsten und auch die *M. paratuberculosis*-Kolonien waren hier erst nach 28,7 bzw. 32,2 Tagen auszumachen. Für *M. fortuitum* wies das Volleimedium die höchste Standardabweichung (s) von 3,1 Tagen auf. Die Koloniemorphologie glich derjenigen auf dem ENCLIT-Nährboden. Die Produktionsleistung ist für alle Stämme als sehr gut zu bewerten. Mit einem Preis von z. Z. ungefähr 3,30 €/Röhrchen ist es im mittleren Bereich anzusiedeln.

4.2 Validierung der Wirkung von N-Acetyl-L-Cystein-NaOH auf

Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis

In beiden Versuchsansätzen konnte bei allen ausgebrachten Verdünnungsstufen aller drei MAP-Stämme und *M. fortuitum* mit und ohne Dekontamination Bakterienwachstum auf Middlebrook 7H10-Medium festgestellt werden. Es entsprach bei semiquantitativer Abstufung ausnahmslos den Anforderungen der DIN-Vorschrift 58943-3. In allen beimpften Flüssigmedien konnte Wachstum beobachtet werden. Die Flüssigmedien, die mit der dekontaminierten MAP-Suspension beimpft wurden, zeigten ebenso wie die mit der nicht vorbehandelten MAP-Suspension beimpften Medien Fluoreszenz unter der UV-Lampe (365 nm).

In Tabelle 21 bis Tabelle 24 sind die Wachstumsergebnisse des ersten Ansatzes mit *M. fortuitum* und verschiedenen MAP-Stämmen dargestellt. Alle Flüssigmedien, die mit vorbehandelter MAP-Suspension beimpft wurden, zeigten Fluoreszenz unter der UV-Lampe, welches als Erhalt der Vermehrungsfähigkeit der Mykobakterien gewertet werden kann. Auf den mit vorbehandelter Suspension beimpften Nährböden waren die gleichen Wachstumsergebnisse oder maximal um eine Stufe geringeres Wachstum feststellbar als auf den Medien, welche mit unbehandelter Bakteriensuspension beimpft worden waren. Dieses Resultat entspricht ausnahmslos den Anforderungen der DIN-Vorschrift 58943-3.

Tabelle 21: Wachstumsergebnisse der ersten Versuchsreihe der Validierung der Dekontaminationswirkung von N-Acetyl-L-Cystein (NALC)-NaOH nach 12 Wochen Inkubation auf *M. fortuitum* auf Middlebrook 7H10-Agar (MBA) und in BBL Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT)

<i>M. fortuitum</i>	Verdünnungs- stufe	ohne	nach	
		Dekontamination	MBA	MGIT
Ansatz		MBA	MBA	MGIT
A	10^0	+++	+++	+
	10^{-3}	+++	++	+
	10^{-4}	++	+	+
B	10^0	+++	+++	+
	10^{-3}	+++	++	+
	10^{-4}	++	+	+

MBA: +++: dichter Rasen (konfluierendes Wachstum); ++: aufgelockerter Rasen; +: mehr als 100 Einzelkolonien; (+): mehr als 50, weniger als 100 Einzelkolonien

MGIT: +: Nachweis von Fluoreszenz unter der UV-Lampe

Tabelle 22: Detaillierte Wachstumsergebnisse der ersten Versuchsreihe der Validierung der Dekontaminationswirkung von N-Acetyl-L-Cystein (NALC)-NaOH nach 12 Wochen Inkubation auf *M. avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) auf Middlebrook 7H10-Agar (MBA) und in BBL Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT)

MAP (DSMZ-Nr. 44133)	Verdünnungs- stufe	ohne	nach Dekontamination	
		Dekontamination	MBA	MGIT
Ansatz		MBA	MBA	MGIT
A	10^0	+++	+++	+
	10^{-1}	+++	+++	+
	10^{-2}	+++	+++	+
	10^{-3}	+++	++	+
	10^{-4}	++	+	+
B	10^0	+++	+++	+
	10^{-1}	+++	+++	+
	10^{-2}	+++	+++	+
	10^{-3}	+++	+++	+
	10^{-4}	++	+	+

MBA: +++: dichter Rasen (konfluierendes Wachstum); ++: aufgelockerter Rasen; +: mehr als 100 Einzelkolonien; (+): mehr als 50, weniger als 100 Einzelkolonien

MGIT: +: Nachweis von Fluoreszenz unter der UV-Lampe

Tabelle 23: Detaillierte Wachstumsergebnisse der ersten Versuchsreihe der Validierung der Dekontaminationswirkung von N-Acetyl-L-Cystein (NALC)-NaOH nach 12 Wochen Inkubation auf *M. avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) auf Middlebrook 7H10-Agar (MBA) und in BBL Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT)

MAP (DSMZ-Nr. 44135)	Verdünnungs- stufe	ohne	nach	
		Dekontamination	MBA	MGIT
Ansatz		MBA	MBA	MGIT
A	10^0	+++	+++	+
	10^{-1}	+++	+++	+
	10^{-2}	+++	+++	+
	10^{-3}	+++	+++	+
	10^{-4}	++	+	+
B	10^0	+++	+++	+
	10^{-1}	+++	+++	+
	10^{-2}	+++	+++	+
	10^{-3}	+++	+++	+
	10^{-4}	++	++	+

MBA: +++: dichter Rasen (konfluierendes Wachstum); ++: aufgelockerter Rasen;
+: mehr als 100 Einzelkolonien; (+): mehr als 50, weniger als 100
Einzelkolonien

MGIT: +: Nachweis von Fluoreszenz unter der UV-Lampe

Tabelle 24: Detaillierte Wachstumsergebnisse der ersten Versuchsreihe der Validierung der Dekontaminationswirkung von N-Acetyl-L-Cystein (NALC)-NaOH nach 12 Wochen Inkubation auf *M. avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) auf Middlebrook 7H10-Agar (MBA) und BBL Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT)

MAP (Feldstamm 423)	Verdünnungs- stufe	ohne Dekontamination	nach Dekontamination	
Ansatz		MBA	MBA	MGIT
A	10^0	+++	+++	+
	10^{-1}	+++	+++	+
	10^{-2}	+++	+++	+
	10^{-3}	+++	++	+
	10^{-4}	++	+	+
B	10^0	+++	+++	+
	10^{-1}	+++	+++	+
	10^{-2}	+++	+++	+
	10^{-3}	+++	++	+
	10^{-4}	++	+	+

MBA: +++: dichter Rasen (konfluierendes Wachstum); ++: aufgelockerter Rasen; +: mehr als 100 Einzelkolonien; (+): mehr als 50, weniger als 100 Einzelkolonien

MGIT: +: Nachweis von Fluoreszenz unter der UV-Lampe

In Tabelle 25 bis Tabelle 28 sind die Wachstumsergebnisse der zweiten Versuchsreihe für *M. fortuitum* und drei verschiedene MAP-Stämme dargestellt. In dieser Versuchsreihe wurde zum Vergleich auch die unbehandelte Bakterien-suspension in MGIT inokuliert. Auch hier waren auf den mit vorbehandelter Suspension beimpften Nährböden die gleichen Wachstumsergebnisse oder maximal um eine Stufe geringeres Wachstum feststellbar als auf den Medien, welche mit unbehandelter Bakterien-suspension beimpft worden waren. Die

Flüssigmedien, die mit der dekontaminierten MAP-Suspension beimpft wurden, zeigten ebenso wie die mit nicht vorbehandelter MAP-Suspension beimpften Medien Fluoreszenz unter der UV-Lampe (365 nm), und zwar entweder am gleichen Tag oder wenige Tage später.

Tabelle 25: Detaillierte Wachstumsergebnisse der zweiten Versuchsreihe der Validierung der Dekontaminationswirkung von N-Acetyl-L-Cystein (NALC)-NaOH auf *Mycobacterium fortuitum* auf Middlebrook 7H10-Agar (MBA) und in BBL Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT)

<i>M. fortuitum</i>	Verdünnungs- stufe	MBA			MGIT		
		ohne Dekontamination	nach Dekontamination	Nachweisdauer ohne Dekontamination (Tage)	nach Dekontamination	Nachweisdauer nach Dekontamination (Tage)	
A	10^0	+++	+++	0	+++	0	
	10^{-3}	+++	+++	3	+++	3	
	10^{-4}	++	+	3	+	4	
B	10^0	+++	+++	0	+++	0	
	10^{-3}	+++	++	3	++	4	
	10^{-4}	++	+	3	+	4	

+++ : dichter Rasen (konfluierendes Wachstum); ++ : aufgelockerter Rasen; + : mehr als 100 Einzelkolonien;
(+) : mehr als 50, weniger als 100 Einzelkolonien

Tabelle 26: Detaillierte Wachstumsergebnisse der zweiten Versuchsreihe der Validierung der Dekontaminationswirkung von N-Acetyl-L-Cystein (NALC)-NaOH auf *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) auf Middlebrook 7H10-Agar (MBA) und in BBL Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT)

MAP (DSMZ- Nr. 44133)	Verdünnungs- stufe	ohne Dekontamination		nach Dekontamination		Nachweisdauer	
		+	+	+	+	ohne Dekontamination (Tage)	nach Dekontamination (Tage)
A	10 ⁰	+++	+++	+++	+++	14	13
	10 ⁻³	+++	+++	++	++	24	31
	10 ⁻⁴	++	++	+	+	17	17
B	10 ⁰	+++	+++	+++	+++	15	15
	10 ⁻³	+++	+++	++	++	17	17
	10 ⁻⁴	++	++	+	+	17	31

+++; dichter Rasen (konfluirendes Wachstum); ++: aufgelockerter Rasen; +: mehr als 100 Einzelkolonien;
(+): mehr als 50, weniger als 100 Einzelkolonien

Tabelle 27: Detaillierte Wachstumsergebnisse der zweiten Versuchsreihe der Validierung der Dekontaminationswirkung von N-Acetyl-L-Cystein (NALC))-NaOH auf *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) auf Middlebrook 7H10-Agar (MBA) und in BBL Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT)

MAP (DSMZ- Nr. 44135)	Verdünnungs- stufe	MBA		MGIT	
		ohne Dekontamination	nach Dekontamination	Nachweisdauer ohne Dekontamination (Tage)	Nachweisdauer nach Dekontamination (Tage)
A	10 ⁰	+++	+++	0	0
	10 ⁻³	+++	+++	17	18
	10 ⁻⁴	++	+	17	31
B	10 ⁰	+++	+++	0	0
	10 ⁻³	+++	++	17	21
	10 ⁻⁴	++	+	68	75

+++ : dichter Rasen (konfluirendes Wachstum); ++ : aufgelockerter Rasen; + : mehr als 100 Einzelkolonien;
(+) : mehr als 50, weniger als 100 Einzelkolonien

Tabelle 28: Detaillierte Wachstumsergebnisse der zweiten Versuchsreihe der Validierung der Dekontaminationswirkung von N-Acetyl-L-Cystein (NALC))-NaOH auf *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) auf Middlebrook 7H10-Agar (MBA) und in BBL Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT)

MAP 423 (Feldisolat)	Verdünnungs- stufe	ohne		nach		Nachweisdauer	
		Dekontamination	Dekontamination	Dekontamination	Dekontamination	ohne	nach
		MBA		MGIT			
						(Tage)	(Tage)
A	10^0	+++	+++	+++	0	0	0
	10^{-3}	+++	+++	+++	17	18	18
	10^{-4}	++	++	+	18	25	25
B	10^0	+++	+++	+++	0	0	0
	10^{-3}	+++	+++	++	19	21	21
	10^{-4}	++	++	+	21	24	24

+++ : dichter Rasen (konfluierendes Wachstum); ++ : aufgelockerter Rasen; + : mehr als 100 Einzelkolonien;
(+) : mehr als 50, weniger als 100 Einzelkolonien

Molekularbasiert konnte mit den Markern F57, *ISMav2* und *IS900* in allen Verdünnungsstufen der MAP-Suspensionen, sowohl ohne als auch nach Dekontamination, MAP nachgewiesen werden. In allen Flüssigmedien konnte direkt nach der Inokulation MAP-DNA detektiert werden. In Abbildung 5 und Abbildung 6 ist exemplarisch der molekularbiologische Erregernachweis in der MAP-Suspension ohne und nach Dekontamination bzw. in den mit der Suspension inokulierten Flüssigmedien dargestellt.

In der MAP-spezifischen quantitativen Triplex Real Time-PCR konnte nach Fluoreszenz der Flüssigmedien zusätzlich DNA-Vermehrung beobachtet werden.

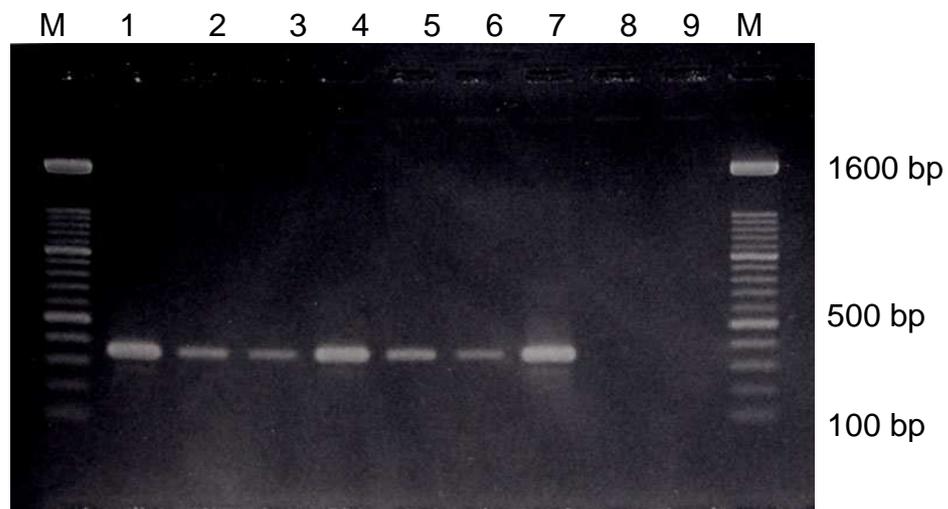


Abbildung 5: Exemplarische Darstellung des Nachweises von *IS900* mit den Primern TJ 1/2 aus MAP-Suspensionen (DSMZ-Nr.: 44135) unterschiedlicher Konzentration ohne und nach Dekontamination mit N-Acetyl-L-Cystein-NaOH. (M): Marker; (1-3): ohne Dekontamination, Verdünnungsstufen „ 10^0 “, „ 10^{-3} “ und „ 10^{-4} “; (4-6): nach Dekontamination, Verdünnungsstufen „ 10^0 “, „ 10^{-3} “ und „ 10^{-4} “; (7): Positivkontrolle MAP 423; (8): Negativkontrolle *M. scrofulaceum*; (9): Leerwert

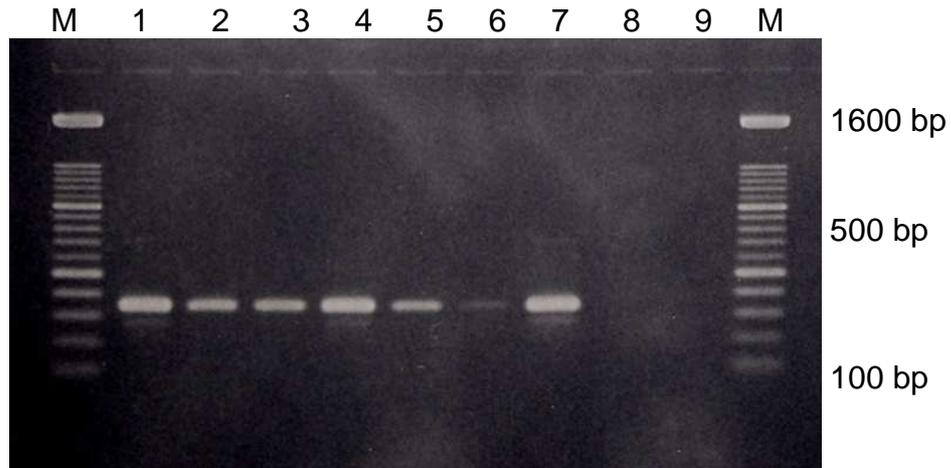


Abbildung 6: Exemplarische Darstellung des Nachweises von *IS900* mit den Primern TJ 1/2 aus BBL Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT), beimpft mit MAP-Suspensionen (DSMZ-Nr.: 44135) unterschiedlicher Konzentration ohne und nach Dekontamination mit N-Acetyl-L-Cystein-NaOH.

(M): Marker; (1-3): ohne Dekontamination, Verdünnungsstufen „10⁰“, „10⁻³“ und „10⁻⁴“; (4-6): nach Dekontamination, Verdünnungsstufen „10⁰“, „10⁻³“ und „10⁻⁴“; (7): Positivkontrolle MAP 423; (8): Negativkontrolle *M. scrofulaceum*; (9): Leerwert

4.3 Mikrobiologische Ergebnisse bei humanen Darmbiopaten

Bei 4 (12,5 %) von 32 Probanden fluoreszierte mindestens ein MGIT-Röhrchen unter der UV-Lampe (365 nm) und zeigte damit Sauerstoffverbrauch durch Wachstum an. Unter den positiven MGIT-Medien befanden sich Ansätze von einem MC- und zwei CU-Patienten sowie einem Kontrollprobanden. Mit der Ziehl-Neelsen-Färbung konnten bei drei (75 %) von vier kulturell positiven Probandenansätzen säurefeste Stäbchen identifiziert (Tabelle 40 und Anhangstabelle 1) und auf dem festen Herrold's Egg Yolk-Medium subkultiviert werden. Bei den verbleibenden fluoreszierenden Ansätzen des vierten Probanden konnte in allen vier Darmabschnitten in der Ziehl-Neelsen-Färbung

blaue fädige Strukturen beobachtet werden. Nach Anzucht auf Rose-Bengal-Agar konnten diese Mikroorganismen als Schimmelpilze identifiziert werden.

Bei einem Kontrollprobanden konnte keine Fluoreszenz der MGIT beobachtet werden. Allerdings zeigte sich auf dem Festmedium Herrold's Egg Yolk nach einer Bebrütungsdauer von neun Wochen Koloniewachstum. In der Ziehl-Neelsen-Färbung wurde dieses Koloniematerial als säurefeste Stäbchen identifiziert (siehe Tabelle 40).

4.4 Molekularbiologische Ergebnisse der mit humanen Darmbioptaten inokulierten BBL Mycobacteria Indicator Tubes (MGIT)

Von insgesamt 240 MGIT-Ansätzen der 32 Probanden erwiesen sich 35 Proben (14,6 %) molekularbiologisch positiv. Wie in Tabelle 29 ersichtlich konnte mit dem Marker *IS900* bei insgesamt 27 Ansätzen (11,3 %) und mit den Markern der Real Time-PCR (*F57* und *ISMav2*) ebenfalls bei insgesamt 27 Ansätzen (11,3 %) MAP-DNA detektiert werden. Bei 17 (7,1 %) Proben waren die nested *IS900*-PCR und mindestens ein Marker der Real Time-PCR übereinstimmend positiv. Bei 10 (4,1 %) Proben kam die nested *IS900*-PCR zu einem positiven und die Real Time-PCR zu einem negativen Ergebnis. Und bei der gleichen Probenzahl kam die Real Time-PCR zu einem positiven, die nested *IS900*-PCR jedoch zu einem negativen Ergebnis. Die Nachweisraten sind somit gleichmäßig verteilt. Bei Anwendung des Symmetrietests nach McNemar für abhängige Stichproben ergibt sich eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von $p = 1,00$. Es wurde ein statistisches Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ verwendet.

Tabelle 29: Darstellung molekularbiologischer Ergebnisse der BBL Mycobacteria Growth Indicator-Tubes (MGIT; n=240) mit der *IS900*-nested-PCR und der Triplex Real Time-PCR in einer zweidimensionalen Häufigkeitstabelle (Vierfeldertafel)

		Real Time (F57 und <i>ISMav2</i>)		
		+	-	
<i>IS900</i>	+	17 (7,1 %)	10 (4,2 %)	27 (11,3 %)
	-	10 (4,2 %)	203 (84,6 %)	213 (88,8 %)
		27 (11,3 %)	213 (88,8 %)	240 (100 %)

In Tabelle 30 ist ersichtlich, dass bei 14 (5,8 %) Proben die nested *IS900*-PCR und der Marker F57 der Real Time-PCR übereinstimmend MAP-DNA detektierten. Bei jeweils 13 (5,4 %) Proben kamen die nested *IS900*-PCR und die Real Time-PCR mit dem Marker F57 zu unterschiedlichen Ergebnissen. Bei Anwendung des Symmetrietests nach McNemar für abhängige Stichproben ergibt sich auch hier aufgrund der gleichmäßigen Verteilung der Nachweisraten beider Marker eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von $p = 1,00$.

Tabelle 30: Darstellung molekularbiologischer Ergebnisse der BBL Mycobacteria Growth Indicator-Tubes (MGIT; n=240) mit der *IS900*-nested-PCR und dem Marker F57 der Triplex Real Time-PCR in einer zweidimensionalen Kontingenztabelle

		F57		
		+	-	
<i>IS900</i>	+	14 (5,8 %)	13 (5,4 %)	27 (11,3 %)
	-	13 (5,4 %)	200 (83,3 %)	213 (88,8 %)
		27 (11,3 %)	213 (88,8 %)	240 (100 %)

Bei 12 (5,0 %) Proben detektierten die nested *IS900*-PCR und der Marker *ISMav2* der Real Time-PCR übereinstimmend MAP-DNA. Bei 15 (5,4 %) Proben kam die nested *IS900*-PCR zu einem positiven und die Real Time-PCR mit dem Marker *ISMav2* zu einem negativen Ergebnis. Bei 4 (1,7 %) Proben verhielt es umgekehrt (siehe Tabelle 31). Bei Anwendung des Symmetrietests nach McNemar für abhängige Stichproben ergibt sich eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von $p = 0,02$. Die Nachweisraten sind somit signifikant verschieden. Die Nachweisrate der nested PCR mit dem Marker *IS900* ist höher.

Tabelle 31: Darstellung molekularbiologischer Ergebnisse der BBL Mycobacteria Growth Indicator-Tubes (MGIT; n=240) mit der *IS900*-nested-PCR und dem Marker *ISMav2* der Triplex Real Time-PCR in einer zweidimensionalen Kontingenztafel

		<i>ISMav2</i>		
		+	-	
<i>IS900</i>	+	12 (5,0 %)	15 (6,3 %)	27 (11,3 %)
	-	4 (1,7 %)	209 (87,1 %)	213 (88,8 %)
		16 (6,7 %)	224 (93,3 %)	240 (100 %)

Bei 11 (4,6 %) Proben detektierten beide Real Time-PCR-Marker übereinstimmend MAP-DNA. Bei 16 (6,7 %) Proben wies der Marker F57 MAP-DNA nach, der Marker *ISMav2* jedoch nicht. Und bei 5 (2,1 %) Proben detektierte der Marker *ISMav2* MAP-DNA, wo der Marker F57 zu einem negativen Ergebnis kam (siehe Tabelle 32). Bei Anwendung des Symmetrietests nach McNemar für abhängige Stichproben ergibt sich hierbei eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von $p = 0,03$. Die Nachweisraten sind somit signifikant verschieden. Die Nachweisrate des Markers F57 ist höher.

Tabelle 32: Darstellung molekularbiologischer Ergebnisse der BBL Mycobacteria Growth Indicator-Tubes (MGIT; n=240) mit den Markern *ISMav2* und F57 der Triplex Real Time-PCR in einer zweidimensionalen Kontingenztabelle

		<i>ISMav2</i>		
		+	-	
F57	+	11 (4,6 %)	16 (6,7 %)	27 (11,3 %)
	-	5 (2,1 %)	208 (86,7 %)	213 (88,8 %)
		16 (6,7 %)	224 (93,3 %)	240 (100 %)

Bei den vier MGIT-Flüssigmedien, die bereits mit dem Außenprimer TJ 1/2 der nested PCR positiv waren, waren auch der Innenprimer TJ 3/4 und die Marker F57 und *ISMav2* positiv (siehe auch Anhangstabelle 2).

Wie aus Tabelle 33 hervorgeht erwiesen sich von 12 Morbus Crohn-Patienten vier (33,3 %) molekularbiologisch als MAP-positiv. Zwei von acht (25,0 %) untersuchten CU-Patienten sowie neun von 12 (75,0 %) Kontrollprobanden erwiesen sich ebenfalls als positiv. Bei Anwendung des verallgemeinerten exakten Tests von Fisher ergibt sich hier eine Signifikanz von $p=0,0586$. Somit ist die Häufigkeitsverteilung positiver molekularbiologischer Ergebnisse der Probanden ohne Berücksichtigung von Störvariablen knapp nicht signifikant. Allerdings ist die höhere MAP-Nachweisrate für nCED auffällig. Aufgrund des nicht signifikanten Ergebnisses wurde auf einen Paarvergleich verzichtet.

Tabelle 33: Molekularbiologisch positive Proben unterschiedlicher Probanden nach Inkubation im Flüssigmedium BBL Mycobacteria Growth Indicator Tube

	positive Probanden	negative Probanden	Summe
MC¹⁾	4 (33,3 %)	8 (66,6 %)	12 (100 %)
CU¹⁾	2 (25,0 %)	6 (75,0 %)	8 (100 %)
nCED³⁾	9 (75,0 %)	3 (25,0 %)	12 (100 %)
Summe	15 (46,9 %)	17 (53,1 %)	32 (100 %)

¹⁾ Morbus Crohn-Patienten, ²⁾ Colitis ulcerosa-Patienten, ³⁾ Kontrollprobanden

Tabelle 34 enthält die Anzahl molekularbiologisch positiver Proben der drei Probandengruppen, aufgeschlüsselt für alle drei Marker. Dabei wird ersichtlich, dass die nested PCR mit dem Marker *IS900* bei vier von 12 (33,3 %) MC-Patienten, bei acht von 12 (66,6 %) Kontrollprobanden und bei einem von acht (12,5 %) CU-Patienten positiv ist. F57 erwies sich bei vier von 12 (33,3 %) MC- und 2 von acht (25,0 %) CU-Patienten sowie acht von 12 (66,6 %) Kontrollprobanden am häufigsten positiv. Der Marker *ISMav2* detektierte drei von 12 (25,0 %) MC- und einen von acht (12,5 %) CU-Patienten sowie fünf von 12 (41,7 %) Kontrollprobanden MAP-positiv.

Tabelle 34: Anzahl und relative Häufigkeit molekularbiologisch positiver Proben von Morbus Crohn (MC)- und Colitis ulcerosa (CU)-Patienten sowie Kontrollprobanden (nCED) bei der Untersuchung auf die Marker *IS900*, *F57* und *ISMav2*

	MC	CU	nCED
<i>IS900</i>	4 (33,3 %)	1 (12,5 %)	8 (66,6 %)
<i>F57</i>	4 (33,3 %)	2 (25,0 %)	8 (66,6 %)
<i>ISMav2</i>	3 (25,0 %)	1 (12,5 %)	5 (41,7 %)
Gesamtzahl der Probanden	12 (100 %)	8 (100 %)	12 (100 %)

Bei 10 von 32 (31,9 %) Probanden erwiesen sich der Marker *IS900* und der Marker *F57* positiv. Bei 4 (12,5 %) Probanden detektierte der Marker *F57* MAP-DNA, der Marker *IS900* jedoch nicht. Und bei 3 (9,4 %) Probanden wurde mittels *IS900*-nested-PCR MAP nachgewiesen, mit dem Marker *F57* der Real Time-PCR erwiesen sich diese Probanden jedoch MAP-negativ (siehe Tabelle 35). Bei Anwendung des Symmetrietests nach McNemar für abhängige Stichproben ergibt sich auch hier aufgrund der gleichmäßigen Verteilung der Nachweisraten beider Marker eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von $p = 1,00$.

Tabelle 35: Darstellung molekularbiologischer Ergebnisse der Probanden mit der *IS900*-nested-PCR und dem Marker F57 der Triplex Real Time-PCR in einer zweidimensionalen Kontingenztabelle

		F57		
		+	-	
<i>IS900</i>	+	10 (31,3 %)	3 (9,4 %)	13 (40,6 %)
	-	4 (12,5 %)	15 (46,9 %)	19 (59,4 %)
		14 (43,8 %)	18 (56,3 %)	32 (100 %)

Wie in Tabelle 36 ersichtlich, detektierten die Marker *ISMav2* und *IS900* bei 9 (28,1 %) Probanden MAP-DNA. Bei 4 Probanden (12,5 %) kam der Marker *IS900* zu einem positiven und der Marker *ISMav2* zu einem negativen MAP-Ergebnis. Und bei keiner Probe kam der Marker *ISMav2* zu einem positiven Ergebnis, wo der Marker *IS900* MAP-DNA nicht nachwies. Bei Anwendung des Symmetrietests nach McNemar für abhängige Stichproben ergibt sich hierbei eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von $p = 0,12$. Der Unterschied der Nachweisraten ist somit nicht signifikant verschieden.

Tabelle 36: Darstellung molekularbiologischer Ergebnisse der Probanden mit den Markern *IS900* und *ISMav2* in einer zweidimensionalen Häufigkeitstabelle

		<i>ISMav2</i>		
		+	-	
<i>IS900</i>	+	9 (28,1 %)	4 (12,5 %)	13 (40,6 %)
	-	0 (0,0 %)	19 (59,4 %)	19 (59,4 %)
		9 (28,1 %)	23 (71,9 %)	32 (100 %)

Mit den Markern F57 und *ISMav2* der Real Time-PCR erwiesen sich 8 (25,0 %) Probanden übereinstimmend positiv. Bei 6 (18,8 %) Probanden war jedoch nur der Marker F57 und bei 1 (3,1 %) Proband nur der Marker *ISMav2* positiv (siehe Tabelle 37). Bei Anwendung des Symmetrietests nach McNemar für abhängige Stichproben ergibt sich hierbei eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von $p = 0,12$. Der Unterschied der Nachweisraten ist somit nicht signifikant unterschiedlich.

Tabelle 37: Darstellung molekularbiologischer Ergebnisse der Probanden mit den Markern der RealTime-PCR F57 und *ISMav2* in einer zweidimensionalen Häufigkeitstabelle

		<i>ISMav2</i>		
		+	-	
F57	+	8 (25,0 %)	6 (18,8 %)	14 (43,8 %)
	-	1 (3,1 %)	17 (53,1 %)	18 (56,3 %)
		9 (28,1 %)	23 (71,9 %)	32 (100 %)

Unter den 12 Morbus Crohn-Patienten konnten molekularbiologisch das *terminale Ileum* und das *Caecum* bei jeweils drei und das *Colon transversum* und das *Colon sigmoideum* bei zwei Probanden positiv befundet werden. Unter den Colitis ulcerosa-Patienten konnten das *terminale Ileum* zweimal und das *Caecum* nur bei einem Patienten als MAP-positiv erachtet werden. Das *terminale Ileum* erwies sich bei 6, das *Caecum* bei zwei, das *Colon transversum* bei sechs und das *Colon sigmoideum* bei vier Kontrollprobanden molekularbiologisch als positiv (siehe Tabelle 38 a bis d).

Tabelle 38: Molekularbiologische MAP-Ergebnisse der einzelnen Darmabschnitte von Morbus Crohn (MC)- und Colitis ulcerosa (CU)-Patienten sowie Kontrollprobanden (nCED) nach Inkubation im MGIT-Flüssigmedium

- a) Molekularbiologische Ergebnisse der Biopate von MC- und CU-Patienten sowie Kontrollprobanden aus dem *Terminalen Ileum*

	PCR-Ergebnis		
	+	-	
MC	3 (10,3 %)	7 (24,1 %)	10 (34,5 %)
CU	2 (6,9 %)	5 (17,2 %)	7 (24,1 %)
nCED	6 (20,7 %)	6 (20,7 %)	12 (41,4 %)
	11 (36,7 %)	18 (62,1 %)	29 (100 %)

b) Molekularbiologische Ergebnisse der Biopate von MC- und CU-Patienten sowie Kontrollprobanden aus dem *Caecum*

	PCR-Ergebnis		
	+	-	
MC	3 (10,7 %)	6 (21,4 %)	9 (32,1 %)
CU	1 (3,6 %)	6 (21,4 %)	7 (25,0 %)
nCED	2 (7,1 %)	10 (35,7 %)	12 (42,9 %)
	6 (21,4 %)	22 (78,6 %)	28 (100 %)

c) Molekularbiologische Ergebnisse der Biopate von MC- und CU-Patienten sowie Kontrollprobanden aus dem *Colon transversum*

	PCR-Ergebnis		
	+	-	
MC	2 (6,7 %)	8 (26,7 %)	10 (33,3 %)
CU	0 (0,0 %)	8 (26,7 %)	8 (26,7 %)
nCED	6 (20,0 %)	6 (20,0 %)	12 (40,0 %)
	8 (26,7 %)	22 (73,3 %)	30 (100 %)

d) Molekularbiologische Ergebnisse der Biopate von MC- und CU-Patienten sowie Kontrollprobanden aus dem *Colon sigmoideum*

	PCR-Ergebnis		
	+	-	
MC	2 (6,1 %)	11 (33,3 %)	13 (39,4 %)
CU	0 (0,0 %)	8 (24,2 %)	8 (24,2 %)
nCED	4 (12,2 %)	8 (24,2 %)	12 (36,4 %)
	6 (18,2 %)	27 (81,8 %)	33 (100 %)

Die molekularbiologischen Ergebnisse der Probandengruppen wurden auf Ebene jeweils eines Darmabschnitts verglichen. Bei Anwendung des Symmetrietests nach McNemar für abhängige Stichproben ergibt sich für das *Terminale Ileum* eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von $p = 0,622$, für das *Caecum* von $p = 0,610$ und für das *Colon sigmoideum* von $p = 0,152$. Die Häufigkeitsunterschiede molekularbiologischer Ergebnisse bei den untersuchten Gruppen sind somit im Bereich des *Terminalen Ileums*, des *Caecums* und des *Colon sigmoideums* nicht statistisch signifikant unterschiedlich. Auf der Ebene des *Colon transversums* ergab sich jedoch eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von $p = 0,048$. Dieser Darmabschnitt ist bei den nCED-Probanden statistisch gesichert häufiger positiv.

Vergleicht man die molekularbiologischen Ergebnisse der Erst- und Zweitprobe (Ansätze A und B) eines jeden Darmabschnitts, inkubiert in MGIT-Flüssigmedium, so wird ersichtlich, dass die Ansätze A und B nur bei insgesamt 4 Proben übereinstimmend MAP-positiv sind. Bei 16 Proben erwiesen sich nur die Ansätze A, bei 10 Proben nur die Ansätze B MAP-positiv (siehe Tabelle 39). Bei Anwendung des Symmetrietests nach McNemar für abhängige Stichproben ergibt sich eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von $p = 0,33$. Die Verteilung positiver Ergebnisse unter den beiden Proben ist somit nicht signifikant unterschiedlich und kann auch zufällig derart verteilt sein.

Tabelle 39: Darstellung molekularbiologischer Ergebnisse der Erst- (A) und Zweitprobe (B) aller Darmabschnittsproben in einer zweidimensionalen Kontingenztafel

		A		
		+	-	
B	+	4	10	14
	-	16	210	226
		20	220	240

Die detaillierten molekularbiologischen Einzelergebnisse positiver Probanden sind in Anhangstabelle 2 aufgelistet.

Abbildung 7 zeigt exemplarisch die Amplifikationskurve der MAP-spezifischen Marker F57 und *ISMAv2* von einem humanen MAP-Isolat, inklusive Positiv- und Negativkontrolle.

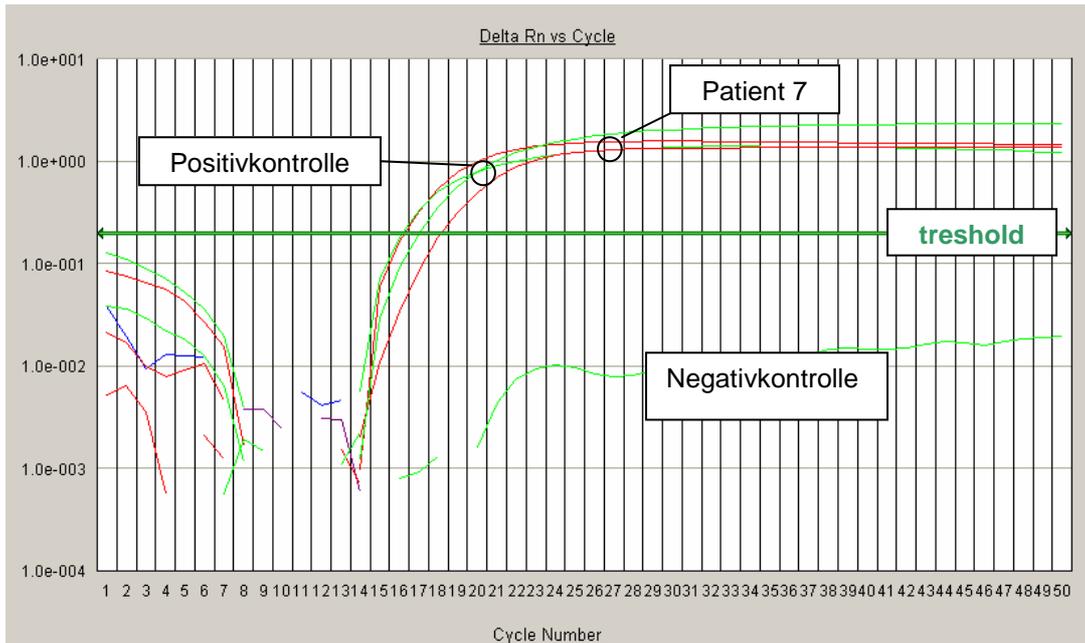


Abbildung 7: Nachweis von F57 und *ISMav2* bei einem humanen MAP-Isolat (Patient 7 III A, Koloniematerial) mit einer Real Time-PCR, inkl. Positiv- und Negativkontrolle sowie Leerwert.

Die Abbildung 8 veranschaulicht beispielhaft die den Nachweis von *IS900* mit dem Außenprimer TJ 1/2 mit der konventionellen nested PCR bei diversen Patienten. Es wird ersichtlich, dass bei Patient 7 bereits nach der Amplifikation des Außenprimers deutliche Banden auf gleicher Höhe wie die Positivkontrolle aufgetreten sind.



Abbildung 8: Exemplarische Darstellung des Nachweises von *IS900* mit den Primern TJ 1/2 in einer konventionellen nested PCR bei verschiedenen Patienten.

(M): Marker, (2-9): Patient 28, (10-11): Patient 7, (12-13): Patient 24, (14): *M. smegmatis*, (15): Negativkontrolle *M. scrofulaceum*, (16): Negativkontrolle *M. celatum*, (17): Positiv-/Positivauflösungskontrolle MAP 423, (18): Leerwert aus Mastermix, (19): Leerwert aus Mastermix, (M): Marker

In Abbildung 9 wird der Nachweis von *IS900* mit dem Innenprimer TJ 3/4 der konventionellen nested PCR bei diversen Patienten beispielhaft dargestellt.

Auch hier sind bei Patient 7 Banden auf Höhe der Positivkontrolle zu beobachten.



Abbildung 9: Exemplarische Darstellung des Nachweises von *IS900* mit den Primern TJ 3/4 in einer konventionellen nested PCR bei verschiedenen Patienten.

(M): Marker, (2-9): Patient 28, (10-11): Patient 7, (12-13): Patient 24, (14): Negativkontrolle *M. smegmatis* und *M. scrofulaceum*, (15): *M. celatum*, (16): Positiv-/Positivaufbereitungskontrolle MAP 423, (17): Leerwert aus TJ 1/2 I, (18): Leerwert aus TJ 1/2 II, (19): Leerwert aus Mastermix, (M): Marker

Zum Test von Gruppen-, Alters- und Geschlechtseinfluss auf die molekularbiologischen Ergebnisse wurde eine logistische Regressionsanalyse durchgeführt. Dabei konnte kein statistisch signifikanter Gruppen- und Geschlechtseinfluss ($p = 0,166$ bzw. $p = 0,101$) beobachtet werden. Der Alterseinfluss war jedoch mit einem p -Wert von $0,033$ statistisch signifikant. Bei einem positiven Regressionskoeffizient von $0,0068$ und einem Odds Ratio (Chancenverhältnis) von $1,07$ bedeutet das, dass die Häufigkeit des MAP-Nachweises mit zunehmendem Alter zunimmt und die Chance pro Lebensjahr um den Faktor $1,07$ steigt.

4.5 Ergebnisse der Sequenzanalyse

Das Kulturmaterial der isolierten Mykobakterien wurde durch Sequenzierung der Gene für die 16S-ribosomale RNS (Ribonukleinsäure) und der 16S-23S „intra-genic spacer region“ (ITS) bestätigt. Die ermittelten DNA-Basensequenzen wurden mit den Informationen der Datenbanken „Basic Local Alignment Search Tool“ (BLAST [NCBI]) und „Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms“ (RIDOM [Ridom GmbH]) verglichen. Da die öffentliche Datenbank BLAST teilweise erheblich differierende Doppelseintragungen für Basensequenzen aufweisen kann, wurde außerdem die qualitätsorientierte Referenzdatenbank RIDOM, in die ausschließlich gut charakterisierte Stammsammlungsstämmen aufgenommen werden, für die Alignierung genutzt. Die Datenbanken ermitteln die Subspezies, welche im Sequenzvergleich die größte Übereinstimmung mit dem zu bestimmenden Erreger aufweist.

Aus dem *Colon transversum* eines Kontrollprobanden konnte *M. avium* ssp. *paratuberculosis* isoliert werden. Die Sequenzanalyse mit Hilfe beider Datenbanken ergab eine 100 %ige Übereinstimmung bei den 16S- und ITS-Sequenzen zu MAP. Es wurden keine Mismatches beobachtet. In der Datenbank RIDOM wurde die Alignierung als „top-score-Ergebnis“ bewertet. Zusätzlich wurden die Markersequenzen *IS900*, *F57* und *ISMav2* mit den Referenzsequenzen der GenBank® des National Center of Biotechnology (Zugriffsnummern X70277, AE016958 und AF286339) verglichen.

Bei einem Colitis ulcerosa-Patienten konnten mit Ausnahme des *Caecums* aus den Darmabschnitten säurefeste Stäbchen isoliert werden, die in der PCR-Diagnostik nicht als *M. avium* ssp. *paratuberculosis* bestimmt werden konnten.

Im Sequenzvergleich erwiesen sich diese Isolate mit Hilfe der Datenbanken als *M. avium* ssp. *avium*. Bei einem weiteren Colitis ulcerosa-Patienten konnten im *Colon transversum* und im *Colon sigmoideum* säurefeste Stäbchen gefunden werden, die sich bei der Alignierung der Sequenzen ebenfalls als *M. avium* ssp. *avium* erwiesen. Auch bei einem Kontrollprobanden konnten vermehrungsfähige säurefeste Stäbchen aus den Biopaten des *Colon transversums* isoliert werden, die sich nach der Sequenzierung im Sequenzvergleich nicht als *M. avium* ssp. *paratuberculosis*, sondern als *M. avium* ssp. *avium* erwiesen (siehe Tabelle 40). Bei allen 16S- und ITS-Sequenzen der mutmaßlichen *M. avium* ssp. *avium*-Isolate zeigten sich in jeweils beiden Datenbanken 100 %ige Übereinstimmungen mit *M. avium* ssp. *avium*. Der Vergleich der 16S-Sequenzen ergab keine Mismatches. Im Vergleich der ITS-Sequenzen war bei jeder Sequenz ein Mismatch zu bemerken.

.

Tabelle 40: Aus humanen Darmbiopaten isolierte säurefeste Stäbchen inklusive Probandenzuordnung, Fluoreszenzzeitpunkt, Koloniewachstum und Sequenzierungsergebnis

Proband	Gruppe	Darmabschnitt	Fluoreszenzzeitpunkt	Koloniewachstum nach	Ergebnis Sequenzanalyse
7	nCED	<i>Colon transversum</i>	-	9 Wochen	<i>M. avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i>
24	nCED	<i>Colon transversum</i>	7. Woche	10 Tagen	<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>
30	CU	<i>Colon transversum</i> ¹⁾	10. Woche	7 Tagen	<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>
		<i>Colon transversum</i> ¹⁾	6. Woche	6 Tagen	<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>
		<i>Colon sigmoideum</i> ¹⁾	6. Woche	6 Tagen	<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>
		<i>Colon sigmoideum</i> ¹⁾	6. Woche	6 Tagen	<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>
31	CU	<i>Terminales Ileum</i> ¹⁾	4. Woche	6 Tagen	<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>
		<i>Terminales Ileum</i> ¹⁾	3. Woche	6 Tagen	<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>
		<i>Colon transversum</i> ¹⁾	4. Woche	6 Tagen	<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>
		<i>Colon transversum</i> ¹⁾	6. Woche	6 Tagen	<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>
		<i>Colon simoideum</i> ¹⁾	2. Woche	6 Tagen	<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>
		<i>Colon simoideum</i> ¹⁾	6. Woche	6 Tagen	<i>M. avium</i> ssp. <i>avium</i>

¹⁾ Doppelansatz A & B

MC: Morbus Crohn-Patient, CU: Colitis ulcerosa-Patient, nCED: Kontrollproband,

Von insgesamt 15 in der PCR positiven Probanden gelang die kulturelle Anreicherung von MAP in lediglich einem Fall. Dabei handelte es sich um eine Probe aus dem *Colon transversum* eines Kontrollprobanden. Bei zwei Colitis ulcerosa-Patienten und einem Kontrollprobanden konnte *Mycobacterium avium* ssp. *avium* kultiviert werden. Sämtliche dieser Proben erwiesen sich mit allen eingesetzten PCR-Systemen als negativ; dieses unterstreicht die Spezifität der molekularbasierten Nachweissysteme. Dass aus den Proben der 14 PCR-positiven Probanden ein kultureller Nachweis nicht gelang, könnte auf nicht (mehr) vermehrungsfähige Erreger zurückzuführen sein. Dieses Problem ist bekannt, da MAP-Zellen dazu neigen, in die sog. Sphäroblastenform überzugehen, in der sie nicht bzw. erst nach erheblich verlängerter Resuszitationszeit in spezifischen Nährmedien möglicherweise anzuzüchten sind.

In Tabelle 41 ist eine zusammengefasste Übersicht geno- und phänotypischer Ergebnisse aller Probanden abgebildet. Bei Anwendung des Symmetrietests nach McNemar für abhängige Stichproben ergibt sich eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von $p = 0,013$. Das bedeutet, dass die verwandten PCR-Verfahren (*IS900*-nested-PCR und Triplex Real Time-PCR) statistisch signifikant empfindlicher sind als der kulturelle Nachweis von Mykobakterien im Flüssigmedium MGIT.

Tabelle 41: Zusammengefasste geno- und phänotypische Ergebnisse aller Probanden

	PCR-positiv	PCR-negativ	Summe
kulturell positiv	1 ¹⁾	3 ²⁾	4
kulturell negativ	14	14	28
Summe	15	17	32

¹⁾ *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* ²⁾ *Mycobacterium avium* ssp. *avium*

Detaillierte geno- und phänotypische Ergebnisse sind für alle Probanden in Anhangstabelle 1 aufgeführt.

Alle Sequenzen wurden der GenBank[®] des National Center of Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) vorgelegt, in die Sammlung aufgenommen und haben Zugriffsnummern erhalten (siehe Tabelle 42).

Tabelle 42: Zugriffsnummern der Sequenzdaten von Patientenisolaten der GenBank® des National Center of Biotechnology Information

Patientenisolat	Zugriffsnummer
Patient 7, IS900	EF059898
Patient 7, 16S	EF059899
Patient 7, 23S	EF059900
Patient 24, 23S	EF059901
Patient 24, 16S	EF059902
Patient 30, 16S	EF059903
Patient 30, 23S	EF059904
Patient 31, 16S	EF059905
Patient 31, 23S	EF059906

4.6 Archivierung humaner Isolate und boviner Referenzstämme

Die drei humanen *M. avium* ssp. *avium*-Isolate sowie das humane MAP-Isolat und die bovinen Referenzstämme (DSMZ-Nr. 44133, 44135, 46621 und ein Feldisolat) wurden mehrfach in Form von Gefrierkulturen, sog. Glyzerinstocks und als Lyophilisat archiviert.

Zur Kontrolle wurden die Lyophilisate und die Gefrierkulturen einer jeden Charge ausgestrichen und ausnahmslos erfolgreich angezüchtet. Nach Abschluss der praktischen Dissertationsarbeit wurden alle Stämme erneut revitalisiert und zeigten sich hierbei ausnahmslos vermehrungsfähig und kontaminationsfrei.

5 DISKUSSION

5.1 Medienvergleich

Ein Ziel dieser Arbeit war es, ein Nährmedium für die Anreicherung von MAP zu finden, welches bei zuverlässiger Kultivierung preiswert und gleichzeitig einfach und möglichst zeitextensiv zu handhaben ist.

In den eigenen Untersuchungen konnte auf dem HEY- Medium frühzeitigeres Wachstum detektiert werden als es von DAMATO und COLLINS (1990) angegeben wurde. Dort betrug die durchschnittliche Anwachsdauer 49 Tage bei einer Inkubation im Röhrchen sowie 43 Tage bei einer Anreicherung auf HEYM-Platten. WISZNIEWSKA et al. (2005) gelang der Nachweis bei Reinkulturen im Mittel nach 35 Tagen Inkubation – es wurden somit rund 14 Tage länger benötigt als in der eigenen Arbeit. Auf Middlebrook 7H10-Agar beobachteten DAMATO und COLLINS (1990) nach durchschnittlich 27 Tagen Wachstum auf dem Festmedium (Platte) sowie nach 28 Tagen auf Schrägröhrchen. Dieses Medium zeigte die größere Anwachsrate und eine geringere Kontaminationsrate als HEYM. Da die Mykobakterien im Spatelverfahren ausgebracht werden können, ist eine Beurteilung und Auszählung von Einzelkolonien gut möglich. Bei der Handhabung von Middlebrook 7H10-Agarplatten in den eigenen Arbeiten fiel jedoch die regelmäßig notwendige Abdichtung mit Parafilm zur Vermeidung der Nährbodenaustrocknung als äußerst zeitaufwendig auf. Bei Nährmedien in Petrischalen ist mühelos eine mikroskopische Musterung durchführbar. Dies kann die Zeit bis zum Kolonienachweis erheblich verkürzen (DAMATO und COLLINS, 1990). So konnten SMITH et al. (2003) mit einer 40fachen Vergrößerung nach 8 Tagen Kolonien nachweisen. Nahezu die

gleiche Anzahl Kolonien war nach 28 Tagen auch makroskopisch sichtbar. KONEMAN et al. (1992) beobachteten auf Middlebrook-Agar nach 27,9 Tagen und auf Löwenstein-Jensen-Schrägagar (LJ) nach 32,9 Tagen Koloniewachstum aus klinischem Material. Gegenüber LJ konnten NIELSEN et al. (2004) auf HEYM deutlich schneller und zuverlässiger MAP-Wachstum feststellen. Auch WISZNIEWSKA et al. (2005) beobachteten MAP-Kolonien auf LJ später als auf HEYM, nämlich nach 6-9 Wochen Inkubation. Beim Vergleich der Produktivität der verschiedenen Nährmedien erwies sich LJ geringfügig besser als HEYM. Bei WISZNIEWSKA et al. (2005) ist die Wachstumsintensität nach 16 Wochen Inkubation auf dem HEY-Medium unwesentlich höher als auf LJ.

Die beiden weiteren Medien des Vergleichs - der Stonebrink- und ENCLIT-Nährboden - sind bislang in wissenschaftlichen Publikationen nicht berücksichtigt worden.

Die Koloniemorphologie von MAP ist abhängig von der Herkunft des Stammes bzw. vom Stammtyp und vom Nährmedium. Neben den nicht-pigmentierten gibt es gelb und orange pigmentierte MAP. Pigmentierte Stämme wurden vorrangig bei Schafen isoliert. Sie sind schwer zu kultivieren. Die Färbung ist während des gesamten Koloniewachstums sichtbar. Sie wird nicht durch eine Tierpassage verändert und ist genetisch bedingt (STEVENSON et al., 2002). Kolonien humaner Isolate sind häufig sehr klein und mit bloßem Auge kaum sichtbar (BULL, T., 2008; persönliche Mitteilung). Auf mykobaktinhaltigen Eigelbmedien wächst MAP klein, glatt, feucht und konvex. Auf eigelbfreien Festmedien wie Middlebrook-7H11 erscheinen MAP-Kolonien rau und

durchscheinend. Die Koloniemorphologie von Mykobakterien ist auch vom Koloniealter abhängig und kann im Laufe des Wachstums variieren (SMITH et al., 2003). Wenn die Kolonien älter werden und das Medium trockener wird, können die Kolonien ein „krümeliges“ Erscheinungsbild annehmen oder es bildet sich ein Hohlraum zwischen Koloniezentrum und Agaroberfläche (MERKAL und CURRAN, 1974; HERMON-TAYLOR und EL-ZAATARI, 2004).

Die Standardabweichung des Paratuberkulose-Nährbodens (ENCLIT) ist mit 10,9 und 1,6 Tagen für MAP sehr unterschiedlich, was durch die schlechte Sichtbarkeit der Kolonien auf der Nährbodenoberfläche begründet sein kann. Aufgrund der weichen Konsistenz des ENCLIT- und Stonebrink-Nährbodens konnten Kolonien nur schlecht von der Oberfläche isoliert werden.

Vergleicht man die Nachweiszeiten für die beiden eingesetzten MAP-Stämme miteinander, so zeigen sich Unterschiede, die sich beim gleichen Medium sogar auf bis zu annähernd sieben Tage belaufen können. Auch die Ergebnisse eines früheren Versuchsansatzes mit 33 verschiedenen bovinen MAP-Stämmen zeigen diese Differenz (FÜLLGRABE et al., 2005). Unterschiedliche Nachweiszeiten boviner Stämme auf dem gleichen Medium wurden auch bei DE JUAN et al. (2006a) beobachtet. Ob ein MAP-Stamm anzuzüchten ist, wird entscheidend durch die Wahl des Nährmediums beeinflusst (CERNICCHIARO et al., 2008). Innerhalb der MAP-Gruppe können je nach Wachstumsgeschwindigkeit verschiedene Phänotypen auftreten, die langsam wachsenden (12 Wochen) ovinen und die schneller wachsenden bovinen Isolate (6-12 Wochen) (BAUERFEIND et al., 1996). Nach DE JUAN et al. (2005a und 2006a) ist diese Einteilung jedoch nicht grundsätzlich von den Tierarten abhängig, von

denen das Isolat gewonnen wurde. Extrem langsam wachsende Stämme können demnach auch von Rindern und Ziegen isoliert werden. Häufig subkultivierte Laborstämme wachsen i. d. R. schneller als frisch gewonnene Feldisolate (PARRISH et al., 2004) und das im HEYM enthaltene Natriumpyruvat kann das Wachstum oviner Stämme hemmen und das der bovinen fördern (JUSTE et al., 1991). Stammspezifisch können daraus Unterschiede in der Zeit bis zur makroskopischen Erkennung von MAP-Kolonien resultieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle fünf eingesetzten Nährmedien für die Kultivierung von MAP geeignet sind. Wegen der kürzesten Nachweisdauer eignet sich das Herrold's Egg Yolk Medium für einen kulturellen Direktnachweis am besten. Für Subkulturen ist der preisgünstige Paratuberkulose-Nährboden (ENCLIT) geeignet. Zur Beurteilung von Einzelkolonien, beispielsweise zur Kontrolle einer Kontamination, ist der Einsatz des Middlebrook 7H10-Agars zu empfehlen.

5.2 Validierung der Dekontaminationswirkung von N-Acetyl-L-

Cystein-NaOH auf *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*

Zwei Faktoren beeinflussen den Erfolg eines Dekontaminationsverfahrens: die Fähigkeit des Agens, Begleitkeime zu reduzieren oder zu hemmen sowie der Effekt auf die Vermehrungsfähigkeit des Zielorganismus selber. Dekontaminationsverfahren können das Wachstum von MAP negativ beeinflussen (REDDACLIFF et al., 2003; GRANT und ROWE, 2004). Und eine falsche Kombination von Dekontaminationsverfahren und Medium kann

Wachstum entgegenwirken (SMITHWICK et al., 1975). Bisher existieren keine wissenschaftlichen Publikationen über die Wirkung von N-Acetyl-L-Cystein (NALC)-NaOH explizit auf MAP; daher wurde das Dekontaminationsverfahren im Vorfeld der eigenen Untersuchungen validiert. NALC wurde bereits zur Dekontamination humaner Darmbioplate eingesetzt (BULL et al., 2003; SCHWARTZ et al., 2000) und ist nach DIN 58943-3 zur Dekontamination humaner Gewebeproben für die Isolation von Tuberkuloseerregern vorgeschrieben. Neben NALC wurde Hexadecylpyridiniumchlorid (HPC) (GRAHAM et al., 1987; COLLINS et al., 2000), Benzalkoniumchlorid (CHIODINI et al., 1986; CHIODINI et al., 1984) und Natriumhydroxid (SECHI et al., 2005) zur Dekontamination humaner Darmbioplate für den MAP-Nachweis eingesetzt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine wachstumshemmende Wirkung der NALC-NaOH-Methode auf Mykobakterien spezies- und stammabhängig ist und für *Mycobacterium avium* ssp. *avium* weniger stark ausgeprägt ist als für *Mycobacterium tuberculosis* (THORNTON et al., 1998). YAJKO et al. (1993) empfehlen für den Nachweis von Erregern des *Mycobacterium avium*-Komplexes aus Stuhlproben die NALC-NaOH-Dekontaminationsmethode.

In der eigenen Arbeit konnte teilweise sowohl eine leichte Verzögerung des Bakterienwachstums von einem bis max. 14 Tagen im Flüssigmedium, als auch eine nach DIN 58943-3 tolerierbare Wachstumsreduzierung (maximal eine semiquantitative Kategorisierungsstufe weniger) nach Dekontamination beobachtet werden. Eine Verringerung der nachweisbaren koloniebildenden Einheiten und ein langsames Wachstum von Mykobakterien infolge des Dekontaminierungsverfahrens wurde auch in anderen Publikationen

beschrieben (GRANT et al., 2003; REDDACLIFF et al., 2003; YEBOAH-MANU et al., 2004). Insgesamt beeinflusst das NALC-Verfahren eine MAP-Isolierung nur sehr geringfügig und in unvermeidbarem Maße und kann als zur Dekontamination humaner Bioprote geeignet angesehen werden.

5.3 Kultureller und molekularbiologischer Nachweis von MAP aus Darmschleimhaut von Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten sowie Kontrollprobanden

5.3.1 Methodische Aspekte

Die Einstufung der Probanden in die drei Gruppen „Morbus Crohn“, „Colitis ulcerosa“ und „nicht chronisch-entzündliche Darmerkrankung“ wurde von auf chronisch-entzündliche Darmerkrankungen spezialisierten Gastroenterologen durchgeführt. Neben bereits vorliegenden Untersuchungsergebnissen und Diagnosen wurde die Gesamtheit der Resultate aus vergangenen und aktuellen Untersuchungen des Universitätsklinikums herangezogen. Allerdings weisen CU und MC zahlreiche Ähnlichkeiten mit anderen Erkrankungen auf. Bei Fehlen pathognomonischer Befunde muss für die Diagnose die Kombination von klinischen, histopathologischen, röntgenologischen und Laborbefunden sowie das Ansprechen auf Therapieversuche herangezogen werden (FRIEDMANN und BLUMBERG, 2005). Außerdem können MC und CU zeitgleich bei einem Patienten auftreten und nacheinander diagnostiziert werden (CHEN et al., 2002). Divertikulitiden anderer Genese können leicht mit einer chronisch-

entzündlichen Darmerkrankung verwechselt werden (GLEDHILL und DIXON, 1998; PEPPERCORN, 2004).

MAP konnte bereits aus dem Blut (NASER et al., 2004; ELGUEZABAL et al., 2005), der Muttermilch (NASER et al., 2000), dem Stuhl (DEL PRETE, 1998; SINGH et al., 2005) und zahlreichen Proben eines HIV-Patienten (RICHTER et al., 2002) detektiert werden. Die meisten Studien beschäftigen sich jedoch mit dem Nachweis aus humanem Darmgewebe. Obwohl laut SCHWARTZ et al. (2000) die Wahrscheinlichkeit, MAP aus dem Darm nachzuweisen bei reseziertem Gewebe größer ist als bei Schleimhautbiopaten, wurden in einer Reihe von neueren Veröffentlichungen Biopate aus der Darmschleimhaut von MC- und CU-Patienten sowie Kontrollprobanden mit dem Ergebnis eines positiven MAP-Nachweises untersucht (BULL et al., 2003; ELLINGSON et al., 2003; SECHI et al., 2005; TADDEI et al., 2005a). Die vergleichende Untersuchung von Biopaten aus verschiedenen Darmabschnitten ein und desselben Patienten wurde bisher nur selten durchgeführt (BERNSTEIN et al., 2003; BULL et al., 2003; AUTSCHBACH et al., 2005). Die eigenen Untersuchungen sind bislang die einzigen, in der vier verschiedenen Darmabschnitte getrennt voneinander untersucht wurden.

In dieser Arbeit wurden erstmalig die drei molekularbiologischen Marker *IS900*, *ISMav2* und *F57* in Verbindung mit der kulturellen Anzucht für den MAP-Nachweis in humanen Darmbiopaten eingesetzt. Zusätzlich ist dies die bisher einzige deutsche Fall-Kontroll-Studie, die drei verschiedene diagnostische Verfahren - Ziehl-Neelsen-Färbung, Kultur und molekularbiologischer Nachweis - kombiniert. Eine gleichzeitige kulturelle und molekularbiologische

Untersuchung von Bioplaten aus einem Darmbereich (BULL et al., 2003; SECHI et al., 2005) lässt aufgrund des genotypischen Verfahrens zwar sofortige Ergebnisse bezüglich der Zielfrequenz erwarten, erlaubt jedoch keine Aussage über die Vermehrungsfähigkeit des molekularbiologisch detektierten Erregers. Eine Anreicherung des Zielkeims vor der eigentlichen molekularbiologischen Untersuchung bietet den Vorteil, dass Bakterien, deren Ausgangskonzentration unter der Nachweisgrenze des gewählten PCR-Verfahrens liegt, nach Vermehrung detektiert werden können. Aus diesem Grunde wurden in der vorliegenden Arbeit die molekularbasierten Untersuchungen aus den mit dem gesamten gewonnenen Darmgewebe eines Darmabschnitts inokulierten Flüssigmedien nach Anreicherung durchgeführt.

Bei MAP handelt es sich um einen schwer zu isolierenden und zu passagierenden Erreger. Er kommt offensichtlich in nur geringen Konzentrationen in humanem Gewebe vor (CHIODINI et al., 1986). Aufgrund der langen Wachstumsdauer kann er leicht von schneller wachsenden Mikroorganismen verdrängt werden. Für den Eisenstoffwechsel ist er auf die externe Zufuhr von Mycobactin angewiesen und kann sich auf einem Medium ohne dieses Supplement nicht vermehren (FRANCIS, 1953; MERKAL et al., 1964). Die Zugabe von Eigelb zum Flüssigmedium wurde zwar in manchen Publikationen beschrieben, ein förderlicher Effekt auf das MAP-Wachstum wird jedoch kontrovers diskutiert (COLLINS et al., 2000; FYOCK et al., 2005) und wirkt sich verzögernd auf den quantitativen Real Time-PCR-Nachweis aus (SWEENEY et al., 2006). STITT et al. (1996) beobachteten Ausflockungen aufgrund des Eigelbzusatzes und Interferenzen mit dem Sauerstoffsensoren am

Boden des MGIT-Röhrchens. In Flüssigmedien wächst MAP in charakteristischer Klumpenform (HERMON-TAYLOR und EL-ZAATARI, 2004). Daher ist als weiterer Hinweis auf das Wachstum von MAP eine inhomogene Trübung oder die Ausbildung kleiner „Körner“ oder Flocken im Kulturmedium zu werten. MAP ist bekannt für seine Eigenschaft, während des Wachstums Zellklumpen zu bilden. Die Zeit bis zum Nachweis hängt von der Zelldichte im Inokulum ab, erhöhte Konzentrationen erniedrigen die Nachweiszeit proportional (FYOCK et al., 2005). Laut GRANT et al. (2003) weist MGIT eine Nachweisgrenze von 10^1 MAP/ml Inokulum auf. Wöchentliches Schütteln fördert das Wachstum in Flüssigmedien (VAN MAANEN, 2005).

Eine Beeinträchtigung von MAP sollte durch Validierung des Dekontaminationsverfahrens weitestgehend ausgeschlossen werden. Subletal geschädigte Organismen benötigen eine verlängerte Inkubation, um im Nährmedium zu wachsen. Eine Inkubationszeit von einem Jahr erwies sich bei hitzegeschädigten Keimen aus Milch (HAMMER et al., 2000) sowie bei humanen Isolaten aus Darmbiopaten (BULL, T., 2005; persönliche Mitteilung) als erforderlich. Manche MAP-Stämme lassen sich jedoch überhaupt nicht kultivieren (HERMON-TAYLOR und EL-ZAATARI, 2004). Zellwanddefekte Formen, sog. Sphäroblasten, sind ebenfalls extrem zeitaufwendig zu kultivieren und lassen sich zudem mit der traditionellen ZN-Färbung nicht anfärben (MARKESICH et al., 1988). Diese Zellformen wurden bereits mehrfach im menschlichen Darm nachgewiesen und wurden ursächlich mit MC in Verbindung gebracht (BURNHAM und LENNARD-JONES, 1978; CHIODINI et al., 1986; GRAHAM et al., 1987; GITNICK et al., 1989; MOSS et al., 1992;

WALL et al., 1993; SECHI et al., 2001). In einigen aktuellen Arbeiten hat sich das Flüssigmedium MGIT zum MAP-Nachweis aus humanen Darmproben als geeignet erwiesen (SCHWARTZ et al., 2000; BULL et al., 2003; SECHI et al., 2005). Es wurden unterschiedliche Inkubationszeiten gewählt: im Mittel 10 Wochen (SECHI et al., 2005), 1 Jahr (SCHWARTZ et al., 2000) oder sogar 88 Wochen (BULL et al., 2003). COLLINS et al. (2000) weiteten die Inkubationszeit sogar auf drei Jahre aus. In der vorliegenden Arbeit wurden die humanen Darmbioplate, im Anschluss an die planmäßige Untersuchung nach 12 Wochen, mindestens neun und längstens 24 Monate im Flüssigmedium MGIT weiter inkubiert, bevor sie einer abschließenden molekularbiologischen Untersuchung unterzogen wurden. Über diese Arbeit hinaus werden die Proben jedoch weiter inkubiert und sollen nach einer Bebrütungsdauer von voraussichtlich zwei bzw. drei Jahren erneut untersucht werden.

Das Insertionselement *IS900* galt lange Zeit als „golden standard“ für die molekularbasierte Detektion von MAP. Die meisten wissenschaftlichen Arbeiten gehen auf die Verwendung von sechs verschiedenen Primerpaaren zurück. Es handelt sich im Einzelnen um AV1/AV2 (BERNSTEIN et al., 2003; NASER et al., 2004; AUTSCHBACH et al., 2005; ROMERO et al., 2005), p90/p91 (MOSS et al., 1992; SANDERSON et al., 1992; DUMONCEAU et al., 1996; RIGGIO et al., 1997; CHIBA et al., 1998; HERMON-TAYLOR et al., 1998; KANAZAWA et al., 1999; BERNSTEIN et al., 2003; NASER et al., 2004; ROMERO et al., 2005; GIBSON et al., 2006), *IS900-1/IS900-2* (WALL et al., 1993; RICHTER et al., 2002), *IS900/150C/IS900/921* (DUMONCEAU et al., 1996; CHIBA et al., 1998; DEL PRETE et al., 1998; KANAZAWA et al., 1999), p89/p92 (SECHI et al.,

2005), L1/L2 (AUTSCHBACH et al., 2005). Einige Autoren (COUSINS et al., 1999; BÖLSKE et al., 2002; ENGLUND et al., 2002; TADDEI et al., 2005b) beschreiben allerdings Kreuzreaktionen mit *IS900*-like-Elementen. Daher erscheint dieser Marker für den spezifischen MAP-Nachweis weniger geeignet. BULL et al. (2003) haben jedoch ein konventionelles nested PCR-Verfahren mit den Primern TJ 1-4 vorgestellt, welches kein anderes Element der *IS900*-Familie detektiert und somit vollkommen spezifisch für MAP sein sollte.

Konventionelle PCR-Verfahren sind in der Lage, weniger als 100 Kopien DNA-Matrix pro Reaktion zu detektieren; darüber hinaus sind nested PCR-Verfahren zum DNA-Nachweis in Proben mit geschädigtem genetischen Material oder in Anwesenheit von Inhibitoren geeignet, wie beispielsweise bei archäologischem Material (FLETCHER et al., 2003; HUGGETT et al., 2004). Sie können eine einzige Kopie der Zielsequenz detektieren und somit fälschlicherweise auch Umweltkontaminationen darstellen. Die Real Time-PCR-Technologie liefert als methodische Weiterentwicklung der konventionellen PCR neben der Detektion im geschlossenen System auch den Vorteil einer gesteigerten Sensitivität (mit Ausnahme der nested PCR, BUSTIN et al., 2005). Sie ist 100- bis 1000fach sensitiver als ein konventionelles Verfahren. Die Nachweisgrenze eines Amplifikates im Agarosegel liegt bei zwei bis vier ng, während der Real Time-PCR Nachweisgrenzen von zwei bis 20 pg attestiert werden (BUSTIN, 2000; MACKAY, 2004). In einigen Arbeiten wird die Entwicklung von *IS900*-gestützten Real Time-PCR-Verfahren beschrieben. Die dargestellten Methoden sind schlicht und kombinieren bereits in der konventionellen PCR verwendete Oligonukleotide (KIM et al., 2002) mit dem Fluoreszenzfarbstoff SybrGreen®

(O'MAHONY et al., 2002). Somit verfügen auch sie nicht über die erforderliche Spezifität, noch genügen sie den europäischen Anforderungen an eine qualitätsgesicherte Diagnostik, wie sie etwa im CEN-Diskussionspapier CEN/TC 275/WG6TAG 3 N 0103 dargestellt wird. Mit den Zielstrukturen *ISMav2* (STROMMENGER et al., 2001) und F57 (POUPART et al., 1993) stehen zwei spezifische Zielstrukturen zur Verfügung. Anhand dieser Referenzsequenzen wurden für das Real Time PCR-Verfahren nach SCHÖNENBRÜCHER et al. (2008) Oligonukleotidprimer und TaqMan[®]-Fluoreszenzsonden abgeleitet. Zur diagnostischen Qualitätssicherung wurde eine interne Amplifikationskontrolle etabliert und mit dem Nachweis von F57 und *ISMav2* zu einem Triplexverfahren kombiniert. Eine hohe Spezifität konnte mit 205 Referenzstämmen, darunter 105 MAP-Stämme bovinen, ovinen und humanen Ursprungs und 100 nicht-MAP-Stämmen, gesichert werden. Die Sensitivität des Verfahrens entspricht mit 1 pg DNS pro Ansatz der Nachweisgrenze des im Vergleich eingesetzten konventionellen nested PCR-Verfahrens nach BULL et al. (2003). Durch die Amplifikation im geschlossenen System ist jedoch das Kontaminationsrisiko geringer als bei einer konventionellen Methode. Bislang existieren jedoch nur sehr wenige Arbeiten über Real Time PCR-Verfahren zum MAP-Nachweis in humanem Gewebe (FUJITA et al., 2002; SECHI et al., 2005). Dies ist die erste deutsche Veröffentlichung über ein Real Time PCR-Verfahren zur Untersuchung von humanen Darmbiopsaten auf MAP und die erste Veröffentlichung überhaupt, die eine interne Amplifikationskontrolle zur Untersuchung humaner Darmbiopsate auf MAP einsetzt.

5.3.2 Vorkommen von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* im Darmgewebe von Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten sowie Kontrollprobanden

In den eigenen Untersuchungen erwiesen sich vier von 12 (33,3 %) MC- und zwei von acht (25,0 %) CU-Patienten sowie neun von 12 (75,0 %) Kontrollprobanden molekularbiologisch MAP-positiv. Das Vorkommen von MAP bei Kontrollprobanden mit Erkrankungen des Magen-Darm-Trakts konnte auch in anderen Studien beobachtet werden (MOSS et al., 1992; SANDERSON et al., 1992; DELL'ISOLA et al., 1994; LISBY et al., 1994; DEL PRETE et al., 1998; SCHWARTZ et al., 2000; BULL et al., 2003; AUTSCHBACH et al., 2005; SECHI et al., 2005). Es gibt Untersuchungen, in die nur MC-Patienten einbezogen wurden, und MAP nicht detektiert werden konnte (AL-SHAMALI et al., 1997; CHIBA et al., 1998; CELLIER et al., 1998; BAKSH, et al., 2004; TZEN et al., 2006). In einigen Studien konnte MAP weder bei MC- und CU-Patienten noch bei Kontrollprobanden nachgewiesen werden (DUMONCEAU et al., 1996; FRANK et al., 1996; RIGGIO et al., 1997; KANAZAWA et al., 1999; FUJITA et al., 2002; ELLINGSON et al., 2003; TADDEI et al., 2005a; LOZANO-LEON et al., 2006) und in manchen Arbeiten wurde der Erreger häufiger bei Kontrollprobanden als bei MC-Patienten festgestellt (ROWBOTHAM et al., 1995; BERNSTEIN et al., 2003; ELGUEZABAL et al., 2005). Diese uneinheitlichen Ergebnisse können durch methodische Differenzen im Studiendesign und der Nachweisverfahren provoziert worden sein: Für eine sensitive Nachweisführung ist die Probenaufbereitung von wesentlicher Bedeutung (MALORNY und HOORFAR, 2005). Um maximale DNA-Ausbeute

zu sichern, ist der Aufschluss der robusten MAP-Zellwand wesentlich. Daher ist ein optimaler mechanischer Disruptionsschritt bei einem Direktnachweis unbedingter Bestandteil des Extraktionsverfahrens (ODUMERU et al., 2001; BULL et al., 2003). Außerdem ist zu bedenken, dass MAP zwar intrazellulär, jedoch außerhalb des Zellkerns anzutreffen ist. Mit manchen kommerziellen DNA-Extraktionskits werden jedoch alle nicht-nuklearen Organellen entfernt. Dies kann zu falsch-negativen Ergebnissen führen (GREENSTEIN, 2003). Ein zusätzlicher Nachteil eines PCR-Direktnachweises sind die aus der Paratuberkulose-Diagnostik bekannten Inhibitoren, die ebenfalls zu falsch-negativen Ergebnissen führen können. Die Gewebeaufbereitung sollte aus frischen Proben erfolgen (BULL et al., 2003). Unabhängig von technischen Gegebenheiten kann die möglicherweise heterogene Verteilung des Bakteriums im Darmgewebe von Bedeutung für den Nachweis sein. Durch das schubweise Auftreten des Morbus Crohn wäre die Krankheitsaktivität zum Zeitpunkt der Probenahme vermutlich mitentscheidend wenn Mikroorganismen im Pathogenesegeschehen eine Rolle spielen. Überdies kann die Lokalisation der Probenahme das Ergebnis erheblich beeinflussen. Höhere MAP-Konzentrationen können sich in und um den Entzündungsherd als primäre Ursache der Entzündung oder durch passiven Transport mittels infiltrierender Entzündungszellen befinden. BULL et al. (2003) propagieren die Probenahme aus dem das Entzündungszentrum umgebenden Gewebe. Diese Empfehlung wurde in der eigenen Arbeit beachtet und umgesetzt. In granulomatösem Gewebe ist die Nachweiswahrscheinlichkeit von MAP nach FIDLER et al. (1994) deutlich höher. Andererseits ist bei starkem Entzündungsgeschehen,

welches zur Ulzeration führt, auch eine Ausscheidung von Zellen einschließlich Mykobakterien in das Darmlumen denkbar. Dies würde die Nachweisbarkeit reduzieren. Auch das Alter der Patienten kann die Resultate beeinflussen. Positive kulturelle Ergebnisse können eher bei jungen MC-Patienten erlangt werden (CHIODINI et al., 1984b und 1984c). Das Altersspektrum in den eigenen Untersuchungen lag zwischen 17 und 76 Jahren und die Häufigkeit des molekularbiologischen MAP-Nachweises stieg mit zunehmendem Alter signifikant an.

Zudem sind unterschiedliche Konzentrationen des Erregers – nach zeitlichem Abstand der Exposition, Quelle und Übertragungsweg – denkbar. Je nach Sensitivität des angewandten Verfahrens kann es so ebenfalls zu abweichenden Ergebnissen kommen. Die divergierende Exposition bei gleichzeitig unterschiedlicher genetisch bedingter Empfänglichkeit (SCHMID et al., 2004) der Probanden gegenüber MAP kann ebenso zur Beeinflussung der Ergebnisse führen, wie eine vorangegangene antimikrobielle oder immunsuppressive Medikation, insbesondere der chronisch-entzündlich erkrankten Darmpatienten.

Das Vorkommen von MAP bei allen untersuchten Probandengruppen der eigenen Untersuchungen spiegelt sicherlich auch die bekanntermaßen weite Verbreitung von Mykobakterien in der Umwelt wider (GAY und SHERMAN, 1992) und deckt sich mit den Ergebnissen anderer Arbeiten (MOSS et al., 1992; SANDERSON et al., 1992; DELL'ISOLA et al., 1994; DEL PRETE et al., 1998; SCHWARTZ et al., 2000; BULL et al., 2003; AUTSCHBACH et al., 2005; SECHI et al., 2005). Wie häufig Menschen mit MAP infiziert sind, verdeutlicht

auch eine spanische Studie: MAP konnte molekularbiologisch bei 41 % der Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) und sogar bei 42,5 % der gesunden Personen im Blut nachgewiesen werden (ELGUEZABAL et al., 2005).

Eine Assoziation zwischen dem MAP-DNA-Nachweis und der klinischen Erkrankung Morbus Crohn scheint nicht durch einen simplen Vergleich der Nachweishäufigkeit darstellbar zu sein. Wendet man das Pathogenesemodell der Paratuberkulose auf die Humanerkrankung an, so repräsentieren klinische Fälle nur einen geringen Teil der tatsächlich infizierten Population (ELGUEZABAL et al., 2005). Und diese sind höchstwahrscheinlich zumeist bereits mit Antibiotika vorbehandelt, so dass die Nachweiswahrscheinlichkeit bei dieser Personengruppe eventuell sogar geringer sein dürfte.

Ein gegenüber CED-Patienten gehäuftes MAP-Vorkommen bei Kontrollprobanden wurde nicht nur in der eigenen Arbeit festgestellt. Bei BERNSTEIN et al. (2003) waren sechs von 19 (31,6 %) Kontrollprobanden molekularbiologisch MAP-positiv, wohingegen bei nur einem von 28 (3,6 %) CU-Patienten MAP nachgewiesen werden konnte. Alle 24 MC-Patienten waren MAP-negativ. Bei 49 CU- und 68 MC-Patienten konnten ROWBOTHAM et al. (1995) keine MAP nachweisen. Allerdings gelang der MAP-Nachweis bei einem von 26 (3,9 %) Kontrollprobanden.

In den eigenen Untersuchungen konnte bei 14 von 15 (93,3 %) molekularbiologisch positiven Proben bisher kein MAP-Wachstum auf Kulturmedien festgestellt werden. Die eigenen Ergebnisse gehen konform mit

denjenigen anderer Arbeitsgruppen (DEL PRETE et al., 1998; COLLINS et al., 2000; ALAM et al., 2002; HRUSKA et al., 2005; PICKUP et al., 2005a; SECHI et al., 2005; STEPHAN et al., 2006). Nicht zwangsläufig sind hier nicht mehr lebensfähige Bakterien nachgewiesen worden, möglich ist auch der Nachweis einer extrem schwer kultivierbaren, zellwanddefekten Form von MAP, sog. Sphäroblasten. Sie replizieren in Kultur extrem langsam und lassen sich in der Ziehl-Neelsen-Färbung nicht darstellen. Generell unterscheidet sich die Färbung intrazellulärer Komponenten bei zellwanddefekten und –intakten Formen nicht, wohl aber die Anfärbung der äußeren Zellwandschichten. Unter dem Elektronenmikroskop erscheinen zellwanddefekte Formen größer und runder als intakte. Sie haben den Großteil ihrer Zellwand eingebüßt und werden nur von einer Plasmamembran begrenzt (HINES und STYER, 2003). Mittels PCR-Verfahren ist eine Unterscheidung beider Formen z. Zt. nicht möglich; allerdings wurden *in situ*-Hybridisierungsmethoden entwickelt, die eine Differenzierung erlauben (HULTEN et al., 2000). In einigen Arbeiten konnten bereits Sphäroblasten im Gewebe von Morbus Crohn-Patienten nachgewiesen werden (BURNHAM und LENNARD-JONES, 1978; GRAHAM et al., 1987; GITNICK et al., 1989; MOSS et al., 1992; WALL et al., 1993; SECHI et al., 2001). CHIODINI et al. (1986) isolierten MAP-Sphäroblasten aus Darmgewebe von Morbus Crohn-Patienten. Erst nach der dritten Passage auf HEYM und einer weiteren Passage in 7H9-Middlebrook-Flüssigmedium waren deutlich säurefeste Mykobakterien anzuzüchten. Wachstum und Transformation zu zellwandintakten Formen konnten nur auf HEYM und 7H9-Middlebrook-Flüssigmedium beobachtet werden. Ein geeignetes Flüssigmedium zur

schnellen Vermehrung von Sphäroblasten ohne Umwandlung zu zellintakten Formen steht nicht zur Verfügung. MARKESICH et al. (1988) verglichen diverse Nährmedien in unterschiedlichen Zusammensetzungen und entwickelten ein Flüssigmedium, welches für die Transformation von Sphäroblasten zu säurefesten Stäbchen am geeignetesten erschien. Es handelt sich um eine Rezeptur aus Kalbfleischbrühe, 1 % Hefeextrakt, 10 % Pferdeserum, 0,3 M Saccharose, 0,2 % MgSO₄, 0,1 % Eisenammoniumsulfat, 0,1 % Natriumzitat und 2 mg Mycobactin J pro Liter. Pferdeserum absorbiert Toxine und ist aufgrund seiner Vielzahl an Nährstoffen wie freie Aminosäuren, freie Fettsäuren, Triglyceride, Cholesterin, Albumin, zahlreiche Vitamine und Spurenelemente sehr wertvoll. Bislang unidentifizierte Faktoren könnten das Wachstum zusätzlich unterstützen. HINES und STYER (2003) stellten fest, dass sich zellwanddefekte Formen in frischem 7H9-Middlebrook-Flüssigmedium mit Glycerin und Mycobactin J, welches auch in dieser Arbeit Verwendung fand, stufenweise zu intakten Formen umwandeln. Auch NASER et al. (2004) isolierten Sphäroblasten aus dem Blut von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, welche sich nach durchschnittlich 12 Wochen Inkubation im 7H9-Middlebrook-Flüssigmedium zu intakten MAP umwandelten.

Sphäroblasten können im Körper länger persistieren, haben geringere chemotaktische Aktivität und sind fähig, Phagozytose in einem größeren Maß zu widerstehen als die intakten Formen (RATNAM und CHANDRASEKHAR, 1976; RYAN und CAMPBELL, 2006). Dauerhaft zellwanddefekte Formen replizieren über einen längeren Zeitraum und vermögen daher eine Infektion in

einem subklinischen bzw. die Erkrankung in einem chronischen Stadium zu halten (CHIODINI et al., 1986). HINES und STYER (2003) vermuten eine Reduktion von Lipoarabinomanan (LAM) bei zellwanddefekten Formen von MAP. LAM gehört zu den dominierenden Immunogenen der Mykobakterienzellwand (HUNTER, 1986). Veränderte Konzentrationen können die Immunantwort des Wirtes verändern. Die bei Sphäroblasten auftretenden morphologischen und chemischen Abweichungen gegenüber intakten Zellen können Diagnose, Virulenz, Pathogenität, Immunantwort und das Ausmaß der Erkrankung bei Mensch und Tier signifikant beeinflussen (HINES und STYER, 2003). Die Anwesenheit von Sphäroblasten bei Morbus Crohn-Patienten und/oder bei an Paratuberkulose erkrankten Wiederkäuern mag erklären, warum der Erreger oft nur in geringer Konzentration nachweisbar ist oder in deutlich veränderten Organen mit der Ziehl-Neelsen-Färbung keine positiven Ergebnisse zu erzielen sind. Außerdem ist eine Anstoßfunktion von Sphäroblasten bei einer überschießenden oder persistierenden Immun- oder Autoimmunreaktion denkbar, die zur Entwicklung der Erkrankung, zumindest bei einem Teil der Patienten führen kann (HULTEN et al., 2000).

CU-Patienten erwiesen sich auch in anderen Arbeiten seltener MAP-positiv als MC-Patienten (SANDERSON et al., 1992; DELL'ISOLA et al., 1994; LISBY et al., 1994; CLARKSTON et al., 1998; DEL PRETE et al., 1998; NASER et al., 2004; AUTSCHBACH et al., 2005).

Colonproben von Kontrollprobanden erwiesen sich mit 10 von 18 (55,6 %) positiven Proben auffallend häufig MAP-positiv. Proben aus dem *Colon transversum* von Kontrollprobanden waren statistisch signifikant ($p=0,048$)

häufiger positiv. Physiologischerweise ist die Stuhlsäule im distalen Colon bereits fast komplett ausgebildet und ihr Kontakt zur Darmschleimhaut länger und enger. Daher ist ein Übergang vorhandener Bakterien in die Mukosa wahrscheinlicher. Bei den MC-Patienten konnte MAP in allen Darmabschnitten ungefähr gleich häufig detektiert werden. Durch eine krankheitsbedingt geschädigte Darmwand können Bakterien in allen Darmbereichen die Mukosa penetrieren.

Aus dem *Colon transversum* eines Kontrollprobanden konnte MAP kultiviert werden. Der Patient litt an einer chronischen Pankreatitis. Vermehrungsfähige *M. avium* ssp. *avium* konnten aus dem *Colon transversum* eines weiteren Kontrollprobanden isoliert werden. Laut Vorbericht hatte er „blutigen Stuhlgang“. GRAHAM et al. zeigten bereits 1987, dass diverse Mykobakterienspezies aus dem Darmgewebe von Patienten ohne chronisch-entzündliche Darm-erkrankungen nachweisbar sind. Auch in anderen Arbeiten konnten neben MAP weitere Mykobakterienspezies aus humanen Darmproben isoliert werden (MOSS et al., 1992; BULL et al., 2003). Spezies des Mykobacterium-avium-Komplexes (MAK) sind häufige Erreger opportunistischer Infektionen (SARITSIRI et al., 2006), insbesondere bei HIV-Patienten (EL-ATROUNI et al., 2006).

Die Ergebnisse dieser Fall-Kontroll-Studie deuten vorerst nicht auf eine Verbindung zwischen *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* und Morbus Crohn hin. Ein kausaler Zusammenhang von MAP und der Krankheitsentstehung einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung konnte bislang nicht eindeutig belegt werden. Falls eine MAP-Exposition zur Ausbildung von Morbus

Crohn nötig sein sollte, ist dies jedoch höchstwahrscheinlich als alleiniger Faktor nicht ausreichend. Molekularbiologische, mikrobiologische ebenso wie u. a. klinische, genetische, psychosoziale und epidemiologische Daten müssen akribisch zusammengeführt werden.

6 SCHLUSSFOLGERUNGEN

- Von den fünf vergleichend untersuchten Festmedien eignet sich das Herrold's Egg Yolk-Schrägmedium (Becton Dickinson®) aufgrund der kürzesten Nachweisdauer für einen kulturellen Direktnachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) am besten.
- Die Dekontamination mit N-Acetyl-L-Cystein-NaOH ist zur Isolierung von Mykobakterien aus humanen Darmbioprotaten geeignet.
- Die Gewinnung überlebensfähiger MAP gestaltet sich schwierig, möglicherweise aufgrund eines Sphäroblasten-Stadiums.
- Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann nicht auf ein ausschließliches Vorkommen von MAP bei Morbus Crohn-Patienten geschlossen werden.
- Die PCR-Verfahren weisen zusätzlich auf ein gehäuftes Vorkommen von MAP bei Kontrollprobanden hin.
- Die eigenen Ergebnisse vermögen die Hypothese einer ursächlichen Beteiligung von MAP an dem Krankheitsgeschehen des Morbus Crohn weder zu verifizieren noch zu falsifizieren.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* (MAP) ist der Erreger der Paratuberkulose der Wiederkäuer. Bereits seit Anfang des letzten Jahrhunderts wird aufgrund der pathomorphologischen Ähnlichkeiten ein ursächlicher Zusammenhang mit Morbus Crohn (MC), einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung des Menschen, vermutet und seitdem kontrovers diskutiert. Für Milchrinderbestände werden in einzelnen Bundesländern Seroprävalenzdaten für Paratuberkulose von bis zu ca. 80 % angegeben. Abgesehen von einer Erregerübertragung durch direkten Tierkontakt und der weiten Verbreitung des Erregers in der Umwelt, werden Lebensmittel als mögliche Vehikel diskutiert.

In zahlreichen Studien wurde MAP-Desoxyribonukleinsäure im Darmgewebe von MC-Patienten und Kontrollen nachgewiesen. Nur in wenigen Untersuchungen wurde parallel die kulturelle Überprüfung der Vermehrungsfähigkeit durchgeführt. Zudem mangelt es den Polymerase-chain-reaction (PCR)-Verfahren an einer diagnostischen Qualitätssicherung mit interner Amplifikationskontrolle (IAK) und die gewählten Marker weisen Kreuzreaktionen mit anderen Mykobakterienspezies auf.

In den eigenen Arbeiten wurde daher die kulturelle Anzucht unter Einsatz eines zuvor eigens validierten Dekontaminationsverfahrens unter Verwendung von N-Acetyl-L-Cystein-NaOH mit der PCR-Analytik kombiniert. Um die Zuverlässigkeit der Nachweisverfahren zu steigern, wurde eine nested PCR und eine kürzlich entwickelte Triplex Real Time-PCR (SCHÖNENBRÜCHER et

al., 2008) inklusive einer internen Amplifikationskontrolle verwendet. So wurden erstmals die drei MAP-spezifischen Marker *IS900*, *ISMav2* und *F57* bei humanen Darmbiopтатаen diagnostisch kombiniert. Für die spätere Subkultivierung und Archivierung der MAP-Stämme wurden in einer vergleichenden Untersuchung preiswerte, einfach zu handhabende und produktive Selektivmedien ermittelt.

Es konnten insgesamt 120 Proben von 32 Probanden berücksichtigt werden. Darunter befanden sich Biopstate von 12 MC- und acht Colitis ulcerosa (CU)-Patienten sowie 12 Kontrollprobanden, die nicht an einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung leiden. Darunter erwiesen sich Anreicherungskulturen von vier (33,3 %) MC- und zwei (25,0 %) CU-Patienten sowie von neun (75,0 %) Kontrollprobanden ($p = 0,059$) als molekularbiologisch MAP-positiv. Die Subkultivierung und Isolierung von MAP gelang aus dem *Colon transversum* einer Kontrollperson. Bei zwei Colitis ulcerosa-Patienten und einer Kontrollperson konnten vermehrungsfähige *Mycobacterium avium* ssp. *avium*-Stämme isoliert werden. Alle Isolate wurden mittels Sequenzanalyse der 16S-ribosomalen RNA (ribonucleic acid) und der 16S-23S „intra-genic spacer region“ (ITS) bestätigt und für die institutseigene Mykobakterienstammsammlung in Form von Gefrierkulturen und Lyophilisaten archiviert.

Nach den Ergebnissen dieser Fall-Kontroll-Studie kann nicht auf ein ausschließliches Vorkommen von MAP bei MC-Patienten geschlossen werden, und die Gewinnung überlebensfähiger MAP gestaltet sich schwierig, möglicherweise aufgrund eines Sphäroblasten-Stadiums. Die PCR-Verfahren weisen zusätzlich auf eine weite Verbreitung von MAP bei Kontrollprobanden

hin. Das angewandte Triplex PCR-Verfahren in Kombination mit einer nested PCR und der kulturellen Diagnostik liefert Ergebnisse hoher Aussagekraft über das Vorkommen von MAP in humanen Darmbiopaten. Von den für die MAP-Kultivierung untersuchten Festmedien eignete sich aufgrund der kürzesten Nachweisdauer das Herrold's Egg Yolk-Schrägmedium (Becton Dickinson®) für einen Direktnachweis am besten. Zur Beurteilung von Einzelkolonien, beispielsweise als Kontaminationskontrolle, ist der Einsatz des Middlebrook 7H10-Agars empfehlenswert (Becton Dickinson®).

Um den möglichen kausalen Zusammenhang von MAP und MC zu erhellen, sind weitere Untersuchungen mit einer größeren Probandenzahl und unter Einbeziehung einer genauen Erhebung von anamnestischen, klinischen, genetischen und psychosozialen Daten sowie der MAP-Exposition nötig.

8 SUMMARY

The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP), the causative agent of Johne's disease in human chronic inflammatory bowel disease remains uncertain. The involvement in the pathogenesis of Crohn's disease (CD) is discussed since the beginning of the last century. The Paratuberculosis data for milk cattle stock show over 80 % prevalence in many countries of the Federal Republic of Germany. Aside from the conceivable transmission of the bacteria to humans by the direct animal contact and the widespread in the environment, food has been considered as possible vector. Previous studies on the occurrence of MAP in gut tissues were based only on one single molecular detection system (e. g. Polymerase-chain-reaction [PCR]). In addition, these PCR-methods lacked of an internal amplification control (IAC) for diagnostic quality assurance and the used markers show cross reactions with other mycobacteria species. Furthermore the examination of the agent's viability was not considered. For this reasons, the present investigation included the cultivation of MAP, using a previously validated decontamination protocol, and PCR-analysis. A nested PCR system as well as a recently developed real time-PCR method were used to increase the reliability of the PCR results. In total three MAP-specific genes were used.

Comparative studies of culture media were done to find appropriate media for subcultures of the mycobacteria isolates

In this study the three PCR markers *IS900*, *ISMav2* and *F57* were first combined with cultural detection of MAP in human biopsies. Four (33.3 %) of

the CD-, two (25.0 %) of the ulcerative colitis (UC) - and nine (75.0 %) of the control patients were positive for MAP with the PCR marker ($p = 0.059$). MAP could be cultivated out of the *colon transversum* of one control person. *M. avium* ssp. *avium* has been isolated out of the biopsies of two UC-patients as well as of a control person. The cultured strains were verified by amplicon sequencing of the 16S-ribosomal RNA (ribonucleic acid) and the 16S-23S „intragenic spacer region” (ITS). The three markers were sequenced as well. All isolates were preserved by deep freezing with glycerol and by freeze drying (lyophilization).

On the basis of the preliminary results it can not be concluded that MAP appeared exclusively in Crohn’s disease patients. In addition, the PCR-systems indicate a frequent occurrence of MAP in control specimens and the recovery of viable MAP has been proven to be difficult. The used triplex real-time PCR system combined with nested PCR and cultural detection of MAP presents reliable results.

Because of the shortest time to detection Herrold’s Egg Yolk Medium (Becton Dickinson®) can be recommended for isolation of MAP out of different samples (e. g. biopsy, feces). The low-priced “Paratuberkulosemedium” (Artelt-ENCLIT®) should be used for sub-cultures. Middlebrook 7H10-agar, prepared on plate, offers potential for the examination of single colonies (e. g. control of pure cultures).

9 LITERATURVERZEICHNIS

ABDULMAWJOOD, A., ROTH, S. und M. BÜLTE (2001):

Evaluation of a PCR system for the detection of *E.coli* O157 based on *rfaE* O157 gene.

42. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, 25.-28.09.2001, Garmisch-Partenkirchen
Proceed. S. 368-373

ABDULMAWJOOD, A., ROTH, S. und M. BÜLTE (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

ADAMS, W. (2001):

Paratuberkulose bei Schafen und Ziegen in Westfalen-Lippe.

Landwirtschaftskammer Westfalen-Lippe.

<http://www.landwirtschaftskammer.com>

AFZAL, M. A., ARMITAGE, E., WILLIAMS, L. C. und P. D. MINOR (2000):

Further evidence of the absence of measles virus genome sequence in full thickness intestinal specimens from patients with Crohn's disease.

J. Med. Virol. 62: 377-382

AKINEDEN, Ö., HASSAN, A. A., SCHNEIDER, E. und E. USLEBER (2006):
Kultureller Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in
Säuglingsnahrung.

47. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen
Veterinärmedizinischen Gesellschaft, 26.-29.09.2006, Garmisch-Partenkirchen

ALAM, A., MIAH, M. R., RAHMAN, M., SATTAR, H. und A. A. SALEH (2002):
Comparison of PCR method with the culture method for identification of
gonococci from endocervical swabs.

Indian J. Med. Microbiol. 20: 37-39

AL-SHAMALI, M., KHAN, I., AL-NAKIB, B., AL-HASSAN, F. und A. S.
MUSTAFA (1997):

A multiplex polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycobacterium*
paratuberculosis DNA in Crohn's disease tissue.

Scand. J. Gastroenterol. 32: 819-823

AL-SOUD, A. W. und P. RADSTROEM (2000):

Effects of Amplification faciliators on diagnostic PCR in the presence of blood,
feces and meat.

J. Clin. Microbiol. 38: 4463-4470

ANDREWS, H., BARCZAK, P. und R. N. ALLAN (1987):

Psychiatric illness in patients with inflammatory bowel disease.

Gut 28: 1600-1604

ANONYMOUS (2001):

Protokoll des Sachverständigengesprächs zur mikrobiologischen Risikoabschätzung einer Verbindung zwischen *Mycobacterium paratuberculosis* und Morbus Crohn. Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin am 19.09.2001.

<http://www.bgvv.de/cm/222protokollmcpa.pdf>.

ANONYMOUS (2003):

Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten im Konsens mit der Deutschen Gesellschaft für Pathologie.

Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn.

Z. Gastroenterol. 41: 19-68

ANONYMOUS (2004):

Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten.

Diagnostik und Therapie der Colitis ulcerosa.

<http://www.uni-duesseldorf.de/AWMF/II/021-009.htm>

ANONYMOUS (2005a):

A case control study investigating drinking water & dairy products in the aetiology of Crohn's disease – A possible role for *Mycobacterium avium paratuberculosis* – The CMAW study. Final report.

http://www.dwi.gov.uk/research/crohns_report.pdf

ANONYMOUS (2005b):

Morbus Crohn und Paratuberkulose: Eine Chronologie.

<http://ticker-grosstiere.animal-health-online.de/20050309-00001/>

ANONYMOUS, (2007a):

Johne's Information Center. Pathology.

<http://www.johnes.org/general/pathology.html>

ANONYMOUS (2007b):

Deutsche Morbus Crohn / Colitis ulcerosa Vereinigung e. V. Morbus Crohn. Wer bekommt Morbus Crohn?

<http://www.dccv.de/crohn-colitis/morbus-crohn/>

ARMITAGE, E., DRUMMOND, H. E., WILSON, D. und S. GOSH (2001):

Increasing incidence of both juvenile-onset Crohn's disease and ulcerative colitis in Scotland.

Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 13: 1439-1447

AUTSCHBACH, F., EISOLD, S., HINZ, U., LINNEBACHER, M., GIESE, T., LÖFFLER, T., BÜCHLER, M. W. und J. SCHMIDT (2005):

High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* IS900 DNA in gut tissues from individuals with Crohn's disease.

Gut 54: 944-949

AYELE, W. Y., BARTOS, M., SVASTOVA, P., und I. PAVLIK (2004):

Distribution of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls.

Vet. Microbiol. 103: 209217

AYELE, W. Y., (2005):

Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis* cultured from locally and commercially pasteurized cow's milk in the Czech Republic.

Appl. Environm. Microbiol. 71: 1210-1214

BAKSH, F. K., FINKELSTEIN, S. D., ARIYANAYAGAM-BAKSH, S. M., SWALSKY, P. A., KLEIN, E. C. und J. C. DUNN (2004):

Absence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in microdissected granulomas of Crohn's disease.

Mod. Pathol. 17: 1289-1294

BANGSOW, T., HUCH, R. MALE, D. und S. MÜLLER (2002):

Polymerase-Kettenreaktion.

In: SCHIMPF: Gentechnische methoden.

Spektrum Akadem. Verlag Berlin Heidelberg, S. 147-167

BARCLAY, R. und C. RATLEDGE (1983):

Iron-binding compounds of *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, and mycobactin-dependent *M. paratuberculosis*.

J. Bact. 153: 1138-1146

BANNANTINE, J., BEACHLER, E., ZHANG, Q., Li, L. und KAPUR, V. (2002):

Genome scale comparison of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* with *Mycobacterium avium* ssp. *avium* reveals potential diagnostic sequences.

J. Clin. Microbiol. 40: 1303-1310

BARTOS, M., SVASTOVA, P. und I. PAVLIK (2003):

Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* isolation in biopsies of Crohn's disease patients and laboratory methods confirmed its presence in milk and cheese. Diagnosis and epidemiology. Morbo di Crohn Nell 'Uomo E Paratuberculosi Nei ruminanti, Roma, 24-25 gennaio 2003

BAUERFEIND, R., BENAZZI, S., WEISS, R., SCHLIESSER, T., WILLEMS, H. und G. BALJER (1996):

Molecular characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* isolates from sheep, goats, and cattle by hybridization with a DNA probe to Insertion element *IS900*.

J. Clin. Microbiol. 34: 1617-1621

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: und J. M. SHARP (2001a):

Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland.

J. Clin. Microbiol. 39: 1517-1521

BEARD, P. M., RHIND, S., BUXTON, D., DANIELS, M. J., HENDERSON, D.,
PIRIE, A., RUDGE, K., GREIG, A., HUTCHINGS, M. R., STEVENSON, K. und
J. M. SHARP (2001b):

Natural Paratuberculosis infection in rabbits in Scotland.

J. Comp. Path. 124: 290-299

BEHR, M. A. und E. SCHURR (2006):

Mycobacteria in Crohn's disease: a persistent hypothesis.

Inflamm. Bowel. Dis. 12: 1000-1004

BENEDICTUS, G., DIJKHUIZEN, A. A. und J. STELWAGEN (1987):

Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle.

Vet. Rec. 15: 142-146

BERGSTRAND, O. und G. HELLERS (1983):

Breast-feeding during infancy in patients who later develop Crohn's disease.

Scand. J. Gastroenterol. 7: 903-906

BERNSTEIN, C. N., BLANCHARD, J. F., RAWSTHORNE, P. und A. WAJDA
(1999):

Epidemiology of Crohn's disease and ulcerative colitis in a central Canadian
province: a population-based study.

Am. J. Epidemiol. 149: 916-924

BERNSTEIN, C. N., NYAR, G., HAMEL, A. und J. F. BLANCHARD (2003):

Study of animal-borne infections in the mucosa of patients with Inflammatory
Bowel Disease and population-based controls.

J. Clin. Microbiol. 41: 4986-4990

BERNSTEIN, C. N., BLANCHARD, J. F., RAWSTHORNE, P. und M. T.
COLLINS (2004):

Population-based case control of seroprevalence of *Mycobacterium*
paratuberculosis in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis.

J. Clin. Microbiol. 42: 1129-1135

BERNSTEIN, C. N., RAWSTHORNE, P., CHEANG, M. und J. F. BLANCHARD
(2006):

A population-based case control study of potential risk factors for IBD.

Am. J. Gastroenterol. 101: 993-1002

BICKLEY, J., SHORT, J. K., McDOWELL, D. G. und H. C. PARKES (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

BJORNSSON, S. und J. H. JOHANSSON (2000):

Inflammatory bowel disease in Iceland, 1990-1994: a prospective, nationwide, epidemiological study.

Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 12: 31-33

BLANCHARD, J. F., BERNSTEIN, C. N., WAJDA, A. und P. ROWSTHORNE (2001):

Small-area variations and sociodemographic correlates for the incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis.

Am.J. Epidemiol. 154: 328-335

BLOBEL, H. und T. SCHLIEßER (1985):

Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren.

VEB Gustav Fischer Verlag, Jena. Band V: 155-313

BOELAERT, F., WALRAVENS, K., BIRONT, P., VERMEERSCH, J.P., BERKVENS, D. und J. GODFROID (2000):

Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population.

Vet. Microbiol. 77, 269-281

BÖLSKE, G., ENGLUND, S und K. E. JOHANNSON (2002):

Falso positive *Mycobacterium paratuberculosis* IS900 PCR.

7th Int. Colloq. on Paratub.: Bilbao, Spanien: 11.-14. Juni.

BÖTTCHER, M. (1997):

Kulturelle und serologische Untersuchungen zur Prävalenz der Paratuberkulose im Regierungsbezirk Arnberg.

Vet. Med. Diss., Hannover.

BÖTTCHER, J. und A. GANGL (2004):

Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* – combined serological testing and classification of individual animals and herds.

J. Vet. Med. B. 51: 443–8.

BÖTTCHER, J., HOFFMANN, D. und A. GANGL (2005):

Paratuberkulose, ein serologisches Untersuchungskonzept.

5. Internationales Symposium zur BHV 1-, BVD- und Paratuberkulose-Bekämpfung, 09.-11.03.2005, Stendal

BOSSARD, C., STEPHAN, R. und T. TASARA (2006):

Application of an F57 sequence-based real time-PCR assay for *Mycobacterium paratuberculosis* detection in bulk tank raw milk and slaughtered healthy dairy cows.

J. Food. Prot. 69: 1662-1667

BRUNELLO, F., PERA, A., MARTINI, S., MARINO, L., ASTEGIANO, M., BARLETTI, C., GASTALDI, P., VERME, G., und G. EMANUELLI (1991):

Antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis* in patients with Crohn's disease.

Dig. Dis. Sci. 36: 1741-1745

BULL, T. J., McMINN, E. J., SIDI-Boumedine, K., SKULL, A., DURKIN, D., NEILD, P., RHODES, G., PICKUP R. und J. HERMON-TAYLOR (2003a):

Detection and Verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Fresh Ileocolonic Mucosal Biopsy Specimens from Individuals with and without Crohn's Disease. J. Clin. Microbiol. 41: 2915-2923

BULL, T. J., SIDI-Boumedine, K., McMINN, E. J., STEVENSON, K., PICKUP R. und J. HERMON-TAYLOR (2003b):

Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) differentiate *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from other species of *Mycobacterium avium* complex.

Mol. Cell. Probes. 17: 157-164

BURNHAM, W. R. und J. E. LENNARD-JONES (1978):

Mycobacteria as possible cause of inflammatory bowel disease.

Lancet 2: 693-696

BUSTIN, S. A. (2000):

Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction assays.

J. Mol. Endocrinol. 25: 169-193

BUSTIN, S. A., BENES, V., NOLAN, T. und M. W. PFAFFL (2005):

Quantitative real-time RT-PCR – a perspective.

J. Mol. Endocrinol. 34: 597-601

CASPARY, W. F., und T. WEHRMANN in: GRETEN, H. (2005):

Innere Medizin. Verstehen - Lernen – Anwenden.

Thieme Verlag, Stuttgart, 12. Ausgabe: 728-739

CELLIER, C., DE BEENHOUWER, H., BERGER, A., PENNA, C.,
CARBONNEL, F., PARC, R., CUGNENC, P. H., LE QUINTREC, Y., GENDRE,
J. P., BARBIER, J. P. und F. PORTAELS (1998):

Mycobacterium paratuberculosis and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum*

DNA cannot be detected by PCR in Crohn's disease tissue.

Gastroenterol. Clin. Biol. 22: 675-678

CERNICCHIARO, N., WELLS, S. J., JANAGAMA, H. und S. SREEVATSAN (2008):

Influence of type of culture medium on chracterization of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* subtypes.

J. Clin. Microbiol. 46: 145-149

ÇETINKAYA, B., ERDOGAN, H. M. und K. Morgan(1998):

Prevalence, incidence and geographical distribution of Johne's disease in cattle in England and the Welsh borders.

Vet. Rec. 143: 265-9.

CHACON, O., BERMUDEZ, L. E. und R. G. BARLETTA (2004):

Johne's disease, inflammatory bowel disease, and *Mycobacterium paratuberculosis*.

Annu. Rev. Microbiol. 58: 329-363

CHEN, G., SAIBIL, F. und I. MORAVA-PROTZNER (2002):

Two for one: coexisting ulcerative colitis and Crohn's disease.

Can. J. Gastroenterol. 16: 29-34

CHERNEY, T. M. und M. T. COLLINS (1996):

Adaption of a bovine ELISA for the detection of *Mycobacterium paratuberculosis* antibody for use with human sera.

5th Int. Colloq. on Paratub., 29. September – 4. Oktober, Madison, Wisconsin

CHIBA, M., FUKUSHIMA, T., HORIE, Y., IIZUKA, M. und O. MASAMUNE (1998):

No *Mycobacterium paratuberculosis* detected in intestinal tissue, including Peyer's patches and lymph follicles, of Crohn's disease.

J. Gastroenterol. 33: 482-487

CHIODINI, R. J., VAN KRUININGEN, H.-J. und R. S. MERKAL (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. und J. A. COUTOU (1984b):

Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease.

J. Clin. Microbiol. 20: 966-971

CHIODINI, R. J., VAN KRUININGEN, H.-J., THAYER, W. R., MERKAL, R.S. und J. A. COUTOU (1984c):

Possible role of Mycobacteria in inflammatory bowel disease. An unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease.

Dig. Dis. Sci. 29: 1073-1079

CHIODINI, R. J., VAN KRUININGEN, H. J., THAYER, W. R. und J. A. COUTU (1986):

Spheroplastic phase of *Mycobacteria* isolated from patients with Crohn's disease.

J. Clin. Microbiol. 24: 357-363

CIRILLO, J. D., FALKOW, S., TOMPKINS, L. S. und L. E. BERMUDEZ (1997):

Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence.

Infect. Immun. 65: 3759-3767

CLARKSTON, W. K., PRESTI, M. E., PETERSEN, P. F., ZACHARY, P. E., FAN, W. X., LEONARDI, C. L., VERNAVA, A. M., LONGO, W. E. und J. M. KREEGER (1998):

Role of *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease: a prospective, controlled study using polymerase chain reaction .

Dis. Colon. Rectum. 41: 195-199

CLEGG, R. M. (1992):

Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids.

Meth. Enzymol. 211: 353-388

COCKERILL, F. R. und J. R. UHL (2001):

Applications and challenges of real-time PCR for clinical microbiology laboratory. In: REISCHL, U., WIIWER und C. COCKERILL (Eds.), Rapid cycle Real-Time PCR methods and applications in microbiology and food analysis. Springer, New York: 3-30

COETSIER, C., VANNUFFEL, P., BLONDEEL, N., EF, J. F., COCITO, C. und J. L. GALA (2000):

Duplex PCR for differential identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium*, and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded tissue from cattle.

J. Clin. Microbiol. 38: 3048-3054

COLLINS, M. T. (1997):

Mycobacterium paratuberculosis: a potential food-borne pathogen?

J. Dairy Sci. 80: 3445-3448

COLLINS, M. T. (2003):

Update on paratuberculosis: 1. Epidemiology of Johne's disease and the biology of *Mycobacterium paratuberculosis*.

Ir. Vet. J. 56: 565-574

COLLINS, D. M., GABRIC, D. M. und G. W. DE LISLE (1990):

Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restricted endonuclease analysis and DNA hybridization.

J. Clin. Microbiol. 28: 1591-1596

COLLINS, M. T., SOCKETT, D. C., GOODGER, W. J., CONRAD, T. A., THOMAS, C. B. und D. J. Carr (1994):

Herd prevalence and geographic distribution of, and risk factors for, bovine paratuberculosis in Wisconsin.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 204: 636-41

COLLINS, M. T., LISBY, G., MOSER, C., CHICJS, D., CHRISTENSEN, S., REICHELDERFER, M., HØIBY, N., HARMS, B. A., THOMSEN, O. Ø., SKIBSTED, U. und V. BINDER (2000):

Results of multiple diagnostic tests for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in patients with Inflammatory Bowel Disease and in controls.

J. Clin. Microbiol. 38: 4372-4381

COLLINS, M. T., SPAHR, U. und P. M. MURPHY (2001):

Ecological characteristics of *M. paratuberculosis*.

Bullet. IDF 362: 32-40

CONRATHS, F. J., GEUE, L. und H. KÖHLER (2006):

Ansätze zur Bekämpfung der Paratuberkulose beim Rind.

47. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Dtsch. Vet. Med. Ges. (DVG), 26.-29. Sep. 2006, Garmisch-Partenkirchen

COUSINS, D. V., EVANS, R. J. und B. R. FRANCIS (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: 458-462

COUSINS, D. V., WHITTINGTON, R., MARSH, I., MASTERS, A., EVANS, R. J und P. KLUVER (1999): Mycobacteria distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess *IS900*-like sequences detectable *IS900* polymerase chain reaction: implications for diagnosis.

Mol. Cell Probes 13: 431-442

CROHN, B. B., GINZBURG, L. und G. D. OPPENHEIMER (1932):

Regional Ileitis: A pathologic and clinical entity.

J. A. M. A. 99: 1323-1329

DALZIEL, T. K. (1913):

Chronic interstitial enteritis.

BMJ 25: 1068-1070

DAMATO, J. J. und M. T. COLLINS (1990):

Growth of *Mycobacterium paratuberculosis* in radiometric, Middlebrook and egg-based media.

Vet. Microbiol. 22: 31-42

DAMATO, J. J., KNISLEY, C. und M. T. COLLINS (1987):

Characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* by gas liquid and thin-layer chromatography and rapid demonstration of mycobactin dependence using radiometric method.

J. Clin. Microbiol. 25: 2380-2383

DE JUAN, L., MATEOS, A., DOMINGUEZ, L., SHARP, J. M. und K. STEVENSON (2005):

Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis.

Vet. Microbiol. 106: 249-257

DE JUAN, L., ALVAREZ, J., ROMERO, B., BEZOS, J., ARANAZ, A., LOZANO, C., LOZANO, F., MATEOS, A. und L. DOMINGUEZ (2005a):

Isolation of *M. a. paratuberculosis* strains belonging to the sheep type in cattle and goats in Spain.

8th Int. Colloq. on Paratub. 14.-18. August 2005, Kopenhagen, Dänemark.

DE JUAN, L., ALVAREZ, J., ARANAZ, A., RODRIGUEZ, A., ROMERO, B., BEZOS, E., MATEOS, A. und L. DOMINGUEZ (2006):

Molecular epidemiology of types I/III strains of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolated from goats and cattle.

Vet. Microbiol. 115: 102-110

DE JUAN, L., ALVAREZ, J., ROMERO, B., BEZOS, J., CASTELLANOS, E., ARANAZ, A., MATEOS, A. und L. DOMINGUEZ (2006a):

Comparison of four different culture media for isolation and growth of type II and type I/III *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* strains isolated from cattle and goats.

Appl. Environm. Microbiol. 72: 5927-5932

DE LISLE, G. W., YATES, G. F., CAVAINAC, S. und D. M. COLLINS (1999):

Evaluation of the MGIT system for culturing *Mycobacterium paratuberculosis* and characterisation of strains by polymerase chain reaction tests.

6th Int. Colloq. on Paratub., Melbourne, Australien, 14.-18. Februar 1999

DELL'ISOLA, B., POYART, C., GOULET, O., MOUGENOT, J. F., SADOUN-JOURNO, E., BROUSSE, N., RICOUR, C. und P. BERCHE (1994):

Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by polymerase chain reaction in children with Crohn's disease.

J. Infect. Dis. 169: 449-451

DEL PRETE, R., QUARANTANA, M., LIPPOLIS, A., GIANNUZZI, V., MOSCA, A., JIRILLO, E. und G. MIRAGLIOTTA (1998):

Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in stool samples of patients with inflammatory bowel disease by *IS900*-based PCR and colorimetric detection of amplified DNA.

J. Microbiol. Meth. 33: 105-114

DEVALLOIS, A., GOH, K. S. und N. RASTOGI (1997):

Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism of the hsp65 gen and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species.

J. Clin. Microbiol. 35: 2969-2973

DIMARELLI-MALLI, Z. und K. SARRIS (2001):

Comparison of DNA probe test and cultivation methods for detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in caprine and ovine faeces.

Aust. Vet. J. 79: 47-50

DIXON, W. J. (1993):

BMDP Statistical Software Manual.

University of California Press (Vol 1 & 2), Berkeley, Los Angeles, London

DOLL, K. (2006):

Die Paratuberkulose - Eine epidemiologische Herausforderung.

Hessische Landestierärztekammer, Kongressband zur Fortbildung am
06.05.2006

DONAGHY, J. A., TOTTON, N. L. und M. T. ROWE (2003):

Evaluation of culture media for the recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from Cheddar cheese.

Lett. Appl. Microbiol. 37: 285-291

DONAT, K. (2005):

Blutserologische Untersuchungen zur Verbreitung von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in sächsischen Rinderbeständen.

5. Internationales Symposium zur BHV 1-, BVD- und Paratuberkulose-Bekämpfung, 09.-11.03.2005, Stendal

DUFOUR, B., POUILLOT, R. und B. DURAND (2004):

A Cost/benefit study of paratuberculosis certification in French cattle herds.

Vet. Res. 35: 69-81

DUMONCEAU, J.-M., VAN GOSSUM, A., ADLER, M., FONTEYNE, P.-A., VAN VOOREN, J.-P., DEVIERE, J. und F. PORTAELES (1996):

No *Mycobacterium* found in Crohn's disease using the polymerase chain reaction.

Dig. Dis. Sci. 41: 412-426

EISENSMITH, S. P. (1994):

PlotIT for Windows.

Scientific Programming Enterprises, Haslett, MI 48840 USA

EL-ATROUNI, W., BERBARI, E. und Z. TEMESGEN (2006):

HIV-associated opportunistic infections. *Bacterial infections*.

J. Med. Liban. 54: 80-83

ELGUEZABAL, N., PAVON, A., GARRIDO, J. M., GEIJO, M. V., SEVILLA, I., TEJADA, A., OCHOTORENO, I., IZETA, A., ADURIZ, G. und R. A. JUSTE (2005):

High frequency of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* DNA in blood of Inflammatory Bowel Disease patients and controls detected by nested PCR.

8th Int. Colloq. on Paratub., 14.-18. August 2005, Kopenhagen, Dänemark.

ELLINGSON, J. L., ANDERSON, J. L., KOZICZKOWSKI, J. J., REDCLIFF, R. P., SLOAN, S. J., ALLEN, S. E. und N. M. SULLIVAN (2005):

Detection of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR.

J. Food Protect. 68: 966-972

ELLIOTT, D. E., URBAN, J. F., ARGO, C. K. und J. V. WEINSTOCK (2000):

Does the failure to acquire helminthic parasites predispose to Crohn's disease?

FASEB. J. 14: 1848-1855

ELLIOTT, D. E., SUMMERS, R. W. und J. V. WEINSTOCK (2004):

Helminths and the modulation of mucosal inflammation.

Curr. Opin. Gastroenterol., 21: 51-58

ELLINGSON, J. L., BOLIN, C. A. und J. R. STABEL (1998):

Identification of a gene unique to *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* and application to diagnosis of paratuberculosis.

Mol. Cell. Probes. 12: 133-142

ELLINGSON, J. L., BREES, D. und N. F. CHEVILLE (2003):

Absence of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* components from Crohn's disease intestinal biopsy tissues.

Clin. Med. Res. 1: 217-226

ELLINGSON, J. L., STABEL, J. R., BISHAI, W. R., FROTHINGHAM, R. und J. MILLER (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: 153-161

ELLINGSON, J. L., ANDERSON, J. L., KOZICZKOWSKI, J. J., RAFCLIFF, R. P., SLOAN, S. J., ALLEN, S. E. und N. M. SULLIVAN (2005):

Detection of viable *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR.

J. Food Prot. 68: 966-972

ELSAGHIER, A., PRANTERA, C., MORENO, C. und J. IVANYI (1992):

Antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis*-specific protein antigens in Crohn's disease.

Clin. Exp. Immunol. 90: 503-508

ELSCHNER, M. (2005):

Programm zur Bekämpfung der Paratuberkulose in den Rinderbeständen Thüringens.

5. Internationales Symposium zur BHV 1-, BVD- und Paratuberkulose Bekämpfung, 09.-11.03.2005, Stendal

ELSCHNER, M. und S. HORNER (2003):

Programm zur Bekämpfung der Paratuberkulose in den Rinderbeständen Thüringens sowie Erfahrungen.

2. Arbeitstagung "Mykobakterieninfektionen", Jena, 13.-14.05.2003.

EL-ZAATARI, F. A. K., NASER, S. A., ENGSTRAND, L., BURCH, P. E., HARCHEM, C. Y., WHIPPLE, D. L. und D. Y. GRAHAM (1995):

Nucleotide sequence analysis and seroreactivities of the 65K heat shock protein from *Mycobacterium paratuberculosis*.

Clin. Diag. Lab. Immunol. 2: 657-664

EL-ZAATARI, F. A. K., OSATO, M. S. und D. Y. GRAHAM (2001):

Etiology of Crohn's disease: the role of *Mycobacterium avium paratuberculosis*.

Trends Mol. Med. 7: 247-252

ENGLUND, S., BÖLSKE, G., BALLAGI-PODÁNY, A. und K. E. JOHANSSON (2001):

Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in tissue samples by single, fluorescent and nested PCR based on the *IS900* gene.

Vet. Microbiol. 81: 257-271

ENGLUND, S., BÖLSKE, G. und K. E. JOHANSSON (2002):

An *IS900* like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*.

FEMS Microbiol. Lett. 209: 267-271

FANG, Y., WU, W. H., PEPPER, J. L., LARSEN, J. L., MARRAS, S. A., NELSON, E. A., EPPERSON, W. B. und CHRISTOPHER-HENNINGS (2002):

Comparison of real-time, quantitative PCR with molecular beacons to nested PCR and culture methods for detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in bovine fecal samples.

J. Clin. Microbiol. 40: 287-291

FEENEY, M., CLEGG, A., WINWOOD, P. und J. SNOOK (1997):

A case-control study of measles vaccination and inflammatory bowel disease.

Lancet 350: 764-766

FENOLLAR, F. und D. RAOULT (2004):

Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms.

APMIS 112: 785-807

FIDLER, H. M., THURRELL, W., JOHNSON, M. I., ROOK, G. A. und J. J. McFADDEN (1994):

Specific detection of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA associated with granulomatous tissue in Crohn's disease.

Gut 35: 506-510

FIOCCHI, C. (1998):

Inflammatory bowel disease. Etiology and pathogenesis.

Gastroenterol. 115: 182-205

FISCHER, O., MATLOVA, L., DVORSKA, L., SVASTOVA, P. und I. PAVLIK (2003):

Nymphs of the oriental cockroach (*Blatta orientalis*) as passive vectors of causal agents of avian tuberculosis and paratuberculosis.

Med. Vet. Entomol. 17: 145-50

FISCHER, O., MATLOVA, L., DVORSKA, L., SVASTOVA, P., BARTL, J., WESTON, R. T. und I. PAVLIK (2004):

Blowflies *Calliphora vicina* and *Lucilia sericata* as passive vectors of *Mycobacterium avium* subsp. *avium*, *M. a. paratuberculosis* and *M. a. hominissuis*.

Med. Vet. Entomol. 18: 116-22

FLETCHER, H. A., DONOGHUE, H. D., HOLTON, J., PAP, I. und M. SPIGELMANN (2003):

Widespread occurrence of *Mycobacterium tuberculosis* DNA from 18th-19th century Hungarians.

Am. J. Phys. Anthropol. 120: 144-152

FLYNN, O., EGAN, J., O'GRADY, D. und M. GOOD (2005):

Inactivation of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) in bovine slurry.

8th International Colloquium on Paratuberculosis. 14.-18. August 2005, Kopenhagen, Dänemark.

FÖRSTER, T. (1948):

Zwischenmolekulare Energieumwandlung und Fluoreszenz.

Ann. Phys. 6: 55-75

FONAGER, K., SØRENSEN, H. T. und J. Olsen (1997):

Change in incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Denmark. A study based on the National Registry of patients 1981-1992.

Int. J. Epidemiol. 26: 1003-1008

FORBES, A. und T. KALANTZIS (2006):

Crohn's disease: the cold chain hypothesis.

Int. J. Colorectal Dis. 21: 399-401

FRANCIS, J., MACTURK, H. M., MADINAVEITIA, J. und G. A. SNOW (1953):
Mycobactin, a growth factor for *Mycobacterium johnei*. I. Isolation from
Mycobacterium phlei.

Biochem. J. 55: 596-607

FRANK, T. S. und S. M. COOK (1996):

Analysis of paraffin sections of Crohn's disease for *Mycobacterium
paratuberculosis* using polymerase chain reaction.

Mod. Pathol. 9: 32-35

FRIEDMANN, S. und R. S. BLUMBERG in: KASPER, D. L., BRAUNWALD, E.,
FAUCI, A. S., HAUSER, S. L., LONGO, D. L., und J. L. JAMESON (2005):

Harrisons Innere Medizin.

ABW Wissenschaftsverlag GmbH, Berlin, 16. Auflage: 1911-1924

FÜLLGRABE, R., SCHÖNENBRÜCHER, H., ABDULMAWJOOD, A. und M.
BÜLTE (2005):

Vergleichende Untersuchungen zum kulturellen Nachweis von *Mycobacterium
avium* ssp. *paratuberculosis*.

46. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Dtsch. Vet. Med.
Ges. (DVG), 27.-30. Sep 2005, Garmisch-Partenkirchen, Proceed. S. 374-378

FUJITA, H., EISHI, Y., ISHIGE, I., SAITOH, K., TAKIZAWA, T., ARIMA, T., und
M. KOIKE (2002):

Quantitative analysis of bacterial DNA from *Mycobacteria* spp., *Bacteroides vulgaris*, and *Echerichia coli* in tissue samples from patients with inflammatory bowel diseases.

J. Gastroenterol. 37: 509-516

FYOCK, T. L., SWEENEY, R. W. und R. H. WHITLOCK (2005):

MGIT, liquid culture system for detection of MAP in bovine fecal samples.

8th International Colloquium on Paratuberculosis. 14.-18. August 2005, Kopenhagen, Dänemark.

GASTEINER, J., WENZL, H., FUCHS, K., JARK, U. und W. BAUMGARTNER (1999):

Serological cross-sectional study of paratuberculosis in cattle in Austria.

J. Vet. Med. B. 46, 457-466

GAO, A., MUTHARIA, L., CHEN, S., RAHN, K und J. ODUMERU (2002):

Effect of pasteurization on survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk.

J. Dairy. Sci. 85: 3198-3205

GAY J. M. und D. M. SHERMAN (1992):

Factors in the epidemiology and control of ruminant paratuberculosis.

Vet. Med. 87: 1133-1139

GIBSON, J., MCCREARY, C., TONER, M., LENNON, A. und M. RIGGIO (2006):

Looking for *Mycobacterium paratuberculosis* DNA by polymerase chain reaction (PCR) in orofacial granulomatosis (OFG) and oral Crohn's disease tissue in an Irish population.

Ir. Med. J. 99: 218

GILAT, T., HACOHEN, D., LILOS, P. und M. J. LANGMAN (1987):

Childhood factors in ulcerative colitis and Crohn's disease. An international cooperative study.

Scan. J. Gastroenterol. 22: 1009-1024

GIONCHETTI, P. (2006):

Extraintestinal manifestations and complications in inflammatory bowel diseases.

World J. Gastroenterol. 12: 4819-4831

GITNICK, G., COLLINS, J., BEAMAN, B., BROOKS, D., ARTHUR, M., IMAEDA, T. und M. PALIESCHESKY (1989):

Preliminary report on isolation of mycobacteria from patients with Crohn's disease.

Dig. Dis. Sci. 34: 925-932

GLEDHILL, A. und M. F. DIXON (1998):

Crohn's-like reaction in diverticular disease.

Gut 42: 392-395

GODFROID, J., DELCORPS, C., IRENCE, L. M., WALRAVENS, K., MARCHE, S. und J. L. GALA (2005):

Definitive differentiation between single and mixed mycobacterial infections in red deer (*Cervus elaphus*) by a combination of duplex amplification of p34 and f57 sequences and Hpy188I enzymatic restriction of duplex amplicons.

J. Clin. Microbiol. 43: 4640-4648

GRAHAM, D. Y., MARKESICH, D. C. und H. H. YOSHIMURA (1987):

Mycobacteria and inflammatory bowel disease: results of culture.

Gastroenterol. 92: 436-442

GRANT, I. R. und M. T. ROWE (2004):

Effect of chemical decontamination and refrigerated storage on the isolation of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* from heat-treated milk.

Lett. Appl. Microbiol. 38: 283-288

GRANT, I. R., BALL, H. J. und M. T. ROWE (1998):

Isolation of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* from milk by immunomagnetic separation.

Lett. Appl. Microbiol. 64: 3153-3158

GRANT, I. R., POPE, C. M., O'RIORDAN, L. M., BALL, H. J. und M. T. ROWE (2000):

Improved detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in milk by immunomagnetic PCR.

Vet. Microbiol. 77: 369-378

GRANT, I. R., BALL, H. J. und M. T. ROWE (2002a):

Incidence of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in bulk raw and commercial pasteurized cow's milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom.

Appl. Environ. Microbiol. 68: 2428-2435

GRANT, I. R., HITCHINGS, E., McCARTNEY, A., FERGUSON, F. und M. T. ROWE (2002b):

Effect of commercial-scale high-temperature, short-time pasteurisation on the viability of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in natural infected cow's milk.

Appl. Environ. Microbiol. 68: 602-607

GRANT, I. R., KIRK, R. B., HITCHINGS, E. und M. T. ROWE (2003):

Comparative evaluation of the MGIT and BACTEC culture systems for the recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk.

J. Appl. Microbiol. 95: 196-201

GRANT, I. R., WILLIAMS, A. G., ROWE, M. T. und D. D. MUIR (2005):

Efficacy of various pasteurization time-temperature conditions in combination with homogenization on inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk.

Appl. Environ. Microbiol. 71: 2853-2861

GREEN, E. P., TIZARD, M. L. V., MOSS, M. T., THOMPSON, J., WINTERBOURNE, D. J., MCFADDEN, J. J., und J. HERMON-THAYLOR (1989):

Sequence and characteristics of *IS900*, an insertion element identified in human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*.

Nucl. Acids Res. 17: 9063-9073

GREENBLOOM, S. L., STEINHART, A. H. und G. R. GREENBERG (1998):

Combination of ciprofloxacin and metronidazole for active Crohn's disease.

Can. J. Gastroenterol. 12: 53-56

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

GREENSTEIN, R. J., SU, L., HAROUTUNIAN, V., SHAHIDI, A. und S. T. BROWN (2007):

On the action of Methotrexate and 6-Mercaptopurine on *M. avium* subspecies *paratuberculosis*.

PloS ONE 2: e161

GREWAL, S. K., RAJEEV, S., SREEVATSAN, S. und F. C. MICHEL Jr. (2006):
Persistence of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* and other zoonotic pathogens during simulated composting, manure packing, and liquid storage of dairy manure.

Appl. Environ. Microbiol. 72: 565-574

GUI, G. P., THOMAS, P. R., TIZARD, M. L., LAKE, J., SANDERSON, J. D. und J. HERMON-THAYLOR (1997):

Two-year-outcomes analysis of Crohn's disease treated with rifabutin and macrolide antibiotics.

J. Antimicrob. Chemother. 39: 393-400

GWOZDZ, J. M., THOMPSON, K. G., MURRAY, A., WEST, D. M. und B. W. MANKTELOW (2000):

Use of the polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in blood and liver biopsies from experimentally infected sheep.

Aust. Vet. J. 78:622-624

HACKER, U., HÜTTNER, K. und M. KONOW (2004):

Untersuchungen zur serologischen Prävalenz und zu Risikofaktoren der Paratuberkulose in Milchviehbetrieben in Mecklenburg-Vorpommern.

Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 117: 140-144

HAMILTON, S. H. (1991):

Diagnosis and comparison of ulcerative colitis and Crohn's disease involving the colon, In: NORRIS, H. T.: Pathology of colon, small intestine and anus.

Churchill Livingstone, New York, Edinburgh, London, Melbourne, Tokyo, 2.

Auflage: 1-22

HAMMER, P. (2003):

Verhalten von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* bei der Be- und Verarbeitung von Lebensmitteln.

Proceed. 44. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“.

Vorträge und Poster. 29. September bis 02. Oktober 2003, Garmisch-Partenkirchen

HAMMER, P. und K. KNAPPSTEIN (1998):

Mycobacterium paratuberculosis als Zoonoseerreger.

Kieler Milchwirtsch. Forsch. Ber. 50: 235-247

HAMMER, P., KIESNER, C. und P. TEUFEL (2000):

Bedeutung der Hitzeresistenz von *Mycobacterium paratuberculosis* für pasteurisierte Milch.

Forschungsreport Ernährung, Landwirtschaft, Forsten, ISSN: 0931-2277,
Deutschland 2: 14-17

HAMMER, P., KIESNER, C., WALTE, M.-G., KNAPPSTEIN, K. und P. TEUFEL
(2002):

Heat resistance of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in raw milk
tested in pilot plant pasteurizer.

Kieler Milchwirtsch. Forsch. Ber. 54: 257-303

HAMPE, J., CUTHBERT, A., CROUCHER, P. J., MIRZA, M. M.,
MASCHERETTI, S., FISHER, S., FRENZEL, H., KING, K., HASSELMEYER,
H., MacPHERSON, A. J., BRIDGER, S., VAN DEVENTER, S., FORBES, A.,
NIKOLAUS, S., LENNARD-JONES, J. E., FOELSCH, U. R., KRAWCZAK, M.,
LEWIS, C., SCHREIBER, S. und C. G. MATHEW (2001):

Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in
German and British population.

Lancet 357: 1925-1928

HAMPE, J., GREBE, J., NIKOLAUS, S., SOLBERG, C., CROUCHER, P. J.,
MASCHERETTI, S., JAHNSEN, J., MOUM, B., KLUMP, B., KRAWCZAK, M.,
MIRZA, M. M., FOELSCH, U. R., VATN, M. und S. SCHREIBER (2002):

Association of NOD2 (CARD15) genotype with clinical course of Crohn's
disease: a cohort study.

Lancet 359: 1661-1665

HARMSSEN, D., DOSTAL, S., ROTH, A., NIEMANN, S., ROTHGÄNGER, J., SAMMETH, M., ALBERT, J., FROSCH, M. und E. RICHTER (2003):

RIDOM: Comprehensive and public sequence database for identification of *Mycobacterium* species.

BMC Infect. Dis. 3: 26-36

HARRIS, N. B. und R. G. BARLETTA (2001):

Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* in veterinary medicine.

Clin. Microbiol. Rev. 14: 489-512

HELZER, J. E., CHAMMAS, S., NORLAND, C. C., STILLINGS W. A. und D. A. ALPERS (1984):

A study of the association between Crohn's disease and psychiatric illness.

Gastroenterol. 86: 324-330

HERMON-TAYLOR, J. und F. A. K. EL-ZAATARI (2004):

Pathogenic mycobacteria in water: a guide to public health consequences, monitoring and management.

Edited by PEDLEY, S., BARTRAM, J., REES, G., DUFOUR, A. und J. COTRUVO.

ISBN: 1 84339 059 0. IWA Publishing, London, UK.

HERMON-TAYLOR, J., BARNES, N., CLARKE, C. und C. FINLAYSON (1998):

Mycobacterium paratuberculosis cervical lymphadenitis followed five years later by terminal ileitis similar to Crohn's disease.

BMJ 316: 449-453

HERRLINGER, K. und E. F. STANGE (2003):

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen.

Internist. 44: 1151-1173

HILDEBRAND, H., FINKEL, Y., GRAHNQUIST, L., LINDHOLM, J., EKBORN, A. und J. ASKLING (2003):

Changing patterns of paediatric inflammatory bowel disease in northern Stockholm 1990-2001.

Gut 52: 1432-1434

HINES, M. E. und E. L. STYER (2003):

Preliminary characterization of chemically generated *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cell wall deficient forms (Spheroplasts).

Vet. Microbiol. 95: 247-258

HINES, S. A., BUERGELT, C. D., WILSON, J. H. und E. L. BLISS (1987):

Disseminated *Mycobacterium paratuberculosis* infection in a cow.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 190: 681-683

HOLT, J. G., KRIEG, N. R., SNEATH, P. A. H., STALEY, J. T. und S. T. WILLIAMS (1994)

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.

Williams and Wilkins Verlag, 9. Auflage: 597- 603

HOMMES, D. W., OLDENBURG, B., VAN BODEGRAVEN, A. A, VAN HOGEZAND, R. A., DE JONG, D. J., ROMBERG-CAMPS, M. J., VAN DER WOUDE, J. und G. DIJKSTRA (2006):

Guidelines for treatment with infliximab for Crohn's disease.

Neth. J. Med. 64: 219-229

HRUSKA, K., BARTOS, M., KRALIK, P. und I. PAVLIK (2005):

Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* in powdered infant milk: paratuberculosis in cattle – the public health problem to be solved

Vet. Med. Czech. 50: 327-335

HUGGETT, J., DHEDA, K., ZUMLA, A. und G. ROOK (2004):

Crohn's disease and MAP.

Lancet 364: 2178

HUGOT, J. P., ALBERTI, C., BERREBI, D., BINGEN, E. und J. P. CEZARD (2003):

Crohn's disease: the cold chain hypothesis.

Lancet 326: 2012-2015

HUGOT, J. P., LAURENT-PUIG, P., GOWER-ROUSEEAU, C., OLSON, J. M., LEE, J. C., BEAUGERIE, L., NAOM, I., DUPAS, J. L., VAN GOSSUM, A., ORHOLM, M., BONAÏTI-PELLIE, C., WEISSENBACH, J., MATHEW, C. G., LENNARD-JONES, J. E., CORTOT, A., COLOMBEL, J. .F. und G. THOMAS (1996):

Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16.

Nature 379: 821-823

HUGOT, J. P., CHAMAILLARD, M., ZOUALI, H., LESAGE, S., CEZARD, J.-P., BELAICHE, J., ALMER, S., TYSK, C., O'MORAIN, C. A., GASSUL, M., BINDER, V., FINKEL, Y., CORTOT, A., MODIGLIANI, R., LAURENT-PUIG, P., GOWER-ROUSEEAU, C., MACRY, J., COLOMBEL, J. F. und G. THOMAS (2001):

Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease.

Nature 411: 599-602

HULTEN, K., KARTTUNEN, T. J., EL-ZIMAITY, H., NASER, S. A., ALMASHHRAWI, A., GRAHAM, D. Y. und F. A. K. EL-ZAATARI (2000a):

In situ hybridization method for studies of cell wall deficient *M. paratuberculosis* in tissue samples.

Vet. Microbiol. 77: 513-518

HULTEN, K., KARTTUNEN, T. J., EL-ZIMAITY, H., NASER, COLLINS, M. T., GRAHAM, D. Y. und F. A. K. EL-ZAATARI (2000b):

Identification of cell wall deficient forms of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in paraffin embedded tissues from animals with Johne's disease by in situ hybridization.

J. Microbiol. Meth. 42:185-195

HUNTER, S. W., GAYLORD, H. und P. J. BRENNAN (1986):

Structure and antigenicity of the phosphorylated lipopolysaccharide antigens from the leprosy and tucercle bacilli.

J. Biol. Chem. 261: 12345-12351

HYAMS, J. S. (1996):

Crohn's disease in children.

Pediatr. Clin. North. Am. 43: 255-77

HYAMS, J. S. (2000):

Inflammatory bowel disease.

Pediatr. Rev. 21: 291-5

IKONOMOPOULOS, J., PAVLIK, I., BARTOS, M., SVASTOVA, P., AYELE, W., Y., ROUBAL, P., LUKAS, J., COOK, N. und M. GAZOULI (2005):

Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail cheeses from Greece and the Czech Republic.

Appl. Environm. Microbiol. 71: 8934-8936

ILSIE (International Life Science Institute, Brüssel):

Mycobacterium avium ssp. *paratuberculosis* (MAP) and the food chain.

Report 2004.

JANTSCHKEK, G., ZEITZ, M., PRITSCH, M., WIRSCHING, M., KLÖR, H.-U.,
STUDT, H. H., RASENACK, J., DETER, H.-C., RIECKEN, E.-O., FEIEREIS,
H., KELLER, W. und the german study group on psychosocial intervention in
Crohn's disease (1998):

Effect of psychotherapy on the course of Crohn's disease: results of the
german prospective multicenter psychotherapy treatment study on Crohn's
disease.

Scand. J. Gastroenterol. 33: 1289-1296

JOHNE, N. A. und L. FROTHINGHAM (1895): Ein eigenthümlicher Fall von
Tuberculose beim Rind.

Dtsch. Z. Tiermed. Vergl. Path. 21: 438-454

JONES, P. H., FARVER, T. B., BEAMAN, B. L., CETINKAYA, B. und K. L.
MORGAN (2000):

Chronic gastrointestinal diseases in dairy farmers in England and the Welsh
boarders: Is there an association between Crohn's disease and bovine
paratuberculosis?

9th Symposium for the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics; 2000 Aug. 6-11, Breckenridge, Colorado

JONES, P. H., FARVER, T. B., BEAMAN, B. L., CETINKAYA, B. und K. L. MORGAN (2006):

Crohn's disease in people exposed to clinical cases of bovine paratuberculosis.
Epidemiol. Infect. 134: 49-56

JORGENSEN, J. B. (1977):

Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry.
Nord. Vet. Med. 29: 267-270

JOTHIKUMARD, N. und M. W. GRIFFITHS (2002):

Rapid detection of *E. coli* O157:H7 with multiplex real time-PCR assays.
Appl. Environm. Microbiol. 68: 3169-3171

JUSTE, R. A., MARCO, J. C., SAEZ DE OCARIZ, C. und J. J. ADURIZ (1991):

Comparison of different media for the isolation of small ruminant strains of *Mycobacterium paratuberculosis*.
Vet. Microbiol. 28: 385-390

KANAZAWA, K., HAGA, Y., FUNAKOSHI, O., NAKAJIMA, H., MUNAKATA, A. und Y. YOSHIDA (1999):

Absence of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in intestinal tissue from Crohn's disease by nested polymerase chain reaction.

J. Gastroenterol. 34: 200-206

KELLER, K. M. und W. NÜTZENADEL (2002):

Leitlinien der Gesellschaft für Pädiatrische Gastroenterologie und Ernährung (GPGE): Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen.

<http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/II/068-001.htm>

KELLER, W., PRITSCH, M., VON WIETERSHEIM, J., SCHEIB, P., OSBORN, W., BALCK, F., DILG, R., SCHMELZ-SCHUMACHER, E., DOPPL, W., JANTSCHKE, G. und H.-C. DETER (2004):

Effect of psychotherapy and relaxation on the psychosocial and somatic course of Crohn's disease: main results of the german prospective multicenter psychotherapy treatment study on Crohn's disease.

J. Psychosom. Res. 56: 687-696

KENNEDY, D. J., HOOD, R. und M. B. ALLWORTH (2002):

Directions for the future control of Johne's disease caused by cattle types of *M. paratuberculosis* in Australia.

7th Int. Colloq. on Paratub., Bilbao, Spanien: 11.-14. Juni.

KIRSCHNER, B. S. (1996):

Ulcerative colitis in children.

Pediatr. Clin. North. Am. 43: 235-54

KIRSCHNER, P., SPRINGER, B., VOGEL, U., MEIER, A., WREDE, A.,
KIEKENBECK, M., BANGE, F.-C. und E. C. BÖTTGER (1993):

Genotypic identification of Mycobacteria by nucleic acid sequence
determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory.

J. Clin. Microbiol. 31: 2882-2889

KLEE, W. (2006):

Paratuberkulose (Johne'sche Krankheit)

In: DIRKSEN, G., GRÜNDER, H.-D. und M. STÖBER (2006):

Innere Medizin und Chirurgie des Rindes.

Parey Verlag, 5. Auflage: 586-591

KÖHLER, H., GEUE, L. und F. J. CONRATHS (2003):

Zur Paratuberkulose-Situation in Deutschland.

Amtstierärztl. Dienst Lebensmittelkontr. 1: 40-44

KÖHLER, H., MÖBIUS, P., MOSER, I. und M. HELLER (2004):

Aktuelle Methoden zur Diagnostik der Paratuberkulose – Bedeutung für
Monitoring und Bekämpfung.

5. Berlin-Brandenburgischer Rindertag, 07.-09. Oktober 2004. Tagungsband.

KOETS A. P., ADUGNA, G., JANSS, L. L. G., VAN WEERING, H. J., KALIS, C. H. J., WENTINK, G. H., RUTTEN, V. P. M. G. und Y. H. SCHUKKEN (2000):
Genetic variation of susceptibility to *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in dairy cattle.
J. Dairy Sci. 83: 2702-2708

KONEMAN, W., ALLEN, S. D., JANDA, W. M., SCHRECKENBERGER, P. C. und C. W. WASHINGTON (1992):
Diagnostic Microbiology.
Philadelphia: J. B. Lippincott

KOPECNA, M., LAMKA, J., TRCKA, I., MORAVKOVA, M., HORVATHOVA, A., LITERAK, I., BARTOS, M. und I. PAVLIK (2005):
Atypical hosts and vectors of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.
8th Int. Colloq. on Paratub., 14.-18. August 2005, Kopenhagen, Dänemark.

KURATA, J. H., KANTOR-FISH, S., FRANKL, H., GODBY, P. und C. M. VADHEIM (1992):
Crohn's disease among ethnic groups in a large health maintenance organization.
Gastroenterol. 102: 1940-1948

KÜHN, T. (2003):

Anzüchtung von *M. paratuberculosis* aus bovinem und ovinem
Untersuchungsmaterial auf Basis fester und flüssiger Kulturverfahren.
AVID-Workshop, 25.03.2003, Heidelberg.

LAMBRECHT, R. S., CARRIERE, J. F. und M. T. COLLINS (1988):
A model for analyzing growth kinetics of a slowly growing *Mycobacterium* spp.
Appl. Environm. Microbiol. 54: 910-916

LARSEN, A. B., MERKAL, R. S. und T. H. VARDAMAN (1956):
Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*.
Am. J. Vet. Res. 17: 549-551

LARSEN, A. B., STALHEIM, O. H., HUGHES, D. E., APPELL, L. H.,
RICHARDS, W. D. und E. M. HIMES (1981):
Mycobacterium paratuberculosis in the semen and genital organs of a semen-
donor bull.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 179: 169-71

LEVENSTEIN, S., PRANTERA, C., VARVO, V., SCRIBANO, M. L., ANDREOLI,
A., LUZI, C., ARCA, M., BERTO, E., MILITE, G. und A. MARCHEGGIANO
(2000):
Stress and exacerbation in Ulcerative colitis: a prospective study of patients
enrolled in remission.
Am. J. Gastroenterol. 95: 1213-1220

LINDBERG, E., LINDQUIST, B., HOLMQUIST, L. und H. HILDEBRAND (2000):
Inflammatory bowel disease in children and adolescents in Sweden,

1984-1995.

J. Pediatr.Gastroenterol. Nutr. 30: 259-64

LILLINI, E., GAMBERALE, F., BITONTI, G., DE GROSSI, L. und A. CERSINI
(2005):

A survey on the prevalence of bovine Paratuberculosis in Latium region (Italy):
8th Int. Colloq. on Paratub., 14.-18. August 2005, Kopenhagen, Dänemark.

LISBY, G., ANDERSEN, J., ENGBAEK, K. und V. BINDER (1994):

Mycobacterium paratuberculosis in intestinal tissue from patients with Crohn's
disease demonstrated by a nested primer polymerase chain reaction.

Scand. J. Gastroenterol. 29: 923-929

LOFTUS, E. V., SILVERSTEIN, M. D., SANDBORN, W. J., TREMAINE, W. J.,
HARMSSEN, W. S. und A. R. ZINSMEISTER (1998):

Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: Incidence,
prevalence, and survival.

Gastroenterol. 114: 1161-1168

LOVELL, R., LEVI, M. und J. FRANCIS (1944):

Studies on the survival of Johne's bacilli.

J. Comp. Path. 54: 120-129

LOZANO-LEON, A., BARREIRO-DE ACOSTA, M. und J. E. DOMINGUEZ-MUNOZ (2006):

Absence of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Crohn's Disease patients.

Inflamm. Bowel Dis. 12: 1190-1192

MACHACKOVA, M., SVASTOVA, P., LAMKA, J., PARMOVA, I. LISKA, V., SMOLIK, J., FISCHER, O. A. und I. PAVLIK (2004):

Paratuberculosis in farmed and free-living ruminants in the Czech Republic (1999-2001) (2004):

Vet. Microbiol. 101: 225-235

MACHAM, L. P., RATLEDGE, C. und J. C. NOCTON (1975)

Extracellular Iron Acquisition by Mycobacteria: Role of the Exochelins and Evidence against the Participation of Mycobactin.

Infect. Immun. 12:1242-51

MACKAY, M. (2004):

Real-Time PCR in the microbiological laboratory.

Clin. Microbiol. Infect. 10: 190-212

MAHMUD, N. und D. G. WEIR (2001):

The urban diet and Crohn's disease. Is there a relationship?

Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 13: 93-5

MALORNA, B. und J. HOORFAR (2005):

Toward standardization of diagnostic PCR testing of fecal samples: lessons from the detection of salmonellae in pigs.

J. Clin. Microbiol. 43: 3033-3037

MANNING, E. J., COM, J. L., SREEVATSAN, S. und J., R. Fischer (2005):

Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from free-ranging birds and mammals on livestock premises.

8th Int. Colloq. on Paratub., 14.-18. August 2005, Kopenhagen, Dänemark.

MARKESICH, D. C., GRAHAM, D. Y. und H. H. YOSHIMURA (1988):

Progress in culture and subculture of spheroplasts and fastidious acid-fast bacilli isolated from intestinal tissues.

J. Clin. Microbiol. 26: 1600-1603

MARTINEZ-MONTIEL, M. P. und M. T. MUNOZ-YAGUE (2006):

Biological therapies for chronic inflammatory bowel disease.

Resp. Esp. Enferm Dig. 98: 265-291

MATE-JIMINEZ, J., MUNOZ, S., VINCENT, D. und J. M. PAJARES (1994):

Incidence and prevalence of ulcerative colitis and Crohn's disease in urban and rural areas of Spain from 1981 to 1988.

J. Clin. Gastroenterol. 18: 27-31

MATSON, A. P., VAN KRUININGEN, H. J., WEST, A. B., CARTUN, R. W.,
COLOMBEL, J. F. und A. CORTOT (1995):

The relationship of granulomas to blood vessels in intestinal Crohn's disease.

Mod. Pathol. 8: 680-685

MAYBERRY, J. F. und R. A. N. HITCHENS (1978):

Distribution of Crohns's disease in Cardiff.

Soc. Sci. Med. 12: 137-138

McCLURE, H. M., CHIODINI, R. J., ANDERSON, D. C., SWENSON, R. B.,
THAYER, W. R. und J. A. COUTU (1987):

Mycobacterium paratuberculosis in a colony of stump-tail macaques (*Macaca arctoides*).

J. Infect. Dis. 155: 1011-1019

McKILLIP, J. und M. DRAKE (2004):

Real Time nucleic acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food.

J. Food Protect. 67: 823-832

MERKAL, R. S. (1984):

Paratuberculosis: advances in cultural, serologic and vaccination methods.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 184: 939-943

MERKAL, R. S. und B. J. CURRAN (1974):

Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*.

Appl. Microbiol. 28: 276-279

MERKAL, R. S., KOPECKY, K. E., LARSEN, A. B. und J. R. THURSTON
(1964):

Improvement in the techniques for primary cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis*.

Am. J. Vet. Res. 25: 1290-1293

MEUCCI, G., VECHI., M., TORGANO, G., ARRIGONI, M., PRADA, A.,
ROCCA, F., CURZIO, M., PERA, A. und R. DE FRANCHIS (1992):

Familial aggregation of inflammatory bowel disease in northern Italy: a multicenter study. The gruppo di studio per le Malattie Infiammatorie Intestinali (IBD study group)

Gastroenterol. 103: 514-519

MEYLAN, M., RINGS, D. M., SHULAW, W. P., KOWALSKI, J. J., BECH-
NIELSEN, S. und G. F. HOFFSIS (1996):

Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* and preservation of immunoglobulin G in bovine colostrum under experimental conditions simulating pasteurization.

Am. J. Vet. Res. 57: 1580-1585

MILLAR, D., FORD, J., SANDERSON, J., WITHEY, S., TIZARD, M., DORAN, T. und J. HERMON-TAYLOR (1996):

IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cow's milk in England and Wales.

Appl. Environm. Microbiol. 62: 3446-3452

MÖBIUS, P. und H. KÖHLER (2005):

Results of a comparative study of PCR-Systems to detect *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.

5. Internationales Symposium zur BHV 1-, BVD- und Paratuberkulose-Bekämpfung, 09.-11.03.2005, Stendal.

MONSEN, U., BROSTROM, O., NORDENVALL, B. und G. HELLERS (1987):

Prevalence of inflammatory bowel disease among relatives of patients with ulcerative colitis.

Scand. J. Gastroenterol. 22: 214-218

MORITA, N., TKI, S., HIROHASHI, T., MINODA, T., OKAWA, K., KONO, S., TAMAKOSHI, A., OHNO, Y., SAWADA, T. und T. MUTO (1995):

Incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in Japan: nationwide epidemiological survey during the year 1991.

J. Gastroenterol. 30: 1-4

MOSS, M. T., GREEN, E. P., TIZARD, M., MALIK, Z. P und J. HERMON-TAYLOR (1991):

Specific detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by DNA hybridization with a fragment of the insertion element *IS900*.

Gut 32: 395-389

MOSS, M. T., SANDERSON, J. D., TIZARD, M., HERMON-TAYLOR, J., EL-ZAATARI, F., MARKESICH, D. und D. Y. GRAHAM (1992):

Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* ssp. *silvaticum* in long term cultures from Crohn's disease and control tissues.

Gut. 33: 1209-1213

MOTIWALA, A. S., AMONSIN, A., STROTHER, M., MANNING, E. J., KAPUR, V. und S. SREEVATSAN (2004):

Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* isolates recovered from wild animals species.

J. Clin. Microbiol. 42: 1703-1712

MULLIS, K. B. und F. A. FALOONA (1987):

Spezifische Synthese von DNA in vitro über eine Polymerase-katalysierte Kettenreaktion.

Meth. Enzymol. 155: 335-350

MURRAY, C. D. (1930):

Psychogenic factors in the etiology of ulcerative colitis and bloody diarrhea.

Am. J. Med. Sci. 1930: 239-248

MUSKENS, J., BAKKER, D., DE BOER, J. und L. VAN KEULEN (2001):

Paratuberculosis in sheep: its possible role in the epidemiology of paratuberculosis in cattle.

Vet. Microbiol. 78: 101-109

NAKASE, H., NISHIO, A., TAMAKI, H., MATSUURA, M., ASADA, M., CHIBA, T. und K. OKAZAKI (2006):

Specific Antibodies against recombinant protein of Insertion Element 900 of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in japanese patients with Crohn's disease.

Inflamm. Bowel. Dis. 12: 62-69

NASER, S. A., SHAFRAN, I. und F. EL-ZAATARI (1999a):

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* in Crohn's disease is serologically positive.

Clin. Diagn. Lab. Immunol. 6: 282: 1-8

NASER, S. A., SCHWARTZ, D. und I. SHAFRAN (2000a):

Isolation of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* from breast milk of Crohn's disease patients.

AJG 95: 1094-1095

NASER, S. A., GHOBRIAL, G., ROMERO, C. und J. F. VALENTINE (2004):
Culture of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* from the blood of
patients with Crohn's disease.

Lancet 364: 1039-1044

NASER, S. A., FELIX, J., LIPING, H., ROMERO, C., ASER, N., WALSH, A. und
W. SAFRANEK (1999b):

Occurrence of *IS900* gene in *Mycobacterium* complex derived from HIV patients.

Mol. Cell. Probes 13: 367-372

NASER, S. A., HULTEN, K., SHAFRAN, I., GRAHAM, D. Y. und F. A. K. EI-
ZAATARI (2000b):

Specific seroreactivity of Crohn's disease patients against p35 and p36 antigens
of *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.

Vet. Microbiol. 77: 497-504

NIELSEN, S. S. und J. F. AGGER (2000):

Prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds.

Proceedings of the sixth International Symposium on Veterinary Epidemiology
and Economics.

Breckenridge, Colorado, USA, Aug 6-11, 2000: 267-269.

NIELSEN, S. S., KOLMOS, B., und A. B. CHRISTOFFERSEN (2004):

Comparison of contamination and growth of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* on two different media.

J. Appl. Microbiol. 96: 149-153

OCHSENKÜHN, T., SACKMANN, M. und B. GÖKE (2003):

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen – Kritische Diskussion von Ätiologie, Pathogenese, Diagnostik und Therapie.

Radiologe 43

ODUMERU, J., GAO, A., CHEN, S., RAYMOND, M. und L. MUTHARIA (2001):

Use of the bead beater for preparation of *Mycobacterium paratuberculosis*.

Canad. 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., BAYLESS, M. T., KIRSCHNER, B. S., HANAUER, S. B., NUNEZ, G. und J. H. CHO (2001):

A frameshift mutation in *NOD2* associated with susceptibility to Crohn's disease.

Nature 411: 603-606

OHMEN, J. D., YANG, H.-Y., YAMAMOTO, K. K., ZHAO, H.-Y., MA, Y., BENTLEY, L. G., HUANG, Z., GERWEHR, S., PRESSMAN, S., MCELREE, C., TARGAN, S., ROTTER, J. I. und N. FISCHER-GHODSIAN (1996):
Susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16 has a role in Crohn's disease, but not in ulcerative colitis.
Hum. Mol. Genet. 10:1679-83

OLSEN, I., WIKER, H. G., JOHNSON, E., LANGE GGEN, H. und L. J. REITAN (2001):
Elevated antibody responses in patients with Crohn's disease against a 14-kDa secreted protein purified from *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis*.
Scand. J. Immunol. 53: 198-203

O'MAHONY, J. und C. HILL (2002):
A Real Time PCR assay for the detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using SYBR Green and the Light Cycler.
J. Microbiol. Methods 51: 283-293

ORHOLM, M., BINDER, V., SØRENSEN, T. I. A., RASMUSSEN, L. P. UND K. O. KYVIK (2000):
Concordance of inflammatory bowel disease among danish twins.
Scan. J. Gastroenterol. 35: 1075-1081

OTT, S. L., WELLS, S. J. und B. A. WAGNER (1999):

Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations.

Prev. Vet. Med. 40: 179-192

PALMER, M. V., STOFFREGEN, W. C., J. G. CARPENTER und J. R. STABEL
(2005):

Isolation of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) from feral cats on a dairy farm with MAP-infected cattle.

J. Wildl. Dis. 41: 629-635

PAOLICCHI, F., CIRONE, K., MORSELLA, C., GIOFFRE, A. und M. ROMANO
(2005):

Isolation of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP) from commercial pasteurized milk.

8th Int. Colloq. on Paratub. Kopenhagen, Dänemark, 14.-17. August

PARRISH, N. M., Ko, C., G., DICK, J. D., JONES, P. B. und J. L. E.
ELLINGSON (2004):

Growth, Congo Red agar colony morphotypes and antibiotic susceptibility testing of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*.

Clin. Med. Res. 2: 107-114

PATJA, A., DAVIDKIN, I., KURKI, T., KALLIO, M., VALLE, M. und H. PELTOLA
(2000):

Serious adverse events after measles-mumps-rubella vaccination during a fourteen-year prospective follow-up.

Pediatr. Infect. Dis. J. 19: 1127-1134

PATEL, J. B., LEONARD, D. G., PAN, X., MUSSER, J. M., BERMAN, R. E. und I. NACHAMKIN (2000):

Sequence-based identification of *Mycobacterium* species using the MicroSeq 500 16S rDNA bacterial identification system.

J. Clin. Microbiol. 38: 246-251

PAVLIK, I., HORVATHOVA, A., DVORSKA, L., BARTL, J., SVASTOVA, P., DU MAINE, R. und I. RYCHLIK (1999):

Standardisation of restriction fragment length polymorphism analysis for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*.

J. Microbiol. Methods 38: 155-167

PAVLIK, I., AYELE, W. Y., FISCHER, O., MATLOVA, L., SVASTOVA, P., BARTOS, M., MACHACKOVA, M., ALEXA, M. und J. LAMKA (2002):

Role of the external environment, plants and non-vertebrates for the spread of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*.

7th Int. Colloq. on Paratub. Bilbao, Spanien, 11.-14. Juni.

PEPPERCORN, M. A. (2004):

The overlap of inflammatory bowel disease and diverticular disease.

J. Clin. Gastroenterol. 38 (5 Suppl.): S8-10

PICKUP, R. W., RHODES, G. SIDI-BOUMEDINE, K., BULL, T., WEIGHTMAN, A., ARNOTT, S. und J. HERMON-TAYLOR (2005a):

Mycobacterium avium subspecies *paratuberculosis* in the catchment and water of the river Taff in South Wales, UK and its potential relationship to clustering of Crohn's Disease in the city of Cardiff.

8th Int. Colloq. on Paratub., Kopenhagen, Dänemark, 14.-17. August.

PICKUP, R. W., RHODES, G., ARNOTT, S., SIDI-BOUMEDINE, K., BULL, T., WEIGHTMAN, A., HURLEY, M. und J. HERMON-TAYLOR (2005b):

Mycobacterium avium subspecies *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 in the city of Cardiff.

Appl. Environm. Microbiol. 71: 2130-2139

PICKUP, R. W., RHODES, G., BULL, T., ARNOTT, S., SIDI-BOUMEDINE, HURLEY, M. und J. HERMON-TAYLOR (2006):

Mycobacterium avium subspecies *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. Environm. Microbiol. 72: 4067-4077

PODOLSKY, D. K. (2002):

Medical progress: Inflammatory bowel disease.

N. Engl. J. Med. 347: 417-429

POUPART, P., COENE, M., VAN HEUVERSWYN, H. und C. COCITO. (1993):

Preparation of a specific RNA probe for detection of *M. paratuberculosis* and diagnosis of Johne's disease.

J. Clin. Microbiol. 31:1601–1605

PRANTERA, C., BOTHAMLEY, G., LEVENSTEIN, S., MANGIAROTTI, R. und R. AGENTIERI (1989):

Crohn's disease and mycobacteria: two cases of Crohn's disease with high anti-mycobacterial antibody levels cured by dapsons therapy.

Biomed. Pharmacother. 43: 295-299

PRANTERA, C., ZANNONI, F., SCRIBANO, M. L., BERTO, E., ANDREOLI, A., KOHN, A. und C. LUZI (1996):

An antibiotic regimen for the treatment of active Crohn's disease: a randomized, controlled clinical trial of metronidazole plus ciprofloxacin.

Am. J. Gastroenterol. 91: 328-332

PRANTERA, C., LOCHS, H., CAMPIERI, M., SCRIBANO, M. L., STURNIOLO, G. C., CASTIGLIONE, F. und M. COTTONE (2006):

Antibiotic treatment of Crohn's disease: results of a multicentre, double blind, randomized, placebo-controlled trial with rifaximin.

Aliment. Pharmacol. Ther. 23: 1117-1125

PROBERT, C. S., JAYANTHI, V., HUGHES, A. O., THOMPSON, J. R., WICKS, A. C. und J. F. MAYBERRY (1993):

Prevalence and family risk of ulcerative colitis and Crohn's disease: an epidemiological study among Europeans and south Asians in Leicestershire.

Gut 34:1547-1551

PROBST, B., VON WIETERSHEIM, J., WIELKE, E. und H. FEIEREIS (1990):

Soziale Integration von Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten. Studie zur Wechselwirkung somatischer, psychischer und sozialer Faktoren.

Zsch. psychosom. Med. 36: 258-275

PUYANG, X., LEE, K., PAWLICHUK, C. und D. KUNIMOTO (1999):

IS1626, a new *IS900*-related *Mycobacterium avium* insertion sequence.

Microbiology. 145: 3163-3168

RATNAM, S. und S. CHANDRASEKHAR (1976):

The pathogenicity of spheroplasts of *Mycobacterium tuberculosis*.

Am. Rev. Respir. Dis. 114: 549-554

REDDACLIFF, L. A., VADALI, A. und R. J. WHITTINGTON (2003):

The effect of decontamination protocols on the number of sheep strain *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* isolated from tissues and faeces.

Vet. Microbiol. 95: 271-282

RICHTER, E., WESSLING, J., LÜGERING, N., DOMSCHKE, W. und S. RÜSCH-GERDES (2002):

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* infection in a patient with HIV, Germany.

Emerg. Infect. Dis. 8: 729-731

RIFFON, R. und K. SAYASITH (2001):

Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR.

J. Clin. Microbiol. 39: 2584-2589

RIGAS, A., RIGAS, B., GLASSMAN, M., YEN, Y. Y., LAN, S. J., PETRIDOU, E., HSIEH, C. C. und D. TRICHOPOULOS (1993):

Breast-feeding and maternal smoking in the etiology of Crohn's disease and ulcerative colitis in childhood.

Ann. Epidemiol. 4: 387-392

RIGGIO, M. P., GIBSON, J., LENNON, A., WRAY, D. und D. G. MACDONALD (1997):

Search for *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in orofacial granulomatosis and oral Crohn's Disease tissue by polymerase chain reaction.

Gut 41: 646-650

ROMERO, C., HAMDI, A., VALENTINE, J. F. und S. NASER (2005):

Evaluation of surgical tissue from patients with Crohn's disease for the presence of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* DNA by in situ hybridization and nested polymerase chain reaction.

Inflamm. Bowel. Dis. 11: 116-125

ROSCH, M., LEIDL, R., TIRPITZ, C., REINSHAGEN, M., ADLER, G. und H. H. KÖNIG (2002):

Kostenerfassung bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen durch direkte Patientenbefragung mit einem Kostenwochenbuch.

Z. Gastroenterol. 40: 217-28

ROSSITER, C. A. und W. R. HENNING (2001):

Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from thin market cows at slaughter.

J. Dairy Sci. 84 (Suppl. 1): 113

ROTH, M. P., PETERSEN, G. M., MCELREE, C., FELDMAN, E. und J. I. ROTTER (1989):

Geographic origins of Jewish patients with inflammatory bowel disease.

Gastroenterology 97: 900-904

ROTH, A., REISCHL, U., SREUBEL, A., NAUMANN, L., KROPPESTEDT, R., HABICHT, M., FISCHER, M. und H. MAUCH (2000):

Novel Diagnostic Algorithm for identification of Mycobacteria using genus-specific amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases.

J. Clin. Microbiol. 38: 1094-1104

ROWE, M.T., WHAN, L., BALL, H. J. und I. R. GRANT (2005):

Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw waters in Northern Ireland.

8th Int. Colloq. on Paratub., 14.-18. August 2005, Kopenhagen, Dänemark.

ROWBOTHAM, D. S., MAPSTONE, N. P., TREJDOSIEWISZCZ, L. K., HOWDLE, P. D. und P. QUIRKE (1995):

Mycobacterium paratuberculosis DNA not detected in Crohn's disease tissue by fluorescent polymerase chain reaction.

Gut 37: 660-667

RUBIN, G. P., HUNGIN, A. P. S., KELLY, P. J. und J. LING (2000):

Inflammatory bowel disease: epidemiology and management in an English general practice population.

Aliment. Pharmakol. Ther. 14: 1553-1559

RYAN, T und D. CAMPBELL (2006):

Mycobacterium paratuberculosis – A public Health Issue?

<http://www.nzfsa.govt.nz/science/research-projects/mycobacteria-paratuberculosis/mycobacteriaparatuberculosis.pdf>

RYAN, P., BENNETT, M. W., AARONS, S., LEE, G., COLLINS, J. K., O'SULLIVAN, G. C. und J. O'CONNELL (2002):

PCR detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease granulomas isolated by laser capture microdissection.

Gut 51: 665-670

SANDERSON, J. D., MOSS, M. T., TIZARD, M. L. und J. HERMON-TAYLOR (1992):

Mycobacterium paratuberculosis DNA in Crohn's disease tissue.

Gut 33: 890-896

SARITSIRI, S. UDOMSANTISOOK, N. und C. SUANKRATAY (2006):

Nontuberculous mycobacterial infections in King Chualalongkorn Memorial Hospital.

J. Med. Assoc. Thai. 89: 2035-2046

SCHMID, M., FELLERMANN, K., WEHKAMP, J., HERRLINGER, K. und E. F. STANGE (2004):

Die Rolle der Defensine in der Pathogenese chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen.

Z. Gastroenterol. 42: 333-338

SCHÖNENBRÜCHER, H., ABDULMAWJOOD, A. und M. BÜLTE (2005):

Development and evaluation of a Real Time-PCR-method for the detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*.

8th Int. Colloq. on Paratub., 14-18.August, Kopenhagen, Dänemark, Proceed. 543

SCHÖNENBRÜCHER, H., ABDULMAWJOOD, A. und M. BÜLTE (2006):

Entwicklung und Validierung eines Real Time-PCR-Verfahrens zum Nachweis von *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*.

Fleischw. 86: 123-125

SCHÖNENBRÜCHER, H., ABDULMAWJOOD, A., FAILING, K. und M. BÜLTE (2008):

New Triplex Real-Time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in bovine feces.

Appl. Environ. Microbiol. 74: 2751-2758

SCHRAUDER, A., AMMON, A., STRAK, K., EULER, U., BRÄUNIG, J. und E. WEISE (2003):

Morbus Crohn und *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* – eine Literaturstudie.

<http://www.bfr.bund.de/cm/208/Morbus%20Crohn%20und%20Mycobacterium%20avium%20ssp%20paratuberculosis%20Literaturstudie.pdf>

SCHWARTZ, D., SHAFRAN, I., ROMERO, C., PIROMALLI, C., BIGGERSTAFF, J., NASER, N., CHAMBERLIN, W. und A. A. NASER (2000):
Use of short-term culture for identification of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in tissue from Crohn's disease patients.
Clin. Microbiol. Infect. 6: 303-307

SECHI, L. A., MURA, M., FRANCESCO, T., AMELIA, L., ANTONELLO, S., GIOVANNI, F. und Z. STEFANIA (2001):
Identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in biopsy specimens from patients with Crohn's disease identified by in situ hybridization.
J. Clin. Microbiol. 39: 4514-4517

SECHI, L. A., SCANU, A. M., MOLICOTTI, P., CANNAS, S., MURA, M. DETTORI, G., FADDA, G. und S. ZANETTI (2005):
Detection and isolation of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* from intestinal mucosal biopsies of patients with and without Crohn's disease in Sardinia.
Am. J. Gastroenterol. 100: 1529-1536

SEITERT, G., BÖGLI-STUBER, K., KOHLER, C., WITTEW, M.,
WASSENAAR, T. M., FREY, J. und B. BISSIG-CHOISAT (2003):

44. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes „Lebensmittelhygiene“. Vorträge und
Poster. 29. September bis 02. Oktober 2003, Garmisch-Partenkirchen

SELVIN, P. (1995):

Fluorescence resonance energy transfer.

Meth. Enzymol. 246: 300-334

SHARFRAN, I., KUGLER, L., EL-ZAATARI, F. A., NASER, S. A. und J.
SANDOVAL (2002):

Open clinical trial of rifabutin and clarithromycin therapy in Crohn's disease.

Dig. Liver Dis. 43: 22-28

SHEFFIELD, B. F., und M. W. CARNEY (1976):

Crohn's disease: a psychosomatic illness?

Br. J. Psychiatry 128: 446-450

SHIVANANDA, S. LENNARD-JONES, LOGAN, R., FEAR, N., PRICE, A.,
CARPENTER, L. und M. VAN BLANKENSTEIN (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

SIEGMUND, B. und M. ZEITZ (2005):

Standard of medical treatment and nutrition in Crohn's disease.

Langenbecks Arch. Surg. 390: 503-509

SILVERSTEIN, M. D., LOFTUS, E. V., SANDBORN, W. J., TREMAINE, W. J.,
FEAGAN, B. G., NIETERT, P. J., HARMSEN, W. S. und A. R. ZINSMEISTER
(1999):

Clinical course and costs of care for Crohn's disease: Markov model analysis of
a population-based cohort.

Gastroenterol. 117: 49-57

SINGH, A. V., SINGH, S. V. und V. K. GUPTA (2005):

Isolation of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* from human beings in
India.

8th Int. Colloq. on Paratub. 14.-18. August 2005, Kopenhagen, Dänemark

SMITH, W., MCGARVAY, K. und J. CULLOR (2003):

The use of spiral plating and microscopic colony counting for the rapid
quantitation of *Mycobacterium paratuberculosis*.

Lett. Appl. Microbiol. 36: 293-296

SMITHWICK, R. W., STRATIGOS, C. B. und H. L. DAVID (1975):

Use of cetylpyridinium chloride and sodium chlorid for the decontamination of sputum specimens that are transported to the laboratory for the isolation of *Mycobacterium tuberculosis*.

J. Clin. Microbiol. 1: 411-413

SONGER, J. G. und K. W. POST (2005)

Veterinary Microbiology. Bacterial and fungal agents of animal disease.

Elsevier Saunders, 1. Auflage: 104-106

SPAHR, U., und K. SCHAFFROTH (2001):

Fate of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in swiss hard and semihard cheese manufactured from raw milk.

Appl. Environm. Microbiol. 67: 4199-4205

SPRINGER, B., STOCKMAN, L., TESCHNER, K., ROBERTS G. D. und E. C. BÖTTGER (1996):

Two-Laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: Molecular versus phenotypic methods.

J. Clin. Microbiol. 34: 296-303

STABEL, J. R. (1997):

An improved method for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three other methods.

J. Vet. Diagn. Invest. 9: 375-380

STABEL, J. R. (1998):

Johne's disease: a hidden threat.

J. Dairy Sci. 81: 283-288

STACHELSCHIED, H. L. (1989):

Zum kulturellen Nachweis von *Mycobacterium paratuberculosis* in Rinderkotproben. Vergleich zweier Dekontaminierungs- und Kulturverfahren.

Diss., Justus-Liebig-Universität Gießen

STÄRK, K., FREI-STÄHELI, C., FREI, P. P., PFEIFFER, D. U., STRASSER, N. M., GOTTSTEIN, B. und U. KIHM (1997):

Häufigkeit und Kosten von Gesundheitsproblemen bei Schweizer Milchkühen und deren Kälbern (1993–1994).

Schweiz. Arch. Tierheilkd. 139: 343–353.

STAHL, D. A. und J. W. URBANCE (1990):

The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria.

J. Bacteriol. 172: 116-124

STAINSBY, K. J., LOWES, J. R., ALLAN, R. N. und J. P. IBBOTSON (1993):

Antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis* and nine species of environmental mycobacteria in Crohn's disease and control subjects.

Gut 34: 371-374

STARK, R., KÖNIG., H. H. und R. LEIDL (2006):

Costs of inflammatory bowel diseases in germany.

Pharmacoeconomics 24: 797-814

STEPHAN, R., SCHUMACHER, S., GRANT, I. und T. TASARA (2206):

Prevalence and persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) in raw milk cheeses collected at retail level in Switzerland.

47. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, 26.-29.09.2006, Garmisch-Partenkirchen

STERNBERG, S., BÖLSKE, G., ROBERTSON, J.-A., OLSSON, S.-O. und D. VISKE (2002):

Screening of Swedish dairy farms for Paratuberculosis.

7th Int. Colloq. on Paratub., Bilbao, Spanien: 11.-14. Juni

STERNBERG, S. und D. VISKE (2003):

Control strategies for Paratuberculosis in Sweden.

Acta. Vet. Scand. 44: 247-249

STERNBERG, L. S., LARSSON, B., MELIN, L. und G. BÖLSKE (2005):

Screening the Swedish sheep population for Paratuberculosis.

8th Int. Colloq. on Paratub., 14.-18. August 2005, Kopenhagen, Dänemark

STEVENSON, K. und J. M. SHARP (1997):

The contribution of molecular microbiology to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* research.

Vet. J. 153: 269-286

STEVENSON, K. HUGHES, V. M., DE JUAN, L., INGLIS, N. F., WRIGHT, F. und J. M. SHARP (2002):

Molecular characterization of pigmented and non-pigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

J. Clin. Microbiol. 40: 1798-1804

STITT, D. T., STURM, K. M. und P. A. HAGEMANN (1996):

Preliminary methods for growing *Mycobacterium paratuberculosis* using the BBL MGIT™ Mycobacteria Indicator Tube.

5th Int. Colloq. on Paratub., 29. September – 4. Oktober, Madison, Wisconsin

STRATMANN, J., STROMMENGER, B., STEVENSON, K. und G. F. GERLACH (2002):

Development of a peptide-mediated capture PCR for detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in milk.

J. Clin. Microbiol. 40: 4244-4250

STROMMENGER, B., STEVENSON, K. und G. F. GERLACH (2001):

Isolation and diagnostic potential of *ISMAV2*, a novel insertion sequence-like element from *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*.

FEMS Microbiol. Lett. 196: 31-37

SUENAGA, K., YOKOYAMA, Y., NISHIMORI, I., SANO, S., MORITA, M
OKAZAKI; K. und S. ONISHI (1999):

Serum antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis* in patients with Crohn's disease.

Dig. Dis. Sci. 44: 1202-1207

SUMMERS, R. W., ELLIOTT, D. E., URBAN, J. F., THOMPSON, R. A. und J.
V. WEINSTOCK (2005a).

Trichuris suis therapy for active Colitis ulcerosa: a randomized controlled trial.

Gastroenterology 128: 825-832

SUMMERS, R. W., ELLIOTT, D. E., URBAN, J. F., THOMPSON, R. A. und J.
V. WEINSTOCK (2005b).

Trichuris suis therapy in Crohn's disease.

Gut 54: 87-90

SUNG, N. und M. T. COLLINS (1998):

Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*.

Appl. Environm. Microbiol. 64: 999-1005

SUNG, N. und M. T. COLLINS (2000):

Effect of three factors in cheese production (pH, salt, heat) on *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* viability.

Appl. Environm. Microbiol. 66: 1334-1339

SWEENEY, R. W., WHITLOCK, R. H. und A. E. Rosenberger (1992):

Mycobacterium paratuberculosis cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows.

J. Clin. Microbiol. 30: 166-171

SWEENEY, R. W., WHITLOCK, R. H. und S. C. MCADAMS (2006):

Comparison of three DNA preparation methods for real-time polymerase chain reaction confirmation of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* growth in an automated broth culture system.

J. Vet. Diagn. Invest. 18: 587-590

SWIDSINSKI, S., SCHMIDT-SCHLÄPFER, G., SCHNEEWEIß, B. und A.

SWIDSINSKI (1998):

Pertussis-PCR. Neuer Standard in der Keuchhustendiagnostik.

Monatschr. Kinderheilk. 146: 1171-1175

TADDEI, S., ZAMBELLI, A., MONTANELLI, A., LUPINACCI, G. und S.

CAVIRANI (2005a):

Isolation of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* from patients with Crohn's disease, ulcerative colitis and healthy controls: preliminary results.

8th Int. Colloq. on Paratub. 14.-18. August 2005, Kopenhagen, Dänemark

TADDEI, R., BARBIERI, I., PACCIARINI, M. L., LOSINI, I., CAMMI, G., BELLETTI, G. L. und N. ARRIGONI (2005b):

An *IS900*-like sequence in *Mycobacterium porcinum* strains isolated from bovine bulk milk: implications for diagnosis.

8th Int. Colloq. on Paratub. 14.-18. August 2005, Kopenhagen, Dänemark

TANAKA, M., RIDDELL, R. H., SAITO, H. SOMA Y. HIDAKA H und H. KUDO (1999):

Morphologic criteria applicable to biopsy specimens for effective distinction of Inflammatory Bowel Disease from other forms of colitis and Crohn's disease from ulcerative colitis.

Scand. J. Gastroenterol 34: 55-67

TASARA, T., HOELZLE, L. E. und R. STEPHAN (2005):

Development and evaluation of a *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) specific multiplex PCR assay.

Int. J. Food Microbiol. 104: 179-287

TASARA, T., BOSSHARD, C. und R. STEPHAN (2006):

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* prevalence studies in bulk tank raw milk and slaughtered health dairy cows in Switzerland using F57 sequence-based real-time PCR assay.

47. Tagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, 26.-29.09.2006, Garmisch-Partenkirchen, Proceed. S. 281

THAYER, W. R. (1992):

The use of antimycobacterial agents in Crohn's disease.

J. Clin. Gastroenterol. 15: 5-7

THOMPSON, N. P., MONTGOMERY, S. M., POUNDER, R. E. und A. J.

WAKEFIELD (1995):

Is measles vaccination a risk factor for inflammatory bowel disease?

Lancet 345: 1071-1074

THOMAS, G., SWIFT, G., GREEN, T., NEWCOMBE, R., BRANIFF-MATHEWS,

C., RHODES, J., WILKINSON, S., STROHMEYER, G. und G. KREUZPAINTER

(1998):

Controlled trial of antituberculous chemotherapy in Crohn's disease: a five year follow up study.

Gut 42: 497-500

THOREL, M.-F., KRICHEVSKY, M. und V. V. LEVY-FREBAULT (1990):

Numerical taxonomy of mycobactin-dependent *Mycobacteria*, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov, and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov.

Int. J. Syst. Bacteriol. 40: 254-260

THORNTON, G. C., MacLELLAN, K. M., BRINK, T. L. und S. PASSEN (1898):

In vitro comparison of NALC-NaOH, Tween 80, and C₁₈-Carboxypropylbetaine for processing of specimens for recovery of mycobacteria.

J. Clin. Microbiol. 36: 3558-3566

TIMMER, A., BREUER-KATSCHINSKY, B. und H. GOEBELL (1999):

Time trend in incidence and disease location of Crohn's disease 1980-1995: a prospective analysis in an urban population in Germany.

Inflamm. Bowel Dis. 5: 79-84

TRALLORI, G., PALLI, D., SAIEVA, C., BARDAZZI, G., BONANOMI, A. G., d'ALBASIO, G., GALLI, M., VANOZZI, G., MILLA, M., TARANTINO, O., RENAI, F., MESSORI, A., AMAROSI, A., PACINI, F. und A. MORETTINI (1996):

A population-based study of inflammatory bowel-disease in Florence over 15 years (1978-92).

Scand. J. Gastroenterol. 31: 892-899

TWORT, F. W. und G. L. Y. INGRAM (1912):

Mycobacterium enteritis chronicae pseudotuberculosis bovis johne and some experiments on the preparation of a diagnostik vaccine for pseudo-tuberculous enteritis of bovine.

Proc. Royal Soc. 84: 517-543

TZEN, C.-Y., WU, T.-Y. und C.-Y. TZEN (2006):

Detection of *Mycobacteria* in Crohn's disease by a broad spectrum Polymerase chain reaction.

J. FORMOS. Med. Assoc. 105: 290-298

VAN GOSSUM, A., ADLER, M., DE REUCK, M., DEVIS, G.,
VANHEURVERZWIJN, R. und R. WLLOX (1996):

Epidemiology of inflammatory bowel disease in Brussels' area.

Acta. Gastroenterol. Belg. 59:7-9

VAN KRUININGEN, H. J., CHIODINI, W. R., THAYER, J. A., COUTU, R. S.,
MERKAL, R. und P. L. RUNNELS (1986):

Experimental disease in infant goats induced by a *Mycobacterium* isolated from a patient with Crohn's disease. A preliminary report.

Digest. Dis. Sci. 31: 1351

VAN MAANEN, C., KOENE, M., OOSTERHUIS, V., VON BANNISEHT, T.,
ALLEN, S. und N. M. SULLIVAN (2005):

Diagnostic performance of a liquid culture method, the TRK ESP Culture System II and para-JEM Broth, for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fecal samples.

8th Int. Colloq. on Paratub. 14.-18. August 2005, Kopenhagen, Dänemark, Proceed. S. 90

VAN SCHAİK, G., ROSSITER, C. R., STEHMANN, S. M., SHIN, S. J. und Y. H. SCHUKKEN (2003):

Longitudinal study to investigate variation in results of repeated ELISA and culture of fecal samples for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in commercial dairy herds.

Am. J. Vet. Res. 64: 479-84.

VANSNICK; E., DE RIJK, P., VERCAMMEN, F., GEYSEN, D., RIGOUTS, L und F. PORTAELS (2004):

Newly developed primers for the detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*.

Vet. Microbiol. 100: 197-204

VARY, P. H., ANDERSEN, P. R., GREEN, E., HERMON-TAYLOR, J. und J. J., MCFADDEN (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

VOGEL, M., GETHMANN, J. und G. LUYVEN (2005):

Paratuberkulose bei Wanderschafherden.

Ministerium für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
des Landes Nordrhein-Westfalen, Landesamt für Ernährungswirtschaft und
Jagd, NRW, Düsseldorf

VON HERBAY, A. (1996):

Pathologie der idiopathischen chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. In:

ADLER, G.: Morbus Crohn-Colitis ulcerosa.

Springer, 2. Auflage: 163-186 (IV)

VON HERBAY, A. (1999):

Histopathologische Diagnostik chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen.

Historischer Rückblick und aktuelle Übersicht.

Pathologie 20: 276-287

VON TIRPITZ, C., REINSHAGEN, M. und G. ADLER in: CLASSEN, M.,

DIEHL, V. und K. KOCHSIEK (2004):

Innere Medizin.

Urban & Fischer Verlag, München-Jena, 5. Auflage: 1214-1223

WAKEFIELD, A. J., EKBOM, A., DHILLON; A. P., PITTILO, M. und R. E.

POUNDER (1995):

Crohn's Disease: Pathogenesis and persistent measles virus infection.

Gastroenterol. 108: 911-916

WALKER-SMITH, J. A. (2000):

Chronic inflammatory bowel disease in children: a complex problem in management.

Postgrad. Med. J. 76: 469-72

WALL, S., KUNZE, Z. M., SABOOR, S., SOUFLERI, I., SEECHURN, P., CHIODINI, R. und J. J. McFADDEN (1993):

Identification of spheroplast-like agents isolated from tissues of patients with Crohn's disease and control tissues by polymerase chain reaction.

J. Clin. Microbiol. 31: 1241-1245

WALMSLEY, R. S., IBBOTSON, J. P., CHAHAL, H. und R. N. ALLAN (1996):

Antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in Crohn's disease.

Q. J. M. 89: 217-221

WEINSTOCK, J. V., SUMMEERS, R. W., ELLIOTT, D. E., KHURRAM, Q., URBAN, J. F. und R. THOMPSON (2002):

The possible link between de-worming and the emergence of immunological disease.

J. Lab. Clin. Med. 139: 334-338

WHAN, L. B., GRANT, I. R., BALL, H. J., SCOTT, R. und M. T. ROWE (2001):
Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium paratuberculosis* in drinking
water.

Lett. Appl. Microbiol. 33: 227-231

WHAN, L. B., BALL, H. J., GRANT, I. R. und M. T. ROWE (2005):
Occurrence of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in untreated water in
Northern Ireland.

Lett. Appl. Microbiol. 71: 7107-7112

WHIPPLE, D. L., CALLIHAN, D. R. und J. L. JARNAGIN (1991):
Cultivation of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* from bovine fecal
specimens and suggested standardised procedure.

J. Vet. Diagn. Invest. 3: 368-373

WHITLOCK, R. H., HUTCHINSON, L. T., GLICKMANN, L. T., MEINERSMANN,
R., ROSSITER, C., BRUCE, J., MERKAL, R. und J. DICK (1986):
Paratuberculosis (Johne's disease) update.

Bovine Pract. 21: 24-30

R. WHITLOCK, A. ROSENBERGER, R. SWEENEY und P. SPENCER (1996):
Distribution of *M. paratuberculosis* in tissue of cattle from herds infected with
Johne's disease.

5th Int. Colloq. on Paratub., 29. Sept- 24. Oct 1996, Madison, Wisconsin

WHITTINGTON, R. J., MARSHALL, I., TURNER, M. J., MCALLISTER, S., CHOY, E., EAMENS, G. J., MARSHALL, D. J. und S. OTTAWAY (1998):

Rapid detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in clinical samples from ruminants and in spiked environmental samples by modified BACTEC 12B radiometric culture and direct confirmation by PCR.

J. Clin. Microbiol. 36: 701-707

WHITTINGTON, R. J., REDDACLIFF, L. A., MARSH, I. und V. SAUNDERS (1999):

Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded intestinal tissue by *IS900* polymerase chain reaction.

Aus. Vet. J. 77: 392-397

WHITTINGTON, R. J., MARSH, I., MCALLISTER, TURNER, M. J., MARSHALL, D. J. und C. A. FRASER (1999):

Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep.

J. Clin. Microbiol. 37: 1077-1083

WHITTINGTON, R. J., LLOYD, J. B. und L. A. REDDACLIFF (2001):

Recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from nematode larvae cultured from the faeces of sheep with Johne's disease.

Vet. Microbiol. 81: 273-279

WHITTINGTON, R. J., TARAGAL, C. A., OTTAWAY, S., MARSH, I. , SEAMAN, J. und V. FRIDRIKSDOTTIR (2001a):

Molecular epidemiological confirmation and circumstances of occurrence of sheep (S) strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cases of paratuberculosis in cattle in Australia and sheep and cattle in Iceland.

Vet. Microbiol. 79: 311-322

WHITTINGTON, R. J., MARSHALL, D. J., NICHOLLS, P. J., MARSH, I. B. und L. A. REDDACLIFF (2004):

Survival and dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the environment.

Appl. Environ. Microbiol. 70: 2989-3004

WHITTINGTON, R. J., MARSH, I. B. und L. A. REDDACLIFF (2005):

Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dam water and sediment.

Appl. Environ. Microbiol. 71: 5304-5308

WISZNIEWSKA, A., SZTEYEN, J., FUS, M. M. und A. A. RUSZCZYNSKA (2005):

Comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* growth on three microbiological media.

8th Int. Colloq. on Paratub. 14.-18. August 2005, Kopenhagen, Dänemark

WITTKOWER, E. (1938):

Ulcerative colitis: personality studies.

BMJ. 2: 1356-1360

WITTWER, C. T., HERRMANN, M. G., GUNDRY, C. N. und K. S. J.

ELENITOBA-JOHNSON (2001):

Real-Time multiplex PCR assays.

Methods 25: 430-442

YAJKO, D. M., NASSOS, P. S., SANDERS, C. A., GONZALEZ, P. C.,

REINGOLD, A. L., HORSBURGH, C. R., HOPEWELL, P. C., CHIN, D. P. und

K. HADLEY (1993):

Comparison of four decontamination methods for recovery of *Mycobacterium avium* Complex from stools.

J. Clin. Microbiol. 31: 302-306

YEBOAH-MANU, D., BODMER, T., MENSAH-QUAINOO, E., OWUSU, S.,

OFORI-ADJEI, D. und G. PLUSCKE (2004):

Evaluation of decontamination methods and growth media for primary isolation of *Mycobacterium ulcerans* from surgical specimens.

J. Clin. Microbiol. 42: 5875-5876

10 ANHANG

10.1 Puffer und Lösungen

10.1.1 Puffer und Lösungen für die Dekontamination

N-acetyl-L-Cystein/NaOH-Lösung

sterile, wässrige 2,9 %ige Lösung

von Na ₃ -Citrat x 2H ₂ O	50 ml
sterile NaOH 4 %ige Lösung	50 ml
N-acetyl-L-Cystein	500 mg

Natriumcitratlösung und NaOH mischen und N-Acetyl-L-Cystein dazugeben.

Diese Gebrauchslösung ist instabil; sie ist täglich frisch anzusetzen.

Phosphatpufferlösung

Phosphatpuffer pH=6,8 (nach Sörensen) $1/15$ molar

(4,84 g KH₂PO₄ + 5,53 g Na₂HPO₄ x 2H₂O, mit sterilem destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen)

10.1.2 Puffer und Lösungen für die PCR

dNTP-Mix (each 10 mM)

10 µl Desoxy-ATP, Natriumsalzlösung PCR Grade

(100 mM, Fa. Merck, 1 934 511)

10 µl Desoxy-CTP, Natriumsalzlösung PCR Grade

(100 mM, Fa. Merck, 1 934 520)

10 µl Desoxy-GTP, Natriumsalzlösung PCR Grade

(100 mM, Fa. Merck, 1 934 538)

10 µl Desoxy-TTP, Natriumsalzlösung PCR Grade

(100 mM, Fa. Merck, 1 934 549)

60 µl Aqua dest.

TBE-Puffer

10 x TBE-Puffer (Stammlösung):

0,5 M Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Fa. Roth, 5429.3)

0,5 M Borat (Fa. Merck, 1.00165.1000)

0,01 M EDTA (TitriplexII) (Fa. Merck, 1.08417)

Die Einwaage wird zunächst in Aqua dest. gelöst, auf 1 l aufgefüllt und anschließend autoklaviert.

1 x TBE-Puffer:

10 x TBE-Stammlösung wird im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest. aufgefüllt.

Gel-Loading Buffer

15 %ige Ficoll-Lösung:

1,5 g Ficoll (Fa. Sigma, Type 70, F-2878)

10 ml Aqua dest.

5 %ige Bromphenolblau-Lösung:

50 mg Bromphenolblau (Fa. Merck, 8122)

1 ml Aqua dest.

Stamm-Lösung (Gel-Loading-Buffer):

10 ml 15 %ige Ficoll-Lösung

0,25 ml 5 %ige Bromphenolblau-Lösung

Gebrauchslösung:

Mischung von 6,25 µl Stamm-Lösung und 25,0 µl Amplifikat (Verhältnis 1:5)

Tris-HCL-Stammlösung:

100 mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan Ultra Qualität (Fa. Roth,
5429.3)

Das Reagenz wird in Aqua dest. gelöst und der pH-Wert auf 8,0 eingestellt.

EDTA Titriplex III Stammlösung:

50 mM EDTA Titriplex III (Fa. Merck, 1.12029.1000)

Das Reagenz in Aqua dest. lösen, steril filtrieren und autoklavieren.

Ethidiumbromid-Färbegrad

Ethidiumbromid-Stammlösung:

0,1 g Ethidiumbromid (Fa. Merck, 1.11608.0030)

10 ml Aqua dest.

Ethidiumbromid-Färbebad:

50 µl Ethidiumbromid-Stammlösung

1,5 l Aqua dest.

Lysispuffer:

10 ml Tris-HCL Stammlösung (100 mM, pH 8,0)

2 ml EDTA Titriplex III Stammlösung (50 mM)

0,6 g Triton X-100 (Fa. Roth, 30512)

mit Aqua dest. auf 50 ml auffüllen, steril filtrieren und autoklavieren.

Die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur.

Das Lysozym (Fa. Merck, 1.05281.0001, 100 000 U/mg) wird erst unmittelbar vor Gebrauch des Puffers zugegeben (20mg/ml). Dabei wird zu der benötigten Menge an Lysispuffer die entsprechende Menge des Enzyms eingewogen.

10.1.3 Lösungen für die Dekontaminationsvalidierung

10.1.3.1 Referenzsuspension

Bariumsulfat, McFarland-Standard 1,0:

9,9 ml Schwefelsäure mit Volumenanteil von 1 % mit 0,1 ml Bariumchloridlösung mit einem Massenanteil von 1 % mischen.

Diese Suspension muss vor jedem Vergleich mit der Bakteriensuspension aufgeschüttelt werden.

10.2 Nährmedien

10.2.1 Löwenstein-Jensen-Festmedium

0,6 l	Aqua dest.	
37,3 g	Medienbasis	
12 ml	Glyzerin	
20	Eier	
4 mg	Mycobactin J	} 50 ml Aqua dest.
180,6 mg	Penicillin	
300 µg	Chloramphenicol E	
1 g	Cycloheximide	
6 g	Brenztraubensäure	

Ergibt einen Liter Nährmedium.

10.2.2 Middlebrook 7H10-Agar

19 g Middlebrook 7H10-Basis

895 ml Aqua dest.

5 ml Glyzerin

21 ml BBL MGIT PANTA

100 ml BBL OADC

2 mg Mycobactin J

Ergibt je nach Dicke des gegossenen Agars ca. 45 Platten.

Fortsetzung Anhangstabelle 1: Zusammengefasste Ergebnisse kultureller und molekularbiologischer Untersuchungen humaner Darmbiopate

Proband	Gruppe (Erkrankung)	Geschlecht Alter	Datum Koloskopie & Anzucht	Darmabschnitte	MGIT- Ansätze	Fluoreszenz MGIT	PCR _{1,2}	Kolonie- wachstum auf HEYM	ZN _{1,2}	PCR _F	ZN _F	ZN _K	PCR _K	Isolat			
3	CU	weiblich 63 Jahre	17.05.2005	Terminales Ileum	A	-	+	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø				
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø				
				Caecum	A	-	+	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø			
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø			
				Colon transversum	A	-	-	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø		
					B	-	-	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø		
				Colon sigmoideum	A	-	-	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	-	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
4	MC	weiblich 76 Jahre	23.05.2005	Terminales Ileum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø				
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø			
				Caecum	A	-	-	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø		
					B	-	-	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø		
				Colon transversum	A	-	-	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	-	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
				Colon sigmoideum	A	-	-	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	-	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	

Fortsetzung Anhangstabelle 1: Zusammengefasste Ergebnisse kultureller und molekularbiologischer Untersuchungen humaner Darmbiopate

Proband	Gruppe (Erkrankung)	Geschlecht Alter	Datum Koloskopie & Anzucht	Darmabschnitte	MGIT- Ansätze	Fluoreszenz MGIT	PCR _{1,2}	Kolonie- wachstum auf HEYM	ZN _{1,2}	PCR _F	ZN _F	ZN _k	PCR _k	Isolat			
5	CU	männlich 40 Jahre	24.05.2005	Terminales Ileum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø			
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
				Caecum	A	-	-	Ø	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	-	Ø	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
				Colon transversum	A	-	-	Ø	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	-	Ø	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
				Colon sigmoideum	A	-	-	Ø	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	-	Ø	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
6	MC	weiblich 24 Jahre	10.06.2005	Terminales Ileum	A	17. Woche	-	+	-	-	-	-	-	Ø			
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
				Caecum	A	17. Woche	-	+	-	-	-	-	-	-	-	Ø	
					B	21. Woche	-	+	-	-	-	-	-	-	-	Ø	
				Colon transversum	A	17. Woche	-	+	-	-	-	-	-	-	-	Ø	
					B	-	-	Ø	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
				Colon sigmoideum	A	22. Woche	-	+	-	-	-	-	-	-	-	Ø	
					B	-	-	Ø	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	

Fortsetzung Anhangstabelle 1: Zusammengefasste Ergebnisse kultureller und molekularbiologischer Untersuchungen humaner Darmbiopate

Proband	Gruppe (Erkrankung)	Geschlecht Alter	Datum Koloskopie & Anzucht	Darmabschnitte	MGIT- Ansätze	Fluoreszenz MGIT	PCR ₁₂	Kolonie- wachstum auf HEYM	ZN ₁₂	PCR _F	ZN _F	ZN _k	PCR _k	Isolat				
7	nCED (chronische Pancreatitis)	männlich 50 Jahre	15.06.2005	Terminales Ileum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø				
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø			
				Caecum	A	-	-	Ø	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	-	Ø	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
				Colon transversum	A	-	+	-	-	+	9. Woche	+	Ø	Ø	Ø	+	+	MAP
					B	-	-	-	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
				Colon sigmoideum	A	-	+	-	-	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	-	-	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
8	MC	männlich 46 Jahre	22.06.2005	Terminales Ileum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø				
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø			
				Caecum	A	-	-	Ø	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
					B	-	-	Ø	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
				Colon transversum	A	-	-	-	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	-	-	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
				Colon sigmoideum	A	-	-	-	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	-	-	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	

Fortsetzung Anhangstabelle 1: Zusammengefasste Ergebnisse kultureller und molekularbiologischer Untersuchungen humaner Darmbiopate

Proband	Gruppe (Erkrankung)	Geschlecht Alter	Datum Koloskopie & Anzucht	Darmabschnitte	MGIT- Ansätze	Fluoreszenz MGIT	PCR ₁₂	Kolonie- wachstum auf HEYM	ZN ₁₂	PCR _F	ZN _F	ZN _k	PCR _k	Isolat			
9	MC	weiblich 60 Jahre	27.06.2005	Terminales Ileum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø				
					B	-	+	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø			
				Caecum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
				Colon transversum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	
				Colon sigmoideum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	
10	CU	männlich 27 Jahre	03.01.2005/ 27.06.2005	Terminales Ileum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø			
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
				Caecum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	
				Colon transversum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	
				Colon sigmoideum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	

Fortsetzung Anhangstabelle 1: Zusammengefasste Ergebnisse kultureller und molekularbiologischer Untersuchungen humaner Darmbiopate

Proband	Gruppe (Erkrankung)	Geschlecht Alter	Datum Koloskopie & Anzucht	Darmabschnitte	MGIT- Ansätze	Fluoreszenz MGIT	PCR ₁₂	Kolonie- wachstum auf HEYM	ZN ₁₂	PCR _F	ZN _F	ZN _k	PCR _k	Isolat			
11	CU	männlich 57 Jahre	25.01.2005/ 27.06.2005	Terminales Ileum	A	-	+	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø				
					B	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø					
				Caecum	A	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø						
					B	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø						
				Colon transversum	A	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø						
					B	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø						
				Colon sigmoideum	A	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø						
					B	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø						
12	nCED (Aneurysma im Analbereich)	männlich 26 Jahre	28.06.2005	Terminales Ileum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø				
					B	-	+	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø				
				Caecum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
				Colon transversum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	+	-	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	
				Colon sigmoideum	A	-	-	Ø	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	-	Ø	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	

Fortsetzung Anhangstabelle 1: Zusammengefasste Ergebnisse kultureller und molekularbiologischer Untersuchungen humaner Darmbiopate

Proband	Gruppe (Erkrankung)	Geschlecht Alter	Datum Koloskopie & Anzucht	Darmabschnitte	MGIT- Ansätze	Fluoreszenz MGIT	PCR ₁₂	Kolonie- wachstum auf HEYM	ZN ₁₂	PCR _F	ZN _F	ZN _k	PCR _k	Isolat			
13	nCED (Laktose- intoleranz)	weiblich 65 Jahre	29.06.2005	Terminales Ileum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø			
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø			
				Caecum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
				Colon transversum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
					B	-	+	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
				Colon sigmoideum	A	-	-	Ø	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
					B	-	+	-	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
14	MC	weiblich 35 Jahre	07.07.2005	Terminales Ileum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
				Caecum	A	-	-	Ø	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
					B	-	-	Ø	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
				Colon transversum	A	-	-	Ø	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
					B	-	-	Ø	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
				Colon sigmoideum	A	-	-	Ø	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
					B	-	-	Ø	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

Fortsetzung Anhangstabelle 1: Zusammengefasste Ergebnisse kultureller und molekularbiologischer Untersuchungen humaner Darmbiopate

Proband	Gruppe (Erkrankung)	Geschlecht Alter	Datum Koloskopie & Anzucht	Darmabschnitte	MGIT- Ansätze	Fluoreszenz MGIT	PCR ₁₂	Kolonie- wachstum auf HEYM	ZN ₁₂	PCR _F	ZN _F	ZN _k	PCR _k	Isolat			
15	nCED (Divertikulitis)	männlich 70 Jahre	11.07.2005	Terminales Ileum	A	-	+	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø			
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø			
				Caecum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
				Colon transversum	A	-	-	Ø	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
					B	-	+	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
				Colon sigmoideum	A	-	-	Ø	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
					B	-	-	Ø	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
16	MC	männlich 29 Jahre	12.07.2005	Terminales Ileum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø			
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
				Caecum	A	-	-	Ø	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	-	Ø	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
				Colon transversum	A	-	+	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
					B	-	-	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
				Colon sigmoideum	A	-	+	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
					B	-	-	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

Fortsetzung Anhangstabelle 1: Zusammengefasste Ergebnisse kultureller und molekularbiologischer Untersuchungen humaner Darmbiopate

Proband	Gruppe (Erkrankung)	Geschlecht Alter	Datum Koloskopie & Anzucht	Darmabschnitte	MGIT- Ansätze	Fluoreszenz MGIT	PCR ₁₂	Kolonie- wachstum auf HEYM	ZN ₁₂	PCR _F	ZN _F	ZN _k	PCR _k	Isolat			
17	nCED (Darmkrebs- vorsorge)	männlich 74 Jahre	14.07.2005	Terminales Ileum	A	-	+	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø				
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø					
				Caecum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
				Colon transversum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	
				Colon sigmoideum	A	-	+	-	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø
18	nCED (chronische Obstipation)	weiblich 63 Jahre	19.07.2005	Terminales Ileum	A	-	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø			
					B	-	+	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
				Caecum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
				Colon transversum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø
				Colon sigmoideum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø

Fortsetzung Anhangstabelle 1: Zusammengefasste Ergebnisse kultureller und molekularbiologischer Untersuchungen humaner Darmbiopate

Proband	Gruppe (Erkrankung)	Geschlecht Alter	Datum Koloskopie & Anzucht	Darmabschnitte	MGIT- Ansätze	Fluoreszenz MGIT	PCR ₁₂	Kolonie- wachstum auf HEYM	ZN ₁₂	PCR _F	ZN _F	ZN _k	PCR _k	Isolat			
19	nCED (Darmkrebs- vorsorge)	männlich 17 Jahre	19.07.2005	Terminales Ileum	A	-	+	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø				
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø					
				Caecum	A	-	+	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
					B	-	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
				Colon transversum	A	-	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
				Colon sigmoideum	A	-	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	+	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
20	CU	weiblich 20 Jahre	21.07.2005	Terminales Ileum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø			
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
				Caecum	A	-	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
				Colon transversum	A	-	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
				Colon sigmoideum	A	-	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	

Fortsetzung Anhangstabelle 1: Zusammengefasste Ergebnisse kultureller und molekularbiologischer Untersuchungen humaner Darmbiopate

Proband	Gruppe (Erkrankung)	Geschlecht Alter	Datum Koloskopie & Anzucht	Darmabschnitte	MGIT- Ansätze	Fluoreszenz MGIT	PCR ₁₂	Kolonie- wachstum auf HEYM	ZN ₁₂	PCR _F	ZN _F	ZN _k	PCR _k	Isolat			
21	nCED (Darmkrebs- vorsorge)	männlich 68 Jahre	27.07.2005	Terminales Ileum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø			
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø			
				Caecum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
				Colon transversum	A	-	+	-	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
				Colon sigmoideum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
22	nCED (Terminale Ileitis)	männlich 30 Jahre	29.07.2005	Terminales Ileum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø			
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
				Caecum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
				Colon transversum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
				Colon sigmoideum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

Fortsetzung Anhangstabelle 1: Zusammengefasste Ergebnisse kultureller und molekularbiologischer Untersuchungen humaner Darmbiopate

Proband	Gruppe (Erkrankung)	Geschlecht Alter	Datum Koloskopie & Anzucht	Darmabschnitte	MGIT- Ansätze	Fluoreszenz MGIT	PCR ₁₂	Kolonie- wachstum auf HEYM	ZN ₁₂	PCR _F	ZN _F	ZN _k	PCR _k	Isolat			
23	nCED (Schmerzen im Unterbauch)	weiblich 24 Jahre	29.07.2005	Terminales Ileum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø				
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø				
				Caecum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
				Colon transversum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	
				Colon sigmoideum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	
24	nCED (rezidivierende Diarrhoe)	weiblich 66 Jahre	22.08.2005	Terminales Ileum	A	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø			
					B	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
				Caecum	A	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	
				Colon transversum	A	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	7. Woche	Ø	10 Tage	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	MAA
				Colon sigmoideum	A	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	

Fortsetzung Anhangstabelle 1: Zusammengefasste Ergebnisse kultureller und molekularbiologischer Untersuchungen humaner Darmbiopate

Proband	Gruppe (Erkrankung)	Geschlecht Alter	Datum Koloskopie & Anzucht	Darmabschnitte	MGIT- Ansätze	Fluoreszenz MGIT	PCR ₁₂	Kolonie- wachstum auf HEYM	ZN ₁₂	PCR _F	ZN _F	ZN _k	PCR _k	Isolat			
27	MC	weiblich 30 Jahre	29.09.2005	Terminales Ileum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø				
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø				
				Colon transversum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
				Colon sigmoideum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	
28	MC	männlich 29 Jahre	04.10.2005	Terminales Ileum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø				
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø			
				Caecum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	
				Colon transversum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	
Colon sigmoideum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø					
	B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø					
29	MC	männlich 55 Jahre	11.10.2005	Colon sigmoideum	A	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø				
					B	-	-	Ø	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø			

Fortsetzung Anhangstabelle 1: Zusammengefasste Ergebnisse kultureller und molekularbiologischer Untersuchungen humaner Darmbiopate

Proband	Gruppe (Erkrankung)	Geschlecht Alter	Datum Koloskopie & Anzucht	Darmabschnitte	MGIT- Ansätze	Fluoreszenz MGIT	PCR ₁₂	Kolonie- wachstum auf HEYM	ZN ₁₂	PCR _F	ZN _F	ZN _k	PCR _k	Isolat			
30	CU	männlich 29 Jahre	11.11.2005	Colon transversum	A	10. Woche	Ø	7 Tage	Ø	-	+	+	-	MAA			
					B	6. Woche	Ø	6 Tage	Ø	-	+	+	-	MAA			
				Colon sigmoideum	A	6. Woche	Ø	6 Tage	Ø	-	+	+	-	+	-	MAA	
					B	6. Woche	Ø	6 Tage	Ø	-	+	+	-	+	-	MAA	
31	CU	männlich 25 Jahre	06.12.2005	Terminales Ileum	A	4. Woche	Ø	6 Tage	Ø	-	+	+	-	MAA			
					B	3. Woche	Ø	6 Tage	Ø	-	+	+	-	MAA			
				Caecum	A	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
					B	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
				Colon transversum	A	4. Woche	Ø	6 Tage	Ø	-	+	+	-	+	+	-	MAA
					B	6. Woche	Ø	6 Tage	Ø	-	+	+	-	+	+	-	MAA
				Colon sigmoideum	A	2. Woche	Ø	6 Tage	Ø	-	+	+	-	+	+	-	MAA
					B	6. Woche	Ø	6 Tage	Ø	-	+	+	-	+	+	-	MAA

Fortsetzung Anhangstabelle 1: Zusammengefasste Ergebnisse kultureller und molekularbiologischer Untersuchungen humaner Darmbiopate

Proband	Gruppe (Erkrankung)	Geschlecht Alter	Datum Koloskopie & Anzucht	Darmabschnitte	MGIT- Ansätze	Fluoreszenz MGIT	PCR ₁₂	Kolonie- wachstum auf HEYM	ZN ₁₂	PCR _F	ZN _F	ZN _K	PCR _K	Isolat			
32	MC	männlich 52 Jahre	06.04.2006	Terminales Ileum	A	-	+	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø				
					B	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø				
				Caecum	A	-	+	-	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
					B	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		
				Colon transversum	A	-	+	-	-	-	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
				Colon sigmoideum	A	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
					B	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	

Legende:

MC: Morbus Crohn-Patient; **CU:** Colitis ulcerosa-Patient; **nCED:** nicht chronisch-entzündlich darmerkrankter Patient (Kontrollproband)

Erkrankung: Grunderkrankung bzw. Koloskopieindikation bei nCED

PCR: Ergebnis der nested PCR und Real Time-PCR (siehe auch Anhangstabelle 2)

PCR₁₂: DNA-Extraktion und PCR nach 12 Wochen Inkubation im Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT)

Fluoreszenz MGIT: Unter der UV-Lampe zeigt MGIT mikrobielles Wachstum durch orange Fluoreszenz an

ZN₁₂: Ziehl-Neelsen-Färbung eines Aliquots nach 12 Wochen Inkubation im MGIT

PCR_F: DNA-Extraktion und PCR nach Fluoreszenz im MGIT

ZN_F: Ziehl-Neelsen-Färbung nach Fluoreszenz im MGIT

ZN_K: Ziehl-Neelsen-Färbung von Koloniematerial

PCR_K: DNA-Extraktion und PCR von Koloniematerial im MGIT;

MAP: *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*; **MAA:** *Mycobacterium avium* ssp. *avium*

Ø: nicht durchgeführt; -: negatives Ergebnis; +: positives Ergebnis

Anhangstabelle 2: Molekularbiologische Ergebnisse positiver Darmbioptate

Proband	MGIT-Ansätze	Gruppe	PCR _{1/2}				PCR _F	PCR _K	PCR _{Final}				PCR-Endergebnis	
			Konventionelle nested PCR		Real Time-PCR				Konventionelle nested PCR	Real Time-PCR	Konventionelle nested PCR	Real Time-PCR		
			TJ 1/2	TJ 3/4	F57	/SMav2								TJ 1/2
1														
Terminales Ileum	A	nCED	-	+	+	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+
Terminales Ileum	B		-	-	+	(+)	Ø	Ø	-	-	-	-	-	+
Caecum	A		-	+	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+
Caecum	B		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
Colon transversum	A		-	+	+	(+)	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+
Colon transversum	B		-	+	-	+	Ø	Ø	-	-	-	-	-	+
Colon sigmoideum	A		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
Colon sigmoideum	B		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
2														
Terminales Ileum	A	MC	-	+	(+)	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+
Terminales Ileum	B		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
Caecum	A		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-

Fortsetzung Anhangstabelle 2: Molekularbiologische Ergebnisse positiver Darmbioptate

Proband	MGIT-Ansätze	Gruppe	PCR ^{1/2}				PCR _F	PCR _K	PCR _{Final}			PCR-Endergebnis	
			Konventionelle nested PCR		Real Time-PCR				Konventionelle nested PCR		Real Time-PCR		
			TJ 1/2	TJ 3/4	F57	/SMav2			TJ 1/2	TJ 3/4	F57		/SMav2
2													
Caecum	B		-	+	-	-	Ø	-	-	-	-	-	+
Colon transversum	A		-	-	-	-	Ø	-	-	-	-	-	-
Colon transversum	B	MC	-	-	-	-	Ø	-	-	-	-	-	-
Colon sigmoideum	A		-	-	-	-	Ø	-	-	-	-	-	-
Colon sigmoideum	B		-	-	+	-	Ø	-	-	-	-	-	+
3													
Terminales Ileum	A		-	+	-	-	Ø	-	-	-	-	-	+
Terminales Ileum	B	CU	-	-	-	-	Ø	-	-	-	-	-	-
Caecum	A		-	+	-	-	Ø	-	-	-	-	+	+
Caecum	B		-	-	-	-	Ø	-	-	-	-	-	+

Fortsetzung Anhangstabelle 2: Molekularbiologische Ergebnisse positiver Darmbioptate

Proband	MGIT-Ansätze	Gruppe	PCR ₁₂				PCR _F	PCR _K	PCR _{Final}				PCR-Endergebnis	
			Konventionelle nested PCR		Real Time-PCR				Konventionelle nested PCR		Real Time-PCR			
			TJ 1/2	TJ 3/4	F57	/SMav2			TJ 1/2	TJ 3/4	F57	/SMav2		
3														
<i>Colon transversum</i>	A	CU	-	-	-	-	Ø	-	-	-	-	-	-	-
<i>Colon transversum</i>	B		-	-	-	-	Ø	-	-	-	-	-	-	-
<i>Colon sigmoideum</i>	A		-	-	-	-	Ø	-	-	-	-	-	-	-
<i>Colon sigmoideum</i>	B		-	-	-	-	Ø	-	-	-	-	-	-	-
7														
<i>Terminales Ileum</i>	A	nCED	-	-	-	-	Ø	-	-	-	-	-	-	-
<i>Terminales Ileum</i>	B		-	-	-	-	Ø	-	-	-	-	-	-	-
<i>Caecum</i>	A		-	-	-	-	Ø	-	-	-	-	-	-	-
<i>Caecum</i>	B		-	-	-	-	Ø	-	-	-	-	-	-	-
<i>Colon transversum</i>	A		+	+	+	+	Ø	+	+	+	+	+	+	+
<i>Colon transversum</i>	B		-	-	-	-	Ø	+	+	+	+	+	+	+
<i>Colon sigmoideum</i>	A		-	+	+	+	Ø	+	+	+	+	+	+	+
<i>Colon sigmoideum</i>	B		-	-	-	-	Ø	-	-	-	-	-	-	-

Fortsetzung Anhangstabelle 2: Molekularbiologische Ergebnisse positiver Darmbioptate

Proband	MGIT-Ansätze	Gruppe	PCR ₁₂				PCR _F Konventionelle nested PCR & Real Time-PCR	PCR _K Konventionelle nested PCR & Real Time-PCR	PCR _{Final}				PCR-Endergebnis	
			Konventionelle nested PCR		Real Time-PCR				Konventionelle nested PCR		Real Time-PCR			
			TJ 1/2	TJ 3/4	F57	/SMav2			TJ 1/2	TJ 3/4	F57	/SMav2		
9														
<i>Terminales Ileum</i>	A	MC	-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Terminales Ileum</i>	B		-	-	+	+	Ø	Ø	-	-	-	+	+	+
<i>Caecum</i>	A		-	-	(+)	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Caecum</i>	B		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	+	+	+
<i>Colon transversum</i>	A		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Colon transversum</i>	B		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Colon sigmoideum</i>	A		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Colon sigmoideum</i>	B		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
10														
<i>Terminales Ileum</i>	A	CU	-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Terminales Ileum</i>	B		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Caecum</i>	A		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Caecum</i>	B		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-

Fortsetzung Anhangstabelle 2: Molekularbiologische Ergebnisse positiver Darmbioptate

Proband	MGIT-Ansätze	Gruppe	PCR ₁₂				PCR _F	PCR _K	PCR _{Final}				PCR-Endergebnis	
			Konventionelle nested PCR		Real Time-PCR				Konventionelle nested PCR		Real Time-PCR			
			TJ 1/2	TJ 3/4	F57	/SMav2			TJ 1/2	TJ 3/4	F57	/SMav2		
			Ø						Ø					Ø
10														
<i>Colon transversum</i>	A	CU	-	-	(+)	-	Ø	Ø	Ø	-	-	-	-	-
<i>Colon transversum</i>	B		-	-	(+)	-	Ø	Ø	Ø	-	-	-	-	-
<i>Colon sigmoideum</i>	A		-	-	-	-	Ø	Ø	Ø	-	-	-	-	-
<i>Colon sigmoideum</i>	B		-	-	-	-	Ø	Ø	Ø	-	-	-	-	-
11														
<i>Terminales Ileum</i>	A	CU	-	-	+	-	Ø	Ø	Ø	-	-	-	-	+
<i>Terminales Ileum</i>	B		-	-	-	-	Ø	Ø	Ø	-	-	-	-	-
<i>Caecum</i>	A		-	-	-	-	Ø	Ø	Ø	-	-	-	-	-
<i>Caecum</i>	B		-	-	-	-	Ø	Ø	Ø	-	-	-	-	-
<i>Colon transversum</i>	A		-	-	-	-	Ø	Ø	Ø	-	-	-	-	-
<i>Colon transversum</i>	B		-	-	-	-	Ø	Ø	Ø	-	-	-	-	-
<i>Colon sigmoideum</i>	A		-	-	-	-	Ø	Ø	Ø	-	-	-	-	-
<i>Colon sigmoideum</i>	B		-	-	-	-	Ø	Ø	Ø	-	-	-	-	-

Fortsetzung Anhangstabelle 2: Molekularbiologische Ergebnisse positiver Darmbioptate

Proband	MGIT-Ansätze	Gruppe	PCR ₁₂				PCR _F	PCR _K	PCR _{Final}				PCR-Endergebnis
			Konventionelle nested PCR		Real Time-PCR				Konventionelle nested PCR	Real Time-PCR	F57	/SMav2	
			TJ 1/2	TJ 3/4	F57	/SMav2							
13													
<i>Colon transversum</i>	A	nCED	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Colon transversum</i>	B		-	-	+	Ø	Ø	-	-	-	-	-	+
<i>Colon sigmoideum</i>	A		-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Colon sigmoideum</i>	B		-	-	+	Ø	Ø	-	-	-	-	-	+

15														
<i>Terminales Ileum</i>	A	nCED	-	+	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	+	
<i>Terminales Ileum</i>	B		-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-	
<i>Caecum</i>	A		-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-	
<i>Caecum</i>	B		-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-	
<i>Colon transversum</i>	A		-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-	
<i>Colon transversum</i>	B		+	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+
<i>Colon sigmoideum</i>	A		-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-	
<i>Colon sigmoideum</i>	B		-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-	

Fortsetzung Anhangstabelle 2: Molekularbiologische Ergebnisse positiver Darmbioptate

Proband	MGIT-Ansätze	Gruppe	PCR ₁₂				PCR _F	PCR _K	PCR _{Final}				PCR-Endergebnis
			Konventionelle nested PCR		Real Time-PCR				Konventionelle nested PCR	Real Time-PCR	F57	ISMav2	
			TJ 1/2	TJ 3/4	F57	ISMav2							
16													
<i>Terminales Ileum</i>	A	MC	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Terminales Ileum</i>	B		-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Caecum</i>	A		-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Caecum</i>	B		-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Colon transversum</i>	A		-	-	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+
<i>Colon transversum</i>	B		-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Colon sigmoideum</i>	A		-	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+
<i>Colon sigmoideum</i>	B		-	-	+	Ø	Ø	Ø	-	-	-	-	-
17													
<i>Terminales Ileum</i>	A	nCED	-	-	+	Ø	Ø	-	-	-	-	-	+
<i>Terminales Ileum</i>	B		-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Caecum</i>	A		-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Caecum</i>	B		-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-

Fortsetzung Anhangstabelle 2: Molekularbiologische Ergebnisse positiver Darmbioptate

Proband	MGIT-Ansätze	Gruppe	PCR ₁₂				PCR _F	PCR _K	PCR _{Final}				PCR-Endergebnis	
			Konventionelle nested PCR		Real Time-PCR				Konventionelle nested PCR		Real Time-PCR			
			TJ 1/2	TJ 3/4	F57	/SMav2			TJ 1/2	TJ 3/4	F57	/SMav2		
17														
<i>Colon transversum</i>	A	nCED	-	-	-	(+)	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Colon transversum</i>	B		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Colon sigmoideum</i>	A		-	+	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+
<i>Colon sigmoideum</i>	B		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-

18														
<i>Terminales Ileum</i>	A	nCED	-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Terminales Ileum</i>	B		-	+	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+
<i>Caecum</i>	A		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Caecum</i>	B		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Colon transversum</i>	A		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Colon transversum</i>	B		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Colon sigmoideum</i>	A		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Colon sigmoideum</i>	B		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-

Fortsetzung Anhangstabelle 2: Molekularbiologische Ergebnisse positiver Darmbioptate

Proband	MGIT-Ansätze	Gruppe	PCR ₁₂				PCR _F	PCR _K	PCR _{Final}				PCR-Endergebnis	
			Konventionelle nested PCR		Real Time-PCR				Konventionelle nested PCR		Real Time-PCR			
			TJ 1/2	TJ 3/4	F57	/SMav2			TJ 1/2	TJ 3/4	F57	/SMav2		
19														
<i>Terminales Ileum</i>	A	nCED	-	+	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+
<i>Terminales Ileum</i>	B		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Caecum</i>	A		-	+	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	+
<i>Caecum</i>	B		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Colon transversum</i>	A		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Colon transversum</i>	B		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Colon sigmoideum</i>	A		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Colon sigmoideum</i>	B		-	-	+	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	+
21														
<i>Terminales Ileum</i>	A	nCED	-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Terminales Ileum</i>	B		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Caecum</i>	A		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Caecum</i>	B		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-

Fortsetzung Anhangstabelle 2: Molekularbiologische Ergebnisse positiver Darmbioptate

Proband	MGIT-Ansätze	Gruppe	PCR ₁₂				PCR _F Konventionelle nested PCR & Real Time-PCR	PCR _K Konventionelle nested PCR & Real Time-PCR	PCR _{Final}				PCR-Endergebnis	
			Konventionelle nested PCR		Real Time-PCR				Konventionelle nested PCR		Real Time-PCR			
			TJ 1/2	TJ 3/4	F57	/SMav2			TJ 1/2	TJ 3/4	F57	/SMav2		
			-	+	-	-			-	-	-	-		
21														
<i>Colon transversum</i>	A	nCED	-	+	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	+
<i>Colon transversum</i>	B		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Colon sigmoideum</i>	A		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Colon sigmoideum</i>	B		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
32														
<i>Terminales Ileum</i>	A	MC	-	+	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+
<i>Terminales Ileum</i>	B		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Caecum</i>	A		-	+	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+
<i>Caecum</i>	B		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Colon transversum</i>	A		-	+	+	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+
<i>Colon transversum</i>	B		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Colon sigmoideum</i>	A		-	(+)	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-
<i>Colon sigmoideum</i>	B		-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-

Legende:

Untersuchungszeitpunkt: PCR₁₂: DNA-Extraktion und PCR nach 12 Wochen Inkubation im Flüssigmedium PCR_F: DNA-Extraktion und PCR nach Fluoreszenz des Flüssigmediums PCR_K: Untersuchung des Koloniematerials der Subkulturen auf Festmedium PCR_{Final}: DNA-Extraktion und PCR abschließend, nach 24 Monaten Inkubation im Flüssigmedium Mycobacteria Growth Indicator Tube, Poolansatz nCED: Kontrollproband

Probanden: MC: Morbus Crohn-Patient CU: Colitis ulcerosa-Patient

Ø: nicht durchgeführt; -: negatives Ergebnis; +: positives Ergebnis

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen, die zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen habe, meinen herzlichen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. M. Bülte bin ich für die Überlassung des Themas, für die vielen Stunden seiner Zeit, die er mir bei der Betreuung dieser Arbeit gewidmet hat und für die Möglichkeit zur wissenschaftlichen Weiterbildung am Institut sehr zu Dank verpflichtet.

Herrn Dr. Holger Schönenbrücher und Herrn Dr. Amir Abdulmawjood danke ich für die stetige und zuverlässige Unterstützung und Beratung.

Den technischen Mitarbeitern des Instituts, insbesondere Frau Claudia Walter und Frau Karin Simon, möchte ich für die praktische Hilfestellung und angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Für die Überlassung der Referenzstämme danke ich Frau Dr. I. Moser (Friedrich-Loeffler-Institut für Tiergesundheit, Jena), Herrn Dr. Dräger (Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz, Koblenz) und Herrn Dr. Tim Bull (Department of Cardiovascular Medicine [Crohn's Disease Group] London).

Bei meinen Freunden, insbesondere Katrin-Annette Göbel und Christina Löchelt, möchte ich mich von Herzen für die immerwährende moralische Unterstützung in der langen Zeit der Dissertationsanfertigung bedanken.

Dank meiner lieben Freundin und ehemaligen Kommilitonin Eva Corsten hat mich dieses Dissertationsthema persönlich sehr interessiert.

Andreas Emrich danke ich herzlich für die Geduld und liebevolle Unterstützung.

Mein größter Dank gilt jedoch meinen Eltern, deren innige Liebe, Förderung und Vertrauen mir die Anfertigung dieser Arbeit erst ermöglicht haben.

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.