

INHALTSVERZEICHNIS

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

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

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